

(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2009-512449

(P2009-512449A)

(43) 公表日 平成21年3月26日 (2009.3.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 127 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-536829 (P2008-536829)	(71) 出願人	507371168
(86) (22) 出願日	平成18年10月19日 (2006.10.19)		ユニバーシティ オブ フロリダ リサー
(85) 翻訳文提出日	平成20年5月29日 (2008.5.29)		チ ファンデーション インコーポレーテ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/041061		ッド
(87) 国際公開番号	W02007/047938		アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビ
(87) 国際公開日	平成19年4月26日 (2007.4.26)		ル グリントー ホール 2 2 3
(31) 優先権主張番号	60/728, 449	(71) 出願人	503245650
(32) 優先日	平成17年10月19日 (2005.10.19)		アメリカ合衆国
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ジョージア州 アトラン
(31) 優先権主張番号	60/754, 881		タ ビュフォード ハイウェー (ケー7
(32) 優先日	平成17年12月29日 (2005.12.29)		9) 4 7 7 0 テクノロジー トランス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ファー オフィス
(31) 優先権主張番号	60/759, 162		
(32) 優先日	平成18年1月14日 (2006.1.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌにおける呼吸器疾患管理のための材料および方法

(57) 【要約】

本発明は、イヌ科動物に感染して該イヌ科動物に呼吸器疾患を引き起こすことができる分離されたインフルエンザウイルスに関する。本発明は、本発明のインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するための組成物および方法にも関する。本発明は、本発明のウイルスを同定して本発明のウイルスの動物への感染を診断するための組成物および方法にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イヌ科動物に感染することができる、分離されたインフルエンザウイルス。

【請求項 2】

H3のHA血清型を持つ、請求項1記載のインフルエンザウイルス。

【請求項 3】

H3N8の血清型を持つ、請求項1記載のインフルエンザウイルス。

【請求項 4】

配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列またはそれらの機能性および/もしくは免疫原性断片を持つポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、または

10

該ポリヌクレオチドが、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列と99%もしくはそれよりも高い配列同一性を持つポリペプチドをコードする、
請求項1記載のインフルエンザウイルス。

【請求項 5】

配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかに示されるヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドを含む、または 該ポリヌクレオチドが配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかに示されるヌクレオチド配列と98%もしくはそれよりも高い配列同一性を持つ、
請求項1記載のインフルエンザウイルス。

20

【請求項 6】

A/イヌ/フロリダ/43/2004と命名されるウイルス分離物またはA/イヌ/フロリダ/242/2003と命名されるウイルス分離物である、請求項1記載のインフルエンザウイルス。

【請求項 7】

イヌ/Jax/05と命名されるウイルス分離物またはイヌ/マイアミ/05と命名されるウイルス分離物である、請求項1記載のインフルエンザウイルス。

30

【請求項 8】

不活化または弱毒化された、請求項1記載のインフルエンザウイルス。

【請求項 9】

薬学的に許容される担体または希釈剤中で提供される、請求項1記載のインフルエンザウイルス。

【請求項 10】

請求項1記載のインフルエンザウイルスのゲノムセグメントまたは遺伝子の全体または一部を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 11】

ノイラミニダーゼ遺伝子、核タンパク質遺伝子、マトリックスタンパク質遺伝子、ポリメラーゼ塩基性タンパク質遺伝子、ポリメラーゼ酸性タンパク質遺伝子、非構造タンパク質遺伝子およびヘマグルチニン遺伝子からなる群より選択されるインフルエンザ遺伝子の全てまたは一部を含む、請求項10記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 12】

インフルエンザウイルスが配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列またはその機能性および/もしくは免疫原性断片を持つポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、または

該ポリヌクレオチドが配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、

50

28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列と99%もしくはそれよりも高い配列同一性を持つポリペプチドをコードする、
請求項10記載のポリヌクレオチド。

【請求項13】

インフルエンザウイルスが配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかに示されるヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドを含む、または
該ポリヌクレオチドが配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかに示されるヌクレオチド配列と98%もしくはそれよりも高い配列同一性を持つ、
請求項10記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項14】

薬学的に許容される担体または希釈剤中で製剤化される、請求項10記載のポリヌクレオチド。

【請求項15】

請求項10記載のポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチド発現構築物。

【請求項16】

請求項10記載のポリヌクレオチドのコードまたは非コード配列にハイブリダイズすることができる、オリゴヌクレオチド。

20

【請求項17】

高ストリンジェントな条件下において配列にハイブリダイズする、請求項16記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項18】

10～500個のヌクレオチド、10～20個のヌクレオチド、21～30個のヌクレオチド、31～40個のヌクレオチド、41～50個のヌクレオチド、51～60個のヌクレオチド、61～70個のヌクレオチド、71～80個のヌクレオチド、81～90個のヌクレオチド、または91～100個のヌクレオチドの長さである、請求項16記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項19】

30

検出可能な標識またはレポーター分子を含む、請求項16記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項20】

請求項1記載のインフルエンザウイルスのゲノムセグメントまたは遺伝子の全てまたは一部を含むポリヌクレオチドと約90%から100%のヌクレオチド配列同一性を持つ、請求項16記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項21】

配列番号：35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、79、80、81、82、83、84、85、86、87または88のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む、請求項16記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項22】

40

請求項10記載のポリヌクレオチドによってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項23】

ヘマグルチニンタンパク質、ノイラミニダーゼタンパク質、核タンパク質、マトリックスタンパク質、ポリメラーゼ塩基性タンパク質、ポリメラーゼ酸性タンパク質および非構造タンパク質からなる群より選択される、請求項22記載のポリペプチド。

【請求項24】

配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片を含む、請求項22記載のポリペプチド。

50

【請求項 25】

薬学的に許容される担体または希釈剤中で製剤化される、請求項22記載のポリペプチド。

【請求項 26】

免疫原がイヌ科動物に感染することができるインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発することができる、請求項1記載のインフルエンザウイルスの免疫原を含む組成物。

【請求項 27】

免疫原が無細胞のウイルス全体もしくはその一部；ウイルスポリヌクレオチド；ウイルスタンパク質；ウイルスポリペプチドもしくはペプチド；ウイルス感染細胞；組換え型ウイルスベクターをベースとする構築物；リアソータントウイルス；または該ウイルスの裸の核酸を含む、請求項26記載の組成物。

【請求項 28】

ウイルスタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドが、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列またはその機能性および/もしくは免疫原性断片を含む、または

該ポリヌクレオチドが配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列と99%もしくはそれよりも高い配列同一性を持つポリペプチドをコードする、請求項27記載の組成物。

【請求項 29】

ウイルスポリヌクレオチドが、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片を含むポリペプチドをコードする、請求項27記載の組成物。

【請求項 30】

薬学的に許容される担体または希釈剤中で製剤化される、請求項26記載の組成物。

【請求項 31】

動物においてイヌ科動物に感染することができるインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するための方法であって、

請求項26記載の組成物の有効量を該動物に投与する工程を含む、方法。

【請求項 32】

組成物が配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片を含むウイルスタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含む、請求項31記載の方法。

【請求項 33】

組成物がイヌ科動物に感染することができるインフルエンザウイルスまたは該ウイルスの一部を含む、請求項31記載の方法。

【請求項 34】

インフルエンザウイルスが、A/イヌ/フロリダ/43/2004と命名されるウイルス分離物、A/イヌ/フロリダ/242/2003と命名されるウイルス分離物、イヌ/Jax/05と命名されるウイルス分離物、もしくはイヌ/マイアミ/05と命名されるウイルス分離物、または該ウイルス分離物のいずれかの一部からなる群より選択される、請求項33記載の方法。

【請求項 35】

免疫応答がインフルエンザウイルスによる動物の感染を予防または阻害する防御免疫応答である、請求項31記載の方法。

【請求項 36】

10

20

30

40

50

インフルエンザウイルスがH3より選択されるHA血清型を持つ、請求項31記載の方法。

【請求項 37】

インフルエンザウイルスがH3N8の血清型を持つ、請求項31記載の方法。

【請求項 38】

組成物がアジュバントをさらに含む、請求項31記載の方法。

【請求項 39】

動物がイヌ科である、請求項31記載の方法。

【請求項 40】

イヌ科動物が飼育慣らされたイヌである、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

組成物が経口的に投与される、請求項31記載の方法。

【請求項 42】

組成物が経皮的、腹腔内または筋肉内に投与される、請求項41記載の方法。

【請求項 43】

組成物が鼻腔内または経口的に投与される、請求項31記載の方法。

【請求項 44】

インフルエンザウイルスが不活化または弱毒化された、請求項33記載の方法。

【請求項 45】

請求項22記載のいずれかのポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項 46】

モノクローナル抗体である、請求項45記載の抗体。

【請求項 47】

ヘマグルチニンタンパク質に結合する、請求項45記載の抗体。

【請求項 48】

ヘマグルチニンタンパク質がH3ヘマグルチニンタンパク質である、請求項47記載の抗体。

【請求項 49】

ヘマグルチニンタンパク質が配列番号：16、配列番号：32、配列番号：62または配列番号：78に示されるアミノ酸配列を含む、請求項47記載の抗体。

【請求項 50】

以下を含む細胞：

a) イヌ科動物に感染することができるインフルエンザウイルス；または

b) 請求項1記載のインフルエンザウイルスのゲノムセグメントまたは遺伝子の全てまたは一部を含むポリヌクレオチド。

【請求項 51】

イヌ科動物の細胞である、請求項50記載の細胞。

【請求項 52】

イヌ科動物に感染することができるインフルエンザウイルスを検出するための方法であって、

動物から生物学的試料を得る工程、および請求項1記載のインフルエンザウイルスのタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに結合する抗体またはリガンドの存在に関して該試料をスクリーニングする工程を含む、方法。

【請求項 53】

イヌ科動物に感染することのできるインフルエンザウイルスを検出するための方法であって、

動物から核酸試料を得る工程、および該核酸試料を請求項16記載のオリゴヌクレオチドと接触させる工程、および該オリゴヌクレオチドがストリンジェントな条件下において該核酸にハイブリダイズするかどうかを調べる工程を含む、方法。

【請求項 54】

10

20

30

40

50

イヌ科動物に感染することのできるインフルエンザウイルスに対して抗ウイルス活性を持つ化合物をスクリーニングするための方法であって、

請求項1記載のウイルスに感染したまたはこのウイルスを含む細胞を試験化合物と接触させる工程、および該試験化合物が該細胞における該ウイルスの活性を阻害するかどうかを調べる工程を含む、方法。

【請求項 5 5】

請求項1記載のインフルエンザウイルスの少なくとも1つの遺伝子、ゲノムセグメントまたはポリヌクレオチドを含む、リアソータントウイルス。

【請求項 5 6】

薬学的に許容される担体または希釈剤中で製剤化される、請求項55記載のリアソータントウイルス。

【請求項 5 7】

HA、NA、NP、MA、PB1、PB2、PAおよびNS、またはその機能性もしくは免疫原性断片からなる群より選択されるイヌインフルエンザウイルスタンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、分離されたウイルス。

【請求項 5 8】

1つまたは複数のポリヌクレオチドが配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75および77からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項57記載のウイルス。

【請求項 5 9】

HAタンパク質が配列番号：16、32、62および78からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 0】

NAタンパク質が配列番号：12、28、58および74からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 1】

NPタンパク質が配列番号：10、26、56および72からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 2】

MAタンパク質が配列番号：14、30、60および76からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 3】

PB1タンパク質が配列番号：4、20、50および66からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 4】

PB2タンパク質が配列番号：2、18、48および64からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 5】

PAタンパク質が配列番号：6、22、52および68からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 6】

NSタンパク質が配列番号：8、24、54および70からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 7】

薬学的に許容される担体または希釈剤中で提供される、請求項57記載のウイルス。

【請求項 6 8】

イヌ科動物に感染することができるインフルエンザウイルスを検出するための方法であって、

動物から核酸を含む試料を得る工程、およびプライマーが結合する配列を核酸が含む場

10

20

30

40

50

合に、該核酸試料を、増幅産物の形成に十分な条件下において該ウイルスのポリヌクレオチドまたは遺伝子配列に対して特異的に結合するフォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマーと接触させる工程；および該増幅産物を検出する工程を含む、方法。

【請求項 69】

オリゴヌクレオチドプライマーが、イヌ科動物に感染することができるインフルエンザウイルスのゲノムセグメントまたは遺伝子の全てまたは一部を含むポリヌクレオチドのコードまたは非コード配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである、請求項68記載の方法。

【請求項 70】

イヌをインフルエンザウイルス感染から保護するための方法であって、
以下を含むワクチンの治療上有効量をイヌに投与する工程を含む、方法：
少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原、および
少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤。

10

【請求項 71】

ウマインフルエンザウイルス抗原が不活化ウイルスを含む、請求項70記載の方法。

【請求項 72】

ウマインフルエンザウイルス抗原が弱毒化生ウイルスを含む、請求項70記載の方法。

【請求項 73】

ワクチンが複数のウイルス分離物からのウマインフルエンザウイルス抗原を含む、請求項70記載の方法。

20

【請求項 74】

ワクチンがH7インフルエンザウイルス由来の少なくとも1つの抗原を含む、請求項70記載の方法。

【請求項 75】

ワクチンが皮下投与される、請求項70記載の方法。

【請求項 76】

ワクチンが鼻腔内投与される、請求項70記載の方法。

【請求項 77】

ワクチンが、百日咳ワクチン、アデノウイルスワクチンおよびパラインフルエンザウイルスワクチンからなる群より選択される少なくとも1つのワクチンと組み合わせて投与される、請求項70記載の方法。

30

【請求項 78】

イヌをH3インフルエンザウイルス感染から保護するための方法であって、
以下を含むワクチンの治療上有効量をイヌに投与する工程を含む、方法：
少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス抗原、ならびに
少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤。

【請求項 79】

ワクチンが以下のイヌインフルエンザウイルス分離物の1つまたは複数に由来する1つまたは複数の抗原を含む、請求項78記載の方法：

40

A/イヌ/フロリダ/43/2004、A/イヌ/フロリダ/242/2003、イヌ/Jax/05、およびイヌ/マイアミ/05。

【請求項 80】

ワクチンがH7インフルエンザウイルス由来の少なくとも1つの抗原を含む、請求項78記載の方法。

【請求項 81】

H3インフルエンザウイルス抗原が不活化ウイルスを含む、請求項78記載の方法。

【請求項 82】

ワクチンが以下のイヌインフルエンザウイルス分離物の1つまたは複数に由来する1つまたは複数の抗原を含む、請求項81記載の方法：

50

A/イヌ/フロリダ/43/2004、A/イヌ/フロリダ/242/2003、イヌ/Jax/05、およびイヌ/マイ
アミ/05。

【請求項 8 3】

H3インフルエンザウイルス抗原が弱毒化生ウイルスを含む、請求項78記載の方法。

【請求項 8 4】

ワクチンが感染したイヌから分離されたウイルス分離物の少なくとも1つの抗原を含む、請求項78記載の方法。

【請求項 8 5】

ワクチンが複数のウイルス分離物に由来する抗原を含む、請求項78記載の方法。

【請求項 8 6】

ワクチンが皮下投与される、請求項78記載の方法。

【請求項 8 7】

ワクチンが鼻腔内投与される、請求項78記載の方法。

【請求項 8 8】

ワクチンがイヌに1回投与される、請求項78記載の方法。

【請求項 8 9】

ワクチンがイヌに少なくとも2回投与される、請求項78記載の方法。

【請求項 9 0】

ワクチンの2回目の用量が1回目用量から約2から約8週後にイヌに投与される、請求項89
記載の方法。

【請求項 9 1】

ワクチンが、百日咳ワクチン、アデノウイルスワクチンおよびパラインフルエンザウイ
ルスワクチンからなる群より選択される少なくとも1つのワクチンと組み合わせて投与さ
れる、請求項78記載の方法。

【請求項 9 2】

イヌをイヌインフルエンザウイルスによって引き起こされる呼吸器病変から保護するた
めの方法であって、

以下を含むワクチンの治療上有効量をイヌに投与する工程を含む、方法：

少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原、および

少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤。

【請求項 9 3】

ワクチンが、イヌがイヌインフルエンザウイルスに感染する前にイヌに投与される、請
求項92記載の方法。

【請求項 9 4】

イヌをイヌインフルエンザウイルスによって引き起こされる呼吸器病変から保護するた
めの方法であって、

以下を含むワクチンの治療上有効量をイヌに投与する工程を含む、方法：

少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原および/または少なくとも1つのH7インフ
ルエンザウイルス抗原、ならびに

少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤。

【請求項 9 5】

ワクチンが、イヌがイヌインフルエンザウイルスに感染する前にイヌに投与される、請
求項94記載の方法。

【請求項 9 6】

イヌをイヌインフルエンザウイルス感染によって引き起こされる鼻または口分泌物中に
イヌインフルエンザウイルスを持つことから保護するための方法であって、

以下を含むワクチンの治療上有効量をイヌに投与する工程を含む、方法：

少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原、および

少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤。

【請求項 9 7】

10

20

30

40

50

ワクチンが、イヌがイヌインフルエンザウイルスに感染する前にイヌに投与される、請求項96記載の方法。

【請求項 9 8】

イヌをイヌインフルエンザウイルス感染によって引き起こされる鼻または口分泌物中にイヌインフルエンザウイルスを持つことから保護するための方法であって、

以下を含むワクチンの治療上有効量をイヌに投与する工程を含む、方法：

少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス抗原、ならびに

少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤。

【請求項 9 9】

ワクチンが、イヌがイヌインフルエンザウイルスに感染する前にイヌに投与される、請求項98記載の方法。

【請求項 1 0 0】

ワクチンが以下を含む、イヌインフルエンザワクチン：

少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス抗原の治療上有効量、ならびに

少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤。

【請求項 1 0 1】

以下のイヌインフルエンザウイルス分離物の1つまたは複数に由来する1つまたは複数の抗原を含む、請求項100記載のワクチン：

A/イヌ/フロリダ/43/2004、A/イヌ/フロリダ/242/2003、イヌ/Jax/05、およびイヌ/マイアミ/05。

【請求項 1 0 2】

ウイルス抗原が不活化ウイルスを含む、請求項100記載のワクチン。

【請求項 1 0 3】

以下のイヌインフルエンザウイルス分離物の1つまたは複数に由来する1つまたは複数の抗原を含む、請求項102記載のワクチン：

A/イヌ/フロリダ/43/2004、A/イヌ/フロリダ/242/2003、イヌ/Jax/05、およびイヌ/マイアミ/05。

【請求項 1 0 4】

ウイルス抗原が弱毒化生ウイルスを含む、請求項100記載のワクチン。

【請求項 1 0 5】

ワクチンが以下を含む、イヌインフルエンザワクチン：

ウマインフルエンザウイルス抗原の治療上有効量、および

少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤。

【請求項 1 0 6】

ウマインフルエンザウイルス抗原が不活化ウイルスを含む、請求項105記載のワクチン。

【請求項 1 0 7】

ウイルス抗原が弱毒化生ウイルスを含む、請求項105記載のワクチン。

【請求項 1 0 8】

イヌをインフルエンザウイルス感染から保護するためのキットであって、

以下を含む、キット：

少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原を含むワクチンの治療上有効量、ならびに

以下からなる群より選択される少なくとも1つの成分：

ワクチンをイヌに投与するための装置、

ワクチンのイヌへの投与を支援する薬学的に許容される賦形剤、

ワクチンに対するイヌの免疫応答を促進する薬学的に許容される賦形剤、

イヌによってワクチンと同時に摂取される食物、および

10

20

30

40

50

イヌによってワクチンと同時に摂取されるごちそう (treat)。

【請求項 109】

ワクチンをイヌに皮下投与するための装置を含む、請求項108記載のキット。

【請求項 110】

ワクチンをイヌに鼻腔内投与するための装置を含む、請求項108記載のキット。

【請求項 111】

イヌをH3インフルエンザウイルス感染から保護するためのキットであって、
以下を含む、キット：

少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス抗原を含むワクチンの治療上有効量、ならびに

10

以下からなる群より選択される少なくとも1つの成分：

ワクチンをイヌに投与するための装置、
ワクチンのイヌへの投与を支援する薬学的に許容される賦形剤、
ワクチンに対するイヌの免疫応答を促進する薬学的に許容される賦形剤、
イヌによってワクチンと同時に摂取される食物、および
イヌによってワクチンと同時に摂取されるごちそう。

【請求項 112】

ワクチンの2回用量を含み、
2回用量が合計でワクチンの治療上有効量を含む、

請求項111記載のキット。

20

【請求項 113】

ワクチンをイヌに皮下投与するための装置を含む、請求項111記載のキット。

【請求項 114】

ワクチンをイヌに鼻腔内投与するための装置を含む、請求項111記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は2006年4月21日に提出された米国特許出願第11/409,416号の一部継続出願である；また本出願は2005年10月19日に提出された米国特許出願第60/728,449号、2005年12月29日に提出された60/754,881、2006年1月14日に提出された同60/759,162号、2006年1月23日に提出された同60/761,451号、および2006年3月3日に提出された同60/779,080号に対する優先権を主張し、各出願の開示は簡単な概要、発明の詳細な説明、実施例、特許請求の範囲、要約、図、表、核酸配列、アミノ酸配列および図を含めて、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

30

【0002】

発明の背景

「ケンネルコフ」、つまり感染性気管気管支炎 (ITB) は、主として咳を特徴とするイヌの急性伝染性呼吸器感染症である (Fordら、1998年)。イヌITBは世界中で最も蔓延しているイヌの感染性呼吸器疾患の一つと考えられており、イヌが犬舎のような過密集団の環境下で飼育されると大流行が流行割合に達することがある。大半の大流行は、イヌ-イヌ間の直接的な接触または呼吸器分泌物のエアロゾル化に起因する (Fordら、1998年)。臨床徴候は、上下気道の上皮にコロニーを形成する細菌性およびウイルス性物質の一つまたは組み合わせに感染することによって引き起こされる。イヌパラインフルエンザウイルス (CPIV) および気管支敗血症菌 (ボルデテラ・ブロンキセプチカ (Bordetella bronchiseptica)) は感染したイヌから分離される最も一般的な生物であるが、イヌジステンパーウイルス (CDV) ならびに1型および2型イヌアデノウイルス (CAV-1、CAV-2) などの複数のその他のウイルス、ならびに連鎖球菌 (Streptococcus sp.)、パストレラ・ムルトシダ (Pasteurella multocoda) および大腸菌 (Escherichia coli) などの細菌が臨床経過および帰結に影響を及ぼし得る (Fordら、1998年)。過密集団では罹患率の高い大

40

50

流行が極めて効率的および急速に発生するが、合併症である呼吸器感染症および死亡は稀である。生命の危険性のある二次的細菌性肺炎が発症する可能性があるが、ITB症例の大部分は自己限定的であり、何ら治療することなく回復する（Fordら、1998年）。

【 0 0 0 3 】

1992年7月、「ケンネルコフ」と推定される呼吸器感染症がニューイングランド、フロリダ、ウエストバージニア、ウィスコンシン、カンザス、コロラド、オクラホマおよびアリゾナの複数のグレイハウンドトラックで流行した。獣医師によると、感染犬の大部分は軽度の咳をして回復したが、数十頭を超えるグレイハウンドが急性出血性肺炎を発症し、その後、急死した（Greyhound Daily News, 1999）。

【 0 0 0 4 】

1998年末から1999年初めにかけて、国中のレース用グレイハウンド犬舎において複数の「ケンネルコフ」の大流行が発生し、その結果、米国内のすべてのレース用グレイハウンドのトラックおよび検疫が数週間にわたって強制的に閉鎖された（Greyhound Daily News, 1999）。フロリダの一つのトラック（Palm Beach Kennel Club）では、咳をすることが一日においてイヌ集団の40%近くに記録された（Dr. William Duggarからの私信）。1992年の大流行と同様に、大半のグレイハウンドでは咳は回復したが、フロリダの10頭のイヌは「ケンネルコフ」の特徴ではない出血性肺炎症候群のために死亡した（Putnam, 1999）。

【 0 0 0 5 】

2003年の3月～4月に、もう一つの「ケンネルコフ」の大流行が米国東部のグレイハウンドトラックで発生した。この大流行はフロリダの4つのトラックの犬舎に端を発したと考えられ、ほぼ3週間にわたってイヌのレースおよび検疫が停止された。West Palm Beachのトラックでは25%近いイヌが感染し、St. PetersburgのDerby Laneでは1400頭のイヌのほぼ50%が咳を発症した。この場合も、大半のイヌは回復したが、複数のイヌは呼吸器感染のために死亡していた。Derby Laneトラック単独の呼吸器大流行の推定経済的影響は200万ドルであった。

【 0 0 0 6 】

1992年、1998～1999年、または2003年のレース用グレイハウンド犬舎における「ケンネルコフ」流行の病因論または臨床病理学について実証した既報の報告はない。感染は、ケンネルコフの二大原因であるCPiVおよび/または気管支敗血症菌によるものであると想定されている。ウェブサイトなどの十分な証拠のないコミュニケーションによると、咳をしているイヌの一部で報告された致命的な出血性肺炎は、溶血性連鎖球菌（*Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*）の感染が原因であり、「イヌ連鎖球菌毒素ショック」である症候群とされる。

【 0 0 0 7 】

1つの宿主動物種からもう1つの宿主動物種へのウイルスの伝播は、インフルエンザウイルスの生態学および疫学の重要な特徴である（Webster、1998年）。インフルエンザウイルスの種間伝播に関する2つの基本的メカニズムが可能である（Websterら、1992年；Lipatovら、2004年）。一つは、一つの動物種からもう一つの動物種への本質的に未変化のウイルスの直接的伝播である。このメカニズムの例には、最近のヒトにおけるトリインフルエンザウイルスのH5N1亜型の感染が含まれ（Subbaraoら、1998；Peirisら、2004；Guanら、2004）、またことによるとスペイン風邪として知られる1918年の感染爆発も含まれる（Reidら、2004年）。第2のメカニズムはインフルエンザゲノムのセグメント化された性質の結果である。異なる動物種からウイルスが宿主に同時感染すると、セグメント化されたウイルス遺伝子が再集合して、別の動物種への感染能力を持つ組換えが起こり得る。例えば、1957年および1968年には、トリおよびヒトインフルエンザウイルス間の遺伝子再集合により形成された新しいウイルスがヒトインフルエンザの感染爆発を起こした（Websterら、1992年；Lipatovら、2004年；Kawaokaら、1989年）。

【 0 0 0 8 】

自然宿主動物種から別の動物種への未変化インフルエンザウイルスの大半の直接的伝播

は、新しい動物種の個体間での持続性の伝播が起こり得ないために終末的事象である。複製および水平伝播には多くのウイルス - 宿主相互作用が必要であり、新しい宿主体内でのインフルエンザウイルスの永続化に対して強力なバリアとなる (Webbyら、2004年)。従って、インフルエンザウイルスの新しい宿主特異的系統の確立は稀であり、家禽、ブタ、ウマおよびヒトにおいてのみ起こっている (Websterら、1992年; Lipatovら、2004年)。

【0009】

インフルエンザ感染は深刻であるため、インフルエンザウイルスによる感染を診断、予防および治療するための方法に対するニーズがある。

【発明の開示】

【0010】

発明の簡単な概要

本発明は、イヌ科に感染してイヌ科に呼吸器疾患を引き起こすことのできる分離されたインフルエンザウイルスに関する。本発明は、本発明のインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するための組成物および方法にも関する。本発明は、さらに、本発明のウイルスを同定して、本発明のウイルスの動物への感染を診断するための組成物および方法にも関する。

【0011】

本発明の一つの局面は、イヌをイヌインフルエンザから保護するためのワクチンおよび方法、このようなワクチンを含むキット、ならびにこのようなワクチンを使用するための方法に関する。この保護は、インフルエンザおよび/またはその症状の1つもしくは複数 (典型的には2つもしくはそれよりも多く) の予防、そのリスクの低減、その発症の遅延、その拡散の縮小、緩解、抑制、および/または根絶を含む。本発明のワクチン、キットおよび方法は一般にイヌに関しての使用に適していると考えられている。イヌには、オオカミ、コヨーテおよびキツネなど、野生、動物園および家庭のイヌが含まれる。イヌには、さらに、例えば、純系および/または雑種の伴侶犬などの家庭内のイヌ、シードッグ、作業犬、牧羊犬、狩猟犬、番犬、警察犬、レース犬、および/または実験犬も含まれる。

【0012】

本発明は、イヌをインフルエンザウイルス感染から保護する (即ち、インフルエンザウイルス感染の予防、そのリスクの低減、その発症の遅延、抑制、緩解、または根絶する) ための方法も一部目的とする。方法は、少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原、少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原、および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス抗原を含むワクチンの治療上有効量を投与する工程を含む。

【0013】

本発明は、イヌを呼吸器の病変から保護する (即ち、呼吸器病変の予防、そのリスクの低減、その発症の遅延、抑制、緩解、または根絶する) ための方法も一部目的とする。方法は、少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原、少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原、および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス抗原を含むワクチンの治療上有効量をイヌに投与する工程を含む。

【0014】

本発明は、イヌインフルエンザウイルス感染によって引き起こされる鼻または口分泌物中にイヌインフルエンザウイルスを持つことからイヌを保護する (即ち、鼻または口分泌物中のイヌインフルエンザウイルスの予防、そのリスクの低減、その発症の遅延、抑制、緩解または根絶) ための方法も一部目的とする。方法は、少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原、少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原、および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス抗原を含むワクチンの治療上有効量をイヌに投与する工程を含む。

【0015】

本発明は、イヌインフルエンザワクチンも一部目的とする。一部の態様において、例えば、ワクチンは、少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原、少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原、および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス

10

20

30

40

50

抗原の治療上有効量を含む。

【0016】

本発明は、イヌをインフルエンザウイルス感染から保護するためのキットも一部目的とする。キットは、少なくとも1つのウマインフルエンザウイルス抗原、少なくとも1つのH3インフルエンザウイルス抗原、および/または少なくとも1つのH7インフルエンザウイルス抗原を含むワクチンの治療上有効量を含む。さらに、キットは以下の少なくとも1つを含む：

ワクチンをイヌに投与するための装置、

ワクチンのイヌへの投与を支援する薬学的に許容される賦形剤、

ワクチンに対するイヌの免疫応答を促進する薬学的に許容される賦形剤、

イヌによってワクチンと同時に摂取される食物、および/または

イヌによってワクチンと同時に摂取されるごちそう (treat)。

【0017】

本発明者の発明のさらなる恩典は、この明細書を読むことから当業者に明らかとなるであろう。

【0018】

発明の詳細な開示

本発明は、イヌ科に感染して呼吸器疾患を引き起こすことのできる分離されたインフルエンザウイルスに関する。一つの態様において、本発明のインフルエンザウイルスは配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片もしくは変異型のいずれかに示されるアミノ酸配列を持つタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。具体的な態様において、ポリヌクレオチドは配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77、またはその断片もしくは変異型のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。本発明のインフルエンザウイルスは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、およびH9、H10、H11、H12、H13、H14、H15もしくはH16のHA亜型、またはN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8もしくはN9のNA亜型を含むことができる。具体的な態様において、本発明のインフルエンザウイルスはH3亜型である。ウイルスは、本明細書に開示される方法に従って、感染したイヌから分離して細胞または卵で培養することができる。一つの例示的態様において、インフルエンザウイルスはインフルエンザAウイルスである。

【0019】

本発明は、本発明のインフルエンザウイルスの遺伝子の全体または一部、またはゲノムセグメントを含むポリヌクレオチドにも関する。一つの態様において、本発明のポリヌクレオチドはヘマグルチニン (HA) 遺伝子、ノイラミニダーゼ (NA) 遺伝子、核タンパク質 (NP) 遺伝子、マトリックスタンパク質 (MAまたはM) 遺伝子、ポリメラーゼ塩基性 (PB) タンパク質遺伝子、ポリメラーゼ酸性 (PA) タンパク質遺伝子、非構造 (NS) タンパク質遺伝子、またはこれらの任意の遺伝子の機能性断片もしくは変異型を含む。一つの具体的な態様において、本発明のポリヌクレオチドはヘマグルチニン (HA) 遺伝子またはその機能性断片もしくは変異型を含む。さらなる態様において、HA遺伝子は以下の一つまたは複数を持つヘマグルチニンタンパク質をコードする：ウマH3共通配列のアミノ酸配列に対して、83位のセリン；222位のロイシン；328位のスレオニン；および/または483位のスレオニン。一つの態様において、HA遺伝子は配列番号：16、32、62、もしくは78に示されるアミノ酸配列、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片または変異型を持つポリペプチドをコードする。具体的な態様において、HA遺伝子は配列番号：15、31、61または77に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0020】

一つの態様において、本発明のポリヌクレオチドは配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64

10

20

30

40

50

、66、68、70、72、74、76もしくは78、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片もしくは変異型のいずれかに示されるアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする。具体的態様において、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76または78に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75または77に示されるヌクレオチド配列、または配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、もしくは78のいずれかの機能性および/または免疫原性断片もしくは変異型をコードする配列を含む。従って、本発明は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかに示されるヌクレオチド配列、または配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかの断片もしくは縮重変異型を含む変異型を含むポリヌクレオチド配列に関する。さらなる具体的態様において、本発明のポリヌクレオチドは以下を含むことができる：配列番号：3の1～2271のヌクレオチド；配列番号：5の1～2148のヌクレオチド；配列番号：7の1～657のヌクレオチド；配列番号：9の1～1494のヌクレオチド；配列番号：11の1～1410のヌクレオチド；配列番号：13の1～756のヌクレオチド；配列番号：15の1～1695のヌクレオチド；配列番号：19の1～2271のヌクレオチド；配列番号：21の1～2148のヌクレオチド；配列番号：23の1～657のヌクレオチド；配列番号：25の1～1494のヌクレオチド；配列番号：29の1～756のヌクレオチド；配列番号：31の1～1695のヌクレオチド；配列番号：47の1～2277のヌクレオチド；配列番号：49の1～2271のヌクレオチド；配列番号：51の1～2148のヌクレオチド；配列番号：53の1～690のヌクレオチド；配列番号：55の1～1494のヌクレオチド；配列番号：57の1～1410のヌクレオチド；配列番号：59の1～756のヌクレオチド；配列番号：61の1～1695のヌクレオチド；配列番号：63の1～2277のヌクレオチド；配列番号：65の1～2271のヌクレオチド；配列番号：67の1～2148のヌクレオチド；配列番号：69の1～690のヌクレオチド；配列番号：71の1～1494のヌクレオチド；配列番号：73の1～1410のヌクレオチド；配列番号：75の1～756のヌクレオチド；および配列番号：77の1～1695のヌクレオチド。さらに、本発明の範囲内と考えられるウイルス性ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、その開示が参照により本明細書に組み入れられるアクセッション番号DQ124147～DQ 124161およびDQ 124190にてGenBankに寄託されている。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明は、本発明のインフルエンザウイルスのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドにも関する。本発明は、このポリペプチドの機能性および/または免疫原性断片および変異型にも関する。意図されるポリペプチドには、本発明のインフルエンザウイルスのHAタンパク質、NAタンパク質、NSタンパク質、核タンパク質、ポリメラーゼ塩基性タンパク質、ポリメラーゼ酸性タンパク質およびマトリックスタンパク質が含まれる。一つの例示的態様において、本発明のポリペプチドは配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片もしくは変異型のいずれかに示されるアミノ酸配列を持つ。

【0022】

本発明は、本発明のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド発現構築物にも関する。一つの態様において、本発明の発現構築物は、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片もしくは変異型のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。具体的態様において、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、

18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76または78に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77に示されるヌクレオチド配列、または配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかの機能性および/もしくは免疫原性断片もしくは変異型をコードする配列を含む。従って、本発明は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかに示されるヌクレオチド配列、または配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかの断片もしくは縮重変異型を含む変異型を含むポリヌクレオチド配列を含む。好ましい態様において、本発明の発現構築物は、本発明の機能的に結合されたポリヌクレオチドの過剰発現に対応する。

【0023】

本発明の発現構築物は、一般に、その発現構築物を発現させようとする対象宿主細胞において機能性である調節エレメントを含む。従って、当業者は、例えば、ヒト宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、昆虫宿主細胞、酵母宿主細胞、細菌宿主細胞および植物宿主細胞内の使用のための調節エレメントを選択することができる。一つの態様において、調節エレメントはイヌ細胞において機能性であるエレメントである。調節エレメントには、プロモーター、転写終結配列は、翻訳終結配列、エンハンサーおよびポリアデニル化エレメントが含まれる。本明細書で用いられる通り、「発現構築物」という用語は、機能的に結合された核酸配列の転写に対応する核酸配列の組み合わせを示す。本明細書で用いられる通り、「機能的に結合する」という用語は、それらの意図する方法で機能することを可能とする関係にある、記載されるコンポーネントの近位を示す。一般に、機能的に結合するコンポーネントは近接する関係にある。

【0024】

本発明の発現構築物は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に機能的に結合するプロモーター配列を含むことができる。プロモーターは、当技術分野において公知である標準的手法を用いてポリヌクレオチドに組み込むことができる。プロモーターの多くの複製または多くのプロモーターが本発明の発現構築物において使用できる。好ましい態様において、プロモーターはその本来の遺伝子環境において転写開始点からの距離とほぼ同一の発現構築物における転写開始点からの距離に位置することができる。この距離における若干の変動は、プロモーター活性を実質的に低下させることなく可能である。転写開始点は、典型的には発現構築物に含まれる。好ましくは、本発明の発現構築物に関連するプロモーターは本発明の機能的に結合するポリヌクレオチドの過剰発現に対応する。

【0025】

真核細胞において本発明の発現構築物と共に使用するためのプロモーターは、ウイルスまたは細胞起源であり得る。ウイルス性プロモーターには、サイトメガロウイルス（CMV）遺伝子プロモーター、SV40初期もしくは後期プロモーター、またはラウス肉腫ウイルス（RSV）遺伝子プロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。細胞起源のプロモーターには、デスミン遺伝子プロモーターおよびアクチン遺伝子プロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。酵母細胞において本発明の発現構築物との使用に適しているプロモーターには、3-ホスホグリセレートキナーゼプロモーター、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼプロモーター、メタロチオネインプロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼ-2プロモーターおよびヘキソキナーゼプロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0026】

発現構築物が植物細胞に提供または導入されなければならない場合、例えば、カリフラ

ワームザイクウイルス (CaMV) 35S (エンハンスド (enhanced) CaMV 35Sプロモーターを含む (例えば、米国特許第5,106,739号およびAn, 1997を参照されたい)) またはCaMV 19Sプロモーターなどの植物ウイルス性プロモーターが使用可能である。植物において発現構築物として使用できるその他のプロモーターには、例えば、プロリフェラ (prolifera) プロモーター、Ap3プロモーター、熱ショックプロモーター、A. ツメファシエンス (A. tumefaciens) のT-DNA 1'-または2'-プロモーター、ポリガラクトナーゼプロモーター、ベチュニア由来カルコンシンターゼA (CHS-A) プロモーター、タバコPR-1aプロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、alcA遺伝子プロモーター、pin2プロモーター (Xuら、1993年)、トウモロコシWip1プロモーター、トウモロコシtrpAプロモーター (米国特許第5,625,136号)、トウモロコシCDPK遺伝子プロモーター、およびRUBISCO SSUプロモーター (米国特許第5,034,322号) も使用可能である。米国特許第6,455,760号もしくは米国特許第6,696,623号に開示、または公開された米国特許出願第20040078841号；米国特許出願第20040067506号；米国特許出願第20040019934号；米国特許出願第20030177536号；米国特許出願第20030084486号；もしくは米国特許出願第20040123349号に開示される任意のプロモーター配列などの根特異的プロモーターは、本発明の発現構築物と共に使用することができる。構成的プロモーター (CaMV、ユビキチン、アクチンまたはNOSプロモーターなど)、発現調節プロモーター、および誘導性プロモーター (熱、光、ホルモンまたは化学物質によって誘導可能なもの意外のプロモーターなど) も本発明のポリヌクレオチド発現構築物との使用のために考えられる。例えば、トマトのE8プロモーター (アクセッション番号：AF515784；Goodら、(1994年) のような果実特異的プロモーターなどの組織特異的プロモーターも使用可能である。(例えば、インゲンマメの) -ファゼオリン遺伝子または (例えば、ダイズの) グリシニン遺伝子およびその他由来のプロモーターなどの種子特異的プロモーターも使用することができる。

10

20

30

40

50

【0027】

原核生物の系での発現のため、本発明の発現構築物は、例えば、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン (trp) プロモーター、ラムダP_Lプロモーター、-ラクタマーゼプロモーター、ラクトースプロモーター、phoAプロモーター、T3プロモーター、T7プロモーター、またはtacプロモーター (de Boerら、1983年) などのプロモーターを含むことができる。

【0028】

本発明の発現構築物は、任意で、転写終結配列、翻訳終結配列、シグナルペプチドをコードする配列および/またはエンハンサーエレメントを含んでもよい。転写終結領域は、典型的には真核生物またはウイルスの遺伝子配列の3'末翻訳領域から得ることができる。転写終結配列は、効果的な終結に備えるためのコード配列の下流に位置し得る。シグナルペプチド配列は、典型的にはタンパク質のアミノ末端に位置する短いアミノ酸配列であり、特異的細胞小器官コンパートメントからタンパク質作用部位および細胞外環境までに及ぶ、広範にわたる翻訳後の細胞内目的地への機能的に結合された成熟ポリペプチドの移動を司る。機能的に結合したシグナルペプチド配列の使用を介した対象となる細胞および/または細胞外目的地への遺伝子産物のターゲティングは、本発明のポリペプチドを用いた使用に関して考えられる。古典的なエンハンサーは、遺伝子転写を亢進させて、さらに発現構築物に含まれることもできるシス作用エレメントである。古典的エンハンサーエレメントは当技術分野において公知であり、CaMV 35Sエンハンサーエレメント、サイトメガロウイルス (CMV) 初期プロモーターエンハンサーエレメントおよびSV40エンハンサーエレメントが含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子発現を亢進させるイントロン介在エンハンサーエレメントも当技術分野において公知である。これらのエレメントは転写領域内に存在しなければならず、配向依存性である。

【0029】

発現構築物から転写されるmRNAのポリアデニル化を誘導するDNA配列も発現構築物に含まれ得て、これらにはオクトピンシンターゼまたはノパリンシンターゼシグナルが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 3 0 】

発現構築物は、例えば、形質転換した細胞を選択するための抗生物質耐性および/または除草剤耐性をコードする遺伝子を含む一つまたは複数の優性選択可能マーカー遺伝子も含むことができる。抗生物質耐性遺伝子は、以下の抗生物質の一つまたは複数に対する耐性を提供し得る：ハイグロマイシン、カナマイシン、ブレオマイシン、G418、ストレプトマイシン、パロモマイシン、ネオマイシンおよびスペクチノマイシン。カナマイシン耐性はネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（NPT II）によって提供され得る。除草剤耐性遺伝子は、ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼまたはグリフォセートに対する耐性を提供し得る。細胞形質転換のスクリーニングに用いられるその他のマーカーには、
- グルクロニダーゼ（GUS）、
- ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、ノバリンシンターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、またはエンハンスドGFPが含まれるが、これらに限定されるものではない（Yangら、1996年）。

10

【 0 0 3 1 】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドベクターにも関する。固有の制限酵素部位は、ポリヌクレオチドベクターへの挿入を可能とする本発明の発現構築物またはポリヌクレオチドの5'および3'末端に含まれ得る。本明細書で用いられる通り、「ベクター」という用語は、例えば、適切な調節領域と結合した場合に複製可能であり、細胞間でポリヌクレオチド配列を移動させることができるプラスミド、コスミド、クロモゾーム、ファージ、ウイルスなどを含む任意の遺伝子エレメントを指す。ベクターは、特定の宿主細胞内でのベクターの複製を可能とするヌクレオチド配列を含む。発現および/またはクローニングには多くのベクターが使用可能であり、pBR322、pUCシリーズ、M13シリーズ、pGEMシリーズ、およびpBLUESCRIPTベクターが含まれるがこれらに限定されるものではない（Stratagene, La Jolla, CA and Promega, Madison, WI）。

20

【 0 0 3 2 】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドのコードまたは非コード配列にハイブリダイズすることができるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーなどのオリゴヌクレオチドプローブおよびプライマーにも関する。本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、インフルエンザウイルス核酸配列を検出するための方法で用いることができる。本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、PCR法および核酸増幅を伴うその他の方法で用いることができる。好ましい態様において、本発明のプローブまたはプライマーはストリンジェントな条件下において本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。本発明のプローブおよびプライマーは、任意で蛍光分子、酵素、放射性分子などのような検出可能な標識またはレポーター分子を含むことができる。本発明のプローブおよびプライマーは、用いられている方法またはアッセイ法における任意の適切な長さであり得る。典型的には、本発明のプローブおよびプライマーは10～500個またはそれよりも多いヌクレオチドの長さである。10～20、21～30、31～40、41～50、51～60、61～70、71～80、81～90、91～100、または101もしくはそれよりも多いヌクレオチドの長さであるプローブおよびプライマーは本発明の範囲内と考えられる。一つの態様において、プローブおよびプライマーは、
9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の任意のヌクレオチドの長さである。本発明のプローブおよびプライマーは、ポリヌクレオチド配列と完全な（100%）ヌクレオチド配列同一性を持ち得て、そうでない場合は、配列同一性は100%未満であり得る。例えば、プローブまたはプライマーと配列の間の配列同一性は99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、またはプローブもしくはプライマーが本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に対してストリンジェントな条件下においてハイブリダイズし得る限り、その他の任意のパーセントの配列同一性であり得る。本発明の例示的プローブおよびプライマーは、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：45および配列番号

30

40

50

：46のいずれか、または配列番号：35～46の任意の機能性断片もしくは変異型に示されるヌクレオチド配列を持つものを含む。

【0033】

本明細書で用いられる通り、「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの混合ポリマーを指し、別途限定されない限り、天然のヌクレオチドと同様の方法で機能を発揮することができる天然型ヌクレオチドの公知の類似体を含む。ポリヌクレオチド配列は、タンパク質に翻訳され得るRNAおよびRNA鎖に転写され得るDNA鎖配列を含む。本発明の任意の核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの相補的配列も本発明の範囲内と考えられる。ポリヌクレオチド配列は、さらに、完全長の配列および完全長配列から派生するより短い配列を含む。本発明は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドに対して配列において相補的であるポリヌクレオチドも内包する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは精製または単離された型として提供され得る。

10

【0034】

遺伝暗号の縮重のため、様々な異なるポリヌクレオチド配列が本発明のポリペプチドをコードし得る。想定されるすべてのトリプレットコドンを示す表(UはTも表す)および各コドンによってコードされるアミノ酸についてはLewin(1985年)に述べられている。さらに、同一または本質的に同一の本発明のポリペプチドをコードする代替のポリヌクレオチド配列を作出することは十分に当業者の技術の範囲内である。これらの縮重変異型および代替ポリヌクレオチド配列は本発明の範囲内である。本明細書で用いられる通り、「本質的に同一な」配列への言及は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの機能性および/または免疫原性活性を物質的には変化させずに、アミノ酸の置換、欠失、付加または挿入をコードする配列を指す。

20

【0035】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドの変異型にも関する。変異型の配列は、配列の一つまたは複数のヌクレオチドが置換、欠失および/または挿入されている配列を含む。DNAの天然のヌクレオチドに関して置換され得るヌクレオチドは、イノシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、ヒポキサンチン、1-メチルグアニン、5-メチルシトシンおよびトリチル化塩基を含み得るがこれらに限定されない塩基分子を持つ。配列におけるヌクレオチドの糖分子はさらに修飾され得て、アラビノース、キシロースおよびヘキソースを含むが、これらに限定されるものではない。さらに、ヌクレオチドのアデニン、シトシン、グアニン、チミンおよびウラシル塩基はアセチル基、メチル基および/またはチオ基で修飾され得る。ヌクレオチドの置換、欠失および/または挿入を含む配列は、当技術分野において公知の標準的手法を用いて作成および検査することができる。

30

【0036】

具体的に例示されている、または本発明のポリペプチドに自然の状態で含まれる以外のアミノ酸の置換も本発明の範囲内と考えられる。例えば、非天然型アミノ酸は、置換アミノ酸を持つポリペプチドが、アミノ酸が置換されていないポリペプチドと実質的に同一の機能活性を維持する限り、ポリペプチドのアミノ酸に置換することができる。非天然型アミノ酸の例には、オルニチン、シトルリン、ヒドロキシプロリン、ホモセリン、フェニルグリシン、タウリン、ヨードチロシン、2,4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、 β -アミノ酪酸、 γ -アミノヘキサン酸、6-アミノヘキサン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、ノルロイシン、ノルバリン、サルコシン、ホモシトルリン、システイン酸、 β -ブチルグリシン、 β -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 γ -アラニン、フルオロアミノ酸、 α -メチルアミノ酸、C-メチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸(designer amino acids)、および一般のアミノ酸類似体が含まれるが、これらに限定されるものではない。非天然型アミノ酸には、誘導体形成された側鎖を持つアミノ酸も含まれる。さらに、タンパク質内

40

50

の任意のアミノ酸がD型（右旋性）またはL型（左旋性）であってよい。本発明のポリペプチドのタンパク質配列の対立遺伝子変異型も本発明の範囲内に含まれる。

【0037】

アミノ酸は、一般に、以下のクラスに分類することができる：非極性、非荷電極性、塩基性および酸性。一つのクラスのアミノ酸を持つ本発明のポリペプチドが同一クラスのもう一つのアミノ酸で置換される保存的置換は、置換が生じたポリペプチドが置換が起こっていないポリペプチドと引き続き実質的に同一の機能性活性を保持する限り、本発明の範囲内である。配列内に一つまたは複数のアミノ酸置換を持つポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは本発明の範囲内と考えられる。以下の表11は、各クラスに属するアミノ酸例のリストを示す。一文字表記のアミノ酸の略号を表12に示す。

10

【0038】

本発明のインフルエンザウイルスのポリペプチドの断片および変異型は、当技術分野において公知の標準的方法を用いて作成して、当技術分野において公知の標準的手法を用いて機能または免疫原性の存在について調べることができる。例えば、本発明のノイラミニダーゼポリペプチドの断片および/または変異型の試験では、酵素活性が測定され得る。このように、当業者は、本発明のポリペプチドの断片および変異型を容易に作成および試験して、その断片または変異型が完全長または非変異型ポリペプチドに比して活性を保持しているかどうかを調べることができる。

【0039】

本発明の範囲内と考えられるポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、本明細書において具体的に例示される本発明の配列とより高い特定の同一性および/または類似性の範囲の観点で規定することもできる。配列同一性は、典型的には60%よりも高く、好ましくは75%よりも高く、より好ましくは80%よりも高く、さらに一層好ましくは90%よりも高く、95%よりも高い値であり得る。配列の同一性および/または類似性は、本明細書に例示される配列に比して、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99%であり得る。特記する場合を除いて、本明細書で用いられる通り2つの配列の配列同一性および/または類似性パーセントは、KarlinおよびAltschul（1993年）に修正されたKarlinおよびAltschulのアルゴリズム（1990年）を用いて求めることができる。このようなアルゴリズムは、Altschulら（1990年）のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み入れられる。所望の配列同一性パーセントを持つ配列を得るために、NBLASTを用いてスコア = 100、語長 = 12にてBLAST検索を実施することができる。比較のためのギャップの整列を得るために、Altschulら（1997年）に記載されるようにGapped BLASTを使用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを用いる場合、それぞれのプログラム（NBLASTおよびXBLAST）のデフォルトのパラメータを用いてもよい。NCBI/NIHのウェブサイトを参照されたい。

20

30

【0040】

本発明は、標準的なストリンジェントな条件および標準的方法（Maniatisら、1982年）においてその配列とハイブリダイズさせるために、本明細書に例示されるポリヌクレオチド配列と十分に相同である配列を持つポリヌクレオチド分子も意図される。本明細書で用いられる通り、ハイブリダイゼーションにおける「ストリンジェント」な条件とは、典型的にはハイブリダイゼーションが6×SSPE、5×Denhardt溶液、0.1% SDS、0.1mg/ml 変性DNA内においてDNAハイブリッドの融点（T_m）を下回る20～25℃で一晩実施される条件を指す。融点T_mは次式により示される（Beltzら、1983年）：

$$T_m = 81.5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 \text{ } ^\circ\text{C} \log[\text{Na}^+] + 0.41 (\% \text{G+C}) - 0.61 (\% \text{ホルムアミド}) - 600 / \text{塩基対の二本鎖の長さ}$$

40

【0041】

洗浄は典型的には以下のように行われる：

- (1) 1×SSPE、0.1% SDSにおいて室温で15分ずつ2回（低ストリンジェントな洗浄）
- (2) 0.2×SSPE、0.1% SDSにおいてT_m-20℃で15分間1回（中ストリンジェントな洗浄）。

50

【0042】

本発明は、本発明のインフルエンザウイルスの遺伝子によってコードされるウイルス性タンパク質およびペプチドにも関する。一つの態様において、ウイルスタンパク質は成熟HAタンパク質である。具体的態様において、成熟HAタンパク質は以下の一つまたは複数を含む：82位のセリン；221位のロイシン；327位のスレオニン；および/または482位のスレオニン。一つの例示的態様において、成熟HAタンパク質は配列番号：33もしくは配列番号：34に示すアミノ酸配列、または配列番号：33もしくは配列番号：34の機能性および/または免疫原性の断片もしくは変異型を持つ。もう一つの態様において、ウイルスタンパク質は、NAタンパク質、NSタンパク質、PBタンパク質、PAタンパク質またはMAタンパク質である。本発明のウイルスタンパク質およびペプチドは、そのタンパク質またはペプチドに特異的に結合する抗体を作出するために使用され得る。本発明のウイルスタンパク質およびペプチドは、免疫原として、またワクチン組成物として使用することもできる。

10

【0043】

本発明は、感受性宿主動物に感染して呼吸器疾患を引き起こすことのできるインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するための組成物および方法にも関する。本発明は、感受性宿主動物において任意の亜型のインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するために用いられ得る。例えば、インフルエンザウイルスは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15またはH16のHA亜型、およびN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8またはN9のNA亜型であり得る。一つの態様においてHA亜型はH3またはH5である。さらなる態様において、NA亜型はN7またはN8である。具体的態様において、免疫応答は亜型H3N8のインフルエンザウイルスに対して誘発される。一つの態様において、宿主動物はイヌ科である。イヌ科には、オオカミ、コヨーテおよびキツネなど、野生、動物園および家庭のイヌが含まれる。イヌには、さらに、例えば、純系および/または雑種の伴侶犬などの家庭内のイヌ、ショードッグ、作業犬、牧羊犬、狩猟犬、番犬、警察犬、レース犬、および/または実験犬も含まれる。一つの具体的態様において、宿主動物はグレイハウンドのような飼育慣らされたイヌである。一つの態様において、動物は本発明のインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するために十分な本発明の免疫原性組成物の有効量を投与される。免疫応答は液性および/または細胞性免疫応答であり得る。一つの具体的態様において、免疫応答は、免疫化後のある期間、免疫された宿主動物体内においてウイルス感染を予防または最小限に抑えることのできる防御的免疫応答である。従って、本発明は、ワクチン接種された動物に本発明のウイルスに対する防御免疫応答を提供することができるワクチン組成物および方法にも関する。

20

30

【0044】

本明細書に記載される通り、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、弱毒化もしくは不活化ウイルスを含む無細胞の完全ウイルス、またはサブビリオン粒子（ビリオンが処理されてウイルス脂質の一部またはすべての除去された「スプリットワクチン」を含む）、ウイルスタンパク質（個々のタンパク質および多くのタンパク質の高分子複合体を含む）、ポリペプチド、およびペプチドを含むそのウイルスの一部、ならびにウイルス感染細胞株、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。ウイルス感染細胞株を含むワクチンまたは免疫原性組成物は、それぞれが異なるウイルス株に感染した多くの細胞株を含んでもよい。

40

【0045】

本発明の1つの態様において、イヌは1種類もしくは複数の不活化（即ち、死菌）および/もしくは弱毒化生インフルエンザウイルスワクチン、または1種類もしくは複数のウイルス分離物に由来するインフルエンザウイルス抗原の1つもしくは多数を含むワクチンで免疫化され得る。一つの態様において、インフルエンザウイルスはイヌインフルエンザウイルスである。もう一つの態様において、インフルエンザウイルスは、イヌインフルエンザウイルスポリペプチドと少なくとも約90%、または少なくとも約95%、もしくは少なくとも約96%、もしくは97%、もしくは98%、もしくは99%、または99%もしくはそれよりも高いアミノ酸配列同一性を持つポリペプチドをコードまたは発現するウマインフルエンザ

50

ウイルスである。一つの態様において、本発明のワクチンで用いられるインフルエンザ抗原は、イヌインフルエンザウイルスのHA抗原および/またはNA抗原と少なくとも約96%の配列同一性を持つ。

【0046】

不活化ワクチンの例は、Intervet Inc. (Millsboro, DE, USA) によって液体ワクチンとして販売されているEQUICINE II (商標) である。EQUICINE II (商標) は、不活化したA/ペンシルバニア/63インフルエンザウイルス (「A/Pa/63」) およびA/ウマ/ケンタッキー/93インフルエンザウイルス (「A/KY/93」) をカルボポール (即ち、HAVLOGEN (登録商標) (Intervet Inc.)) と共に含む。より具体的には、EQUICINE II (商標) の用量は、不活化A/Pa/63を $10^{6.0}$ EID₅₀、不活化A/KY/93を $10^{6.3}$ EID₅₀、体積に基づいて0.25%のカルボポール、1mlの総液量を作成するために十分なPBSを含む。

10

【0047】

不活化ワクチンのもう一つの例はウマインフルエンザウイルスA/ウマ/オハイオ/03 (「Ohio 03」) である。いくつかの態様において、このようなワクチンは、MVP Laboratories, Inc. (Ralston, NE) から市販されている乳化されたポリマーをベースとするアジュバントであるCARBIGEN (商標) を含む。このようなワクチンにおいて、投与単位は、典型的には、少なくとも約250 HA単位のウイルス、約250から約12,500 HA単位のウイルス、または約1000から約6200 HA単位のウイルスを含む。CARBIGEN (商標) の推奨濃度は約5から約30% (質量に基づく) である。

20

【0048】

弱毒化生ワクチンの例は、水で再溶解することができる凍結乾燥ワクチンの剤形の改変された生のウマ/ケンタッキー/91 (「A/KY/91」) インフルエンザである。いくつかの態様において、この再溶解は、ワクチン投与量を総液量1mlとするために十分なワクチン級の水を用いて実施される。このようなワクチンの局面は、例えば、参照によりそれらの全体が本特許に組み入れられる米国特許第6,436,408号、同6,398,774号および同6,177,082号において考察される。再溶解された場合、このようなワクチンの用量は、例えば、1ml当たり $10^{7.2}$ TCID₅₀のA/KY/91、1ml当たり0.015gのN-Z AMINE AS (商標)、1ml当たり0.025gのゼラチン、および1ml当たり0.04gのDラクトースを含む。N-Z AMINE AS (商標) は、カゼインの酵素加水分解によって産生されるアミノ酸およびペプチドの精製したソースである。N-Z AMINE AS (商標) はKerry Bio-Science (Norwich, NY, USA) より販売されている。

30

【0049】

好ましい態様において、ワクチンは、例えば、ウマ/ニューマーケット/79株のように、HAコード配列においてフロリダ/43/2004と少なくとも約93%の相同性を持つH3インフルエンザ抗原を含む。好ましい相同性は、例えばウマ/アラスカ/1/91およびウマ/サンティアゴ/85の株のように少なくとも約96%である。続く実施例において、ウマ/ケンタッキー/91、ウマ-2/ケンタッキー/93、ウマ-1/ペンシルバニア/63およびウマ オハイオ/03インフルエンザ抗原がワクチンに組み入れられた。好ましいワクチンは、ウマ/ウィスコンシン/03、ウマ/ケンタッキー/02、ウマ/ケンタッキー/93およびウマ/ニューマーケット 2/93を含むワクチンも含む。続く実施例では、H3N8ウイルスが用いられた。但し、その他のH3インフルエンザウイルスは本発明に従って用いることができると考えられる。

40

【0050】

弱毒化生ワクチンは簡便な方法で調製することができる。このような方法は、一般に、例えば、インビトロにおける継代による病原性株の修飾、低温適応、遺伝子操作による生物の病原性の修飾、キメラの調製、ウイルスベクターへの抗原の挿入、非病原性野性株の選択などを含む。

【0051】

いくつかの態様において、弱毒化生ウイルス株は細胞培養物、実験動物、宿主以外の動物または鶏卵を介しての野生型ウイルスの連続継代によって誘導される。このような継代中の遺伝子突然変異の蓄積は、典型的に本来の宿主に対する生物の病原性の段階的喪失に

50

至る。

【0052】

いくつかの態様において、弱毒化生ウイルス株は許容細胞の弱毒化突然変異ウイルスおよび病原性ウイルスの同時感染によって調製される。結果的に得られる望ましい組換え型ウイルスは、病原性ウイルスに由来する感染防御抗原についてコードする遺伝子を持つ弱毒化ウイルスの安全性を持つ。

【0053】

いくつかの態様において、弱毒化生ウイルス株は低温適応によって調製される。低温適応したウイルスは上気道において見られる温度でのみ複製するという利点を持つ。低温適応したウマインフルエンザウイルスの作出の方法は米国特許第6,177,082号に記載されている。結果として得られる望ましい低温適応したウイルスは以下の表現型の1つまたは複数を付与する：低温適応、温度感受性、優性干渉および/または弱毒化。

10

【0054】

いくつかの態様において、弱毒化生ウイルス株は、元々のウイルスの感染防御特性を保持しながら、病原性ウイルスを元々のウイルスに比して非病原性または低病原性のウイルスに転換するための点突然変異、欠失または挿入などの分子的方法によって調製される。

【0055】

いくつかの態様において、弱毒化生ウイルスは、感染防御抗原の遺伝子の候補を非病原性もしくは低病原性のウイルスまたはその他の生物のゲノムにクローニングすることによって調製される。

20

【0056】

不活化（即ち、「死菌」）ウイルスワクチンはウイルスを簡便な方法を用いて不活化することによって調製することができる。典型的には、このようなワクチンは免疫応答を促進し得る賦形剤、およびワクチンにおいて慣例的に用いられるその他の賦形剤を含む。例えば、以降の実施例では、EQUICINE II（商標）は、HAVLOGEN（登録商標）を含む。ウイルスの不活化は、ウイルスの複製能を無能にするために、ウイルスを不活化化合物（例えば、ホルマリン、プロピオラクトン（「BPL」）、プロモエチルアミン（「BEA」）、およびバイナリーエチレンイミン（「BEI」）で処理することによって、または非化学的方法（例えば、熱、凍結/融解、もしくは超音波処理）によって達成することができる。

【0057】

以降の実施例では、刺激ウイルスとしてウマ/オハイオ/03が用いられた。これはフロリダ/43/04分離物と約99%の相同性を持つことが公知であり、イヌにおいて感染の症状および血清転換を誘発することが示されている。実施例18はウマインフルエンザワクチンのイヌにおける有効性を例証し、CARBIGEN（商標）アジュバントを含むワクチン組成物中の不活化Ohio 03抗原でワクチン接種されたイヌにおける血球凝集阻害（または「HI」もしくは「HAI」）力価を示す。表29は、ワクチン接種前、ワクチン接種後、および2回目ワクチン接種後、さらに刺激後の力価を示す。結果は、ワクチン接種したイヌにおけるワクチン接種後の各段階でのHI力価、および対照において増大がほとんどまたは全くないことを示す。表30は、同一試験からの臨床徴候、ウイルス分離、および病理組織学の結果を例証する。刺激された動物は臨床徴候、ウイルス排出、または明確な病理組織学を示さなかったが、陽性HI力価（表29）は免疫した動物における顕著な抗体価を示す。

30

40

【0058】

その他のH3インフルエンザウイルス抗原ワクチンも本発明に内包される点に留意されるべきである。本明細書および以降の実施例に記載されるそれらは本発明およびその好ましい態様を例証するために示されるものであって、特許請求される発明の範囲を制限するためのものではない。

【0059】

H3インフルエンザウイルス抗原以外のインフルエンザ抗原が本発明に従って用いられ得る点にも留意すべきである。このような抗原には、例えば、ウマA1亜型（H7N7）であるウマ/PA/63の抗原が含まれる。このような抗原の1つまたは複数が1つまたは複数のH3インフ

50

ルエンザ抗原を伴ってまたは伴わずに用いられ得ることが考えられる。

【0060】

一般に、ワクチンは治療上有効量にて投与される。「治療上有効量」とは、イヌ患者において標的ウイルスに対する防御反応を誘発するために十分な量である。典型的には、投与は、それがインフルエンザまたはその症状の1つもしくは複数（典型的には2つまたはそれよりも多く）を予防し、そのリスクを低減し、その発症を遅延し、その拡散を縮小し、緩解、抑制または根絶する場合、「治療上有効」である。典型的なインフルエンザの症状には、例えば、発熱（イヌでは典型的には $103.0\text{ }^{\circ}\text{F}$ ； $39.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）、咳嗽、くしゃみ、病理組織学的病変、眼分泌物、鼻分泌物、嘔吐、下痢、抑鬱、体重低下、空嘔吐、喀血、および/または聴取可能なラ音が含まれる。その他のしばしばより重度の症状には、例えば、肺、縦隔または胸膜腔における出血；気管炎；気管支炎；細気管支炎；支持性気管支肺炎；ならびに/または肺の上皮内壁および気道内腔における好中球および/もしくはマクロファージの浸潤が含まれる。

10

【0061】

ワクチンは、併用療法、即ち、ワクチン自体に加えて1つまたは複数の追加の活性物質、アジュバント、療法などの投与を含む療法の一部として投与してもよい。この場合、「治療上有効」量を構成するワクチンの量は、ワクチンが単独で投与される場合に「有効」量を構成するであろうワクチンの量よりも少ない可能性があることが認識されなければならない。その他の療法は、例えば、抗ウイルス剤、鎮痛薬、解熱剤、去痰剤、抗炎症剤、抗ヒスタミン剤、インフルエンザウイルス感染に起因する細菌感染を治療するための抗生物質、安静、および/または輸液など、当技術分野で公知の療法を含み得る。いくつかの態様において、本発明のワクチンは百日咳ワクチン、アデノウイルスワクチン、および/またはパラインフルエンザウイルスワクチンと組み合わせて投与される。

20

【0062】

いくつかの態様において、例えば、弱毒化生ワクチンの典型的用量は少なくとも約 10^3 pfu /イヌであり、より典型的には約 $10^3 \sim 10^9\text{ pfu}$ /イヌである。本発明において「pfu」は「プラーク形成単位」を意味する。いくつかの態様において、弱毒化生ワクチンの典型的用量は少なくとも約 10^3 TCID_{50} /イヌであり、より典型的には約 $10^3 \sim 10^9\text{ TCID}_{50}$ /イヌである。いくつかの態様において、弱毒化生ワクチンの典型的用量は少なくとも約 10^3 EID_{50} /イヌであり、より典型的には約 $10^3 \sim 10^9\text{ EID}_{50}$ /イヌである。いくつかの態様において、死菌ワクチンの典型的用量は少なくとも約40 HA単位であり、典型的には約40～約10,000 HA単位であり、より典型的には約500～約6200 HA単位である。いくつかの態様において、用量は約6100～約6200 HA単位である。

30

【0063】

いくつかの好ましい態様において、ワクチンは弱毒化生ワクチンを免疫原性量よりも少なくとも約 $10^{0.5}\text{ pfu}$ /イヌ高い濃度で含む。いくつかの好ましい態様において、ワクチンは弱毒化生ワクチンを免疫原性量よりも少なくとも約 $10^{0.5}\text{ TCID}_{50}$ /イヌ高い濃度で含む。いくつかの好ましい態様において、ワクチンは弱毒化生ワクチンを免疫原性量よりも少なくとも約 $10^{0.5}\text{ EID}_{50}$ /イヌ高い濃度で含む。

40

【0064】

免疫原性量は、当技術分野において一般的に公知である刺激用量滴定試験の手法によって実験的に求めることができる。このような手法には、典型的には、多くのイヌを異なる用量のワクチンでワクチン接種する工程、続いて、最低保護用量を求めるために病原性ウイルスでイヌを刺激する工程が含まれる。

【0065】

好ましい投与計画に影響を及ぼす要因には、例えば、対象の種類（例えば、種および品種）、年齢、体重、性別、食餌、活性、肺の大きさ、および状態；投与経路；用いられる特定のワクチンの有効性、安全性、および免疫期間のプロフィール；送達系が用いられるかどうか；さらにワクチンが薬剤および/またはワクチンの組み合わせの一部として投与されるのかが含まれ得る。従って、実際に用いられる投与量は具体的な動物におい

50

て変動することができて、従って、上記に示される典型的な投与量から逸脱する可能性がある。このような投与量調整の決定は、一般に、簡便な方法を用いて当業者の技術の範囲内である。弱毒化生ウイルスは一般に自己増殖性であり、従って、投与されるこのようなウイルスの具体的な量は必ずしも決定的ではない点にさらに留意すべきである。

【0066】

ワクチンはイヌの患者に対して1回で、またはもう一つの選択肢として数日、数週間、数カ月もしくは数年を通して2回もしくはそれよりも多い回数で投与される可能性があることが考えられる。いくつかの態様において、ワクチンは少なくとも2回投与される。いくつかのこのような態様において、例えば、ワクチンは2回投与されて、2回目の用量（例えば、ブースター）は1回目から少なくとも約2週間後に投与される。いくつかの態様において、ワクチンは2回投与されて、2回目の用量は1回目の後、8週間以内に投与される。いくつかの態様において、2回目の用量は、1回目の用量後約2週間から約4年、1回目の用量後約2から約8週間、または1回目の用量後約3から約4週間後に投与される。いくつかの態様において、2回目の用量は1回目の用量から約4週間後に投与される。上記の態様において、1回目およびその後の投与量は、例えば、量および/または剤形などを変更してよい。しかしながら、しばしば投与量は量および剤形に関して同一である。単回用量のみが投与される場合、その用量単独におけるワクチンの量は一般にワクチンの治療上有効量を含む。しかし、1回よりも多い用量が投与される場合は、それらの用量を統合したワクチンの量が治療上有効量を含み得る。

【0067】

いくつかの態様において、ワクチンはイヌレシピエントがインフルエンザに感染する前に投与される。このような態様において、ワクチンは、例えば、インフルエンザまたは1つもしくは複数（典型的には2つもしくはそれよりも多い）インフルエンザの症状を予防し、そのリスクを低減し、または発症を遅延させるために投与され得る。

【0068】

いくつかの態様において、ワクチンはイヌレシピエントがインフルエンザに感染した後投与される。このような態様において、ワクチンは、例えば、インフルエンザまたは1つもしくは複数（典型的には2つもしくはそれよりも多く）のインフルエンザ症状を緩解させ、抑制し、または根絶し得る。

【0069】

ワクチンの好ましい組成物は、例えば、ワクチンが不活化ワクチン、弱毒化生ワクチンまたはその双方であるかどうか依存する。またワクチンの投与の方法にも依存する。ワクチンが1つまたは複数の通常の薬学的に許容される担体、アジュバント、その他の免疫応答促進剤、および/またはビヒクル（vehicle）（集合的に「賦形剤（excipient）」と呼ばれる）を含むことが考えられる。このような賦形剤は、一般に、ワクチン中の活性成分と適合性であるように選択される。賦形剤の使用は、一般に当業者に公知である。

【0070】

「薬学的に許容される」という用語は、修飾された名詞が薬学的製品中での使用に適していることを意味するために形容詞的に用いられる。例えば、薬学的なワクチン中の賦形剤を示すために用いられる場合、それは賦形剤を組成物のその他の成分と適合性であり、意図されるレシピエントであるイヌに対して不都合に有害でないと見なす。

【0071】

ワクチンは、例えば、粘膜投与（鼻腔内、経口、気管内および眼科的など）ならびに非経口投与を含む通常の方法で投与することができる。粘膜投与はしばしば弱毒化生ワクチンにとって特に有利である。非経口投与は、しばしば、不活化ワクチンにとって特に有利である。

【0072】

粘膜ワクチンは、例えば、薬学的に許容される乳濁液、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキシル剤のような液体の剤形であり得る。このようなワクチンに適した賦形剤には、例えば、水、生理食塩液、デキストロース、グリセロール、ラクトース、ショ糖、デンプ

10

20

30

40

50

ン粉末、アルカン酸のセルロースエステル、セルロースアルキルエステル、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸および硫酸のナトリウムおよびカルシウム塩、ゼラチン、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、ならびに/またはポリビニルアルコールなどの当技術分野において広く用いられる不活性の希釈剤が含まれる。賦形剤は様々な湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、香料（例えば、甘味料）、および/または芳香物質を含むこともできる。

【0073】

口腔粘膜ワクチンは、例えば、簡便な投与のためにタブレット化またはカプセル化されてもよい。このようなカプセルまたはタブレットは徐放性製剤を含むことができる。カプセル、タブレットおよび丸剤の場合、投与剤形はクエン酸ナトリウム、または炭酸もしくは炭酸水素マグネシウムもしくはカルシウムのような緩衝物質も含むことができる。タブレットおよび丸剤はさらに腸溶コーティングを用いて調製することができる。

10

【0074】

ワクチンはイヌの患者の飲水および/または飼料を介して投与され得ることが考えられる。ワクチンはごちそうまたは玩具の形で投与され得ることがさらに考えられる。

【0075】

「非経口投与」には、皮下注射、粘膜下注射、静脈内注射、筋肉内注射、胸骨内注射、経皮注射および注入が含まれる。注射可能調製物（例えば、滅菌注射可能な水性または油性の懸濁液）は、ビヒクル、溶媒、分散媒、湿潤剤、乳化物質および/または懸濁物質のような適切な賦形剤を用いて公知の技術に従って製剤化することができる。これらには、典型的には、例えば、水、生理食塩液、デキストロース、グリセロール、エタノール、コーン油、綿実油、落花生油、ゴマ油、ベンジルアルコール、1,3-ブタンジオール、リンガー液、等張塩化ナトリウム液、無刺激性揮発性油（例えば、合成モノまたはジグリセリド）、脂肪酸（例えば、オレイン酸）、ジメチルアセトアミド、界面活性剤（例えば、イオン性および非イオン性洗剤）、プロピレングリコール、および/またはポリエチレングリコールが含まれる。賦形剤は、pH緩衝物質のようなその他の少量の補助的物質も含み得る。

20

【0076】

ワクチンは、イヌの患者の免疫応答（抗体反応、細胞反応またはその双方を含み得る）を促進して、それによってワクチンの有効性を高める1つまたは複数の賦形剤を含んでもよい。このような賦形剤（または「アジュバント」）の使用は、不活化ワクチンを用いる際に特に有益であり得る。アジュバントは、イヌの患者の免疫系の細胞に対して直接（例えば、サイトカインまたはカルメット-ゲラン桿菌（「BCG」））または間接的な効果（リポソーム）を持つ物質であり得る。しばしば適切なアジュバントの例には、油（例えば、鉱油）、金属の塩（例えば、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム）、細菌成分（例えば、細菌性リポサッカライド、フロイントアジュバント、および/またはMDP）、植物成分（例えば、Quil A）、ならびに/または担体効果を持つ1つもしくは複数の物質（例えば、ベントナイト、ラテックス粒子、リポソーム、および/もしくはQuil A、ISCOM）が含まれる。上記の通り、アジュバントは例えばCARBIGEN（商標）およびカルボポールをさらに含む。本発明は、アジュバントを含むワクチンならびにいかなるアジュバントも含まないワクチンの双方を含むことが認識されるべきである。

30

40

【0077】

ワクチンは保存のために凍結乾燥（または別の方法で液体の体積を減らして）、続いて、投与前または投与時に液体に再溶解され得ることが考えられる。このような再溶解は、例えば、ワクチン級の水を用いて実施され得る。

【0078】

本発明は、上記の方法の実施における使用に適したキットをさらに含む。キットは、上記のワクチンを含む投与剤形を含む。キットは、少なくとも1つの追加の成分、および典型的にはワクチンを追加の成分と共に使用するための説明書も含む。追加の成分は、例えば、投与前または投与中にワクチンと混合することができる1つまたは複数の追加の成分

50

(例えば、上記の賦形剤の1つもしくは複数、飼料、および/またはおやつなど)であり得る。追加の成分は、もう一つの選択肢として(または追加的に)、ワクチンをイヌの患者に投与するための1つまたは複数の装置を含み得る。このような装置は、例えば、シリンジ、吸入器、噴霧器、ピペット、鉗子、または医学的に許容される任意の送達用媒体であり得る。いくつかの態様において、装置はワクチンの皮下投与に適している。いくつかの態様において、装置はワクチンの鼻腔内投与に適している。

【0079】

医用薬剤または生物製剤に関する技術分野において公知のその他の賦形剤および投与モードを使用してもよい。

【0080】

本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、例えば、本発明のインフルエンザウイルスのHAタンパク質、NAタンパク質、核タンパク質、ポリメラーゼ塩基性タンパク質、ポリメラーゼ酸性タンパク質および/またはマトリックスタンパク質をコードする遺伝子を含み得る組換え型ウイルスベクターをベースとする構築物も含む。組換え型ベクター/ウイルス構築物を作成するために用いることができる任意の適切なウイルスベクターが本発明に従って用いられることが意図される。例えば、アデノウイルス、アピボックス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、カナリアボックス、エントモボックス、ブタボックス、ウェストナイルウイルス、および当技術分野において公知であるその他から派生するウイルスベクターは本発明の組成物および方法と共に使用することができる。コンポーネントをコードおよび発現する組換え型ポリヌクレオチドベクターは、当技術分野において標準的な遺伝子工学の手法を用いて構築することができる。さらに、本明細書に記載される様々なワクチン組成物は別々に、また互いに組み合わせて使用してもよい。例えば、動物の一次免疫化は単一または多くの系統のコンポーネントを持つ組換え型ベクターをベースとする構築物を使用し得て、続いて、不活化ウイルスまたは不活化ウイルス感染細胞株を含むワクチン組成物を用いて二次的追加免疫を行ってもよい。本発明のワクチン組成物を用いたその他の免疫化プロトコールは当業者には明白であり、本発明の範囲内と考えられる。

【0081】

本発明は、本発明のインフルエンザウイルスの少なくとも一つの遺伝子またはゲノムセグメント、および本発明の異なるインフルエンザウイルスまたは本発明のウイルス以外のインフルエンザウイルス由来のウイルス遺伝子またはゲノムセグメントの残りを含むリアソータントウイルスにも関する。リアソータントウイルスは、ドナーである本発明のインフルエンザウイルスの核酸とレシピエントであるインフルエンザウイルスの核酸の遺伝的リアソータント、およびその後のドナーウイルスの核酸を含むリアソータントウイルスの選択によって作出することができる。リアソータントウイルスを作出および分離するための方法は当技術分野において周知である(Fieldsら、1996年)。一つの態様において、本発明のリアソータントウイルスはヒト、トリ、ブタまたはウマインフルエンザウイルスの遺伝子またはゲノムセグメントを含む。本発明のリアソータントウイルスは、リアソータントウイルスが本発明のドナーインフルエンザウイルス由来の少なくとも1つの遺伝子またはゲノムセグメントを含む限り、ドナーおよびレシピエントインフルエンザウイルス由来の核酸の任意の組み合わせを含んでよい。一つの態様において、レシピエントインフルエンザウイルスはウマインフルエンザウイルスであり得る。

【0082】

ウイルスタンパク質の天然、組換え型または合成ポリペプチド、およびそのペプチド断片も、本発明の方法に従ってワクチン組成物として使用することができる。一つの態様において、ワクチン組成物はイヌインフルエンザウイルスのポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む。一つの態様において、ワクチン組成物は配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片または変異型を持つポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。具体的態様において、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18

10

20

30

40

50

、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76または78に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77に示されるヌクレオチド配列、または配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかの機能性および/もしくは免疫原性断片または変異型をコードする配列を含む。さらなる具体的態様において、本発明のポリヌクレオチドは以下を含むことができる：配列番号：3のヌクレオチド1～2271；配列番号：5のヌクレオチド1～2148；配列番号：7のヌクレオチド1～657；配列番号：9のヌクレオチド1～1494；配列番号：11のヌクレオチド1～1410；配列番号：13のヌクレオチド1～756；配列番号：15のヌクレオチド1～1695；配列番号：19のヌクレオチド1～2271；配列番号：21のヌクレオチド1～2148；配列番号：23のヌクレオチド1～657；配列番号：25のヌクレオチド1～1494；配列番号：29のヌクレオチド1～756；配列番号：31のヌクレオチド1～1695；配列番号：47のヌクレオチド1～2277；配列番号：49のヌクレオチド1～2271；配列番号：51のヌクレオチド1～2148；配列番号：53のヌクレオチド1～690；配列番号：55のヌクレオチド1～1494；配列番号：57のヌクレオチド1～1410；配列番号：59のヌクレオチド1～756；配列番号：61のヌクレオチド1～1695；配列番号：63のヌクレオチド1～2277；配列番号：65のヌクレオチド1～2271；配列番号：67のヌクレオチド1～2148；配列番号：69のヌクレオチド1～690；配列番号：71のヌクレオチド1～1494；配列番号：73のヌクレオチド1～1410；配列番号：75のヌクレオチド1～756；および配列番号：77のヌクレオチド1～1695。もう一つの態様において、ワクチン組成物は、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片または変異型を持つポリペプチドを含む。さらなる態様において、ワクチン組成物は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドがインフルエンザのポリヌクレオチドまたはポリペプチドと少なくとも約90%または少なくとも約95%、もしくは少なくとも約96%、もしくは97%、もしくは98%、または99%もしくはそれよりも高い配列同一性を持つウマインフルエンザウイルスのポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む。一つの態様において、多くの系統から由来するウイルスポリペプチドは、ワクチン組成物中で混合され得て、宿主動物にワクチン接種するために使用することができる。例えば、本発明のインフルエンザウイルスの少なくとも2つの異なる系統に由来するウイルス性HAタンパク質をベースとするポリペプチドがワクチンにおいて混合され得る。ポリペプチドは一つの系統に対して相同であり得て、またはアミノ酸配列が少なくとも2つの異なる系統に由来するポリペプチドの連結または結合によって派生する「ハイブリッド」または「キメラ」ポリペプチドを含んでもよい。ウイルス性ポリペプチドを調製するための手順は当技術分野において周知である。例えば、ウイルス性のポリペプチドおよびペプチドは固相合成法（Merrifield、1963年）を用いて合成することができる。ウイルスのポリペプチドおよびペプチドは、ウイルスのタンパク質またはペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を細菌、酵母または哺乳動物細胞株などの宿主細胞内で発現させて、その発現したタンパク質を当技術分野の標準的な技術を用いて精製する組換えDNA技術を用いて作成することもできる。

【0083】

本発明のワクチン組成物は裸の核酸組成物も含む。一つの態様において、核酸は本発明のインフルエンザウイルスのHAおよび/またはNAタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み得る。核酸ワクチン接種のための方法は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第6,063,385号および米国特許第6,472,375号において開示されている。核酸はプラスミドまたは遺伝子発現カセットの剤形であり得る。一つの態様において、核酸は動物に投与されるリポソームに被包されて提供される。

【0084】

10

20

30

40

50

本発明に従って用いることができるワクチン組成物ならびにポリペプチドおよび核酸などの免疫原は、薬学的に許容される担体または希釈剤と共に提供され得る。本発明において有用な化合物および組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するための公知の方法に従って製剤化してよい。製剤化については、当業者に周知であって容易に入手可能な多くの情報源に詳細に記載されている。例えば、E.W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Science, Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company、第19版、1995年は本発明と関連付けて用いることができる製剤化について述べている。一般に、本発明の組成物は、組成物の有効な投与を促進するために有効量の免疫原を適切な担体と組み合わせるように製剤化される。また、この方法で用いられる組成物は様々な剤形であり得る。これらには、例えば、錠剤、丸剤、粉剤、液剤または懸濁剤、坐剤、注射可能および不溶性の液剤、およびスプレーなど、固体、半固体および液体の投与剤形が含まれる。好ましい剤形は、意図する投与モードおよび治療適用に依存する。組成物は、好ましくは、当業者に公知である通常の薬学的に許容される担体および希釈剤も含む。このペプチド模倣物と共に使用するための担体または希釈剤の例には、水、生理食塩液、鉱油を含む油、エタノール、ジメチルスルホキシド、ゼラチン、シクロデキストラン、ステアリン酸マグネシウム、デキストロース、セルロース、糖、炭酸カルシウム、グリセロール、アルミナ、デンプン、ならびに相当する担体および希釈剤、またはこれらの任意の混合物が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の免疫原の製剤は、懸濁物質、保護剤、潤滑剤、緩衝剤、保存剤および安定剤を含んでもよい。所望の治療的投与のためのこのような用量の投与に備えるため、本発明の薬学的組成物は、好都合に、担体または希釈剤を含む組成物全体の重量に基づく免疫原の重量に基づいて約0.1% ~ 45%、特に1 ~ 15%を含む。

10

20

【0085】

本発明のワクチンおよび免疫原性組成物は当技術分野において周知の手順によって調製することができる。例えば、ワクチンまたは免疫原は、典型的には、例えば液体の溶液または懸濁液などの注射可能剤として調製される。ワクチンまたは免疫原は、投与製剤と適合する方法およびレシピエントにおいて治療上有効かつ免疫原性であるような量で投与される。特定のワクチンまたは免疫原製剤において最適な投与量および投与パターンについて、当業者は容易に判断することができる。

【0086】

本発明のペプチドおよび/またはポリペプチドは多抗原性ペプチド (MAP) 構築物の形で提供することができる。MAP構築物の調製はTam (1988年) に述べられている。MAP構築物は、免疫原の多数の複製が合成されるリジン残基のコアマトリックスを使用する (Posnettら、1988年)。それぞれが同一または異なる免疫原を含有する多くのMAP構築物が本発明の方法に従ってワクチン組成物として調製されて投与され得る。一つの態様において、MAP構築物は一つまたは複数のアジュバントと共に提供および/または投与される。本発明のインフルエンザポリペプチドは、一つまたは複数のポリペプチドを含む高分子タンパク質構造物としても作成および投与され得る。公開された米国特許出願であるUS2005/0009008には、インフルエンザウイルスのためのワクチンとしてウイルス様粒子を産生するための方法が開示されている。

30

【0087】

本発明の方法に従って、本明細書に記載されるワクチンおよび免疫原性組成物は、その後のウイルスによる宿主の刺激または感染に対して防御免疫を誘発するための有効な量および方法で、感受性の宿主、典型的にはイヌ科、より典型的には飼育慣らされたイヌに投与される。一つの態様において、宿主動物はイヌ科である。イヌには、オオカミ、コヨーテおよびキツネなど、野生、動物園および家庭のイヌが含まれる。イヌには、さらに、例えば、純系および/または雑種の伴侶犬などの家庭内のイヌ、ショードッグ、作業犬、牧羊犬、狩猟犬、番犬、警察犬、レース犬、および/または実験犬も含まれる。一つの具体的態様において、宿主動物はグレイハウンドのような飼育慣らされたイヌである。ワクチンまたは免疫原は、典型的には、例えば皮下、腹腔内または筋肉内のいずれかの注射により非経口的に投与される。その他の適切な投与モードは経口または鼻腔投与を含む。通常

40

50

はワクチンまたは免疫原は、動物に対して少なくとも2回、各投与間に1週またはそれよりも多い週の間隔を空けて投与される。しかし、ワクチンまたは免疫原の初回および追加免疫投与のためのその他の投与計画が、意図され、医師の判断および治療しようとする特定の宿主動物に依存し得る。

【0088】

ワクチン製剤中のウイルスおよびウイルス感染細胞は、当技術分野において公知の方法を用いて不活化または弱毒化してよい。例えば、完全ウイルスおよび感染細胞は、パラホルムアルデヒド、ホルマリン、プロピオラクトン (BPL)、プロモエチルアミン (BEA)、パイナリーエチレンイミン (BEI)、フェノール、UV光、高温、凍結融解、音波処理 (超音波処理を含む) などに曝露することによって不活化または弱毒化することができる。ワクチン用量中の無細胞の完全ウイルスの量は、約0.1mgから約5mgの範囲であり、より通常は約0.2mgから約2mgであることができる。ウイルス感染細胞株を含むワクチン製剤の投与量は、通常は、用量当たり約 10^6 個から約 10^8 個の細胞、より通常は用量当たり約 5×10^6 個から約 7.5×10^7 個の細胞を含む。動物のための用量中のタンパク質またはペプチド免疫原の量は、用量を投与される動物の大きさ、年齢などに依存して、約0.1 μ gから10000 μ g、または約1 μ gから5000 μ g、または約10 μ gから1000 μ g、または約25 μ gから750 μ g、または約50 μ gから500 μ g、または100 μ gから250 μ gまで変動し得る。

10

【0089】

ウイルスもしくはウイルス感染細胞またはウイルス性タンパク質もしくはペプチドなどの本発明の免疫原性またはワクチン組成物は、典型的には投与直前にアジュバントと混合してよい。ワクチン製剤での使用について意図されるアジュバントには、スレオニルムラミルジペプチド (MDP) (Byarsら、1987年)、サポニン、コリネバクテリウムパルバム (*Cornebacterium parvum*)、フロイント完全およびフロイント不完全アジュバント、アルミニウム、またはこれらの任意の混合物が含まれる。ミョウバンなど、本発明の方法およびワクチンとの使用に適切なその他の様々なアジュバントが当技術分野において公知であり、本発明との使用に関して意図される。

20

【0090】

本発明はさらに本発明のタンパク質またはペプチドと特異的に結合する抗体にも関する。本発明の抗体はモノクローナルおよびポリクローナル抗体組成物を含む。好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。抗体全体およびその抗原結合断片が本発明において意図される。従って、例えば、適切な抗体に結合した断片にはFab₂、FabおよびFv抗体断片が含まれる。本発明の抗体は、蛍光分子 (例えば、フルオレセインまたは酵素) などの検出可能分子で標識してよい。

30

【0091】

本発明は、本発明のインフルエンザウイルスの検出および同定、ならびに本発明のインフルエンザウイルスの動物への感染の診断のための方法および組成物にも関する。本発明の方法は、動物由来の生物学的試料におけるイヌインフルエンザの存在の検出を含む。試料中のイヌインフルエンザの検出は、動物におけるイヌインフルエンザを診断するために有用である。さらに、この情報は、ある期間にわたって存在するイヌインフルエンザの特徴的な量に基づいて動物の予後を判断するための能力を提供し得て、動物における治療のための物質および処置の選択を支援し、治療のモニタリングを支援することができる。この方法は、試験対象である動物のイヌインフルエンザの不在を証明する能力も提供する。

40

【0092】

動物におけるイヌインフルエンザ検出能は、異なる地理的位置におけるイヌインフルエンザの大流行の評価を可能とする。この情報はさらに早期の検出を可能とするので、感染した動物は疾患の蔓延を制限するために隔離することが可能であり、治療オプションの早期介入が可能となる。さらに、この有効な情報を持っていることは、医療担当者に対して、医療供給品および有効であればワクチンの組み立てを含めて、多くの疾病動物を治療するための準備の方向を提供することができる。

【0093】

50

一つの態様において、本発明の方法は、イヌなどの試験動物からの生物学的試料の採取を伴う。生物学的試料は、細胞、組織、被毛、全血、血清、血漿、乳頭吸引液、肺洗浄液、脳脊髄液、唾液、汗および涙を含む任意の生物材料であり得る。

【0094】

動物試験試料は、動物がインフルエンザの症状を発症しているか否かにかかわらず、イヌインフルエンザウイルスを持っていることが疑われる動物から採取され得る。また、対照試料は、イヌインフルエンザを持っていないことが公知である動物から提供または採取することができる。さらなる対照は、例えば、偽陽性および偽陰性の結果を抑制するため、アッセイ法の試薬がA型イヌインフルエンザウイルスを積極的に検出することを確認するために提供されてもよい。

10

【0095】

生物学的試料中のイヌインフルエンザの有無の検出に加えて、本発明で用いられる検出方法は核酸配列の変化など、環境、薬剤投与、遺伝子操作または突然変異、損傷、飼料の変化、加齢、または動物のその他の任意の特徴に起因し得るイヌインフルエンザウイルスにおける突然変異も検出することができる。突然変異は、また、イヌインフルエンザAを以前には有効であった薬剤に対して耐性とする、または異なる動物種、つまりヒトにおけるウイルスの感染および伝播を可能とする場合がある。例えば、トリインフルエンザAウイルスはその他の動物およびヒトに感染することが示されている。

【0096】

動物におけるインフルエンザウイルスを検出するための一つの態様において、診断は高品質の試料の採取、検査施設への迅速な輸送、および検査室での検査前の適切な保管によって促進される。ウイルスは、感染細胞および分泌物を含む試料中で最もよく検出される。一つの態様において、ウイルス抗原の直接検出のための、ならびに/または細胞培養中の核酸および/もしくはウイルス分離のための標本は、臨床症状発症直後の3日間に採取する。上気道のウイルス感染症の診断には、鼻腔スワブ、鼻咽頭スワブ、鼻咽頭吸引液、鼻腔洗浄液および咽頭スワブを含むがこれらに限定されない多くのタイプの標本が適切である。スワブに加えて、組織または血清の試料を採取してもよく、観血的手順も実施可能である。

20

【0097】

一つの態様において、呼吸器の標本を採取して1~5mlのウイルス輸送培地に入れて輸送する。様々なウイルスの回収に十分な多くの培地が市販されている。臨床標本は輸送培地に加えらる。鼻腔または鼻咽頭スワブもウイルス輸送培地に入れて輸送してよい。輸送培地の一つの例は、子ウシ抽出液 10gmおよびウシアルブミン画分V 2gmであり、無菌蒸留水に400mまで加える。硫酸ゲンタマイシン液 (50mg/ml) 0.8mlおよびアンホテリンB (250 µg/ml) 3.2mlなどの抗生物質も加えることができる。培地は、好ましくは、濾過処理によって滅菌する。無菌生理食塩液 (0.85% NaCl) などの鼻腔洗浄液も呼吸器ウイルスの標本の採取に使用することができる。

30

【0098】

一つの態様において、血清は臨床症状発症後すぐに、好ましくは7日以内に急性期の動物から採取した全血1~5mlから血清を採取する。例えば、症状発症後約14日など、回復期血清試料を採取してもよい。血清標本は、中和試験において呼吸器ウイルスに対する抗体の検出に有用であり得る。

40

【0099】

いくつかの場合において、試料は一定期間を通して個々の動物から採取され得る (例えば、1日1回、週1回、月1回、半年に1回、または年1回)。一定期間を通して個々の動物から多くの試料を採取することは、早期検出からの結果を確認し、さらに/または具体的な治療、例えば選択された治療薬剤に対する反応性または耐性を明らかにするために使用することができる。

【0100】

本発明の方法は、動物に由来する試験試料中の1つまたは複数の病理学的物質の存在、

50

および各病理学的物質の量を検出するために使用することができる。酵素結合免疫吸着法（ELISA）、間接蛍光抗体（IFA）試験、血球凝集および血球凝集阻害（HI）アッセイ法、ならびにウェスタンブロットを含む抗体アッセイ法を含むがこれらに限定されない病理学的物質を検出するための任意の方法を使用してよい。公知の細胞培養法も使用することができる。陽性培養は、細胞培養の免疫蛍光法または細胞培養用培地（上清）のHIアッセイ法を用いてさらに同定してもよい。

【0101】

さらに、核酸（DNAもしくはRNA）またはタンパク質を検出するための方法が使用できる。このような方法には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および逆転写酵素（RT）PCR試験およびリアルタイム試験、ならびに定量的なヌクレアーゼプロテクションアッセイ法が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらのアッセイ法を実施するための検査キットが市販されている。例えば、QIAGEN（Valencia, CA）より一段階RT-PCRキットおよびウイルスRNA抽出キットが販売されている。

10

【0102】

一つの態様において、方法は本発明のウイルスまたはウイルスタンパク質に特異的な抗体を使用する。一つの具体的態様において、本発明のウイルスのHAタンパク質に特異的な抗体が使用される。もう一つの態様において、本発明のウイルスのNPタンパク質に特異的な抗体が使用される。鼻腔または鼻咽頭域に由来するような適切な試料が動物から得られて、それからウイルスまたはウイルスタンパク質が単離される。続いて、本発明のウイルスのHAまたはNPなどのタンパク質に特異的な抗体の結合に関して、ウイルスコンポーネントがスクリーニングされる。もう一つの態様において、動物から血清試料（またはその他の抗体を含む試料）が得られて、この血清について本発明のウイルスのタンパク質に結合する抗体の存在をスクリーニングする。例えば、プレート壁が壁に結合するHAおよび/もしくはNPタンパク質、またはそのペプチド断片を持つ場合は、ELISA法が実施できる。続いて、プレート壁を試験動物由来の血清または抗体と接触させる。動物体内にHAおよび/またはNPタンパク質に特異的に結合する抗体が存在することは、その試験動物が本発明のインフルエンザウイルスに感染しているまたは感染したことがあることを示す。

20

【0103】

一つの態様において、病理学的物質の存在は生物学的試料におけるその物質に対する抗体の有無を調べることによって検出される。それは、動物の感染後、血液検査で抗体が検出できる前に一定期間（例えば、数カ月）を要することもある。一旦形成されると、抗体は、たとえ疾患の治療が成功した後であっても、通常は何年も持続する。インフルエンザAに対する抗体の検出は、感染が最近または過去のいつであったかは示すことはできない。

30

【0104】

抗体検査は液体に対しても実施することができる。抗体アッセイ法には、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、間接蛍光抗体（IFA）法、およびウェスタンブロットが含まれる。好ましくは、抗体検査は、例えばELISAまたはIFA、続くウェスタンブロットなど、多くのアッセイ法を用いて実施される。抗体アッセイ法は、ELISA法またはIFA法のいずれか、続いてウェスタンブロットアッセイ法を用いて2段階の過程で実施してよい。ELISAはIFAよりも信頼性の高い正確なアッセイ法と考えられるが、IFAはELISAが有効でない場合に使用できる可能性がある。（より特異的な試験である）ウェスタンブロット試験は、すべての動物、特に、ELISA法またはIFA法において陽性または境界域の陽性（不確か）とされている動物において実施することもできる。

40

【0105】

インフルエンザウイルスの検出に使用することができるその他の抗体をベースとする試験には血球凝集阻害試験が含まれる。血球凝集活性は、（Burlesonら、1992）およびKendallら、1982年が記載したように、ニワトリまたはシチメンチョウの赤血球を用いて動物由来の生物学的試料において検出可能である。一つの態様において、本発明のインフルエンザまたはHAタンパク質もしくはペプチドを血清または抗体を含む試験試料と接触させる。

50

続いて、トリなどの動物由来の赤血球（RBC）を加える。HAに対する抗体が存在すれば、RBCは凝集しない。HAに対する抗体が存在しない場合は、RBCはHAの存在下にて凝集する。標準的な血球凝集阻害アッセイ法に対する変更および修正は当技術分野において公知であり、本発明の範囲内と考えられる。

【0106】

動物の感染は、鼻腔または鼻咽頭スワブなどの試料からのウイルスの分離によっても調べることができる。ウイルス分離は、細胞培養および鶏卵接種法を含む標準的な方法を用いて実施してよい。

【0107】

さらなる態様において、核酸をベースとするアッセイ法を本発明のウイルスの検出のために使用することができる。一つの態様において、核酸試料は動物から得られて、その核酸が本発明のインフルエンザウイルスに特異的な配列を含む場合、その核酸は増幅産物を産生するプライマーを用いたPCRに供される。具体的態様において、RT-PCRが対象ウイルスのアッセイ法に用いられる。一つの例示的態様において、リアルタイムRT-PCRが本発明のインフルエンザウイルスについてアッセイするために用いられる。PCR、RT-PCRおよびリアルタイムPCR法は当技術分野において公知であり、米国特許第4,683,202号；米国特許第4,683,195；米国特許第4,800,159号；米国特許第4,965,188号；米国特許第5,994,056号；米国特許第6,814,934号、ならびにSaikiら（1985年）；Sambrookら（1989年）；Leeら（1993年）；およびLivakら（1995年）において開示されている。一つの態様において、PCRアッセイ法はインフルエンザマトリックス（MA）遺伝子および/またはHA遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドを使用する。増幅産物が本発明のインフルエンザウイルスの配列を持つか否かを調べるために、増幅産物をシーケンシングしてもよい。その他の核酸をベースとするアッセイ法は本発明のウイルスによるウイルス感染を検出および診断するために使用され得て、このようなアッセイ法は本発明の範囲内と考えられる。一つの態様において、核酸を含む試料について、ウイルスのポリヌクレオチドまたは遺伝子配列に特異的であるフォワードおよびリバースプライマーを用いて、PCRをベースとする増幅を行う。試料中の核酸がRNAである場合は、RT-PCRを実施してもよい。リアルタイムPCRについては、プライマーと共に検出可能プローブを使用する。

【0108】

多くの循環インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）遺伝子に特異的なプライマーセットが公知であり、引き続き開発中である。インフルエンザウイルスゲノムは一本鎖RNAであり、DNAコピー（cDNA）は逆転写酵素（RT）ポリメラーゼを用いて作成しなければならない。例えば、RT-PCRを用いたRNAゲノムの増幅は、典型的にはインフルエンザA亜型および公知のHA配列およびノイラミニダーゼ（NM）-1に基づいて設計されるオリゴヌクレオチドプライマーのペアを必要とする。このプライマーは、一つのウイルスの亜型のためのRNAを特異的に増幅するように選択することができる。亜型特異的なプライマーを用いて作成されるDNAは、シーケンシングなどの分子遺伝学的技術によってさらに分析され得る。この試験は好ましくは陽性対照を用いて実施され、または産物はシーケンシングおよび公知の配列との比較により確認される。ターゲットPCR産物がないこと（即ち、「陰性」の結果）は、ウイルスの存在を排除しない可能性がある。続いて、結果は、臨床スワブまたは感染細胞培養から数時間以内に得られる。インフルエンザウイルスAのPCRおよびRT-PCRについては、Fouchierら、2000年およびMaertzdorfら、2004年によって報告されている。

【0109】

本発明は、本発明のウイルスに対する抗ウイルス活性を持つ化合物または薬剤のスクリーニングのための方法にも関する。一つの態様において、本発明のウイルスに感染した細胞を試験化合物または薬剤と接触させる。続いて、接触後のウイルス量またはウイルス活性を測定する。抗ウイルス活性を示す化合物または薬剤をさらなる評価のために選択され得る。

【0110】

本発明は、本発明のインフルエンザウイルスに感染した単離細胞にも関する。一つの態様において、細胞は、イヌ腎上皮細胞などイヌの細胞である。

【0111】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドで形質転換した細胞にも関する。好ましくはポリヌクレオチド配列は本発明の発現構築物において提供される。より好ましくは、発現構築物は、本発明の機能的に結合したポリヌクレオチドの細胞内での過剰発現に備える。一つの態様において、細胞は、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78、またはその機能性断片もしくは変異型のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする配列を含むポリヌクレオチド配列で形質転換される。10
具体的態様において、細胞は、それぞれ、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75または77に示されるヌクレオチド配列を含む配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78の任意の機能性断片もしくは変異型をコードする配列で形質転換される。従って、
本発明は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77のいずれかに
20
示されるヌクレオチド配列、または配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75
もしくは77のいずれかの断片または縮重変異型を含む変異型を含むポリヌクレオチド配列で形質転換された細胞に関する。

【0112】

形質転換した細胞は、例えば、プロトプラストを含む植物細胞の真核細胞であり得て、または形質転換した細胞は例えば大腸菌または枯草菌 (*B. subtilis*) などの細菌細胞の原核細胞であり得る。動物細胞には、ヒトの細胞、哺乳動物細胞、特にイヌの細胞、トリの細胞および昆虫細胞が含まれる。植物細胞には、双子葉、単子葉および針葉樹の細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。 30

【0113】

本発明は、本発明のウイルスタンパク質またはポリペプチドを発現および産生するトランスジェニック植物を含む植物にも関する。本発明のポリヌクレオチドで形質転換された、または本発明のポリヌクレオチドを含むように交配された植物、植物組織および植物細胞は本発明によって意図される。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは植物、植物組織または植物細胞において過剰発現する。本発明のインフルエンザワクチン組成物を産生するために植物が使用され得て、この植物の摂取を介してワクチンを投与することができる (例えば、米国特許第5,484,719号および米国特許第6,136,320号を参照されたい)。

【0114】

本発明は、本発明のウイルスによるウイルスの検出または感染の診断のためのキットにも関する。一つの態様において、キットは本発明のインフルエンザウイルスに特異的に結合する本発明の抗体、またはその抗原性部分を含む。もう一つの態様において、キットは本発明の一つまたは複数のポリペプチドまたはペプチドを含む。具体的態様において、ポリペプチドは配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、33、34、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76もしくは78、またはその機能性および/もしくは免疫原性断片もしくは変異型のいずれかに示されるアミノ酸配列を持つ。さらなる態様において、キットは本発明の一つまたは複数のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む。具体的態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75もしくは77、またはその断片もしくは 40
50

は変異型のいずれかに示されるヌクレオチド配列を持つ。キットは、任意で、一つまたは複数の抗体、調節ポリペプチドもしくはペプチド、および/または調節ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを含む。キットの抗体、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、および/またはオリゴヌクレオチドは適切な容器またはパッケージに入れて提供され得る。

【0115】

本出願は、インフルエンザウイルスの感染および病原のためのモデルとしての雑種犬の使用にも関する。一つの態様において、雑種犬に、本発明のイヌインフルエンザウイルスのようなインフルエンザウイルスを接種する。任意で、接種後、イヌに治療用物質を投与してもよい。イヌは、ウイルスの接種前にインフルエンザウイルスに対する免疫応答を生じさせるための組成物を投与されていてもよい。組織、血液、血清およびその他の生物学的試料は、接種の前および/または後に入手され得て、PCR、RT-PCR、核酸シーケンシング、および免疫組織化学を含むがこれらに限定されない当技術分野において公知の方法を用いてウイルスの存在および組織の病原について調べられ得る。

10

【0116】

イヌインフルエンザウイルス株（「A/イヌ/フロリダ/43/2004」および「A/イヌ/フロリダ/242/2003」と命名）は、2006年10月9日にAmerican Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108に寄託された。イヌインフルエンザウイルス株（「イヌ/Jax/05」および「イヌ/マイアミ/05」と命名）は2006年10月27日にAmerican Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108に寄託された。本ウイルス株は、37 CFR 1.14および35 U.S.C. 122に基づいて、本特許出願の係属期間中、特許商標庁長官（the Commissioner of Patents and Trademarks）によって資格があると定められた人物が培養物を入手することが確保される条件下で寄託されている。寄託物は、本出願またはその子孫出願の同等物が出願される国において外国の特許法によって要求があれば、提供可能であろう。但し、寄託物が提供可能であることは、行政上の措置によって与えられる特許権の逸脱において、本発明を实践するための許可をなすものではないことが理解されるべきである。

20

【0117】

さらに、本ウイルス寄託物は、微生物の寄託に関するブダペスト条約の規定に従って保存および公開されるものであり、即ち、寄託物の試料の分譲に関する最新の請求後少なくとも5年間、およびいかなる場合も、寄託日から少なくとも30年間または培養物の開示内容を発行し得る任意の特許の権利行使可能期間にわたって、生存可能かつ汚染のない状態に維持されるために必要なあらゆる注意を持って保存される。寄託者は、寄託物の条件のために、要請があった場合に寄託機関が試料を分譲できない場合は寄託物を取り替える義務を負うことを了承する。本培養寄託物の公開可能性に関する全ての制限は、それを開示する特許が許可され次第、変更不可能に排除されるであろう。

30

【0118】

表57は、A/イヌ/フロリダ/43/2004 (Ca/Fla/43/04) と同定されたイヌインフルエンザウイルスと、H3N8ウマ分離物およびイヌ/フロリダ/242/2003分離物のヘマグルチニン（つまり「HA」）、ノイラミニダーゼ（つまり「NA」）および核タンパク質（NP）の遺伝子によってコードされるアミノ酸配列の類似性を示す。

40

【0119】

本明細書に開示される任意の態様の任意の要素は本明細書に開示される任意のその他の要素または態様と組み合わせることが可能であり、このような組み合わせは特に本発明の範囲内と考えられる。

【0120】

本明細書において言及または引用されるすべての特許、特許出願、仮出願、および刊行物は、それらが本明細書の明確な開示と相反しない限り、すべての図および表を含めて、参照により全体が組み入れられる。

【0121】

50

実施例1～6の材料および方法

グレイハウンドからの血液および鼻腔スワブの採取

呼吸器疾患の大流行が発生しているレース用犬舎の臨床的に疾患または正常なグレイハウンドから、頸静脈穿刺により急性期および回復期の血液試料を採取した。回復期試料は急性試料の4～12週後に採取した。血清を回収し、-80℃で保存した。鼻腔スワブを採取して、細菌分離のための提出まで活性炭を加えたAmies輸送培地（Becton Dickinson Biosciences）中に置いた。

【0122】

グレイハウンドの死亡後検査

2004年1月のフロリダトラックでの大流行において死亡した8頭中5頭のグレイハウンドについて、University of Florida College of Veterinary Medicine（UF CVM）のAnatomic Pathology Serviceにて徹底した死亡後検査を実施した。もう1頭のイヌの死亡後検査は個人の動物病院で実施されて、組織を病理組織学的診断のためにUF CVMに提出した。組織は10%中性緩衝ホルマリン中で固定して、パラフィンに包埋し、5μmの切片を病理組織学的診断のためのヘマトキシリン・エオジンで染色するか、または以下に記載する通り免疫組織化学的検査に備えて加工した。未固定の組織は細菌培養に提出して、同じく-80℃で保存した。

【0123】

イヌウイルス性呼吸器病原体に関する血清学的検査

急性期および回復期の対の血清試料は、イヌジステンパーウイルス、2型アデノウイルスおよびパラインフルエンザウイルスに対する血清中和試験のため、Cornell University College of Veterinary MedicineのAnimal Health Diagnostic Laboratory（AHDL）に送付した。抗体価は、細胞培養物のウイルス感染を阻害する血清の最終希釈として表される。急性期および回復期試料間の抗体価の4倍の増加として定義される血清変換はウイルス感染を示した。これらのウイルス性病原体に対する血清変換は検出されなかった。

【0124】

イヌ細菌性呼吸器病原体に関する微生物検査

対の鼻腔スワブおよび死亡後組織は、細菌の分離および同定のためにUF CVMのDiagnostic Clinical Microbiology/Parasitology/Serology Serviceに送付した。試料は、非選択培地ならびにボルデテラ属（Regan-Lowe; Remel）およびマイコプラズマ属（Remel）の選択培地で培養した。すべての培養物は、増殖なしと報告する前に21日間維持した。数頭のグレイハウンドから得られた鼻腔スワブは、細菌培養のためにKansas State University College of Veterinary MedicineのDepartment of Diagnostic Medicine/Pathobiologyにも送付した。臨床的に疾患が認められて試験が行われた70頭のイヌの内、気管支敗血症菌（*Bordetella bronchiseptica*）が1頭のイヌの鼻腔から分離されて、マイコプラズマ属は33頭のイヌの鼻腔から回収された。パスツレラ・ムルトシダは、膿性鼻分泌物の見られるイヌの鼻腔から広く回収された。2004年1月の大流行で死亡したイヌの内の2頭では死亡後に肺に若干の大腸菌の増殖が認められ、1頭では大腸菌およびストレプトコッカス・カニス（*Streptococcus canis*）の若干の増殖が見られ、またもう1頭では緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）および酵母の若干の増殖が認められた。死亡したイヌの気管または肺からは、気管支敗血症菌およびマイコプラズマは分離されなかった。

【0125】

死亡後組織からのウイルスの分離

凍結組織を融解して、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）および抗生物質を強化した10倍量の最小必須培地（MEM）を加えてホモジナイズした。遠心分離により固体の細片を除去して、上清を培養細胞または10日齢の孵化鶏卵に接種した。死亡したグレイハウンド由来の組織ホモジネートを、広範囲のウイルス性病原体の複製を支持する種々の細胞培養物に接種した。細胞培養物には、Vero（アフリカミドリザル腎上皮細胞、ATCC No. CCL-81）、A-72（イヌ腫瘍線維芽細胞、CRL-1542）、HRT-18（ヒト直腸上皮細胞、CRL-11663）、MDCK（イヌ腎上皮細胞、CCL-34）、イヌ一次腎上皮細胞（AHDL, Cornell University）、

10

20

30

40

50

イヌ一次肺上皮細胞 (AHDL)、およびウシ一次精巢細胞 (AHDL) が含まれた。MDCKおよびHRT細胞は2.5 µg/mL TPCK処理トリプシン (Sigma) を強化したMEMで培養し、残りの細胞株は10% ウシ胎児血清および抗生物質を強化したMEMで培養した。細胞は、25cm²のフラスコを用いて5%CO₂含有加湿大気中、37℃で培養した。対照培養には強化MEMを接種した。培養物は形態学的変化を1日1回観察して、接種後5日に回収した。回収した液体および細胞は遠心分離により清澄化して、最初の接種において記載した通り、新鮮な細胞に接種し、2回の盲目継代を行った。清澄化した上清の血球凝集活性は、記載される通り (Burlesonら、1992年; Kendalら、1982年)、ニワトリまたはシチメンチョウの赤血球を用いて測定した。鶏胚を用いたウイルス分離では、組織ホモジネートの0.1mLを尿膜嚢に接種して、35℃にて48時間、インキュベートした。2回の盲目継代後、尿膜腔液の血球凝集活性を、記載される通り (Burlesonら、1992年; Kendalら、1982年)、測定した。

10

【0126】

RT-PCR、ヌクレオチドシーケンシング、および系統学的解析

製造業者の説明書に従ってRNeasyキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、組織培養上清または尿膜腔液から全RNAを抽出した。全RNA (10ng) は、一段階RT-PCRキット (Qiagen, Valencia, CA) を製造業者の説明書に従って使用して、cDNAに逆転写した。cDNA内の8つのインフルエンザウイルス遺伝子のコード領域のPCR増幅は、汎用遺伝子特異的プライマーセットを用いて既報 (Klimovら、1992a) の通り実施した。得られたDNA単位複製配列は、サイクルシーケンシングダイターミネーターケミストリー (ABI) を用いたApplied Biosystems 3100自動DNAシーケンサーでの自動シーケンシングのための鋳型として用いられた。ヌクレオチド配列は、GCG Package (著作権)、バージョン10.0 (Accelrys) (Womble, 2000) を用いて解析した。ヌクレオチド配列からの系統発生の推定およびブーstrapの算出にはPhylogeny Inference Package (著作権) バージョン3.5を用いた (Felsenstein, 1989年)。系統樹は、MEGA (著作権) プログラム (Kumarら、2004年) において実行されたTamura-Neiガンマモデルを用いて近隣結合法により得られた系統樹と比較して、PAUP (著作権) 4.0ベータプログラム (Sinauer Associates) により確認した。

20

【0127】

イヌの実験的接種

6カ月齢の4頭の特定病原体除去ビーグル犬 [(雌雄各2頭 (Liberty Research))] を使用した。理学的検査、ならびに詳細な血球計測/型別計測を含むベースラインの血液検査、血清化学的検査パネル、および尿検査より、動物が健常であることが明らかとなった。動物は、実験動物管理認定協会より認定されたBSL 2-強化施設内で群飼いた。ベースラインの直腸温度は1日2回、7日間、記録した。イヌは、気管内チューブの挿管に備えて、プロポフォル (ディプリバン (登録商標)、Zeneca Pharmaceuticals、0.4mg/kg体重 ~ 効果) の静脈内注入により麻酔した。各イヌにA/イヌ/フロリダ/43/2004 (イヌ/FL/04) (H3N8) ウイルスを10^{6.6}の半数組織培養物感染用量 (TCID₅₀) の総用量で接種して、半量は気管内チューブを介して気管末端に投与して、残りの半量はカテーテルを介して深部鼻気道に投与した。理学的検査および直腸温の記録は、1日2回、接種後 (p.i.) 14日間実施した。p.i.0、3、5、7、10および14日に頸静脈穿刺により血液試料 (4mL) を採取した。鼻腔および口咽頭の標本は、各イヌからp.i.0~5、7、10および14日にポリエステルスワブ (Fisher Scientific) を用いて採取した。スワブはウイルス輸送培地 (Remel) に回収して、-80℃で保存した。2頭のイヌ (雌雄各1頭) はp.i.5日にBeuthanasia-D (登録商標) 液 (1mL/5kg体重; Schering-Plough Animal Health Corp) の静脈内接種により安楽死させて、残りの2頭は14日目に死亡後検査のために安楽死させた。組織学的検査のための組織は既述の通り加工した。ウイルス培養用の組織は-80℃で保存した。この試験は、University of Florida Institutional Animal Care and Use Committeeにより承認された。

30

40

【0128】

実験的に接種されたイヌからのウイルス排出

肺ホモジネート、および遠心分離によるスワブ輸送培地の清澄化により調製したスワブ

50

抽出液の段階希釈は、0.5%BSAおよび抗生物質を強化したMEMで調製した。ブランクアッセイ法は、6穴組織培養プレート中の単層のMDCK細胞を用いて既報（Burlesonら、1992年）の通り実施した。接種した単層細胞層に0.8%アガロースおよびTPCK-トリプシン 1.5 μg/mLを含む強化MEMを重ねた。細胞は、固定およびクリスタルバイオレットでの染色前に、5%CO₂を含む加湿大気中で37℃にて72時間、培養した。ウイルス濃度は、組織1グラム当たりまたはスワブ当たりのブランク形成単位（PFU）として表した。

【0129】

免疫組織化学

グレイハウンドおよびビーグル犬由来の脱パラフィンおよび再水和した5 μm肺組織切片をBond-Rite（商標）スライドガラス（Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI）にセットして、プロテイナーゼK（DakoCytomation, Carpinteria, CA）、ペルオキシダーゼ遮断試薬（Dako（登録商標）En Vision（商標）Peroxidase Kit, Dako Corp.）で順次処理した。切片を、イヌジステンパーウイルス（VMRD, Inc.）、2型イヌアデノウイルス（VMRD, Inc.）、イヌパラインフルエンザウイルス（VMRD, Inc.）、またはインフルエンザA H3（Chemicon International, Inc.）に対するモノクローナル抗体の1:500希釈と共に室温で2時間インキュベートした。対照には、同一の切片とマウスIgG（1mg/mL、Serotec, Inc.）のインキュベート、およびモノクローナル抗体と通常のイヌ肺切片のインキュベートが含まれた。一次抗体で処理した後、切片は製造業者の説明書に従って二次イムノペルオキシダーゼおよびペルオキシダーゼ基質試薬（Dako（登録商標）EnVision（商標）Peroxidase Kit, Dako Corp.）と共にインキュベートした。切片をヘマトキシリンで対比染色して、清澄化剤#2およびBluing試薬（Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI）で処理して脱水し、Permount（ProSciTech）を用いてカバーガラスをかけた。

【0130】

血球凝集阻害（HI）試験

血清試料は、56℃での60時間の熱失活前に、レセプター破壊酵素（RDE, Denka）（血清1容積：RDE 3容積）と共にインキュベートした。インフルエンザA/イヌ/FL/04（H3N8）ウイルスはMDCK細胞を用いて37℃にて36～48時間、増殖させた。ウイルス培養の上清を回収して、遠心分離により清澄化して-80℃で保存した。HIアッセイ法は既報（Kendalら、1982年）の通り実施した。つまり、25 μl中4血球凝集単位のウイルスをマイクロタイターウェルの段階希釈した等量の血清に加えて、室温で30分間、インキュベートした。等量の0.5% v/vシチメンチョウ赤血球を加えて、30分後に血球凝集力価を目視により求めた。エンドポイントのHI力価は、血球凝集を完全に阻害する血清の最終希釈として定義された。血清変換は、急性期および回復期の対の試料間におけるHI力価の4倍の増大として定義された。単一試料の血清陽性は1:32のHI抗体価として定義された。

【0131】

マイクロ中和（MN）試験

A/イヌ/FL/04（H3N8）に対する血清抗体反応の中和は、既報のMNアッセイ法（Roweら、1999年）により検出された。但し、イヌ血清はアッセイ前に上記のようにRDE処理した。エンドポイントの力価は、100 TCID₅₀のウイルスを50%中和する血清の最高希釈として定義された。血清変換は、急性期および回復期の対の試料間におけるMN力価の4倍の増大として定義された。単一試料の血清陽性は1:80のMN力価として定義された。

【0132】

以下は、本発明を実践するための手順を例示する実施例である。これらの実施例は限定として見なされるべきではない。特記する場合を除いて、すべてのパーセントは重量に基づき、すべての溶媒混合物割合は体積に基づく。

【0133】

実施例1

2004年1月に、フロリダのトラックの2箇所の犬舎およびこれらの犬舎にイヌを供給する地元飼育場で飼育されている22頭のレース用グレイハウンドにおいて、呼吸器疾患の大流行が発生した。各犬舎建物には約60頭、飼育場には約300頭のイヌがいた。大流行は6日間

起こって、その後、新しい症例は特定されなかった。22頭中14頭のイヌが39.5～41.5 の発熱を示し、10～14日間にわたって咳をして、最終的に回復した。残りの8頭の内、見かけ上健康であった6頭のイヌは予想に反して死亡して、口および鼻から出血が見られた。その他の2頭のイヌは、急激な悪化のために、口および鼻からの出血発生の24時間以内に安楽死させた。これらの双方のイヌは41 の熱があった。8頭中4頭の死亡が犬舎施設で発生して、4頭は飼育場で発生した。死亡の50%が大流行の3日目に発生した。22頭のイヌは17カ月齢から4歳であったが、73%は17～33カ月齢であった。

【0134】

2つの臨床的症候群が認められた：初期の発熱およびその後の10～14日間の咳、その後の回復を特徴とする比較的軽度の疾病（14頭のイヌ）、または呼吸器の出血を伴う極めて急激な死亡（8頭、死亡率 36%）。致命的な症例の8頭中6頭について、死亡後検査を実施した。すべてのイヌが、肺、縦隔および胸膜腔に過度の出血を示した。呼吸器の組織学的検査の結果、肺出血に加えて、すべてのイヌが気管炎、気管支炎、細気管支炎、および化膿性気管支肺炎を示した（図3）。これらの組織の上皮裏打ちおよび気道腔に好中球およびマクロファージの浸潤が見られた。これらのイヌから調製した肺ホモジネートをウイルス培養のために、サル、ヒト、ウシおよびイヌの様々な細胞株に接種した。1頭のイヌの肺ホモジネートがトリプシンの存在下で培養したMadin-Darbyイヌ腎上皮細胞（MDCK）において細胞変性作用を引き起こし、細胞培養の上清はニワトリ赤血球を凝集した。A型インフルエンザウイルスの予備的証拠は、インフルエンザAおよびBウイルスの核タンパク質の検出に関する市販のELISA、ならびにインフルエンザAウイルスのマトリックス遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR解析により得られた。さらに、血球凝集活性はウマインフルエンザA H3亜型に対する参照抗血清により阻害されたが、ヒトインフルエンザAのH1-H11およびH13亜型に特異的な抗血清では阻害されなかった（表3）。ウイルスの分子特性を解明するため、本発明者らはウイルスゲノムの8つのRNAセグメントのヌクレオチド配列を調べた。公知のインフルエンザウイルス遺伝子との配列の比較および系統学的解析により、イヌ分離物の8つの遺伝子は、現代のウマインフルエンザA（H3N8）ウイルス由来のそれに極めて類似し、96～97%の配列同一性を持つ（図1A、表4）。これに対して、トリ、ブタおよびヒトのインフルエンザA分離物由来の代表的遺伝子はイヌ分離物と94%の同一性を示した（表4）。これらのデータは、イヌ分離物であるA/イヌ/フロリダ/43/2004（イヌ/FL/04）をウマインフルエンザウイルスの現代の系統に密接に関連するインフルエンザA H3N8と同定した。イヌ分離物のすべての遺伝子がウマインフルエンザウイルス由来であったことから、本発明者らはウマインフルエンザウイルスの全ゲノムがイヌに伝播されたと結論づけた。

【0135】

実施例2

グレイハウンドの臨床的および病理学的観察所見におけるイヌ/FL/04ウイルスの役割について検討するため、本発明者らはインフルエンザA H3に対するモノクローナル抗体を用いて肺組織の免疫組織化学的染色（IHC）を実施した。ウイルス性H3抗原は気管支および細気管支の上皮細胞、気管支腺上皮細胞の細胞質に一貫して検出され、またマクロファージは気道腔および肺胞腔に検出された（図2A）。これらのデータは、多くのイヌにおけるH3亜型のインフルエンザウイルスの肺感染の診断を支持する。

【0136】

実施例3

呼吸器疾患大流行の病因論におけるイヌ/FL/04様ウイルスの関与について調べるため、本発明者らは血球凝集阻害（HI）およびマイクロ中和（MN）により病気のイヌ11頭および無症状の接触犬16頭から採取した急性期および回復期の対の血清を分析した。急性期から回復期までのイヌ/FL/04に対する抗体価の4倍の増加として定義される血清変換が、両アッセイ法において、11頭中8頭（73%）の病犬で発生した（表1）。血清変換はHIアッセイ法では16頭中6頭（38%）の無症状接触犬で発生し、MNアッセイ法では16頭中8頭（50%）が血清変換を示した（表1）。血清変換のデータは、イヌのイヌ/FL/04様ウイルスの感

染が大半の動物において呼吸器疾患の発症と時間的に一致することを実証した。

【 0 1 3 7 】

大流行の3カ月後に、病犬と共に飼育されていたさらに46頭の無症状のイヌから単一の血清試料を採取した。これらの内、43検体（93%）が両アッセイ法において血清陽性であった。検査した73頭の集団全体については、病犬の82%（11頭中9頭）および健常接触犬の95%（62頭中59頭）を含む93%が両アッセイ法において血清陽性であった。呼吸器疾患歴のないイヌにおける高い血清疫学は、イヌインフルエンザウイルスの大半の感染は不顕性であることを示しており、イヌにおけるウイルスの効率的伝播が示唆される。不顕性感染がウイルスの伝播に寄与するか否かは不明である。

【 0 1 3 8 】

実施例4

イヌ/FL/04ウイルスのイヌへの感染能力についてより理解するために、4頭の6カ月齢の純系ビーグル犬に $10^{6.6}$ 半数組織培養物感染用量（TCID₅₀）を気管内または鼻腔内経路によりそれぞれ接種した。すべてのイヌが接種後（p.i.）最初の2日間に発熱（直腸温 39）を発症したが、14日間の観察期間を通して咳または鼻分泌物などの呼吸器症状を示したものはなかった。ウイルス排出は、鼻および口咽頭のスワブにおけるウイルスの定量によって調べた。4頭中2頭のイヌのみが検出可能量のウイルスを排出した。1頭のイヌはp.i.1日および2日にウイルスを排出し（スワブ当たり $1.0 \sim 2.5 \log_{10}$ PFU）、その他のイヌは接種後連続4日間にわたってウイルスを排出した（スワブ当たり $1.4 \sim 4.5 \log_{10}$ PFU）。p.i.5日における2頭のイヌの死亡後検査より、グレイハウンドにおける自然発生性疾患に見られる所見とほぼ等しい壊死性増殖性気管炎、気管支炎および細気管支炎が認められたが、肺出血または気管支肺炎は認められなかった。IHCにより、ウイルスH3抗原が気管支、細気管支および気管支腺の上皮細胞の細胞質に検出された（図2B）。感染性ウイルスが1頭のイヌの肺組織から回収された。p.i.14日における残りの2頭の死亡後検査より、呼吸組織における最小限の組織学的変化、IHCによるウイルスH3抗原の不在、および肺ホモジネートからのウイルスの無回収が確認された。これらの後者の2頭のイヌにおける血清変換は、MNアッセイ法においてp.i.7日に検出され、14日までに抗体価はさらに2～3倍に増加した。これらの結果より、熱性反応、肺実質におけるウイルス抗原および感染性ウイルスの存在、インフルエンザに典型的な病理組織学的所見、ならびに血清変換に示されるように、イヌ/FL/04感染に対するイヌの感受性が確立された。実験的に接種したビーグル犬において重度の疾患および死亡を再現できなかったことは、自然感染したグレイハウンドの大集団が無症候性であったことを考えると、驚くべきことではない。

【 0 1 3 9 】

実施例5

2004年1月の大流行以前にイヌ/FL/04様インフルエンザウイルスがフロリダのグレイハウンド集団で広まっていたかどうかを調べるため、65頭のレース用グレイハウンドに由来する保存血清についてHIおよびMNアッセイ法を用いてイヌ/FL/04に対する抗体の存在を調べた。1996年～1999年に試料採取した33頭のイヌでは、検出可能な抗体はなかった。2000年～2003年に試料採取した32頭の内、9頭は双方のアッセイ法において血清陽性であった - 2000年に1頭、2002年に2頭、および2003年に6頭（表5）。血清陽性のイヌは1999年から2003年まで病因不明の呼吸器疾患の大流行に関与したフロリダのトラックで飼育されており、イヌ/FL/04様ウイルスがこれらの大流行の原因物質であった可能性があることを示唆する。この可能性をさらに調べるために、本発明者らは2003年3月に出血性気管支肺炎のために死亡したグレイハウンドから採取された保存組織を調べた。1頭のイヌに由来する肺ホモジネートをMDCK細胞および鶏胚に接種したところ、H3N8インフルエンザウイルスが回収されて、A/イヌ/フロリダ/242/2003（イヌ/FL/03）と命名された。イヌ/FL/03の完全ゲノムの配列解析はイヌ/FL/04に対して>99%同一性を示し（表4）、イヌ/FL/04様ウイルスが2004年以前にグレイハウンドに感染していたことを示す。

【 0 1 4 0 】

実施例6

2004年6月から8月にフロリダ、テキサス、アラバマ、アーカンソー、ウェストバージニアおよびカンザスの14箇所のトラックで何千頭ものレース用グレイハウンドに呼吸器疾患の大流行が発生した。

【0141】

これらのいくつかのトラックの担当者は、それらのイヌ集団の少なくとも80%が臨床疾患を有すると推定した。大半のイヌは2004年1月の大流行時のイヌと同様の発熱（39）および咳の臨床徴候を示したが、多くのイヌは粘液膿性の鼻分泌物も呈した。多くの死亡が報告されたが、正確な死亡率は求められなかった。

【0142】

本発明者らは、フロリダの4箇所のトラックに収容されている94頭のイヌから急性期および回復期の対の血清を採取し：これらのイヌの56%はイヌ/FL/04に対する抗体価が4倍に上昇しており、100%が血清陽性であった（表6）。ウェストバージニアおよびカンザスの29頭のイヌから得られた回復期血清もイヌ/FL/04に対する抗体を有した。本発明者らは、テキサスのトラックで出血性気管支肺炎のために死亡した1頭のグレイハウンドの肺からインフルエンザA（H3N8）ウイルスを分離した。A/イヌ/テキサス/1/2004（イヌ/TX/04）と命名されたこの分離物の全ゲノムをシーケンシングした結果、イヌ/FL/04と99%の同一性を示した（表4）。13カ月の期間中の致命的なイヌの症例および地理的に異なる位置から得られた密接に関連する3つのインフルエンザウイルスの分離、ならびにレース用グレイハウンドにおける広範な感染を示す実質的な血清学的証拠は、イヌ集団においてイヌ/FL/04様ウイルスが持続的に広がっていることを示唆する。

【0143】

イヌ/FL/03、イヌ/FL/04およびイヌ/TX/04のHA遺伝子を系統発生的に解析した結果、それらは単系統性のグループを構成し、頑健なブーツストラップはその系統が2002年および2003年に分離されたウマウイルスの現代のH3遺伝子とは明らかに異なったことを裏付けている（図1B）。その他の7つのゲノムセグメントの系統学的解析およびヌクレオチド配列の対比較より、イヌ遺伝子がウマウイルスの系統に最も密接に関連する異なる亜系統として分離したことを裏付けている（データは示さず、表4）。ウマインフルエンザから分離した単系統性のグループとしてのイヌインフルエンザウイルスのクラスター形成は、HAにおける4つのサインアミノ酸変化の存在によっても裏付けられる（表2）。2003年および2004年の血清学的結果と共に、これらのデータはウマからイヌへの単一のウイルス伝播およびその後のグレイハウンド集団内でのウイルスの水平伝染と一致する。しかし、未同定の保有動物種からの固有系統のインフルエンザウイルスの度重なる導入は、可能性はなさそうであるが、正式には除外することはできない。

【0144】

ウイルスHAは、インフルエンザウイルスの宿主動物特異性に関する重要な決定要因である（Suzukiら、2000年）。イヌ宿主への適応に関連し得るHA内の残基を特定するため、本発明者らは、イヌHAの推定したアミノ酸配列を現代のウマウイルスのそれと比較した。ウマおよびイヌの成熟HA共通アミノ酸配列は、4つのアミノ酸変化によって区別される：N83S、W222L、I328TおよびN483T（表2参照）。イヌウイルスには、共通ウマ配列に比してアミノ酸の欠失が見られる。従って、HAウマ配列の7位のアミノ酸はHAイヌ配列では6位であり、HAウマ配列の29位のアミノ酸はHAイヌ配列では28位であり、HAウマ配列の83位のアミノ酸はHAイヌ配列では82位などである。このように、4つの置換アミノ酸は配列番号：33および配列番号：34に示されるアミノ酸配列の82、221、327および482位である。その他の動物種に由来するH3分子では様々な極性残基が見られることから、共通配列83位のアスパラギンのセリンへの置換は機能的な重要性の不明な変化である。H3 HA開裂部位近くの共通配列328位における厳密に保存されたイソロイシンはスレオニンによって置換されている。病原における宿主プロテアーゼによるHA開裂の中核的役割は、この変化がさらなる試験に値することを示唆している。共通配列222位のトリプトファンからロイシンへの置換は、レセプター機能を調節することができるシアル酸結合ポケットに隣接する非保存的变化であることから（Weisら、1988年）、非常に際立っている。面白いことに、222位のロ

イシンは、典型的にH4、H8、H9およびH12 HA亜型に見られることから（Nobusawaら、1991年；Kovacovaら、2002年）、イヌH3 HAに固有ではない。ブタのH4亜型の感染（Karasinら、2000年）ならびにヒトおよびブタのH9亜型ウイルスの感染（Peirisら、1999年）が報告されていることから、ロイシンの置換は哺乳動物宿主におけるウイルス特異性とさらに適合性であり得る。共通配列483位におけるスレオニンによるアスパラギンの置換の結果、すべてのHA亜型で保存されるHA2サブユニットにおける糖鎖付加部位の消失が起こった（Wagnerら、2002年）。ウマウイルスのイヌへの適応に際してのHAにおけるこれらのアミノ酸の変化の重要性は依然明らかにされていないが、これまでに同様のアミノ酸変化が種間伝播に関連して観察されている（Vinesら、1998年；Matrosovichら、2000年）。本発明のその他のインフルエンザウイルスタンパク質およびウマ共通配列のアミノ酸の相違点を表19～25に示す。

10

【0145】

レース用 그레이ハウンドに最初に感染したウマインフルエンザウイルスのソースは依然推論的である。 그레이ハウンド競技場の犬舎はウマまたは競馬場の近くには位置しておらず、 그레이ハウンドおよびウイルスを排出しているウマの接触は2004年の異なる州での多くの大流行を説明するには不十分であることが示唆される。 想定されるウマウイルスへの曝露源は 그레이ハウンドへの馬肉の給餌であり、その飼料にはインフルエンザを保有する可能性のあるウマを含めて、屠体を加工する缶詰工場より提供される生肉が添加される。 この感染機序の前例には、感染したニワトリの屠体を給餌されたブタおよび動物園のネコ科動物へのH5N1トリインフルエンザウイルスの種間伝播の報告が含まれる（Webster、1998年；Keawcharoenら、2004年；Kuikenら、2004年）。これはウマインフルエンザのイヌへの初期導入における現実味のある経路ではあるが、異なる州における何千頭というイヌでの最近の多くのインフルエンザ大流行を説明するものではない。本発明者らの実験的接種試験は、たとえ力価は中程度であっても、イヌの鼻道および口咽頭にウイルスが存在することを実証した。それにも関わらず、これらの結果はウイルス排出が可能であり、大粒のエアロゾル、媒介物または直接の粘膜接触によるイヌ-イヌ間のウイルス伝達がこの疾患の家畜流行疫学に関与し得ることを示している。

20

【0146】

無関係の哺乳動物種への完全哺乳動物インフルエンザウイルスの種間伝達は稀な事象である。これまでの試験では、ヒトインフルエンザA（H3N2）ウイルスのイヌへの一過性の感染に関する限定的な血清学的またはウイルス学的証拠 - 但し双方ではない - を提供している（Nikitinら、1972年；Kilbourneら、1975年；Changら、1976年；Houserら、1980年）。しかし、イヌ宿主における持続的循環を示す証拠はなかった。ブタからヒトへのブタインフルエンザウイルスの直接伝達は十分に実証されているが（Dacsoら、1984年；Kimuraら、1998年；Patriarcaら、1984年；Topら、1977年）、ブタウイルスのヒト宿主への適応に関する証拠はない。本報告書において、本発明者らは完全なウマインフルエンザA（H3N8）ウイルスのもう一つの哺乳動物種であるイヌへの種間伝播に関するウイルス学的、血清学的および分子的証拠を提供する。イヌウイルスHAにおける固有のアミノ酸置換、ならびに米国の多くの州でのイヌの感染に関する血清学的確認は、ウイルスのイヌ宿主への適応を示唆する。イヌはヒトにとって重要な伴侶動物であることから、これらの所見は公衆衛生にとって意味があり；イヌはヒトへの新しいインフルエンザAウイルスの新規伝達源を提供し得る。

30

40

【0147】

（表1）A/イヌ/フロリダ/43/04（H3N8）に対する抗体反応

	疾病犬 (11頭) ^a		健常接触犬 (16頭) ^b	
反応	HI ^c	SN ^d	HI	SN
血清変換 (%) ^e	73	73	38	50
血清陽性 (%) ^f	82	82	100	100
抗体価幾何学平均 ^g	329	424	268	431

^a 疾病の臨床徴候を伴うイヌの数。

^b 臨床的疾患犬と接触して飼育されている無症候性のイヌの数。

^c A/イヌ/フロリダ/43/2004ウイルスを用いた血球凝集阻害 (HI) アッセイ法。

^d A/イヌ/フロリダ/43/2004ウイルスを用いたマイクロ中和 (MN) アッセイ法

^e 急性期および回復期の対の血清の抗体価が少なくとも4倍に増加したイヌのパーセント

^f

^f 回復期血清において陽性抗体価 (HI抗体価 32 : MN抗体価 80) を伴うイヌのパーセント。

^g 回復期血清の抗体価幾何学平均。

【 0 1 4 8 】

(表 2) イヌおよびウマのH3ヘマグルチニン間のアミノ酸の違い

ウマH3 共通配列	イヌ/FL/03	イヌ/FL/04	イヌ/TX/04	想定される機能上の意義
G7*	D	-†	-	DはアヒルおよびヒトのH3 HAにも見られる
I29	-	M	M	Iはすべての種由来のH3 HAに保存されている
N83	S	S	S	その他の種のH3 HAのこの位置に存在する様々な極性アミノ酸
S92	-	N	-	NはいくつかのアヒルH3 HAに存在する
L118	-	-	V	LはすべてのH3 HAに保存されている
W222	L	L	L	Wはすべての種の大半のH3 HAに保存されている ; レセプター結合部位の近くに位置する
A272	V	A	V	Vは最近のいくつかのウマ分離物に存在する
I328	T	T	T	Tはすべてのトリ、ブタまたはヒトH3 HAに厳密に保存されている
N483	T	T	T	NはすべてのH3およびその他のHA亜型に出現する。置換により、糖鎖形成部位は消失する。
K541	-	R	-	塩基性アミノ酸の保存的变化

* 成熟H3 HAのアミノ酸残基 (一文字表記) および位置。アミノ酸コードは、A=アラニン、D=アスパラギン酸、G=グリシン、I=イソロイシン、K=リジン、L=ロイシン、M=メチオニン、N=アスパラギン、R=アルギニン、S=セリン、T=スレオニン、V=バリン、W=トリプトファンである。

† 共通のウマH3 HAからの変化なしを示す。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 9 】

(表3) 異なるHA亜型に対する参照抗血清によるウイルス分離物の血球凝集阻害

参照抗血清	HA特異性	HI力価 ^a
プエルトリコ/8/34	H1	5
ブタ/アイオワ15/30	H1	5
シンガポール/01/57	H2	5
シャンハイ/11/87	H3 ^b	5
ウマ/マイアミ/1/63	H3	160
アヒル/チェコスロバキア/56	H4	5
アジサシ/南アフリカ/61	H5	5
シチメンチョウ/マサチューセッツ/65	H6	5
トリペスト/オランダ/27	H7	5
トリペスト/ロストク/34	H7	5
ウマ/ペスト/1/56	H7	5
シチメンチョウ/オンタリオ/6118/68	H8	5
ウズラ/ホンコン/G1/97	H9 ^b	5
ヒヨコ/ホンコン/G9/97	H9 ^b	5
ヒヨコ/ドイツ/49	H10	5
アヒル/イングランド/56	H11	5
カモメ/メリーランド/704/77	H13	5
正常なヒツジ血清	-	5
正常なフェレット血清	-	5

^a イヌ#43由来のウイルス分離物に対する血球凝集阻害力価^b ポリクロナル抗血清はフェレットにおいて作出されたが、その他のすべての抗血清はヒツジまたはヤギにおいて作出された。

【 0 1 5 0 】

(表4) ウマ、トリ、ブタおよびヒトのインフルエンザA株に対するA/イヌ/フロリダ/43/2004 (H3N8) 遺伝子の配列相同性

遺伝子	ウマ	トリ	ブタ	ヒト
PB2 DQ124147	96.9 (98.7) ^a Eq/ケンタッキー/2/8 M73526	88.6 (96.8) Mall/アルバータ/98/85 AY633315	87.9 (96.8) Sw/オンタリオ/ 01911-1/99 AF285892	86.2 (96.4) PR/8/34 (HK/213/03) AF389115 (AY576381)
PB1 DQ124148	97.1 (98.8) Eq/テネシー/5/86 M25929	83.9 (97.1) Ck/ブリティッシュコロンビア/04 (Gull/Md/704/77) AY61675 (M25933)	83.9 (97.1) Sw/コリア/S109/04 (Sw/サスカチュワン/ 18789/02) AY790287 (AY619955)	83.9 (97.1) WSN/33 (Sing/1/57) J02178 (M25924)
PA DQ124149	96.3 (97.5) M26082 Eq/テネシー/5/86	87.0 (94.3) Ck/チリ/4591/02 (ダチョウ/SA/08103/95) AY303660(AF508662)	84.3 (94.6) Sw/ホンコン/ 126/02 M26081	83.8 (93.4) タイワン/2/70 (ベトナム/ 1203/04) AY210199 (AY818132)
HA (H3) DQ124190	97.4 (97.1) Eq/FL/1/93 L39916	80.7 (89.0) Dk/ノルウェー/1/03 AJ841293	80.0 (87.7) Sw/オンタリオ/42729a/01 AY619977	81.8 (87.9) HK/1/68 AF348176
NP DQ124150	96.6 (97.9) Eq/テネシー/5/86 M30758	87.9 (95.1) Ck/チリ/176822/02 AY303658	85.4 (93.5) Sw/オンタリオ/42729a/01 (Sw/フーチェン/1/2003) AY619974 (AY747611)	84.7 (93.0) HK/1073/99 (ホンコン/ /538/97) AF255742 (AF255751)
NA (N8) DQ124151	96.8 (97.0) Eq/テネシー/5/86 L06583	84.0 (85.2) Dk/NJ/2000 L06583	na ^b	na ^b
M DQ124152	97.9 (95.7) Eq/テネシー/5/86 (Eq/ケンタッキー/92) M63529 (AF001683)	94.1 (94.0) Tky/Mn/833/80 AF001683	93.7 (93.5) Sw/サスカチュワン/ 18789/02 M63527	91.2 (95.4) WSN/33 (ホンコン/ 1073/99) J02177 (AJ278646)
NS DQ124153	97.5 (95.7) Eq/Tn/5/86 (Eq/ケンタッキー/92) M80973 (AF001671)	92.0 (90.4) Mal/NY/6750/78 M80945	91.1 (89.1) Sw/チャイナ/8/78 (Sw/コリア/s452/04) M80968 (AY790309)	91.4 (90.0) ブレヴィグ (Brevig) ミッション/1/18 AF333238

10

20

30

40

^a 動物種からのインフルエンザウイルス分離物の大半の相同遺伝子に対するA/イヌ/フロリダ/43/04 (H3N8) 遺伝子のヌクレオチドおよびアミノ酸 (括弧内) 配列同一性パーセント、続いてそれらのGenbank配列データベースアクセッション番号。

^b 該当なし: N8ノイラミニダーゼはヒトまたはブタのウイルスではこれまで報告されなかった。

【 0 1 5 1 】

(表5) 1996年から2003年に採取されたグレイハウンド血清のA/イヌ/フロリダ/43/04 (H3N8) に対する抗体価

	年 ^a					
	1996	1997	1998	2000	2002	2003
検査したイヌの数	8	6	19	4	6	22
血清陽性を示したイヌの数	0	0	0	1	2	6
抗体価 ^b				512	232, 524	280-2242

10

^a フロリダのレース用グレイハウンドからの血清試料採取年。

^b 6頭の2003年血清陽性犬の範囲を含む、血清陽性犬におけるマイクロ中和試験抗体価。

【0152】

(表6) 2004年6月のフロリダの4箇所のトラックにおけるレース用グレイハウンドのA/イヌ/フロリダ/43/2004 (H3N8) に対する抗体反応

反応	トラックA	トラックB	トラックC	トラックD
検査したイヌの数 ^a	37	10	22	25
血清変換 (%) ^b	46	90	100	64
血清陽性 (%) ^c	100	100	100	100
抗体価幾何学平均 ^d	401	512	290	446

20

^a A/イヌ/フロリダ/43/04 (H3N8) を用いたHIにより試験した臨床的に疾病の見られるイヌの数。

^b 急性期および回復期血清の抗体価における 4倍の増加を示すイヌのパーセント。

^c 回復期血清において陽性の抗体価 (HI抗体価 > 16) を示したイヌのパーセント。

30

^d 回復期血清における抗体価幾何学平均

【0153】

実施例7～11の材料および方法

イヌの組織

フロリダ北東部の保護施設におけるインフルエンザ大流行で2005年4月/5月に死亡した6頭の雑種犬およびフロリダ南東部の動物病院でのインフルエンザ大流行において2005年5月に死亡した1頭のペットのヨークシャーテリアについて、University of Florida College of Veterinary MedicineのAnatomic Pathology Serviceにて死亡後検査を実施した。組織は10%中性緩衝ホルマリン中で固定して、パラフィンに包埋し、病理組織学的診断のための5μmの切片をヘマトキシリン・エオジンで染色した。未固定の組織は、ウイルス学的分析まで-80℃で保存した。

40

【0154】

イヌ組織試料からのRNAの抽出

7頭の各イヌに由来する凍結肺組織を融解して、使い捨ての組織グライNDER (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT) を用いて、0.5%ウシ血清アルブミン (BSA) および抗生物質 (ゲンタマイシンおよびシプロフロキサシン) を強化した最小必須培地 (MEM) を加えてホモジナイズした。市販のキット (RNeasy (登録商標) Mini Kit, QIAGEN Inc., Valencia, CA) を製造業者の説明書に従って用いて全RNAを抽出し、最終液量 60μL の緩衝液で溶出した。呼吸器疾患を伴わないイヌから採取した肺組織からも、全RNAを抽出した。

50

【0155】

リアルタイムRT-PCR

ROXをパッシブレファレンス色素として含むQuantiTect（登録商標）プローブRT-PCRキット（QIAGEN Inc., Valencia, CA）を用いて、イヌ組織試料から抽出された全RNAに対して一段階定量的リアルタイムRT-PCRを実施した。つまり、2つのプライマー-プローブセットを各試料中のインフルエンザA配列の検出に用いた（表7）。1つのプライマー-プローブセットはイヌヘマグルチニン（H3）遺伝子配列に選択的であった。他方のプライマー-プローブセットはA型インフルエンザウイルスのマトリックス（M）遺伝子の高度に保存的領域をターゲットとした。各リアルタイムRT-PCR反応において、最終液量 25 μ L中、2X QuantiTect（登録商標）Probe RT-PCR Master Mix 12.5 μ L、QuantiTect（登録商標）RT Mix 0.25 μ L、フォワードおよびリバースプライマー（それぞれ、0.4 μ Mの最終濃度）、プローブ（0.1 μ Mの最終濃度）、ならびにRNaseフリーの水を含む反応混合液に抽出した全RNA 5 μ Lを加えた。イヌ組織試料から抽出されたRNAの存在に関する内因性の内部対照である18S rRNAの検出には、TaqMan（登録商標）リボソームRNA対照試薬（Applied Biosystems, Foster City, CA）を製造業者の説明書に従って使用した。

10

【0156】

Mx3000P（登録商標）QPCR System（Stratagene, La Jolla, CA）を用いて、反応混合物に対して定量的一段階リアルタイムRT-PCRを実施した。サイクリング条件は、50 °Cでの30分間の逆転写段階、HotStarTaq（登録商標）DNAポリメラーゼを活性化させるための95 °Cでの15分間の初回変性段階、および40サイクルの増幅を含んだ。各増幅サイクルには、94 °Cでの15秒間の変性およびその後の60 °Cでの1分間のアニーリング/伸長が含まれた。FAM（発光波長 518nm）およびVIC（発光波長 554nm）蛍光シグナルは各サイクルの終了時に記録した。閾値サイクル（Ct）は、それぞれの各実験において閾値蛍光（dR）を1000に設定することによって求めた。データの収集および解析には、Mx3000P（登録商標）バージョン2.0ソフトウェアプログラム（Stratagene, La Jolla, CA）を用いた。H3またはM遺伝子の閾値サイクル（Ct）が呼吸器疾患を伴わないイヌから得られた肺組織のCtよりも3単位少ない場合、試料はインフルエンザAウイルスに関して陽性と判断した。陽性対照は、A/イヌ/FL/242/03（H3N8）ウイルスから抽出されたRNAの増幅物から構成された。

20

【0157】

MDCK細胞におけるウイルスの分離

7頭の各イヌに由来する凍結肺組織を融解して、0.5%（BSA）および抗生物質（ゲンタマイシンおよびシプロフロキサシン）を強化した10倍量のDulbecco修正イーグル培地（DMEM）を加えてホモジナイズした。遠心分離により固体の細片を除去して、上清を1 μ g/mL TPCCK処理したトリプシン（Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）および抗生物質（ゲンタマイシンおよびシプロフロキサシン）を加えたDMEMで培養したMadin-Darbyイヌ腎（MDCK）細胞に接種した。細胞は、25cm²のフラスコを用いて5%CO₂含有加湿大気中、37 °Cにて培養した。培養物は形態学的変化を1日1回観察して、接種後5日に回収した。回収した培養物を遠心分離により清澄化して、上清を初回接種において記載した通り新鮮なMDCK細胞に接種し；血球凝集またはRT-PCRによりインフルエンザウイルスの証拠を示さなかった試料についてはさらに2回の継代を行った。清澄化した上清の血球凝集活性は、既報の通り（Burleson, F.ら、1992年；Kendal, P.ら、1982年）、0.5%シチメンチョウ赤血球を用いて測定した。RT-PCRは、下記の通り、実施した。

30

40

【0158】

孵化鶏卵におけるウイルス分離

ホモジネートは、MDCK細胞の接種に関して上記の通り、凍結肺組織から調製した。ホモジネート（0.2mL）を10日齢の孵化鶏卵の尿嚢に接種した。35 °Cにて48時間インキュベーション後、尿膜腔液の回収前に一晚、卵を4 °Cで冷却した。清澄化した上清の血球凝集活性は、既報の通り（Burleson, F.ら、1992年；Kendal, P.ら、1982年）、0.5%シチメンチョウ赤血球を用いて測定した。RT-PCRは、下記の通り、実施した。初回接種後にインフルエンザウイルスの証拠を示さなかった試料については、孵化鶏卵を用いたさらに2回の継代

50

を行った。

【0159】

RT-PCR、ヌクレオチドシーケンシング、および系統学的解析

製造業者の説明書に従ってQIAamp（登録商標）ウイルスRNAミニキット（QIAGEN Inc., Valencia, CA）を用いて、MDCK上清または尿膜腔液からウイルスRNAを抽出した。ウイルスRNAは、QIAGEN（登録商標）一段階RT-PCRキット（QIAGEN Inc., Valencia, CA）を製造業者の説明書に従って使用して、cDNAに逆転写した。cDNA内の8つのインフルエンザウイルス遺伝子のコード領域のPCR増幅は、汎用遺伝子特異的プライマーセット（プライマー配列は要求に応じて与えられる）を用いて既報（Klimov, A.ら、1992b）の通り実施した。得られたDNA単位複製配列は、サイクルシーケンシングダイターミネーターケミストリー（Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いたABI PRISM（登録商標）3100自動DNAシーケンサーでの自動シーケンシングのための鋳型として用いられた。ヌクレオチド配列はLasergene 6 Package（登録商標）（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を用いて解析した。ヌクレオチド配列からの系統発生の推定およびブーストラップの算出にはPHYMLIPバージョン3.5（著作権）ソフトウェアプログラムを用いた（Felsenstein, J., 1989年）。系統樹は、MEGA（著作権）プログラム（Kumar, S.ら、2004年）において実行されたTamura-Neiモデルを用いて近隣結合法により得られた系統樹と比較して、PAUP（著作権）4.0ベータプログラム（Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA）により確認した。

10

【0160】

血球凝集阻害（HI）試験

血清試料は、56 での30分間の熱失活前に、レセプター破壊酵素（RDE、デンカ生検株式会社、東京、日本）（血清1容積：RDE 3容積）と共にインキュベートした。インフルエンザA/イヌ/ジャクソンビル/05（H3N8）ウイルスはMDCK細胞を用いて5%CO₂中、37 にて72時間、増殖させた。ウイルス培養の上清を回収して、遠心分離により清澄化して-80 で保存した。HIアッセイ法で用いられるその他のウイルスはすべて、10日齢の孵化鶏卵で培養し、尿膜腔液を回収して-80 で保存した。HIアッセイ法は既報（Kendal, P.ら、1982年）の通り実施した。つまり、25 μl中4血球凝集単位のウイルスを96穴プラスチックプレートにて段階希釈した等量の血清に加えて、室温で30分間、インキュベートした。等量の0.5%シチメンチョウ赤血球を加えて、30分後に血球凝集力価を目視により求めた。エンドポイントのHI力価は、血球凝集を完全に阻害する血清の最終希釈として定義された。

20

30

【0161】

実施例7 - 臨床症例

2005年4月および5月に、既報（Crawford, P.C.ら、2005年）の呼吸器疾患大流行がフロリダ北東部の保護施設に収容されていたイヌで発生した。この大流行には3カ月齢から9歳までの年齢範囲の少なくとも58頭が関与し、純系のイヌおよび雑種犬が含まれた。最も一般的な臨床徴候は、7～21日間にわたる膿性鼻分泌物および咳であった。7日にわたって臨床疾患が認められた43頭の内、41頭はイヌ/FL/04（H3N8）に対して32から>1024のHI抗体価を示した。少なくとも10頭の犬が肺炎に進行し、この内、6頭は安楽死させた。これらの6頭の雑種犬は、4カ月齢から3歳までの雌雄各3頭であった。臨床徴候の期間は、安楽死の時点で2～10日であった。死亡後検査において、これらのイヌは肺のうっ血および浮腫を示した。呼吸器の組織学的検査では、鼻炎、気管炎、気管支炎、細気管支炎および化膿性気管支肺炎が認められた。気管、気管支、細気管支および気管支腺に、上皮細胞の壊死およびびらんが認められた。呼吸組織に好中球およびマクロファージの浸潤が見られた。

40

【0162】

2005年5月にフロリダ南東部の動物病院において40頭のペットのイヌにおいて呼吸器疾患の大流行が発生した。最も一般的な臨床徴候は、10～30日間にわたる膿性鼻分泌物および咳であった。40頭の内、17頭はイヌ/FL/04（H3N8）に関して血清陽性であり、HI抗体価は32から>1024であった。急性期および回復期の対の血清が得られた10頭のイヌでは、血清変換が生じた。3頭のイヌは肺炎に進行した。これらの内の1頭である9歳の雄のヨーク

50

シャーテリアは臨床徴候の発症後3日に死亡した。このイヌは、気管気管支炎、肺の浮腫およびうっ血、ならびに重度気管支肺炎であった。6頭の保護施設のイヌと同様に、気道の上皮細胞の壊死およびびらん、ならびに組織における好中球浸潤が認められた。

【0163】

実施例8 - リアルタイムRT-PCRおよびウイルスの分離

7頭のイヌから得られた肺組織を、A型インフルエンザのM遺伝子およびイヌH3N8インフルエンザAウイルスのH3遺伝子を検出する定量的リアルタイムRT-PCRアッセイ法で解析した。7頭すべてのイヌの肺がインフルエンザAのM遺伝子およびイヌインフルエンザH3遺伝子の双方に関して陽性であった(表8)。MDCK細胞で3回継代後、3日間の肺炎の後に死亡した保護施設のイヌの肺からインフルエンザAのH3N8亜型のウイルスが分離された。このウイルスはA/イヌ/ジャクソンビル/05 (H3N8) (イヌ/Jax/05) と命名された。孵化鶏卵で2回継代後、同じく3日間の肺炎の後に死亡したペットのイヌの肺からインフルエンザAのH3N8亜型のウイルスが分離された。このウイルスはA/イヌ/マイアミ/05 (H3N8) (イヌ/マイアミ/05) と命名された。

10

【0164】

実施例9 - イヌインフルエンザA H3N8分離物の遺伝子解析

イヌ/Jax/05およびイヌ/マイアミ/05の配列解析の結果、それらのヘマグルチニン(HA)遺伝子は2004年および2005年のトラックでのインフルエンザ大流行時に肺炎で死亡したレース用グレイハウンドの肺から回収されたイヌ/FL/04、イヌ/TX/04およびイヌ/アイオワ/05分離物と98%一致することが明らかとなった(Crawford, P.C, ら、2005年; Yoon K -Yら、2005年)。さらに、イヌ/Jax/05およびイヌ/マイアミ/05のHA遺伝子は、2000年以降に分離された現代のウマインフルエンザウイルスと98%一致した。HA遺伝子の系統学的比較では、イヌ/Jax/05およびイヌ/マイアミ/05ウイルスはイヌ/FL/04、イヌ/TX/04、およびイヌ/アイオワ/05のグレイハウンド分離物、ならびに現代のウマ分離物とクラスターを形成し、1990年代初期に分離された古いウマウイルスとは異なる群を形成することが示された(図4)。さらに、イヌ/Jax/05、イヌ/マイアミ/05およびイヌ/アイオワ/05分離物は、イヌ/FL/04またはイヌ/FL/03よりもイヌ/Tx/04により密接に関連した。2005年の分離物は先の2003年および2004年イヌウイルスから枝分れしたと思われる亜型を形成し、約10箇所の節減的に情報価値のある部位が異なる。これらの相違は、外部の感染源から定期的に再導入されるのとは対照的に、イヌからイヌへと水平伝播するという仮説を支持する。2003年から2005年までの突然変異の蓄積は、イヌインフルエンザウイルスに生じたと予想されるように、ウイルスが新しい宿主に伝達された後に受けなければならない適応の進行中の過程を例示するものである。

20

30

【0165】

実施例10 - イヌインフルエンザA H3N8分離物のアミノ酸解析

6検体のすべてのイヌ分離物には、それらを現代のウマインフルエンザと区別する保存的アミノ酸置換があった(表9)。これらの保存的置換はI15M、N83S、W222L、I328TおよびN483Tであった。成熟HAタンパク質を系統学的に比較した結果、イヌ/Jax/05、イヌ/マイアミ/05およびイヌ/アイオワ/05ウイルスはイヌ/TX/04分離物と共に亜型を形成することが示された(図4)。この亜型とその他のイヌウイルスを区別する3つのアミノ酸変化(L118V、K261NおよびG479E)があった(表9)。2005年の分離物をそれらのルーツであるイヌ/TX/04と区別する2つのアミノ酸変化(F79LおよびG218E)があった。さらに、グレイハウンド以外のイヌからの2005年分離物であるイヌ/Jax/05およびイヌ/マイアミ/05は1個のアミノ酸変化であるR492Kがイヌ/アイオワ/05グレイハウンド分離物と異なった。最後に、イヌ/Jax/05は一つのアミノ酸S107Pにおいてイヌ/マイアミ/05とは異なった。その他のすべてのH3N8ウマおよびイヌウイルスにおいて、Tを持つA/ウマ/チーリン/1/89 (Guo Y. ら、1992年)を除いてSは107の位置に保存される。

40

【0166】

実施例11 - イヌインフルエンザA H3N8分離物の抗原分析

血球凝集阻害(HI)試験は、以前および現代のウマインフルエンザウイルスおよびイヌ

50

インフルエンザウイルス、ならびにインフルエンザウイルスに感染したウマおよびイヌから2005年に採取された血清を用いて実施された(表10)。イヌ/FL/04に対して免疫したフェレットの血清も分析に含めた。ウマ血清のHI抗体価は現代のウマウイルスを以前の分離物と比較して調べた結果、8~16倍高かったが、イヌウイルスを用いて調べると少なくとも1/4低下した。イヌ血清は以前のウマウイルスとは非反応性であったが、現代のウマ分離物およびイヌ分離物を用いて調べると抗体価は4倍に増加した。これは、イヌインフルエンザウイルスに対して免疫されたフェレットの血清についても観察された。これらの血清反応パターンは、イヌインフルエンザウイルスおよび現代のウマインフルエンザウイルスの間の抗原類似性を実証するものであり、系統学的解析と一致した。イヌ/マイアミ/05分離物に対するウマ、イヌおよびフェレット血清の抗体価は、2003年および2004年のイヌ分離物における抗体価とほぼ等しかった。しかし、イヌ/Jax/05分離物の抗体価は1/2~1/4であった。このことは、イヌ/Jax/05が抗原的にはその他のイヌ分離物とは異なり、成熟HAの107位における単一のアミノ酸の変化に一部関連し得ることを示唆する。

10

【 0 1 6 7 】

(表7) インフルエンザAウイルスのマトリックス遺伝子およびイヌインフルエンザA(H3N8)のH3遺伝子の定量的リアルタイムRT-PCR解析のためのプライマーおよびプローブ

プライマー	ターゲット	配列	適用
Ca-H3-F387	H3 (nt 387-406)	5'-tatgatcgtccgcatcat-3' (SEQ ID NO: 79)	H3のフォワードプライマー
Ca-H3-R487	H3 (nt 487-467)	5'-gtccacttcttcggtttga-3' (SEQ ID NO: 80)	H3のリバースプライマー
Ca-H3-P430	H3 (nt 430-459)	FAM-aattcacagcagagggattcacatggacag-BHQ1 (SEQ ID NO: 81)	TaqMan (登録商標) プロローブ
FluA-M-F151	M (nt 151-174)	5'-catggatggctaaagacaagacc-3' ^a (SEQ ID NO: 82)	Mのフォワードプライマー
FluA-M-R276	M (nt 276-253)	5'-agggcatttggacaaaakcgctcta-3' (SEQ ID NO: 83)	Mのリバースプライマー
FluA-M-P218	M (nt 218-235)	FAM-acgcTcaccgTgcccAgt-BHQ1 ^b (SEQ ID NO: 84)	TaqMan (登録商標) プロローブ

^a 下線を引いた文字rはaまたはgのヌクレオチドを示し、下線を引いた文字kはgまたはtのヌクレオチドを示す。

^b 大文字は固定された核酸残基を示す。

【 0 1 6 8 】

(表8) フロリダの保護施設および動物病院において呼吸器疾患大流行時に肺炎で死亡したイヌの肺組織に対して実施した定量的リアルタイムRT-PCRおよびウイルス分離

10

20

30

40

イヌID	場所	臨床疾患の 期間	リアルタイムRT-PCR		ウイルス 分離
			M (Ct)	HA (Ct)	
A/イヌ/FL/242/03 陽性対照			28.15	27.36	
1079	保護施設 (フロリダ北東部)	2日間	29.81	28.84	なし
1078	保護施設 (フロリダ北東部)	3日間	30.37	29.71	MDCK 継代3回目
318	保護施設 (フロリダ北東部)	9日間	33.89	32.97	なし
320	保護施設 (フロリダ北東部)	10日間	39.44	37.09	なし
319	保護施設 (フロリダ北東部)	6日間	33.87	32.23	なし
1080	保護施設 (フロリダ北東部)	6日間	38.87	38.23	なし
374	動物病院 (フロリダ南東部)	3日間	24.05	22.65	鶏卵 継代2回目

10

20

【 0 1 6 9 】

(表9) イヌインフルエンザウイルスおよび現代のウマインフルエンザウイルスにおける成熟HAのアミノ酸の比較

30

	アミノ酸																	
	7	15	54	78	79	83	92	107	118	159	218	222	261	328	479	483	492	541
A/ウマ/KY/5/02	G	I	N	V	F	N	S	S	L	N	G	W	K	I	G	N	R	K
A/ウマ/MA/213/03	.	.	.	A	S
A/ウマ/OH/1/03	D	.	K	A	S
A/イヌ/FL/242/03	.	M	K	A	.	S	.	.	.	S	.	L	.	T	.	T	.	.
A/イヌ/FL/43/04	.	M	K	A	.	S	N	.	.	S	.	L	.	T	.	T	.	R
A/イヌ/TX/1/04	.	M	K	A	.	S	.	.	V	S	.	L	N	T	E	T	.	.
A/イヌ/アイオワ/05	.	M	K	A	L	S	.	.	V	S	E	L	N	T	E	T	.	.
A/イヌ/マイアミ/05	.	M	K	A	L	S	.	.	V	S	E	L	N	T	E	T	K	.
A/イヌ/ジャクソンビル/05	.	M	K	A	L	S	.	P	V	S	E	L	N	T	E	T	K	.

10

20

30

40

【 0 1 7 0 】

(表 1 0) 以前および現代のウマインフルエンザウイルスおよびイヌインフルエンザウイルスに対するウマ、イヌおよびフェレット血清の抗体価

抗原	血清抗体価 ^a		
	ウマ	イヌ	フェレット ^b
ウマ/マイアミ/63	40	<10	16
ウマ/Ky/86	40	40	32
ウマ/KY/92	40	<10	32
ウマ/NY/99	320	40	128
ウマ/KY/05/02	320	160	256
ウマ/MA/213/03	640	160	512
ウマ/OH/01/03	640	160	512
イヌ/FL/03	160	160	512
イヌ/FL/04	160	80	512
イヌ/Tx/04	160	160	512
イヌ/マイアミ/05	160	80	256
イヌ/Jax/05	40	40	128

10

20

^a 抗体価は、ウマ、イヌまたはフェレットの血清の段階希釈、ならびに抗原のカラムに列記されるウイルスを用いて実施した血球凝集阻害試験で求められた。

^b イヌ/FL/04ウイルスで免疫したフェレットの血清

30

【 0 1 7 1 】

実施例12～15の材料および方法例

イヌインフルエンザウイルス接種物

ウイルス接種物は、Madin-Darbyイヌ腎（MDCK）上皮細胞に既報（Crawfordら、2005年）のオリジナル分離物の3回継代物であるA/イヌ/FL/43/04（H3N8）のストックを接種して調製した。1μg/mL TPCK処理トリプシン（Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）および抗生物質（ゲンタマイシンおよびシプロフロキサシン）を強化したDulbecco最小必須培地（DMEM）中の接種されたMDCK細胞は、250cm²のフラスコに入れて5%CO₂を含む加湿大気中、37℃にて生育させた。培養物は形態学的変化を1日1回観察して、接種後5日に回収した。回収した培養物は遠心分離によって清澄化して、上清をイヌの接種まで-80℃で保存した。ReedおよびMuench法によるウイルス力価の測定には、上清の画分を使用した。力価は、1mL当たり10⁷半数組織培養物感染用量（TCID₅₀）のA/イヌ/フロリダ/43/04（イヌ/FL/2004）であった。

40

【 0 1 7 2 】

実験的接種

コロニーで繁殖した4カ月齢の8頭の雑種犬（Marshall BioResources, North Rose, NY）（雌雄各4頭）をUniversity of Florida Institutional Animal Care and Use Committeeにより承認された実験的接種試験に使用した。イヌの体重は13～17kgであった。イヌは、理学的検査、ベースラインの血液検査、および接種前2週間の体温記録に基づいて、健康であった。すべてのイヌは、施設への到着時および2週間後に採取した対の血清試料に

50

ついて実施した血清学的検査に基づいて、イヌインフルエンザウイルスへの曝露歴はなかった。イヌは、気管内チューブの挿管に備えて、プロポフォル（ディプリバン（登録商標）、Zeneca Pharmaceuticals、行うために0.4mg/kg体重）の静脈内注入により麻酔した。6頭（雌雄各3頭）のイヌに、気管内チューブに挿入した直径の小さなゴム製カテーテルを介して5mL無菌生理食塩液中 10^7 TCID₅₀のイヌ/FL/04ウイルスを遠位気管に投与して、それぞれ接種した。2頭のイヌ（雌雄各1頭）には等量の無菌生理食塩液を偽接種した。偽接種した対照のイヌは、ウイルス接種したイヌとは別の部屋に収容して、別の担当者がケアした。理学的検査および直腸温の記録は、1日2回、接種後（p.i.）6日間実施した。

【0173】

咽頭および直腸スワブの採取

ウイルス排出をモニターするために、p.i.0～6日にポリエステルスワブ（Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, PA）を用いて口咽頭標本を各イヌから1日2回、採取した。スワブは、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）を含む無菌リン酸緩衝生理食塩液（PBS）1mL中に置いた。直腸スワブは0日から6日まで1日1回、各イヌから採取した。スワブ抽出液は、スワブ輸送培地を遠心分離によって清澄化して調製した。スワブ抽出液の画分は、Directigen（商標）の市販の免疫アッセイキット（BD, Franklin Lakes, NJ）を製造業者の説明書に従って用いて、インフルエンザAウイルス核タンパク質について直ちに検査した。残りの抽出液は、その他のウイルス学的アッセイ法まで-80℃にて保存した。

【0174】

死亡後検査

p.i. 1日に、偽接種した1頭およびウイルス接種した1頭のイヌをBeuthanasia-D（登録商標）液（1mL/5kg体重；Schering-Plough Animal Health Corp）の静脈内注入により安楽死させた。p.i. 2日から5日まで毎日、ウイルス接種した1頭のイヌを同様に安楽死させた。p.i. 6日に偽接種およびウイルス接種した残りのイヌを安楽死させた。詳細な死亡後検査は1名の試験担当者（WLC）により実施された。組織は10%中性緩衝ホルマリン中で固定して、パラフィンに包埋し、5μmの切片を病理組織学的診断のためにヘマトキシリン・エオジンで染色するか、または以下に記載する通り免疫組織化学的検査に備えて加工した。未固定の肺組織は、細菌の分離および同定のため、University of Florida College of Veterinary MedicineのDiagnostic Clinical Microbiology/Parasitology/Serology Serviceに送付した。試料は、非選択培地およびボルデテラ属（Regan-Lowe; Remel, Lenexa, KS）およびマイコプラズマ属（Remel）の選択培地で培養した。すべての培養物は、増殖なしと報告する前に21日間維持した。未固定の組織は、同じくウイルス学的分析まで-80℃で保存した。

【0175】

免疫組織化学

脱パラフィンおよび再水和した5μmの気管および肺組織切片をBond-Rite（商標）スライドガラス（Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI）にセットして、プロテインナーゼK（DAKO Cytomation, Carpinteria, CA）ペルオキシダーゼ遮断試薬（DAKO（登録商標）EnVision（商標）ペルオキシダーゼキット、DAKO Corp., Carpinteria, CA）で順次処理した。切片は、インフルエンザA H3に対するモノクローナル抗体の1:500希釈（Chemicon International, Inc., Temecula, CA）と共に室温で2時間、インキュベートした。対照には、同一の切片とマウスIgG（1mg/mL、Serotec, Inc. Raleigh, NC）のインキュベート、およびモノクローナル抗体と正常なイヌ肺切片のインキュベートが含まれた。一次抗体で処理した後、切片は製造業者の説明書に従って二次イムノペルオキシダーゼおよびペルオキシダーゼ基質試薬（Dako（登録商標）EnVision（商標）ペルオキシダーゼキット、Dako Corp.）と共にインキュベートした。ヘマトキシリンで切片を対比染色して、清澄化剤#2およびBluing試薬（Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI）で処理して脱水し、Permount（ProSciTech, Queensland, Australia）を用いてカバーガラスをかけた。

【0176】

スワブおよび組織からのRNAの抽出

各イヌに由来する肺および気管の組織を融解して、使い捨ての組織グライNDER (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT) を用いて、0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) および抗生物質 (ゲンタマイシンおよびシプロフロキサシン) を強化した最小必須培地 (MEM) を加えてホモジナイズした。市販のキット (RNeasy (登録商標) ミニキット、QIAGEN Inc., Valencia, CA) を製造業者の説明書に従って用いて、組織ホモジネートならびに口咽頭および直腸スワブ抽出液から全RNAを抽出して、最終液量 60 μ L の緩衝液で溶出した。

【0177】

リアルタイムRT-PCR

ROXをパッシブレファレンス色素として含むQuantiTect (登録商標) プローブRT-PCRキット (QIAGEN Inc., Valencia, CA) およびA型インフルエンザウイルスのマトリックス (M) 遺伝子の高度保存領域をターゲットとするプライマー-プローブセット (Payungporn S. ら、2006年a; Payungporn S. ら、2006年b) を用いて、全RNAに対して一段階定量的リアルタイムRT-PCRを実施した。各リアルタイムRT-PCR反応において、最終液量 25 μ L 中、2X QuantiTect (登録商標) Probe RT-PCR Master Mix 12.5 μ L、QuantiTect (登録商標) RT Mix 0.25 μ L、フォワードおよびリバースプライマー (それぞれ、0.4 μ M の最終濃度)、プローブ (0.1 μ M の最終濃度)、ならびにRNaseフリーの水を含む反応混合液に抽出した全RNA 5 μ L を加えた。スワブおよび組織試料から抽出されたRNAの存在に関する内因性の内部対照として、また標準化対照としてのGAPDHの検出には、TaqMan (登録商標) GAPDH対照試薬 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を製造業者の説明書に従って使用した。

10

20

【0178】

Mx3000P (登録商標) QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて、反応混合物に対して定量的一段階リアルタイムRT-PCRを実施した。サイクリング条件は、50 °C での30分間の逆転写段階、HotStarTaq (登録商標) DNAポリメラーゼを活性化させるための95 °C での15分間の初回変性段階、および40サイクルの増幅を含んだ。各増幅サイクルには、94 °C での15秒間の変性およびその後の60 °C での1分間のアニーリング/伸長が含まれた。FAM (発光波長 518nm) およびVIC (発光波長 554nm) 蛍光シグナルは各サイクルの終了時に記録した。閾値サイクル (Ct) は、それぞれの各実験において閾値蛍光 (dR) を1000に設定することによって求めた。データの収集および解析には、Mx3000P (登録商標) バージョン2.0ソフトウェアプログラム (Stratagene, La Jolla, CA) を用いた。陽性対照は、A/イヌ/FL/242/03 (H3N8) ウイルスから抽出されたRNAの増幅物から構成された。結果は、各試料についてM Ct値を対応するGAPDHのCt値で割って標準化した。

30

【0179】

組織からのウイルスの再分離

ウイルス接種したイヌから得られた肺および気管の凍結組織を融解して、0.5% BSAおよび抗生物質を強化した10倍量のDMEM中でホモジナイズした。遠心分離により固体の細片を除去して、上清を上記の通り1 μ g/mLのTPCK処理したトリプシン (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) および抗生物質を強化したDMEMで培養したMDCK細胞に接種した。細胞は、25cm²のフラスコを用いて5%CO₂含有加湿大気中、37 °C にて培養した。培養物は形態学的変化を1日1回観察して、接種後5日に回収した。回収した培養物を遠心分離により清澄化して、上清を初回接種において記載した通り新鮮なMDCK細胞に接種し; 血球凝集またはRT-PCRによりインフルエンザウイルスの証拠を示さなかった試料についてはさらに2回の継代を行った。清澄化した上清の血球凝集活性は、上記の通り0.5% シチメンチョウ赤血球 (Crawfordら、2005年) を用いて測定した。RT-PCRは、下記の通り、実施した。

40

【0180】

RT-PCR、ヌクレオチドシーケンシング、および系統学的解析

製造業者の説明書に従ってQIAamp (登録商標) ウイルスRNAミニキット (QIAGEN Inc., Valencia, CA) を用いて、MDCK上清からウイルスRNAを抽出した。ウイルスRNAは、QIAGEN (登録商標) 一段階RT-PCRキット (QIAGEN Inc., Valencia, CA) を製造業者の説明書に

50

従って使用して、cDNAに逆転写した。cDNA内の8つのインフルエンザウイルス遺伝子のコード領域のPCR増幅は、汎用遺伝子特異的プライマーセット（プライマー配列は要求に応じて与えられる）を用いて既報（Crawfordら、2005年）の通り実施した。得られたDNA単位複製配列は、サイクルシーケンシングダイターミネーターケミストリー（Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いたABI PRISM（登録商標）3100自動DNAシーケンサーでの自動シーケンシングのための鋳型として用いられた。ヌクレオチド配列はLasergene 6 Package（登録商標）（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を用いて解析した。呼吸器での複製中に何らかの変化が生じたか否かを調べるために、感染犬から回収されたウイルスのヌクレオチド配列を接種物中のウイルスの配列と比較した。

【0181】

10

実施例12 - 臨床疾患

ウイルス接種された6頭のすべてのイヌが最初のp.i. 2日間に発熱（直腸温 39 ）を発症したが、6日間の観察期間を通して咳または鼻分泌物などの呼吸器症状を示したものはいなかった。偽接種したイヌは臨床的に健常な状態を維持した。

【0182】

実施例13 - ウイルス排出

インフルエンザAの核タンパク質がp.i. 24時間にウイルス接種したイヌの1頭から採取された口咽頭スワブで検出された。p.i. 72、84および120時間に1頭のイヌから、またp.i. 108、120および132時間にはもう1頭のイヌから採取された口咽頭スワブが定量的リアルタイムRT-PCRによりウイルスに関して陽性であった（表11）。スワブ抽出液1μL当たりのインフルエンザM遺伝子コピーの絶対数は、p.i.3日から6日まで経時的に増加した。直腸スワブには、ウイルスは検出されなかった。

20

【0183】

実施例14 - 死亡後検査

特定病原体除去ビーグルを用いた過去の実験的感染（Crawfordら、2005年）とは対照的に、ウイルス接種した雑種犬は、p.i.1日から6日までの肺の肉眼的および組織学的分析により示される通り、肺炎を発症した。肺炎に加えて、イヌは、自然感染したイヌにおける報告（Crawfordら、2005年）と同様に鼻炎、気管炎、気管支炎および細気管支炎を呈した。気道の裏打ち細胞および気管支腺に上皮の壊死およびびらんが認められ、粘膜下組織には好中球およびマクロファージの浸潤が見られた（図5、上段）。免疫組織化学的検査により、気管支、細気管支および気管支腺の上皮細胞にウイルス性H3抗原が検出された（図5、下段）。細菌の重複感染はなかった。2頭の偽接種犬の呼吸組織は正常であった。

30

【0184】

実施例15 - 気管および肺におけるウイルスの複製

気管および肺は、p.i. 1日から6日まですべてのイヌにおいて定量的リアルタイムRT-PCRによりウイルスに関して陽性であった（表12）。気管ホモジネート1μL当たりのインフルエンザM遺伝子コピーの絶対数はp.i. 1日から5日まで増加して、その後、6日には減少した。肺ホモジネート1μL当たりのM遺伝子コピーの絶対数はp.i. 1日から6日まで減少した。一般に、気管には6日間の各p.i.日に肺よりも $1\log_{10}$ 多いウイルスが含まれた。

【0185】

40

（表11）定量的リアルタイムRT-PCRによる、イヌインフルエンザウイルスを接種された雑種犬の中咽頭におけるウイルス排出の検出

イヌID	p. i. 時間 (時間) ^a	M/GAPDH比 ^b	マトリックス遺伝子 (コピー/ μ L) ^c
860	72	1.20	1.57E+02
	84	1.30	8.25E+02
	120	1.23	1.47E+03
894	108	1.17	1.17E+02
	120	1.41	1.37E+02
	132	1.27	3.74E+02

10

^a A/イヌ/FL/43/04 (H3N8) ウイルスの接種後の、イヌから口咽頭スワブが採取された時期。

^b 標準化比は、各スワブ抽出液についてM (Ct) をGAPDH (Ct) で割って算出した。

^c スワブ抽出液1 μ L当たりのマトリックス遺伝子コピーの絶対数。

20

【0186】

(表12) 定量的リアルタイムRT-PCRによる、イヌインフルエンザウイルスを接種された雑種犬の気管および肺におけるウイルス複製の検出

イヌID	p. i. 時間 (時間) ^a	M/GAPDH比 ^b		マトリックス遺伝子 (コピー/ μ L) ^c	
		肺	気管	肺	気管
797	24	1.20	1.43	8.22E+05	3.11E+04
801	48	1.33	0.99	1.15E+05	6.52E+06
789	72	1.44	1.12	2.39E+04	1.56E+05
819	96	1.40	1.27	3.19E+04	1.43E+05
860	120	1.59	1.04	3.48E+03	1.17E+06
894	144	1.70	1.15	4.78E+02	1.50E+03

30

^a A/イヌ/FL/43/04 (H3N8) ウイルスの接種後の、イヌから組織が採取された時期。

^b 標準化比は、各組織ホモジネートについてM (Ct) をGAPDH (Ct) で割って算出した

^c

組織ホモジネート1 μ L当たりのマトリックス遺伝子コピーの絶対数。

40

【0187】

実施例16の材料および方法例

ウイルス株

イヌインフルエンザウイルス株ならびにトリ、ウマおよびヒト由来のウイルス株(表15に列記)を孵化鶏卵またはMDCK細胞で増殖させて、それらの感染性をニワトリ胚におけるエンドポイント希釈またはブランク法により定量した。シチメンチョウ赤血球(red blood cell)の赤血球(erythrocytes)を用いた血球凝集試験により、迅速なウイルスの定量

50

が実施された。

【0188】

診断のための標本

2005年にウイルス性呼吸器疾患が疑われる症例から採取された合計60頭のイヌの肺組織について、イヌインフルエンザウイルスの存在を調べた。

【0189】

イヌ組織試料からのRNAの抽出

20～30mgの重量の肺組織のブロックを使い捨ての組織グライNDER (Kendal) に入れてホモジナイズした。製造業者の説明書に従って市販のキット (RNeasyミニキット、Qiagen, Valencia, CA) を用いて全RNAを抽出し、最終液量 60 μ L の液量で溶出した。

10

【0190】

プライマーおよびプローブの設計

CLUSTAL Xプログラム (バージョン1.8) を用いて、様々な亜型および多様な動物種に由来するH3およびM遺伝子のマルチプル配列アラインメントを実施した。マトリックス (M) プライマーおよびプローブはインフルエンザAウイルスの異なる亜型に対応する公知の配列を通じての保存領域より選択され、H3ヘマグルチニン遺伝子特異的なプライマーおよびプローブはウマおよびイヌインフルエンザAウイルス遺伝子に特異的にマッチして、相同のトリおよびヒト遺伝子にはミスマッチするように選択した (表13)。プライマー設計ソフトウェア (OLIGOS バージョン9.1) およびEXIQON (<http://lnatools.com>) より提供されるウェブ上の解析ツールをT_mの算出ならびに二次構造および自己ハイブリダイゼーションの予測に使用した。18S rRNAの保存領域を、イヌ組織試料から抽出されたRNAの存在に関する内因性内部対照として使用した。Pre-Developed TaqMan (登録商標) Assay Reagents for Eukaryotic 18S rRNA (VIC/TAMRA) (Applied Biosystems) を組織試料における18S rRNAのリアルタイム検出に使用した。

20

【0191】

リアルタイムRT-PCRの条件

一段階定量的リアルタイムRT-PCRは、ROXをパッシブレファレンス色素として含むQuantitect プローブRT-PCRキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて実施した。各リアルタイムRT-PCR反応において、最終液量 20 μ L 中、2X QuantiTech プローブRT-PCRマスターミックス 10 μ L、QuantiTech RT Mix 0.2 μ L、プライマー (H3遺伝子については最終濃度0.4 μ M、M遺伝子については最終濃度0.6 μ M)、プローブ (H3遺伝子については最終濃度0.1 μ M、M遺伝子については最終濃度0.2 μ M)、RNaseフリーの水を含む反応混合液と化合するための鋳型としてRNA試料の5 μ Lを使用した。一段階リアルタイムRT-PCRはMx3005PリアルタイムQPCRシステム (Stratagene) を用いて実施した。サイクリング条件は、50℃、30分間の逆転写過程を含んだ。HotStarTaq DNAポリメラーゼを活性化するための95℃、15分間の1回目変性段階の後、増幅は変性 (94℃、15秒間) およびアニーリング/伸長 (60℃、30秒間) を含む40サイクルの期間中に実施された。FAM (H3およびM検出のため発光波長516nm) およびVIC (18S rRNA検出のため発光波長555nm) の蛍光シグナルはサイクル当たり1回ずつ、伸長段階の終了時に得た。リアルタイムPCRアッセイ法のデータの取得および解析はMx3005Pソフトウェア バージョン2.02 (Stratagene) を用いて実施した。

30

40

【0192】

イヌインフルエンザ (H3N8) のためのH3プライマー/プローブの特異性、およびA型インフルエンザウイルスのためのMプライマー/プローブセットの汎用性

各プライマー/プローブセットの特異性について試験するために、インフルエンザAウイルスの複数の公知の亜型から抽出されたRNAをリアルタイムRT-PCRアッセイ法における鋳型として用いた (表15)。

【0193】

リアルタイムRT-PCRの性能の測定のためのRNA標準

イヌインフルエンザAウイルス (A/イヌ/フロリダ/242/2003 (H3N8)) の遺伝子は、T7プロモーターと結合したプライマーを用いることによってH3 (nt 1～487) およびM (nt 1～

50

276) のPCR単位複製配列を作出するために使用した(表13)。続いて、リボプロブインビトロ転写システム-T7 (Promega)を製造業者の説明書に従って用いることによって、H3およびM遺伝子の精製PCR単位複製配列をインビトロにおける転写のための鋳型として用いた。転写されたRNAの濃度は、260nmでの吸光度を測定して算出した。次に、感受性試験を実施するためにRNAを $10^8 \sim 10$ コピー/ μL の範囲で10倍段階希釈した。さらに、リアルタイムRT-PCRの全体の性能を調べるために、初回RNA鋳型濃度(コピー/ μL)の対数を各希釈より得られた閾値サイクル(Ct)に対してプロットして標準曲線を作成した。

【0194】

リアルタイムRT-PCRおよびDirectigen Flu A検査キットの比較感受性試験

$10^{6.67}\text{EID}_{50}/\text{mL}$ (HA=64) のA/ワイオミング/3/2003 (H3N2) および $10^{7.17}\text{EID}_{50}/\text{mL}$ (HA=16) のA/イヌ/フロリダ/242/2003(H3N8)を含む2つのウイルス株のストックウイルスを検出閾値アッセイ法に使用した。高速インフルエンザA抗原検出キットであるDirectigen Flu A (Becton, Dickinson and Company)を製造業者の説明書に従って使用して、標本のリン酸緩衝生理食塩液(PBS)($125\mu\text{L}$)の対数希釈を用いた。それぞれのDirectigen Flu A検査装置には膜の中央部に紫色のドットとして現れるH1N1インフルエンザ抗原スポットがあり、核タンパク質(NP)に対するモノクローナル抗体に基づいて検査の完全性が示される。ドットを取り巻く紫色の三角形の出現は、試験標本におけるインフルエンザNPの存在を示す。三角形からの紫色のシグナルの強度は、+(三角形の輪郭)、++(明るく着色した三角形)、+++(暗紫色の三角形)および++++(極めて暗紫色の三角形)としてスコア化される。ウイルスRNAはQIAampウイルスRNAミニキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて各ウイルス希釈液の $125\mu\text{L}$ 画分からウイルスRNAを抽出し、最終液量 $50\mu\text{L}$ に溶出した。抽出したウイルスRNAの $5\mu\text{L}$ 容量を、Directigen Flu Aキットを用いた比較感受性試験においてリアルタイムRT-PCRにより試験した。

【0195】

実施例16

イヌインフルエンザに関するリアルタイムRT-PCRアッセイ法は、宿主細胞由来の18S rRNAならびにインフルエンザAウイルスゲノム由来のMおよびH3をターゲットとする3つの分子プローブからの情報に依拠する(表14)。宿主遺伝子の増幅は標本の品質および完全性に関するレポーターである。イヌインフルエンザ(H3N8)ウイルスを含む臨床的、剖検または実験的試料は3つのプローブを用いて増幅シグナルが得られることが期待された。Mおよび18S rRNAプローブを用いた場合は増幅シグナルを与えるがH3については陰性である標本は、ヒト、ブタもしくはトリ由来、またはH3以外の亜型に由来するインフルエンザウイルスH3亜型の指標である。これらの稀なケースは、シーケンシングによって分析することができる単位複製配列cDNAを作出するためのHA汎用プライマーを用いたRT-PCRにより解決することができる。適切に採取および取り扱われたインフルエンザAウイルスを含まない標本は、18S rRNA単位複製配列シグナルのみを与える。18S rRNAプローブおよびH3プローブのみが増幅シグナルを与える状況は、そうでないことが証明されない限り、技術が不完全であることの指標であり；Mプローブでの偽陰性またはH3での偽陽性のいずれかが実証されなければならない。最後に、3つのプローブを用いて増幅シグナルを与えられない標本は、不完全な試料の採取、変性、RNA抽出の不備、またはPCRで用いられたポリメラーゼの阻害物質の存在が示唆される。

【0196】

イヌインフルエンザAウイルス(H3N8)のH3プライマー/プローブセットの特異性、およびA型インフルエンザのMプライマー/プローブセットの汎用性について調べるため、インフルエンザAウイルスの複数の亜型をリアルタイムRT-PCRにより試験した。結果は、H3プライマー/プローブセットがイヌインフルエンザ(H3N8)を用いた場合にのみ陽性の増幅シグナルを与えることを示している。その他の亜型またはヒトH3株では、顕著な偽陽性または非特異的な増幅シグナルは認められなかった。Mプライマー/プローブセットは、試験したすべての株において明確な増幅シグナルを与えた(表15)。これらの結果は、H3プライマー/プローブはイヌインフルエンザAウイルス(H3N8)を特異的に検出し、Mプライマ

ー/プローブはA型インフルエンザウイルスの多くの亜型を検出することを示した。

【0197】

リアルタイムRT-PCRアッセイ法の性能は、MおよびH3のインビトロにおける転写RNAのエンドポイント希釈により評価した。予想通り、閾値サイクル(Ct)は、RNA標準の希釈に直接関連して増加した。蛍光シグナルは、MおよびH3のRNA標準の希釈において、それぞれ、 10^3 および 10^2 コピー/ μ Lの低い値で検出可能である(図6Aおよび6B)。MおよびH3遺伝子の標準曲線は、各希釈から得られた閾値サイクル(Ct)に対して開始時のRNA濃度の対数をプロットして作成した(図6Cおよび6D)。標準曲線の勾配を用いて、理論上は指数関数的であるPCR反応効率を求め; 100%増幅効率は各サイクルの単位複製配列濃度の倍化を意味する。約-3.1~-3.6の勾配の標準曲線は、典型的には正確な定量(90~110%の反応効率)を必要とする大半のアプリケーションにおいて受け入れ可能である。Rsquared値は、標準曲線のプロットに対する全データの適合である。すべてのデータが完全に曲線上に位置する場合は、Rsquaredは1.00となる。データが曲線からさらに離れるに伴って、Rsquaredは減少する。0.985のRsquared値は大半のアッセイ法において受け入れ可能である。M標準曲線の勾配は-3.576(効率=90.4%)、Rsquared=1.00であり、H3標準曲線では勾配-3.423(効率=95.9%)およびRsquared=0.999であった。これらの値は、リアルタイムRT-PCRアッセイ法の増幅効率および全体の性能が申し分ないことを示している。本発明者らは、H3プライマー/プローブセットに比してMプライマー/プローブセットの低い効率および感度は多くの亜型、宿主および系統のウイルスを通じてのM遺伝子配列の変異性を幅広く網羅することを確保するために必要なMプライマー配列のN倍縮重が原因としている。

10

20

【0198】

リアルタイムRT-PCRアッセイ法の感度を市販の高速抗原検出アッセイ法(Directigen Flu A)とも比較した。A/ワイオミング/3/2003(H3N2)およびA/イヌ/フロリダ/242/2003(H3N8)の対数希釈をDirectigen Flu AおよびリアルタイムRT-PCRで分析した。Directigen Flu Aの結果より、双方のウイルス株に対する感受性がこれらの実験で用いられたウイルスストック株からの約100倍希釈であることが示された(図7)。イヌウイルス(A/イヌ/フロリダ/242/2003: $10^6 \times$ PFU/ml)の試料より生じるシグナル(紫色)は、これらの試料中の低いウイルス濃度に一致して、ヒトウイルス(A/ワイオミング/3/2003: $10^7 \times$ PFU/ml)に見られるシグナルよりも極めて弱いものであった。または、イヌインフルエンザの低いシグナルはNPに対するモノクローナル抗体の分子特異性、即ち、イヌインフルエンザAウイルスのNPエピトープ内でのアミノ酸の保存が低いことによるものである可能性がある。

30

【0199】

M遺伝子のリアルタイムRT-PCRは、A/イヌ/フロリダ/242/2003およびA/ワイオミング/3/2003の反応あたり、それぞれ、10および30PFU当量のウイルスで閾値を上回るCt値を与えた(表16)。2つのウイルス株の感受性の値の差異は元々のウイルス力価の差異である。本発明者らのリアルタイムRT-PCRアッセイ法におけるH3プライマー/プローブは専らイヌインフルエンザAウイルスを増幅することから、イヌおよびヒトインフルエンザウイルス間のH3遺伝子検出の比較は実施されなかった。RT-PCRの感受性は、高速抗原検出キットよりも 10^5 倍高い値であった。

40

【0200】

急性呼吸器疾患のイヌから得られた剖検標本におけるRT-PCR検査の性能について評価するため、2005年に提出された60検体のイヌ肺組織試料についてリアルタイムRT-PCRによりイヌインフルエンザAウイルスの存在を調べた。60検体中合計12検体の試料(20%)がMおよびH3の双方の遺伝子について陽性であり、残りの48検体の試料はMおよびH3の双方の遺伝子について陰性の結果を示した。リアルタイムアッセイ法の特異性について調べるため、鶏卵およびMDCK細胞接種によりウイルス分離の試みを実施し; RT-PCRによりイヌインフルエンザに関して陽性であった12検体中2検体の試料からイヌインフルエンザウイルスが得られた(データは示さず、原稿準備中)。すべての組織が重度呼吸器疾患の既往を有するイヌから採取されたが、大半の試料ではリアルタイムRT-PCRまたは従来の分離のいずれ

50

によってもイヌインフルエンザウイルスは得られず、気管支敗血症菌、イヌジステンパーまたはパラインフルエンザウイルスなどのその他の呼吸器病原体の高い出現率が示唆された。本明細書における一段階リアルタイムRT-PCRアッセイ法は、イヌインフルエンザAウイルス（H3N8）検出のための高速かつ高感度の経済的なアプローチを提供する。疾患の早期段階におけるイヌインフルエンザAウイルス（H3N8）感染の迅速な検査による診断は、臨床上の患者および施設の運営管理に関連する情報を与え得る。

【 0 2 0 1 】

（表 1 3）リアルタイムRT-PCR検出およびインビトロ転写において用いられたプライマーおよびプローブ

オリゴ名	タイプ	ターゲット	配列*	適用
Ca-H3-F387	フォワードプライマー	H3 (nt 387-406)	5'-tatgcacgcgccgatccat-3' (SEQ ID NO: 79)	リアルタイムPCR
Ca-H3-R487	リバースプライマー	H3 (nt 487-467)	5'-gctccacttcttccggttttga-3' (SEQ ID NO: 80)	
Ca-H3-P430	TaqManプローブ	H3 (nt 430-459)	FAM-aattcacagcagagggattcacatggacag-BHQ1 (SEQ ID NO: 81)	
FluA-M-F151	フォワードプライマー	M (nt 151-174)	5'-catggartggctaaagacaaagacc-3' (SEQ ID NO: 82)	リアルタイムPCR
FluA-M-R276	リバースプライマー	M (nt 276-253)	5'-agggcattttggacaaaakcgtcta-3' (SEQ ID NO: 83)	
FluA-M-P218	LNA TaqManプローブ	M (nt 218-235)	FAM-acgcTcaccgTgcccAgt-BHQ1 (SEQ ID NO: 84)	
H3-F1	フォワードプライマー	H3 (nt 1-14)	5'-tattcgtctcaggagcaaaaagcagggg-3' (SEQ ID NO: 85)	インビトロ転写
T7/H3-R490	リバースプライマー	T7/H3 (nt 487-467)	5'-tgtaatacgactcactatagggctccacttcttccggtttga-3' (SEQ ID NO: 86)	
M-F1	フォワードプライマー	M (nt 1-15)	5'-gatcgtcttctcaggagcaaaaagcaggtag-3' (SEQ ID NO: 87)	インビトロ転写
T7/M-R276	リバースプライマー	M (nt 276-253)	5'-tgtaatacgactcactatagggcattttggacaaaagcgctc-3' (SEQ ID NO: 88)	

*注：大文字 = LNA（固定された核酸）残基、r = aまたはg、k = gまたはt、下線 = T7プロモーター配列

【 0 2 0 2 】

（表 1 4）リアルタイムRT-PCRアッセイ法の評価

10

20

30

40

50

評価	結果		
	M	H3	18S rRNA
イヌインフルエンザAウイルス (H3N8) について陽性	+	+	+
インフルエンザAウイルス (亜型不明) について陽性	+	-	+
インフルエンザAウイルスについて陰性	-	-	+
RNA抽出エラーまたはPCR阻害物質の存在	-	-	-

10

【 0 2 0 3 】

(表 1 5) インフルエンザAウイルスの複数の亜型を用いたイヌH3プライマー/プローブセットの特異性試験およびMプライマー/プローブセットの汎用性試験

亜型	系統名	宿主	リアルタイムRT-PCR による検出	
			H3遺伝子 (Ct)	M遺伝子(Ct)
H1	A/オハイオ/1983	ヒト	Ctなし	15.40
	A/WSN/1933	ヒト	Ctなし	20.09
H3	A/ワイオミング/3/2003	ヒト	Ctなし	28.85
	A/ビクトリア/3/1975	ヒト	Ctなし	16.62
	A/イヌ/FL/242/2003	イヌ	28.43	29.25
H4	シチメンチョウ/MN/1066/1980	トリ	Ctなし	17.49
	臨床試料*	トリ	Ctなし	20.87
H5	Aヒヨコ/タイ/CUK2/2004	トリ	Ctなし	20.13
	A/キジ/NJ/1335/1998	トリ	Ctなし	16.64
H6	臨床試料*	トリ	Ctなし	19.52
H10	臨床試料*	トリ	Ctなし	25.64
	臨床試料*	トリ	Ctなし	19.59
H11	臨床試料*	トリ	Ctなし	15.72
	臨床試料*	トリ	Ctなし	24.55

* 臨床試料の亜型はヌクレオチドシーケンシングによって確認された点に留意されたい。

【 0 2 0 4 】

(表 1 6) リアルタイムRT-PCRおよびDirectigen Flu A間のインフルエンザAウイルス検出に関する比較感受性試験

10

20

30

40

ウイルス 希釈	Directigen Flu A		MのリアルタイムRT-PCR (Ct)	
	A/イヌ/242/03	A/ワイオミング/3/03	A/イヌ/242/03	A/ワイオミング/3/2003
10 ⁻¹	++	++++	22.42	19.48
10 ⁻²	+	+++	25.85	22.66
10 ⁻³	-	-	29.27	25.76
10 ⁻⁴	実施せず	実施せず	32.66	28.66
10 ⁻⁵	実施せず	実施せず	35.48	33.14
10 ⁻⁶	実施せず	実施せず	37.51	35.06
10 ⁻⁷	実施せず	実施せず	39.09	36.44
10 ⁻⁸	実施せず	実施せず	Ctなし	38.93

10

20

【 0 2 0 5 】

(表 1 7)

アミノ酸の分類	アミノ酸の例
非極性	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
非帯電極性	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
酸性	Asp, Glu
塩基性	Lys, Arg, His

30

【 0 2 0 6 】

(表 1 8)

文字記号	アミノ酸	文字記号	アミノ酸
A	アラニン	M	メチオニン
B	アスパラギンまたは アスパラギン酸	N	アスパラギン
C	システイン	P	プロリン
D	アスパラギン酸	Q	グルタミン
E	グルタミン酸	R	アルギニン
F	フェニルアラニン	S	セリン
G	グリシン	T	スレオニン
H	ヒスチジン	V	バリン
I	イソロイシン	W	トリプトファン
K	リジン	Y	チロシン
L	ロイシン	Z	グルタミンまたは グルタミン酸

40

50

【 0 2 0 7 】

(表 1 9) H3N8ウマおよびイヌインフルエンザウイルスのPB2タンパク質間のアミノ酸の相違

位置	ウマ共通配列*	イヌ/FL/03	イヌ/FL/04
5	K	K	E
12	S	L	L
37	G	G	E
175	R	R	I
374	L	I	I
375	R	R	K
447	Q	Q	H

10

【 0 2 0 8 】

(表 2 0) H3N8ウマおよびイヌインフルエンザウイルスのPB1タンパク質間のアミノ酸の相違

位置	ウマ共通配列*	イヌ/FL/03	イヌ/FL/04
114	V	I	I
154	D	G	G
221	A	T	T
317	M	I	I
459	I	I	V
682	I	I	V

20

【 0 2 0 9 】

(表 2 1) H3N8ウマおよびイヌインフルエンザウイルスのPAタンパク質間のアミノ酸の相違

位置	ウマ共通配列*	イヌ/FL/03	イヌ/FL/04
27	D	N	N
62	I	V	V
213	R	K	K
337	A	T	T
343	A	E	E
345	L	I	I
353	K	R	R
400	T	T	A
450	V	I	I
460	M	M	I
673	R	R	K
675	N	D	D

30

40

* 1963年から1998年に分離されたウイルスの有効な遺伝子に基づく。

【 0 2 1 0 】

(表 2 2) H3N8ウマおよびイヌインフルエンザウイルスのNPタンパク質間のアミノ酸の相違

位置	ウマ共通配列*	イヌ/FL/03	イヌ/FL/04
16	G	D	D
157	A	T	T
214	R	R	K
285	V	V	I
286	A	T	T
359	A	T	T
375	D	D	N
384	R	K	K
452	R	K	K

10

【 0 2 1 1 】

(表 2 3) H3N8ウマおよびイヌインフルエンザウイルスのNAタンパク質間のアミノ酸の相違

位置	ウマ共通配列*	イヌ/FL/03	イヌ/FL/04
9	A/T	T	A
12	S	F	F
20	L	I	I
40	G	R	R
42	G	D	D
46	N	K	K
52	E	E	K
61	R	K	K
69	N	S	S
72	E	K	K
201	V	I	I
261	I	V	V
301	I	I	V
396	N	D	D
397	L	P	P

20

30

【 0 2 1 2 】

(表 2 4) H3N8ウマおよびイヌインフルエンザウイルスのM1タンパク質間のアミノ酸の相違

位置	ウマ共通配列*	イヌ/FL/03	イヌ/FL/04
M1 161	S	S	A
M1 208	K/Q	R	R

* 1963年から1998年に分離されたウイルスの有効な遺伝子に基づく。

【 0 2 1 3 】

(表 2 5) H3N8ウマおよびイヌインフルエンザウイルスのNS1タンパク質間のアミノ酸の相違

40

位置	ウマ共通配列*	イヌ/FL/03	イヌ/FL/04
44	K	R	R
59	R	H	H
71	E	K	K
86	A	T	T
88	R	R	L
140	R	G	G
216	P	S	S

* 1963年から1998年に分離されたウイルスの有効な遺伝子に基づく。

10

【 0 2 1 4 】

実施例17 - イヌインフルエンザ刺激モデルの開発

フロリダで大流行したインフルエンザから分離されたイヌインフルエンザ (canine influenza) (イヌインフルエンザ (canine flu)) ウイルスはH3N8型インフルエンザウイルスであることが観察されていて、ウマインフルエンザウイルス株であるA/ウマ/オハイオ/03と密接に関連した (Crawford et al., SCIENCE Vol. 309, September 2005、参照により全体が本特許に組み入れられる)。この試験では、イヌにおいてインフルエンザ様疾病を誘発するためにウマインフルエンザウイルス株であるA/ウマ/オハイオ/03を使用することの可能性について検討された。

20

【 0 2 1 5 】

手順：

雌雄の10頭の13週齢のビーグル犬を供給業者から入手して、BSL-2施設内において個別のケージに入れて飼育した。イヌは各群5頭の2群に無作為に振り分けた。表26に示す通り、一方の群は気管内刺激に供して、他方の群は口鼻腔内刺激に供した。14週齢の時点でイヌを刺激した。

【 0 2 1 6 】

(表 2 6) 実験設計

群	イヌの数	刺激経路
1	5	気管内
2	5	口鼻腔

30

【 0 2 1 7 】

細胞培養で増殖させたウマインフルエンザウイルスA/ウマ/オハイオ/03を刺激ウイルスとして使用した。気管内刺激では、刺激ウイルスは、カフ付き気管チューブ (サイズ 4.0 /4.5、Sheridan, USA) および給液チューブ (サイズ 5Fr、1.7mm、長さ 1/16インチ、Kendall, USA) からなる送達チューブを介して、0.5~1.0mlの液量で投与した。口鼻腔刺激では、刺激ウイルス (10×7.0~10×8.0 TCID₅₀/イヌ) を噴霧器 (DeVilbiss Ultra-Neb (登録商標) 99超音波噴霧器、Sunrise Medical, USA) を用いて2~3mlの液量でミストとして投与した。

40

【 0 2 1 8 】

刺激後14日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。標準的プロトコル (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA) に従ってH3N8ウマインフルエンザウイルスを用いてHI力価を測定するため、0日 (刺激前)、ならびに刺激後7および14日に各イヌから血清試料を採取した。病理組織学的評価に備えて、全てのイヌを人道的に安楽死させて肺組織を10%緩衝ホルマリン中に採取した。

【 0 2 1 9 】

結果：

この実験の結果を表27にまとめる。インフルエンザ関連性の臨床徴候が刺激後数頭のイヌにおいて観察された。これらの徴候には、発熱 (>103 °F; >39.4 °C) および咳嗽が含

50

まれた。2群の5頭中1頭（即ち、20％）に比して、1群では5頭中2頭（即ち、40％）が発熱（ $> 103^{\circ}\text{F}$ ； $> 39.4^{\circ}\text{C}$ ）を示した。刺激後に口鼻腔刺激群の1頭がくしゃみを示して、もう1頭が咳嗽を示した。1群では、10～80のHI力価範囲、幾何学平均力価（GMT）20が観察された。2群では40～160の力価範囲、GMT 86が観察された。各群の1頭のイヌがインフルエンザと適合性するまたはインフルエンザに疾患特異的な病理組織学的病変を示した。

【0220】

（表27）イヌインフルエンザ刺激 - 臨床徴候、ウイルス分離、病理組織学の結果、および血清学の結果

イヌ*ID	刺激 方法*	臨床 徴候	ウイルス分離			顕微鏡的 病変 (病理組織学)	血清学 (HI力価)		
			鼻腔／口腔 スワブ	気管 擦過物	肺組織		刺激前	刺激後 7日	刺激後 14日
AAH	気管内	なし	陰性	陰性	陰性	陰性	10	10	20
ADB	気管内	なし	陰性	陰性	陰性	陰性	10	80	20
ADC	気管内	熱発*	陰性	陰性	陰性	陰性	10	20	20
AEB	気管内	熱発	陰性	陰性	陰性	陽性	10	40	20
AEE	気管内	なし	陰性	陰性	陰性	不明確	10	20	10
AAE	口鼻腔	なし	陰性	陰性	陰性	陰性	10	80	80
AAG	口鼻腔	なし	陰性	陰性	陰性	陰性	10	40	80
ABY	口鼻腔	散発性の くしゃみ、 散発性の 咳嗽	陰性	陰性	陰性	陽性	10	80	160
ADY	口鼻腔	熱発、 散発性の くしゃみ	陰性	陰性	陰性	陰性	10	80	80
ADZ	口鼻腔	なし	陰性	陰性	陰性	陰性	10	80	160

* 動物はウマインフルエンザ分離物であるOhio 03で刺激した。

** 直腸温? 103 F; 39.4

【0221】

実施例18 - イヌにおけるウマインフルエンザウイルスワクチンの有効性

フロリダで大流行したインフルエンザから分離されたイヌインフルエンザ (イヌインフ

10

20

30

40

50

ルエンザ)ウイルスはH3N8インフルエンザウイルスであることが観察されていて、配列類似性に基づいて、ウマインフルエンザウイルスのA/ウマ/オハイオ/03と密接に関連した。以下の試験は、実験的に不活化したウマインフルエンザウイルスワクチンの有効性を調べるために実施された。

【0222】

手順：

雌雄の9頭の7週齢のビーグル犬を供給業者から入手して、BSL-2施設内において個別のケージに入れて飼育した。これらのイヌは、表28に示す通り、2群に無作為に振り分けた。

【0223】

(表28) 実験設計

群	イヌの数	処理
1	5	ワクチン
2	4	対照

【0224】

最初の群は、不活化してCARBIGEN(商標)でアジュバント化したウマインフルエンザウイルスA/ウマ/オハイオ/03ワクチンを8~12週齢の時点で皮下(SQ)経路によってワクチン接種した5頭のイヌから構成された。A/ウマ/オハイオ/03は、標準的な方法を用いてバイナリーエチレンイミン(BEI)により不活化した。ワクチンの各用量には、質量に基づいて5%のCARBIGEN(商標)、不活化ウイルス 4096 HA単位、用量の総液量を1mlとするために十分なPBS、およびpHを7.2~7.4に調整するために十分なNaOHが含まれた。H3N8ウマインフルエンザウイルス標準的プロトコル(SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA)を用いてHI力価を測定するために、1回目および2回目ワクチン接種日、ならびに1回目および2回目ワクチン接種後7日および14日、ならびに刺激前に全てのイヌから血清試料を採取した。2回目ワクチン接種後3週に、ワクチン接種したイヌ5頭および年齢期の対応するイヌ4頭からなる第2群(即ち、対照群)を細胞培養で増殖させたウマインフルエンザウイルスA/ウマ/オハイオ/03(107.0~108.0 TCID₅₀/イヌ)で1頭当たり1~2mlの液量にて口鼻腔内投与により刺激した。刺激ウイルスは噴霧器(DeVilbiss Ultra-Neb(登録商標)99超音波噴霧器、Sunrise Medical, USA)を用いてミストとして投与した。刺激後14日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。病理組織学的評価に備えて肺組織を10%緩衝ホルマリンに採取するために、刺激後7日に5頭(ワクチン接種群 3頭、対照群 2頭)および刺激後14日に4頭(対照群 2頭、ワクチン接種群 2頭)のイヌを人道的に安楽死させた。

【0225】

結果：

この実験の結果を表29および30にまとめる。ワクチン接種した全てのイヌがワクチン接種後に血清転換を示した。40~640のHI力価範囲および129のGMTがウマインフルエンザウイルスA/ウマ/オハイオ/03でのワクチン接種後期間に観察されて、イヌインフルエンザ分離物であるA/イヌ/フロリダ/242/03では160~320のHI力価および211の幾何平均力価が観察された。6頭中2頭のワクチン接種犬が >103 F(>39.4)の発熱を1日示して、刺激後、いずれのイヌにもその他の臨床徴候は観察されなかった。

【0226】

結論：

ワクチン接種した全てのイヌが不活化してCARBIGEN(商標)でアジュバント化したウマインフルエンザウイルスに反応した。イヌインフルエンザウイルス分離物を用いたHI力価の結果は、不活化したウマインフルエンザワクチンがイヌインフルエンザウイルスに対して検出可能な量の交差反応抗体を誘導したことを示唆する。この実験で用いられた刺激ウイルスがビーグル犬に注目に値するいかなる臨床的な疾病も誘発しなかったにも関わらず

10

20

30

40

50

、イヌインフルエンザウイルス分離物を用いたHI力価に基づいて、不活化したウマワクチンは、イヌにおいて、H3N8型イヌインフルエンザウイルスによって引き起こされる「イヌインフルエンザ」疾病から潜在的にイヌを保護することができる交差反応抗体を誘導するために用いることができると結論付けられた。

【0227】

(表29) 血清学 - ワクチン接種前後および刺激後のHI力価

イヌ*	群	HI力価							
		ワクチン接種前		1回目 ワクチン接種後		2回目 ワクチン接種後		刺激後*	
		7日	14日	7日	14日	7日	14日	7日	14日
AKT	ワクチン接種**	40	80	640	640	640	640	320	320
ALH	ワクチン接種**	40	80	320	160	160	160	80	***
ALU	ワクチン接種**	40	80	320	160	160	160	80	80
ANJ	ワクチン接種**	40	80	320	160	160	80	320	***
ANU	ワクチン接種**	40	80	320	160	160	80	160	***
AJW	対照	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	***
AKR	対照	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	***
ALZ	対照	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	20
ARC	対照	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	10

* 動物はウマインフルエンザ分離物であるOhio 03で刺激した。

** ワクチン接種にはCARBIGEN (商標) でアジュバント化した不活化ウマインフルエンザウイルスOhio 03ワクチンを使用した。

*** 刺激後7日に安楽死させた。

【0228】

(表30) イヌインフルエンザ刺激* - 臨床徴候、ウイルス分離、病理組織学の結果

イヌID	処理群	臨床徴候	ウイルス分離			顕微鏡的病変 (病理組織学)
			鼻腔スワブ	気管擦過物	肺組織	
AKT	ワクチン接種**	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
ALH	ワクチン接種**	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
ALU	ワクチン接種**	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
ANJ	ワクチン接種**	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
ANU	ワクチン接種**	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
AJW	対照	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
AKR	対照	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
ALZ	対照	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
ARC	対照	なし	陰性	陰性	陰性	陰性

10

* 動物はウマインフルエンザ分離物であるOhio 03で刺激した。

** ワクチン接種にはCARBIGEN (商標) でアジュバント化した不活化ウマインフルエンザウイルスOhio 03ワクチンを使用した。

【0229】

実施例19 - イヌにおけるウマインフルエンザウイルスワクチンの有効性

20

フロリダでのインフルエンザ大流行から分離されたイヌインフルエンザウイルスは、多くのH3N8型ウマインフルエンザウイルス分離物と密接に関連すると特徴付けられた。DNAおよびアミノ酸配列類似性の分析から、イヌインフルエンザウイルスはウマインフルエンザウイルスのA/ウマ/オハイオ/03と極めて類似することが示された。市販のウマインフルエンザワクチンのイヌにおける有効性を調べるために、イヌにおいて以下の試験が実施された。

【0230】

手順：

雌雄の約16カ月齢の雑種20頭およびビーグル犬20頭を試験に使用した。イヌは各群6～7頭の6群(表31)に無作為に振り分けた。1および4群のイヌには、16および17カ月齢の時点で、市販の不活化してアジュバント化したウマインフルエンザワクチン(EQUICINE IIT M, Intervet Inc., Millsboro, DE)を皮下(SQ)経路によりワクチン接種した。2および5群のイヌに修飾ウマ/ケンタッキー/91生インフルエンザワクチンを1mlの液量で鼻腔内投与(単一の鼻孔)によりワクチン接種した。標準的プロトコル(SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA)を用いてH3N8ウマインフルエンザウイルスおよびイヌインフルエンザウイルスを用いたHI力価の測定に備えて、ワクチン接種日、1回目ワクチン接種後(1、2、4および5群)および2回目ワクチン接種後(1および4群)7および14日に血液試料を採取した。

30

【0231】

ワクチン接種群(最終のワクチン接種後72時間)および対照群に、細胞培養で増殖させたウマインフルエンザウイルス株であるA/ウマ/オハイオ/03(1頭当たり $10 \times 7.0 \sim 10 \times 8.0$ TCID₅₀)を1～2mlの液量で口鼻腔内投与により刺激した。刺激ウイルスは噴霧器(DeVilbiss Ultra-Neb(登録商標)99超音波噴霧器、Sunrise Medical, USA)を用いてミストとしてイヌに投与した。刺激後12日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。ウイルス分離のため、刺激後-1日から12日まで毎日、抗生物質(ネオマイシンおよびポリミキシンB)を加えたEarl MEM培地に鼻腔および口咽頭スワブを採取した。スワブ中のウイルスの存在は、動物が鼻/口分泌物中にウイルスを排出していることを示す。病理組織学的評価に備えて、全てのイヌを刺激後12日に人道的に屠殺して肺組織を10%緩衝ホルマリン中に採取した。

40

【0232】

(表31) 実験設計

50

群	イヌの数	品種	処理	投与回数	ワクチン接種経路
1	7	ビーグル	EQUICINE II (商標)**	2	皮下
2	7	ビーグル	A/KY/91***	1	鼻腔内
3	6	ビーグル	対照	N/A*	N/A*
4	7	雑種	EQUICINE II (商標)	2	皮下
5	7	雑種	A/KY/91	1	鼻腔内
6	6	雑種	対照	N/A*	N/A*

* 該当なし

** EQUICINE II (商標) は Intervet Inc. より液体ワクチンとして販売されている。EQUICINE II (商標) は、不活化されたA/ペンシルバニア/63インフルエンザ(つまり、「A/Pa/63」) ウイルスおよびA/ウマ/ケンタッキー/93インフルエンザ(つまり、「A/KY/93」) ウイルスをカルボポール(即ち、HAVLOGEN(登録商標)(Intervet Inc.))と共に含む。より具体的には、EQUICINE II (商標) の1回用量は、不活化したA/Pa/63 $\times 10^{6.0}$ EID₅₀、不活化したA/KY/93 $\times 10^{6.7}$ EID₅₀、体積に基づく0.25%カルボポール、および1mlの総液量を作成するために十分なPBSを含む。

*** A/KY/91は水で再溶解した凍結乾燥ワクチンである。このような再溶解は、ワクチン投与量を総液量1mlとするために十分なワクチン級の水を用いて実施された。ワクチンはウマ/ケンタッキー/91インフルエンザ(つまり「A/KY/91」) ウイルスを含んだ。このワクチンについては、例えば、参照によりそれらの全体が本特許に組み入れられる米国特許第6,436,408号、同6,398,774号および同6,177,082号において考察される。再溶解した場合、ワクチンの1回用量はA/KY/91 1ml当たり $10^{7.2}$ TCID₅₀、N-Z AMINE AS(商標) 1ml当たり0.015g、ゼラチン 1ml当たり0.0025g、およびDラクトース 1ml当たり0.04gを含んだ。N-Z AMINE AS(商標) は、カゼインの酵素加水分解によって産生されるアミノ酸およびペプチドの精製したソースである。N-Z AMINE AS(商標) はKerry Bio-Science(Norwich, NY, USA) より販売されている。

【0233】

結果：

ワクチン接種した全てのイヌがワクチン接種後に血清転換を示して、HI力価はウマインフルエンザウイルス(H3N8型)を用いたA/KY/91ワクチン群のイヌにおける10~40に比して、EQUICINE II(商標) ワクチン群では10~80であった。

【0234】

イヌインフルエンザおよびウマインフルエンザウイルス(H3N8型)を用いたHI力価の測定のために、ワクチン接種後(EQUICINE II(商標) ワクチン) については2回目ワクチン接種後) 2週に採取した試料を分析した。HIの結果を表32に示す。臨床徴候には、刺激後に観察された発熱($>103^{\circ}\text{F}$; $>39.4^{\circ}\text{C}$)、散発性の咳嗽、および軽度の鼻分泌物が含まれる。

【0235】

(表32) 血清学 - ワクチン接種後2週のHI力価

10

20

30

40

群	イヌの数	品種	処理	HI力価			
				ウマインフルエンザウイルス		イヌインフルエンザウイルス	
				範囲	GMT	範囲	GMT
1	7	ビーグル	Equicine II (商標)	10-80	36	10-80	33
2	7	ビーグル	A/KY/91	10-20	12	20-160	54
3	6	ビーグル	対照	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
4	7	雑種	Equicine II (商標)	40-80	54	40-80	50
5	7	雑種	A/KY/91	10-40	24	40-80	49
6	6	雑種	対照	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*

10

* 該当なし

【0236】

ビーグル犬では、EQUICINE II (商標) ワクチン群 (1群) の6頭中2頭、A/KY/91 ワクチン群 (2群) の7頭中1頭および対照群 (3群) の6頭中2頭が発熱を示した。3群 (対照群) の6頭中1頭のイヌが0.25%ニワトリ赤血球 (CRBC) を用いた血球凝集試験により鼻腔スワブ材料の細胞培養上清中にウイルスについて陽性であった。対照群 (3群) の6頭中1頭およびA/KY/91 ワクチン群 (2群) の7頭中1頭のイヌが刺激後観察期間中に軽度の鼻分泌物を示した。ビーグル犬では、対照群およびワクチン群に統計学的有意差はなかった ($P>0.05$)。

20

【0237】

雑種犬では、EQUICINE II (商標) ワクチン群 (4群) の7頭中5頭、A/KY/91 ワクチン群 (5群) の7頭中1頭および対照群 (6群) の6頭中5頭のイヌが発熱を示した。4および6群のそれぞれ1頭のイヌが軽度の鼻分泌物を示して、5群の1頭のイヌが散発性の咳嗽を示した。EQUICINE II (商標) ワクチン群 (4群) の7頭中2頭および対照群 (6群) の6頭中3頭のイヌがHAアッセイ法により鼻腔スワブ中のインフルエンザウイルスについて陽性であった。A/KY/91 群 (5群) のイヌには、鼻腔スワブ材料中にインフルエンザウイルスに関して陽性のイヌはいなかった。

30

【0238】

結論：

血清学により、市販のウマインフルエンザワクチンを用いたイヌのワクチン接種は中等度のインフルエンザ抗体反応を刺激することが示された。H3N8型インフルエンザウイルスでの刺激後のイヌにおけるインフルエンザ関連性の臨床徴候の発現には、若干の品種差がある可能性がある。弱毒化生ウマインフルエンザワクチン (A/KY/91) は、雑種犬において直腸温の点で臨床的疾患の発症からの有意 ($P<0.05$) な保護を示した。同様に、弱毒化生ウイルスワクチンは鼻分泌物中のインフルエンザウイルスの排出を予防した。

【0239】

実施例20 - イヌインフルエンザ刺激モデルの開発

試験のためにイヌにおいて疾病を誘発することが成功しなかった報告書を考慮して、イヌにおけるイヌインフルエンザ刺激モデルを開発するためにイヌインフルエンザウイルスであるH3N8を用いることの可能性を以下の試験で検討した。

40

【0240】

手順：

10頭の雌雄の雑種犬を、市販業者から入手して、BSL-2施設にてケージで飼育した。イヌは各群5頭の2群に無作為に振り分けた。表33に示す通り、一方の群は気管内/鼻腔内刺激に供して、他方の群は供された。

【0241】

(表33) 実験設計

群	イヌの数	刺激経路
1	5	気管内/鼻腔内
2	5	口鼻腔

【0242】

約12週齢の時点でイヌを刺激した。孵化鶏卵で増殖させたイヌインフルエンザウイルス（A/イヌ/フロリダ/242/03）ウイルスを刺激ウイルスとして使用した。各イヌに、合計約107.2 TCID₅₀のウイルスを2ml（口鼻腔内投与）または4ml（気管内/鼻腔内投与）のいずれかの液量で投与した。

【0243】

気管内/鼻腔内刺激では、カフ付き気管チューブ（サイズ4.5/5.0、Sheridan, USA）および給液チューブ（サイズ5Fr、1.7mm；長さ16インチ（41cm）、Kendall, USA）からなる送達チューブを用いて先ず刺激ウイルス3mlを、次いでPBS 5mlを気管に投与して、さらにシリンジを用いて刺激ウイルス1mlおよび大気3mlを順次、鼻孔に投与した。

【0244】

口鼻腔内刺激では、噴霧器（Nebulair（商標）、DVM Pharmaceuticals, Inc., Miami, FL）を用いて刺激ウイルスをミストとして約2mlの液量で投与した。刺激後14日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。病理組織学的検査に備えて、イヌを刺激後14日に安楽死させて、組織（肺および気管）の試料を10%緩衝ホルマリンに回収した。

【0245】

結果：

1および2群の全てのイヌが24～48時間以内にイヌインフルエンザの臨床徴候を発症した。各イヌが以下の臨床徴候の2つまたはそれよりも多くを示した：発熱（ $>103.0^{\circ}\text{F}$ ； $>39.4^{\circ}\text{C}$ ）、咳嗽、漿液性または粘液膿性の眼分泌物、漿液性または粘液膿性の鼻分泌物、嘔吐、下痢、抑鬱、体重低下、空嘔吐、喀血および聴取可能なラ音。1群の5頭中5頭および2群の5頭中4頭のイヌの肺組織が以下の1つまたは複数を含む病理組織学的病変を示した：びまん性膿性気管支肺炎、腔内の好中球浸出物のプラグならびに粘膜および細気管支周辺組織における顕著な単核細胞凝集を伴う気管支炎/細気管支炎、多数の泡沫性マクロファージを伴う肺胞内の混合浸出物、リンパ細胞性および形質細胞性ならびに顆粒球性の細胞浸潤、ならびにインフルエンザウイルス感染と適合性またはインフルエンザウイルス感染に疾病特異的なII型肺細胞の増殖を伴う肺胞隔壁の肥厚。気管組織の試料は正常であった。

【0246】

結論：

本試験で用いられたもののようなH3N8イヌインフルエンザ分離物は、本試験で記載された方法または同様の方法の一つを用いてイヌにおいてイヌインフルエンザ疾病を誘発するために使用することができる。

【0247】

実施例21 - イヌインフルエンザ刺激モデルの開発

イヌにおけるイヌインフルエンザ刺激モデルを開発するためのイヌインフルエンザウイルスH3N8を使用する可能性について、以下の試験でさらに詳しく検討した。

【0248】

手順：

15頭の17～18週齢の雑種犬および5頭の15週齢のビーグル犬を市販業者から入手して、BSL-2施設においてケージで飼育した。雑種犬は、各群5頭の3群（1群～3群）に無作為に振り分けた。ビーグル犬は全て、表34に示す通り1つの群（4群）に振り分けた。

【0249】

（表34）実験設計

10

20

30

40

群	品種	イヌの数	刺激ウイルス用量
1	雑種	5	$10^{6.8}$ TCID ₅₀
2	雑種	5	$10^{5.8}$ TCID ₅₀
3	雑種	5	$10^{4.8}$ TCID ₅₀
4	ビーグル	5	$10^{6.8}$ TCID ₅₀

【0250】

イヌを病原性イヌインフルエンザウイルスであるA/イヌ/フロリダ/242/2003（イヌインフルエンザ疾病を伴うグレイハウンドの肺から分離された）（University of FloridaのDr. Cynda Crawfordより提供）で口鼻腔内投与により刺激した。刺激ウイルスは噴霧器（Nebulair（商標））を用いてミストとして約2mlの液量で投与した。刺激後14日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。

10

【0251】

結果：

1および4群のイヌの80%（5頭中4頭）、2および3群のイヌの100%が48時間以内にイヌインフルエンザの臨床徴候を発症した。各イヌは以下の臨床徴候の1つまたは複数を示した：発熱（ >103.0 F； >39.4 ）、咳嗽、漿液性または粘液膿性の眼分泌物、漿液性または粘液膿性の鼻分泌物、嘔吐、下痢、抑鬱、体重低下、空嘔吐およびラ音。ビーグル犬に観察された臨床徴候は一般に雑種犬に比してより軽度かつ短期間であった。

20

【0252】

結論：

本試験で用いられたもののようなH3N8イヌインフルエンザ分離物は、 $104.8 \sim 106.8$ TCID₅₀の刺激用量範囲で、本試験で記載された方法または同様の方法を用いてイヌにおいてイヌインフルエンザ様またはケンネルコフ様の疾病を誘発するために用いられ得る。雑種犬およびビーグル犬に認められた臨床徴候にはいくつかの相違があった。一般に、ビーグル犬は雑種犬に比してより軽度のインフルエンザ関連性の臨床徴候を示す傾向がある。

【0253】

実施例22 - イヌインフルエンザワクチン有効性試験

以下の試験は、H3N8ウマインフルエンザワクチンのイヌにおけるイヌインフルエンザウイルスに対する有効性を調べるために実施された。

30

【0254】

手順：

17頭の14週齢の雑種犬および10頭の8週齢のビーグル犬を市販業者から入手した。イヌは表35に示す通り5試験群に無作為に振り分けて、研究施設内で飼育した。

【0255】

（表35）実験設計

群	齢期	イヌの数	処理	投与回数	ワクチン接種時の齢期 (週齢)
1	14週齢	7	ワクチン接種	2	14 & 18
2	14週齢	5	ワクチン接種	1	18
3	14週齢	5	対照	--	--
4	8週齢	5	ワクチン接種	2	8 & 12
5	8週齢	5	対照	--	--

40

【0256】

この試験で用いられたワクチンはHAVLOGEN（登録商標）でアジュバント化した不活化ウマインフルエンザウイルス（A/ウマ/KY/02）ワクチンであった。このワクチンを調製するため、ウイルスは標準的方法を用いてバイナリーエチレンイミン（BEI）により不活化した。各ワクチン用量は、HAVLOGEN（登録商標）（10% v/v）、不活化ウイルス 6144 HA単

50

位、10%チメロサル 0.1% (v/v)、フェノールレッド 0.1% (v/v)、pHを6.8~7.2に調整するために十分なNaOH、および総投与液量を1mlとするために十分なPBSを含んだ。

【0257】

1および4群のイヌはワクチンの2回用量でワクチン接種した。2回目用量（即ち、ブースター）は1回目の4週後に投与した。2群のイヌは18週齢の時点で1回用量でワクチン接種した。1回目および2回目ワクチン接種後0日（ワクチン接種前）、7および14日に、H3N8イヌインフルエンザ分離物を用いて標準的プロトコル（例えば、SAM 124、CVB、USDA、Ames、LA）でHI力価を評価するため、血液試料を採取した。刺激約5日前にイヌをBSL-2施設に移して、個別ケージで飼育した。

【0258】

ワクチン接種群および齢期の対応する対照群の全てのイヌを、1および4群の2回目ワクチン接種後ならびに2群の1回目ワクチン接種後2週に病原性イヌインフルエンザウイルス（1頭当たりA/イヌ/フロリダ/242/2003 107.7 TCID₅₀）の口鼻腔内投与により刺激した。刺激ウイルスは噴霧器（Nebulair（商標））を用いてミストとして1頭当たり2mlにて投与した。刺激後17日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。刺激後-1日（即ち、刺激前日）から17日までウイルス分離のため、ウイルス輸送培地 2mlを含む試験管に鼻腔および口咽頭スワブを採取した。病理組織学に備えて、全てのイヌを刺激後17日に安楽死させて、肺および気管の試料を10%緩衝ホルマリンに採取した。HI力価測定のため、刺激後7および14日に血液試料を採取した。刺激後観察において用いられた臨床徴候スコア割付を表36に示す。

【0259】

結果：

2回ワクチン接種群（1および4群）の全てのイヌがイヌインフルエンザウイルス分離物に対してHI抗体価反応を発現した（表37）。刺激後、全ての群において刺激後14日の力価が約4倍に増大したことは、全てのイヌが刺激ウイルスに曝露されたことを間接的に示した。全てのイヌがイヌインフルエンザの以下の徴候の1つまたは複数を発症した：発熱（ >103.0 F； >39.4 ）、咳嗽、漿液性または粘液膿性の眼分泌物、漿液性または粘液膿性の鼻分泌物、嘔吐、下痢、抑鬱、体重低下、および呼吸困難。ワクチン接種群は、齢期の対応する対照群に比して、程度の軽い臨床徴候を示した（表38）。8週齢（ $P=0.040$ ）および14週齢（ $P=0.003$ ）のイヌ（それぞれ、4群および1群）の双方において、2回用量のワクチン接種に起因して臨床徴候の有意な軽減が見られた。この実験では、1回用量のワクチン接種は臨床徴候の有意な軽減を示さなかった（ $P=0.294$ ）（2群）。

【0260】

ウイルス分離結果を表39に示す。14週齢のイヌでは、2回用量ワクチン群（1群）の7頭中2頭（29%）、1回用量ワクチン群（2群）の5頭中3頭（60%）、および対照群（3群）の5頭中5頭（100%）のイヌから採取されたスワブ試料よりイヌインフルエンザウイルスが分離された。8週齢のイヌでは、2回用量ワクチン群（4群）の5頭中1頭（20%）および対照群（5群）の5頭中4頭（80%）のイヌからウイルスが分離された。ワクチン接種していない対照群（3および5群）に比して、2回用量ワクチン接種（1および4群）に起因してスワブ試料中のイヌインフルエンザウイルスについて陽性のイヌの数が有意な減少（ $P=0.003$ ）を示した。1回用量ワクチン群（2群）および対照群（3群）においてスワブ試料中のイヌインフルエンザウイルス陽性のイヌの数に減少が見られたが（60%対100%）、差は統計学的に有意でなかった（ $P=0.222$ ）。

【0261】

イヌインフルエンザ疾病と適合性または疾病特異的な病変を特定するため、病変に関して肺および気管組織試料の病理組織学的評価を行った。これには、例えば、以下の1つまたは複数が存在するかどうかの検討が含まれる：化膿性気管支肺炎を伴う領域、単核細胞凝集（リンパ球、形質細胞）を伴う気管支周囲炎/細気管支周囲炎；腔内における顆粒球細胞片のプラグの存在；呼吸上皮の過形成；多量の顆粒球細胞および細胞片を伴う肺胞における混合浸出物；（泡沫性）マクロファージ、形質細胞およびリンパ球の凝集；ならび

10

20

30

40

50

にII型肺細胞の増殖を伴う肺胞隔壁の肥厚。

【0262】

表40は、イヌにおけるこの実験での病変の程度の総括を示す。14週齢のイヌでは、2回用量ワクチン接種群（2群）の7頭中5頭および1回用量ワクチン接種群（1群）の5頭中4頭のイヌにおいて肺病変は規模が小さくかつ程度が軽かった。対照群の全てのイヌ（3群）は重度かつ大規模な病変を示して、保護作用がないことが示唆された。14週齢のイヌでは、1回または2回用量ワクチン接種に起因する気管病変の差はなかった。8週齢のイヌでは、2回用量ワクチン接種群および対照群のイヌで肺病変に差はなかった。何らかの気管病変を示したイヌはいなかった。

【0263】

結論：

この試験の結果は以下を実証する。（1）不活化したH3N8ウマインフルエンザウイルスはワクチン接種したイヌにおいてイヌインフルエンザウイルス交差反応性のHI抗体反応を誘発することができる、（2）H3N8ウマインフルエンザウイルスワクチンの使用はイヌにおいてイヌインフルエンザウイルス疾病の程度を軽減することができる、および（3）H3N8ウマインフルエンザウイルスワクチンの使用は鼻および/または口分泌物中のウイルス排出を抑制することができる。

【0264】

（表36）臨床徴候および評点系

臨床徴候	1日当たりのスコア
体温	
<103.0°F (<39.4°C)	0
103.0 – 103.9°F (39.4–	2
104.0-104.9°F (40.0-40.5°C)	3
>105.0°F (>40.6°C)	4
咳嗽	
咳嗽なし	0
散発性	2
発作性	4
くしゃみ	
くしゃみなし	0
散発性	1
発作性	2
鼻分泌物	
分泌物なし	0
漿液性－少量	1
漿液性－多量	1
粘液膿性－少量	2
粘液膿性－多量	3

10

20

30

40

臨床徴候	1日当たりのスコア
眼分泌物	
分泌物なし	0
漿液性－少量	1
漿液性－多量	1
粘液膿性－少量	2
粘液膿性－多量	3
喀血	
なし	0
あり	5
抑鬱	
なし	0
あり	1
食欲不振	
なし	0
あり	1
呼吸器の徴候	
なし	0
ラ音	3
呼吸困難	4
あえぎ	5
粘液性の喀痰	
なし	0
あり	2
嘔吐	
なし	0
あり	1
糞便の異常	
なし	0
あり	1

10

20

30

【 0 2 6 5 】

(表 3 7) 血清学 - 血球凝集阻害力価

群番号	イヌID	齢期 (週齢)	処理	投与回数	HI力価										刺激後 日数	
					1および4群の1回目ワクチン接種後日数											
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14				
1	921	14	ワクチン接種	2	<10	<10	10	20	40	20	42***	7	14			
1	926	14	ワクチン接種	2	<10	<10	<10	40	40	80	80	80	320			
1	931	14	ワクチン接種	2	<10	<10	<10	10	20	40	20	80	>640			
1	955	14	ワクチン接種	2	<10	<10	<10	10	40	40	160	320	>640			
1	011	14	ワクチン接種	2	<10	<10	<10	10	20	40	160	320	>640			
1	013	14	ワクチン接種	2	<10	<10	<10	20	40	40	160	320	>640			
1	019	14	ワクチン接種	2	<10	<10	<10	10	20	40	80	>640	>640			
2	922	14	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>640	>640	>640			
2	953	14	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	>640	>640			
2	015	14	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	>640	>640			
2	016	14	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	320	>640			
2	017	14	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	>640	>640			
3	923	14	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160	>640			
3	012	14	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	320	>640			
3	014	14	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160	>640			
3	018	14	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160	>640			
3	01A	14	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160	>640			
4	406	8	ワクチン接種	2	<10	<10	10	40	80	80	160	>640	>640			
4	407	8	ワクチン接種	2	<10	20	20	40	40	40	320	>640	>640			
4	504	8	ワクチン接種	2	<10	<10	10	20	20	80	160	>640	>640			
4	704	8	ワクチン接種	2	<10	<10	10	40	80	160	>640	>640	>640			
4	705	8	ワクチン接種	2	<10	<10	<10	40	80	160	>640	>640	>640			
5	404	8	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160	>640			
5	405	8	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80	>640			
5	610	8	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	40	>640			
5	702	8	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160	>640			
5	703	8	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160	>640			

* 1回目ワクチン接種 - 1群および4群

** 2回目ワクチン接種 - 1群および4群；1回目ワクチン接種 - 2群

*** 刺激日

【0266】

(表38) 総イヌインフルエンザウイルス疾病臨床スコアの分析

10

20

30

40

50

群	処理	ワクチン 投与回数	1および4群の1回目 ワクチン接種時の年齢	1頭当たりの 平均総スコア	P値*
1	ワクチン接種	2	14 週齢	8.7	0.003 (1群対3群)
2	ワクチン接種	1	14 週齢 (これらのイヌは 18週齢の時点で1回、 ワクチン接種した)	21.8	0.294 (2群対3群)
3	対照	--	14 週齢 (これらのイヌは ワクチン接種しなかった)	25.4	--
4	ワクチン接種	2	8 週齢	2.0	0.040 (4群対5群)
5	対照	--	8 週齢 (これらのイヌは ワクチン接種しなかった)	5.4	--

* SAS (登録商標) バージョン8.2のNPARIWAY法を用いて解析 (ワクチン群はウィルコクソン順位検定を用いて比較した)。

【 0 2 6 7 】

(表 3 9) ウイルス排出

10

20

30

40

群 番号	イヌ ID	齢期 (週齢)	処理	ワクチン 投与 回数	刺激後日数																		
					-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	921	14	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	926	14	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	931	14	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	955	14	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	011	14	ワクチン接種	2	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	013	14	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	019	14	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	922	14	ワクチン接種	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	953	14	ワクチン接種	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	015	14	ワクチン接種	1	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	016	14	ワクチン接種	1	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	017	14	ワクチン接種	1	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	923	14	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	012	14	対照	N/A	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	014	14	対照	N/A	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	018	14	対照	N/A	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	01A	14	対照	N/A	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	406	8	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	407	8	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	504	8	ワクチン接種	2	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	704	8	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	705	8	ワクチン接種	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	404	8	対照	N/A	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	405	8	対照	N/A	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	610	8	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	702	8	対照	N/A	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	703	8	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

10

20

30

40

【 0 2 6 8 】

(表 4 0) 組織試料の病理組織学的評価

群番号	イヌID	齢期 (週齢)	処理	投与 回数	顕微鏡的病変 (病理組織学)	
					肺	気管
1	921	14	ワクチン接種	2	+/-	-
1	926	14	ワクチン接種	2	-	+/-
1	931	14	ワクチン接種	2	-	-
1	955	14	ワクチン接種	2	+/-	-
1	011	14	ワクチン接種	2	+/-	-
1	013	14	ワクチン接種	2	+/-	+/-
1	019	14	ワクチン接種	2	+/-	+/-
2	922	14	ワクチン接種	1	+/-	-
2	953	14	ワクチン接種	1	+/-	+/-
2	015	14	ワクチン接種	1	+/-	+
2	016	14	ワクチン接種	1	-	-
2	017	14	ワクチン接種	1	+/-	+/-
3	923	14	対照	N/A	+	+/-
3	012	14	対照	N/A	+	-
3	014	14	対照	N/A	+	-
3	018	14	対照	N/A	+	-
3	01A	14	対照	N/A	+	+/-
4	406	8	ワクチン接種	2	+/-	-
4	407	8	ワクチン接種	2	-	-
4	504	8	ワクチン接種	2	+/-	-
4	704	8	ワクチン接種	2	-	-
4	705	8	ワクチン接種	2	-	-
5	404	8	対照	N/A	-	-
5	405	8	対照	N/A	-	-
5	610	8	対照	N/A	+/-	-
5	702	8	対照	N/A	+/-	-
5	703	8	対照	N/A	-	-

10

20

30

「+」 インフルエンザ感染に一致するまたは疾病特異的な重度の病変

「+/-」 軽度の病変（不明確）

「-」 正常

【0269】

実施例23 - イヌインフルエンザワクチン有効性試験

イヌにおけるイヌインフルエンザウイルスに対する多価H3N8ウマインフルエンザワクチンの有効性を調べるために、以下の試験が実施された。

【0270】

手順：

17頭の15週齢のビーグル犬を市販業者から入手した。イヌは表41に示す通り3群に無作為に振り分けて、研究施設にて飼育した。

40

【0271】

（表41）実験設計

群	イヌの数	処理	投与 回数	ワクチン接種時の 齢期 (週齢)
1	7	ワクチン接種	2	15 & 19
2	5	ワクチン接種	1	19
3	5	対照	--	--

50

【0272】

この試験で使用したワクチンは、HAVLOGEN（登録商標）でアジュバント化した不活化ウマインフルエンザ（A/ウマ/KY/02、A/ウマ/KY/93およびA/ウマ/NM/2/93）ワクチンであった。このワクチンを調製するため、ウイルスは標準的な方法を用いてバイナリーエチレンイミン（BEI）により不活化した。各ワクチン用量は、HAVLOGEN（登録商標）（10% v/v）、各不活化ウイルス 2048 HA単位、10%チメロサル 0.1%（v/v）、フェノールレッド 0.1%（v/v）、pHを6.8～7.2に調整するために十分なNaOH、および総投与液量を1mlとするために十分なPBSを含んだ。

【0273】

1群のイヌはワクチンの2回用量でワクチン接種した。2回目（即ち、ブースター）用量は1回目用量の4週後に投与した。2群のイヌは19週齢の時点でワクチンの1回用量でワクチン接種した。1回目および2回目ワクチン接種後0日（ワクチン接種前）、7および14日にH3N8イヌインフルエンザ分離物を用いて標準的プロトコルによりHI力価を評価するため、血液試料を採取した。刺激7日前にイヌをBSL-2施設に移して、個別ケージで飼育した。

【0274】

ワクチン接種群および年齢の対応する対照群の全てのイヌを、1群の2回目ワクチン接種後および2群の1回目ワクチン接種後2週に病原性イヌインフルエンザウイルス（1頭当たりA/イヌ/フロリダ/242/2003 107.3 TCID₅₀）の口鼻腔内投与により刺激した。刺激ウイルスは噴霧器（Nebulair（商標））を用いてミストとして1頭当たり2mlにて投与した。刺激後14日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。病理組織学に備えて、全てのイヌを刺激後14日に安楽死させて、肺および気管の試料を10%緩衝ホルマリンに採取した。HI力価測定のため、刺激後7および14日に血液試料を採取した。刺激後観察において用いられた臨床徴候スコア割付を表42に示す。

【0275】

結果：

ワクチン接種した全てのイヌがイヌインフルエンザウイルス分離物に対してHI抗体力価反応を発現した（表43）。刺激後に、全ての群において刺激前のHI力価に比して刺激後14日のHI力価が約4倍に増大したことは全てのイヌが刺激ウイルスに曝露されたことを間接的に示す。全てのイヌがイヌインフルエンザ疾病の徴候を発症して、各イヌは以下の臨床徴候の1つまたは複数を示した：発熱（ >103.0 F； >39.4 ）、咳嗽、漿液性または粘液膿性の眼分泌物、漿液性または粘液膿性の鼻分泌物、嘔吐、下痢、抑鬱、体重低下および呼吸困難。ワクチン接種群は、年齢の対応する対照群に比して、程度の軽い臨床徴候を示した（表44）。イヌにおける2回用量のワクチン接種に起因して、臨床徴候の有意（ $P=0.028$ ）な軽減が見られた（1群）。1回用量のワクチン接種は臨床徴候の有意な軽減を示さなかった（ $P=0.068$ ）（2群）。

【0276】

実施例22と同じく、イヌインフルエンザ疾病と適合性または疾病特異的な病変を特定するため、病変に関して肺および気管組織試料の病理組織学的評価を行った。表45は、イヌにおけるこの実験での病変の程度の総括を示す。15週齢のイヌでは、1回用量または2回用量のイヌのワクチン接種が全てのイヌにおいて肺の病変を予防した。対照群の5頭中4頭（80%）のイヌが、インフルエンザ疾患に一致する重度の化膿性気管支肺炎を有した。2回用量のワクチン群（1群）の7頭中1頭および対照群（3群）の5頭中1頭のイヌが、インフルエンザ疾病に帰することができる気管支炎を示唆する軽度の気管支病変を有した。

【0277】

結論：

この試験の結果は、1) 不活化したH3N8ウマインフルエンザウイルスがワクチン接種したイヌにおいてイヌインフルエンザウイルス交差反応性HI抗体反応を誘発することができる、および2) H3N8ウマインフルエンザウイルスワクチンの使用がイヌにおいてイヌインフルエンザウイルス疾病の程度を軽減することができることを実証する。

【0278】

(表 4 2) 臨床徴候および評点系

臨床徴候	1日当たりのスコア
体温	
<103.0°F (<39.4°C)	0
103.0 – 103.9°F (39.4–	2
104.0-104.9°F (40.0–	3
>105.0°F (>40.6°C)	4
咳嗽	
咳嗽なし	0
散発性	2
発作性	4
くしゃみ	
くしゃみなし	0
散発性	1
発作性	2
鼻分泌物	
分泌物なし	0
漿液性－少量	1
漿液性－多量	1
粘液膿性－少量	2
粘液膿性－多量	3
眼分泌物	
分泌物なし	0
漿液性－少量	1
漿液性－多量	1
粘液膿性－少量	2
粘液膿性－多量	3
喀血	
なし	0
あり	5
抑鬱	
なし	0
あり	1
食欲不振	
なし	0
あり	1
呼吸器の徴候	
なし	0
ラ音	3
呼吸困難	4
あえぎ	5
粘液性の喀痰	
なし	0
あり	2
嘔吐	
なし	0
あり	1
糞便の異常	
なし	0
あり	1

10

20

30

40

50

【 0 2 7 9 】

(表 4 3) 血清学 - 血球凝集阻害力価

群 番号	イヌID	処理	投与 回数	HI力価									
				1群の1回目ワクチン接種後日数								刺激後 日数	
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14		
1	ALK	ワクチン接種	2	<10	<10	20	20	80	40	160	320		
1	AMF	ワクチン接種	2	<10	<10	10	20	20	40	160	320		
1	AKY	ワクチン接種	2	<10	20	20	20	40	40	160	80		
1	ALC	ワクチン接種	2	<10	10	10	10	40	40	160	160		
1	ALL	ワクチン接種	2	<10	<10	10	10	40	20	160	320		
1	ALM	ワクチン接種	2	<10	<10	10	20	40	40	80	160		
1	AMU	ワクチン接種	2	<10	20	40	40	40	40	40	160		
2	ALA	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	10	320	160		
2	AMA	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	20	>640	80		
2	APD	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	10	>640	320		
2	APG	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	10	320	80		
2	APT	ワクチン接種	1	<10	<10	<10	<10	<10	10	320	320		
3	ALT	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160		
3	AMS	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160		
3	AKX	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	80		
3	ALX	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80		
3	AMJ	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	80		

* 1回目ワクチン接種 - 1群

** 2回目ワクチン接種 - 1群 ; 1回目ワクチン接種 - 2群

*** 刺激日

【 0 2 8 0 】

(表 4 4) 総イヌインフルエンザ疾病臨床スコアの分析

10

20

30

40

群	処理	投与回数	1群の1回目 ワクチン接種時の年齢	1頭当たりの 平均総スコア	P値*
1	ワクチン接種	2	15 週 齢	6.3	0.028 (1群対3群)
2	ワクチン接種	1	15 週 齢 (これらのイヌは 19週 齢の時点で1回、 ワクチン接種した)	14.2	0.068 (2群対3群)
3	対照	--	15 週 齢 (これらのイヌは ワクチン接種しなかった)	24.4	--

* SAS (登録商標) バージョン8.2のNPARIWAY法を用いて解析 (ワクチン群はウィルコクソン順位和検定を用いて比較した)。

【 0 2 8 1 】

(表 4 5) 組織試料の病理組織学的評価

10

20

30

40

群番号	イヌID	処理	投与回数	顕微鏡的病変 (病理組織学)	
				肺	気管
1	ALK	ワクチン接種	2	-	+/-
1	AMF	ワクチン接種	2	-	-
1	AKY	ワクチン接種	2	-	-
1	ALC	ワクチン接種	2	-	-
1	ALL	ワクチン接種	2	-	-
1	ALM	ワクチン接種	2	-	-
1	AMU	ワクチン接種	2	-	-
2	ALA	ワクチン接種	1	-	-
2	AMA	ワクチン接種	1	-	-
2	APD	ワクチン接種	1	-	-
2	APG	ワクチン接種	1	-	-
2	APT	ワクチン接種	1	-	-
3	ALT	対照	N/A	+/-	-
3	AMS	対照	N/A	+	-
3	AKX	対照	N/A	+	-
3	ALX	対照	N/A	+	+/-
3	AMI	対照	N/A	-	-

10

20

「+」 インフルエンザ感染に一致するまたは疾病特異的な重度の病変

「+/-」 軽度の病変（不明確）

「-」 正常

【0282】

実施例24 - イヌインフルエンザワクチン有効性試験

（1）イヌにおけるイヌインフルエンザウイルスに対する一価対多価H3N8ウマインフルエンザワクチンの有効性、および（2）ワクチン有効性に対する投与経路の影響を調べるために、以下の試験が実施された。

【0283】

30

手順：

30頭の10週齢のビーグル犬を市販業者から入手した。イヌは表46に示す通り6群に無作為に振り分けて、研究施設にて飼育した。

【0284】

（表46）実験設計

群	イヌの数	処理	ワクチン 接種経路	投与 回数	ワクチン 接種時の齢期 (週齢)
1	5	VAX-1	IN	2	10 & 14
2	5	VAX-2	SQ	2	10 & 14
3	5	VAX-2	IN	2	10 & 14
4	5	VAX-3	SQ	2	10 & 14
5	5	VAX-3	IN	2	10 & 14
6	5	対照	--	--	--

40

【0285】

3種類のワクチン（VAX-1、VAX-2およびVAX-3）を使用した。VAX-1はHAVLOGEN（登録商標）でアジュバント化した不活化ウマインフルエンザウイルス（A/ウマ/KY/02）の一価ワクチンであり、各用量はHAVLOGEN（登録商標）（10% v/v）、不活化ウイルス 6144 HA単位、10%チメロサル 0.1%（v/v）、フェノールレッド 0.1%（v/v）、pHを6.8～7.2に

50

調整するために十分なNaOH、および総投与液量を1mlとするために十分なPBSを含んだ。VAX-2はHAVLOGEN（登録商標）でアジュバント化した不活化ウマインフルエンザウイルス（A/ウマ/KY/02）の一価ワクチンであり、ワクチンの各用量はHAVLOGEN（登録商標）（10% v/v）、不活化ウイルス 4096 HA単位、10%チメロサル 0.1%（v/v）、フェノールレッド 0.1%（v/v）、pHを6.8~7.2に調整するために十分なNaOH、および総投与液量を1mlとするために十分なPBSを含んだ。VAX-3はHAVLOGEN（登録商標）でアジュバント化した不活化ウマインフルエンザ（A/ウマ/KY/02、A/ウマ/KY/93およびA/ウマ/NM/2/93）の多価ワクチンであり、HAVLOGEN（登録商標）（10% v/v）、株当たり不活化ウイルス 2048 HA単位、10%チメロサル 0.1%（v/v）、フェノールレッド 0.1%（v/v）、pHを6.8~7.2に調整するために十分なNaOH、および総投与液量を1mlとするために十分なPBSを含んだ。ワクチン製剤のために用いられた全てのインフルエンザウイルスは、標準的な方法を用いてバイナリーエチレンイミン（BEI）により不活化された。

10

【0286】

各群のワクチンおよび投与経路を表46に示す。ワクチン接種群の全てのイヌが鼻腔内（IN）または皮下（SQ）経路を介してワクチン接種されて、各イヌは2回用量の投与を受けた。2回目（即ち、ブースター）用量は1回目用量の4週後に投与した。1回目および2回目ワクチン接種後0日（ワクチン接種前）、7および14日にH3N8イヌインフルエンザ分離物を用いて標準的プロトコルによりHI力価を評価するため、血液試料を採取した。刺激7日前にイヌをBSL-2施設に移して、個別ケージで飼育した。

【0287】

ワクチン接種群および年齢の対応する対照群の全てのイヌを、2回目ワクチン接種後2週に病原性イヌインフルエンザウイルス（1頭当たりA/イヌ/フロリダ/242/2003 107.4 TCID₅₀）の口鼻腔内投与により刺激した。刺激ウイルスは噴霧器（Nebulair（商標））を用いてミストとして1日当たり2mlにて投与した。刺激後14日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。HI力価測定のため、刺激後7および14日に血液試料を採取した。病理組織学に備えて、全てのイヌを刺激後14日に安楽死させて、肺および気管の試料を10%緩衝ホルマリンに採取した。刺激後観察において用いられた臨床徴候スコア割付を表47に示す。

20

【0288】

結果：

ワクチンの種類に関わらず、SQ経路を介してワクチン接種された全てのイヌがイヌインフルエンザウイルス分離物に対してHI抗体価反応を発現した（表48）。ワクチンの種類に関わらず、INワクチン接種群（即ち、1、3および5群）のイヌには、ワクチン接種後期間中、イヌインフルエンザウイルス分離物に対してHI抗体価反応を発現したイヌはいなかった。しかし、全てのイヌにおいて刺激後14日までに抗体価が4倍に増加し、間接的に、全てのイヌが刺激ウイルスに曝露されたことが示された（表47）。

30

【0289】

全てのイヌがイヌインフルエンザの以下の臨床徴候の1つまたは複数を発症した：発熱（ >103.0 F； >39.4 ）、咳嗽、漿液性または粘液膿性の眼分泌物、漿液性または粘液膿性の鼻分泌物、嘔吐、下痢、抑鬱、体重低下、および呼吸困難。ワクチン接種群は、年齢の対応する対照群に比して、程度の軽い臨床徴候を示した（表49）。VAX-3をSQ経路によりワクチン接種されたイヌ（4群）では、臨床徴候の顕著な軽減が見られた。この実験では、VAX-1、VAX-2またはVAX-3のIN投与はイヌインフルエンザウイルスの臨床徴候における顕著な軽減を示さなかった。

40

【0290】

実施例22および23と同じく、イヌインフルエンザ疾病と適合性または疾病特異的な病変を特定するため、病変に関して肺および気管組織試料の病理組織学的評価を行った。表50は、イヌにおけるこの実験での病変の程度の総括を示す。対照群の5頭中5頭のイヌ（6群）がインフルエンザ感染に一致する肺病変を示した。VAX-2をSC経路でワクチン接種された5頭中2頭（2群）およびVAX-3をSC経路でワクチン接種された5頭中3頭（4群）のイヌに

50

はいかなるインフルエンザ関連性の肺病変もなかった。ワクチンを鼻腔内経路により投与された全てのイヌが、ワクチンの種類に関わらず、インフルエンザ感染に一致する重度の肺病変を示した。この試験で観察された気管の病変は極めて軽度であった。

【 0 2 9 1 】

結論：

この試験の結果は以下を実証する。(1) 不活化したH3N8ウマインフルエンザウイルスはSQ経路を介してワクチン接種したイヌにおいてイヌインフルエンザウイルス交差反応性HI抗体反応を誘発することができる、(2) 一価(VAX-1およびVAX-2)または多価ワクチン(VAX-3)のいずれの鼻腔内投与もイヌでは有効でなかった、および(3) 多価ワクチン(VAX-3)の皮下投与はイヌにおいてイヌインフルエンザウイルス疾病の程度を有意($P = 0.016$)に軽減させた。

【 0 2 9 2 】

(表 4 7) 臨床徴候および評点系

臨床徴候	1日当たりのスコア
体温	
<103.0°F (<39.4°C)	0
103.0 – 103.9°F (39.4-	2
104.0-104.9°F (40.0-	3
>105.0°F (>40.6°C)	4
咳嗽	
咳嗽なし	0
散発性	2
発作性	4
くしゃみ	
くしゃみなし	0
散発性	1
発作性	2
鼻分泌物	
分泌物なし	0
漿液性－少量	1
漿液性－多量	1
粘液膿性－少量	2
粘液膿性－多量	3
眼分泌物	
分泌物なし	0
漿液性－少量	1
漿液性－多量	1
粘液膿性－少量	2
粘液膿性－多量	3
咯血	
なし	0
あり	5
抑鬱	
なし	0
あり	1
食欲不振	
なし	0
あり	1
呼吸器の徴候	
なし	0
ラ音	3
呼吸困難	4
あえぎ	5
粘液性の喀痰	
なし	0
あり	2

10

20

30

40

臨床徴候	1日当たりのスコア
嘔吐	
なし	0
あり	1
糞便の異常	
なし	0
あり	1

【 0 2 9 3 】

(表 4 8) 血清学 - 血球凝集阻害力価

群 番号	イヌID	処理	ワクチン 接種経路	投与 回数	HI力価								刺激後 日数
					ワクチン接種後日数								
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14	
1	248	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	40
1	501	ワクチン接種	IN	2	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	160	160
1	502	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
1	469	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
1	46A	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80
2	232	ワクチン接種	SQ	2	<10	<10	<10	20	20	40	320	640	
2	511	ワクチン接種	SQ	2	<10	10	10	20	20	20	160	640	
2	514	ワクチン接種	SQ	2	<10	<10	40	40	80	40	160	320	
2	461	ワクチン接種	SQ	2	<10	10	10	20	20	20	>640	>640	
2	463	ワクチン接種	SQ	2	<10	10	40	80	80	40	80	320	
3	246	ワクチン接種	IN	2	<10	10	<10	<10	<10	<10	40	40	
3	505	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80	
3	506	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160	
3	464	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80	
3	465	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160	
4	23B	ワクチン接種	SQ	2	<10	10	10	40	40	20	160	160	
4	247	ワクチン接種	SQ	2	<10	<10	<10	20	20	20	160	320	
4	508	ワクチン接種	SQ	2	<10	10	40	40	80	80	320	320	
4	512	ワクチン接種	SQ	2	<10	<10	20	20	80	80	320	160	
4	516	ワクチン接種	SQ	2	<10	10	10	20	80	80	160	>640	
5	503	ワクチン接種	IN	2	<10	10	<10	<10	<10	<10	80	160	
5	513	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80	
5	462	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	320	

10

20

30

40

群 番号	イヌID	処理	ワクチン 接種経路	投与 回数	HI力価										
					ワクチン接種後日数									刺激後 日数	
					0*	7	14	28**	35	42***					
5	466	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	7	14			
5	46B	ワクチン接種	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80			
6	236	対照	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160			
6	504	対照	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	160			
6	507	対照	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160			
6	515	対照	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160			
6	468	対照	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160			

* 1回目ワクチン接種

** 2回目ワクチン接種

*** 刺激日

【0294】

(表49) 総イヌインフルエンザ疾病臨床スコアの分析

10

20

30

40

50

群	処理	ワクチン 接種経路	1頭当たりの平均総スコア	P値*
1	VAX-1	IN	35.2	0.500 (1群対6群)
2	VAX-2	SQ	31.0	0.345 (2群対6群)
3	VAX-2	IN	39.4	0.631 (3群対6群)
4	VAX-3	SQ	13.0	0.016 (4群対6群)
5	VAX-3	IN	42.6	0.790 (4群対6群)
6	対照	--	36.8	--

10

20

30

40

* SAS (登録商標) バージョン8.2のNPARIWAY法を用いて解析 (ワクチン群はウィルコクソン順位和検定を用いて比較した)。

【 0 2 9 5 】

(表 5 0) 組織試料の病理組織学的評価

群 番号	イヌID	処理	ワクチン 接種経路	投与 回数	顕微鏡的病変 (病理組織学)	
					肺	気管
1	248	ワクチン接種	IN	2	+	-
1	501	ワクチン接種	IN	2	+	-
1	502	ワクチン接種	IN	2	+	-
1	469	ワクチン接種	IN	2	+	+
1	46A	ワクチン接種	IN	2	+	+
2	232	ワクチン接種	SQ	2	+	-
2	511	ワクチン接種	SQ	2	+	-
2	514	ワクチン接種	SQ	2	-	-
2	461	ワクチン接種	SQ	2	+	-
2	463	ワクチン接種	SQ	2	-	-
3	246	ワクチン接種	IN	2	+	-
3	505	ワクチン接種	IN	2	+	-
3	506	ワクチン接種	IN	2	+	+
3	464	ワクチン接種	IN	2	+	-
3	465	ワクチン接種	IN	2	+	+
4	23B	ワクチン接種	SQ	2	-	-
4	247	ワクチン接種	SQ	2	+/-	-
4	508	ワクチン接種	SQ	2	-	-
4	512	ワクチン接種	SQ	2	-	+/-
4	516	ワクチン接種	SQ	2	+	+
5	503	ワクチン接種	IN	2	+	+/-
5	513	ワクチン接種	IN	2	+	+
5	462	ワクチン接種	IN	2	+	+/-
5	466	ワクチン接種	IN	2	+	+
5	46B	ワクチン接種	IN	2	+	-
6	236	対照	--	2	+	-
6	504	対照	--	2	+	+
6	507	対照	--	2	+	+
6	515	対照	--	2	+	+/-
6	468	対照	--	2	+	+

10

20

30

40

50

「+」 インフルエンザ感染に一致するまたは疾病特異的な重度の病変

「+/-」 軽度の病変（不明確）

「-」 正常

【0296】

実施例25 - イヌインフルエンザワクチン有効性試験

イヌインフルエンザ疾病はH3N8インフルエンザウイルス（CIV）によって引き起こされる。CIVはウマH3N8ウイルスに非常に密接に関連して（Crawfordら、2005年）、曝露された全てのイヌに感染する。曝露されたイヌの約80%が臨床徴候を発症した。以下の試験では、不活化したH3N8ウマインフルエンザウイルスワクチンおよびイヌインフルエンザウイルスワクチンの有効性について調べた。

【0297】

手順：

35頭のビーグル犬および5頭の雑種犬がこの試験で使用された。ビーグル犬は3群に無作為に振り分けられた（表51）。雑種犬は全て、対照群（3群）に振り分けられた。全てのイヌが標準的なグロースダイエットで飼育されて、飲水は自由に与えられた。

【0298】

（表51）実験設計

群	処理	ワクチン 接種経路	イヌの 数	ワクチン 接種時の齢期 (週齢)	刺激
1	VAX-1	IM	15	8 & 12	実施
2	VAX-2	SC	5	8 & 12	実施
3	対照	N/A	20	N/A	実施

【 0 2 9 9 】

1および2群のイヌはVAX-1またはVAX-2のいずれかをワクチン接種された（表51）。VAX-1はHAVLOGEN（登録商標）でアジュバント化した不活化ウマインフルエンザウイルス（A/ウマ/KY/02）ワクチンであった。ワクチンの調製のため、ワクチンウイルスは標準的な方法を用いてバイナリーエチレンイミン（BEI）により不活化した。ワクチンの各用量は、HAVLOGEN（登録商標）（10% v/v）、不活化ウイルス 6144 HA単位、10% チメロサル 0.1%（v/v）、フェノールレッド 0.1%（v/v）、総投与液量を1mlとするために十分なPBS、およびpHを6.8~7.2に調整するために十分なNaOHを含んだ。

【 0 3 0 0 】

VAX-2は不活化してCARBIGEN（商標）でアジュバント化したイヌインフルエンザ抗原ワクチン（A/イヌ/FI/43/2004）であった。A/イヌ/FI/43/2004は、標準的な方法を用いてバイナリーエチレンイミン（BEI）により不活化した。ワクチンの各用量には、質量に基づいて5%のCARBIGEN（商標）、不活化ウイルス 約1280 HA単位、投与の総液量を1mlとするために十分なPBS、およびpHを7.2~7.4に調整するために十分なNaOHが含まれた。H3N8ウマインフルエンザウイルス標準的プロトコル（SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA）を用いてHI力価を測定するために、全てのイヌから1回目および2回目ワクチン接種日、1回目および2回目ワクチン接種後7日および14日、ならびに刺激前に血清試料を採取した。刺激7日前にイヌをABSL-2施設に移して、個別ケージで飼育した。

【 0 3 0 1 】

ワクチン接種群および齢期の対応する対照群の全てのイヌを、2回目ワクチン接種後2週に病原性イヌインフルエンザウイルス（1頭当たりA/イヌ/フロリダ/242/2003 107.2 TCID₅₀）の口鼻腔内投与により刺激した。刺激ウイルスは噴霧器（Nebulair（商標））を用いてミスト（2ml/イヌ）として投与した。刺激後14日間、インフルエンザ関連性の臨床徴候についてイヌを観察した。刺激後-1日（即ち、刺激前日）から14日までウイルス分離のために、ウイルス輸送培地 2mlを含む試験管に毎日、鼻腔および口咽頭スワブを採取した。HI力価測定のため、刺激後7および14日に血液試料を採取した。刺激後観察において用いられた臨床徴候スコア割付を表52に示す。

【 0 3 0 2 】

結果：

ワクチン接種した全てのイヌ（1および2群）がイヌインフルエンザウイルス分離物に対してHI抗体価反応を発現した（表53）。全てのイヌがイヌインフルエンザの以下の徴候の1つまたは複数を発症した：発熱（>103.0 F；>39.4℃）、咳嗽、漿液性または粘液膿性の眼分泌物、漿液性または粘液膿性の鼻分泌物、嘔吐、下痢、抑鬱、および食欲不振。ワクチン接種群は、齢期の対応する対照群に比して、程度の軽い臨床徴候を示した（表54）。VAX-1（1群）またはVAX-2（2群）のいずれかをワクチン接種したイヌにおいて、臨床徴候の有意（ $P < 0.001$ ）な軽減が見られた。

【 0 3 0 3 】

ウイルス分離結果を表55および56に示す。病原性イヌインフルエンザウイルス刺激後、1群（VAX-1）の15頭中5頭（33%）、2群（VAX-2）の5頭中0頭（0%）、および対照群（3群）の20頭中17頭（85%）のイヌからイヌインフルエンザウイルスが分離された。不活化したウマインフルエンザワクチン（VAX-1）およびイヌインフルエンザウイルス（VAX-2）ワクチン接種群の双方が、対照群に比して、鼻もしくは口分泌物またはその双方においてウイルス排出の有意（ $P = 0.004$ ）な減少を示した（表55）。

【 0 3 0 4 】

結論：

この試験の結果は以下を実証する。(1) 不活化したH3N8ウマインフルエンザウイルスおよびイヌインフルエンザウイルスのワクチンはワクチン接種したイヌにおいてイヌインフルエンザウイルス反応性HI抗体反応を誘発することができる、(2) H3N8ウマインフルエンザウイルスまたはイヌインフルエンザウイルスワクチンの使用はイヌにおいてイヌインフルエンザウイルス疾病の程度を軽減することができる、ならびに(3) H3N8ウマインフルエンザウイルスまたはイヌインフルエンザウイルスワクチンの使用は鼻および/または口分泌物中のウイルス排出を抑制することができる。

【 0 3 0 5 】

(表 5 2) 臨床徴候および評点系

臨床徴候	1日当たりのスコア
体温	
<103.0°F (<39.4°C)	0
103.0 – 103.9°F (39.4–	2
104.0-104.9°F (40.0-40.5°C)	3
>105.0°F (>40.6°C)	4
咳嗽	
咳嗽なし	0
散発性	2
発作性	4
くしゃみ	
くしゃみなし	0
散発性	1
発作性	2
鼻分泌物	
分泌物なし	0
漿液性－少量	1
漿液性－多量	1
粘液膿性－少量	2
粘液膿性－多量	3
眼分泌物	
分泌物なし	0
漿液性－少量	1
漿液性－多量	1
粘液膿性－少量	2
粘液膿性－多量	3
喀血	
なし	0
あり	5
抑鬱	
なし	0
あり	1
食欲不振	
なし	0
あり	1
呼吸器の徴候	
なし	0
ラ音	3
呼吸困難	4
あえぎ	5
粘液性の喀痰	
なし	0
あり	2
嘔吐	
なし	0
あり	1
糞便の異常	
なし	0
あり	1

10

20

30

40

(表 5 3) 血清学 - 血球凝集阻害力価

群 番号	イヌ ID	処理	ワクチン 接種経路	HI力価									
				ワクチン接種後日数					刺激後日数				
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14	28	35
1	AYS	ワクチン接種	IM	<10	<10	<10	20	40	40	80	>640		
1	AZV	ワクチン接種	IM	<10	<10	<10	20	40	40	160	>640		
1	BAD	ワクチン接種	IM	<10	<10	<10	40	40	80	80	320		
1	BAE	ワクチン接種	IM	<10	<10	10	20	20	20	40	320		
1	BAH	ワクチン接種	IM	<10	<10	10	10	40	40	160	>640		
1	BAJ	ワクチン接種	IM	<10	<10	10	20	80	80	40	320		
1	BAN	ワクチン接種	IM	<10	10	10	20	40	40	40	320		
1	BBN	ワクチン接種	IM	<10	10	10	20	80	80	40	320		
1	BBT	ワクチン接種	IM	<10	<10	<10	20	40	40	40	160		
1	BBY	ワクチン接種	IM	<10	<10	<10	20	80	80	160	>640		
1	BCS	ワクチン接種	IM	<10	10	40	40	160	160	160	160		
1	BCZ	ワクチン接種	IM	<10	10	10	20	80	40	160	160		
1	BDP	ワクチン接種	IM	<10	<10	<10	20	40	40	80	>640		
1	BEE	ワクチン接種	IM	<10	10	20	40	80	80	160	320		
1	BEY	ワクチン接種	IM	<10	<10	10	10	40	40	160	160		
2	AZH	ワクチン接種	SC	<10	<10	10	20	80	80	160	160		
2	AZT	ワクチン接種	SC	<10	<10	10	10	40	80	320	>640		
2	BBC	ワクチン接種	SC	<10	<10	20	40	160	160	80	160		
2	BCM	ワクチン接種	SC	<10	<10	10	20	80	40	80	160		
2	BEB	ワクチン接種	SC	<10	<10	<10	10	20	40	80	160		
3	AYT	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	320		
3	AZJ	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	160		
3	AZL	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160		
3	AZN	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	160		
3	BAB	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	320		

10

20

30

群 番号	イヌ ID	処理	ワクチン 接種経路	HI力価									
				ワクチン接種後日数				刺激後日数					
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14		
3	BBD	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>640	
3	BBU	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	
3	BBZ	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	
3	BCC	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	
3	BCD	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>640	
3	BCG	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>640	
3	BCI	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	
3	BCL	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>640	
3	BCV	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	
3	BDU	対照	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>640	
3	MFI	対照	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	<10	<10	320	
3	MFJ	対照	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	<10	<10	320	
3	MFK	対照	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	<10	<10	320	
3	MFR	対照	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	<10	<10	320	
3	MFS	対照	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	<10	<10	>640	

* 1回目ワクチン接種

** 2回目ワクチン接種

*** 刺激日

【0307】

(表54) 総イヌインフルエンザ疾病臨床スコアの分析

10

20

30

40

群	処理	1頭当たりの 平均総スコア	P値*
1	VAX-1	9.1	<0.001 (1群対3群)
2	VAX-2	5.4	<0.001 (2群対3群)
3	対照	24.1	---

* SAS (登録商標) バージョン9.1のNPARIWAY法を用いて解析 (ワクチン群はGLM法を用いて比較した)。

10

【0308】

(表55) 刺激後のウイルス排出

群	処理	ウイルスを 排出した イヌのパーセント	P値*
1	VAX-1	33% (5/15)	0.004 (1群対3群)
2	VAX-2	0% (0/5)	0.004 (2群対3群)
3	対照	85% (17/20)	---

20

* SAS (登録商標) (バージョン9.1) のFREQ法およびFisherの直接検定に関連するP値を用いて解析した。

【0309】

(表56) 血清学 - 血球凝集阻害力価

群 番号	イヌID	処理	ワクチン 接種経路	刺激後日数															
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	AYS	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	AZV	ワクチン接種	IM	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAD	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAE	ワクチン接種	IM	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAH	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAJ	ワクチン接種	IM	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAN	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BBN	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BBT	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BBY	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BCS	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BCZ	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BDP	ワクチン接種	IM	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BEE	ワクチン接種	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BEY	ワクチン接種	IM	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	AZH	ワクチン接種	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	AZT	ワクチン接種	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	BBC	ワクチン接種	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	BCM	ワクチン接種	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	BEB	ワクチン接種	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AYT	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AZJ	対照	N/A	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AZL	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AZN	対照	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BAB	対照	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

10

20

30

40

群 番号	イヌID	処理	ワクチン 接種経路	刺激後日数															
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3	BBD	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BBU	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BBZ	対照	N/A	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCC	対照	N/A	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCD	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCG	対照	N/A	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCI	対照	N/A	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCL	対照	N/A	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCV	対照	N/A	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BDU	対照	N/A	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFI	対照	N/A	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFJ	対照	N/A	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFK	対照	N/A	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFR	対照	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFS	対照	N/A	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N

10

20

30

40

N - 口または鼻腔スワブからウイルスは分離されなかった。

P - 鼻もしくは口または鼻腔および口腔のスワブからウイルスが分離された。

【 0 3 1 0 】

(表 5 7) インフルエンザウイルス間のヘマグルチニン、ノイラミニダーゼおよび核タンパク質遺伝子アミノ酸配列の類似性

遺伝子 (イヌ /フロリダ/43/2004)	アミノ酸 配列 類似性	比較のために使用したインフルエンザウイルスの 遺伝子
ヘマグルチニン	88	ウマ/アルジェ/72
HA	90	ウマ/サンパウロ/6/69
HA	91	ウマ/マイアミ/1/63
HA	93	ウマ/ニューマーケット/79
HA	94	ウマ/ケンタッキー/1/81
HA	95	ウマ-2/ルーディアーナ/87
HA	96	ウマ/アラスカ/1/91
HA	97	ウマ/テネシー/5/86
HA	98	ウマ/ケンタッキー/5/02
HA	99	ウマ/オハイオ/1/2003
HA	99	ウマ/フロリダ/242/2003
ノイラミニダーゼ	88	Eq/アルジェ/72
NA	90	ウマ/サンパウロ/6/69
NA	91	ウマ/マイアミ/1/63
NA	93	ウマ/ニューマーケット/79
NA	94	ウマ/ケンタッキー/1/81
NA	95	ウマ-2/ルーディアーナ/87
NA	96	ウマ/サンティアゴ/85
NA	97	ウマ/テネシー/5/86
NA	98	ウマ/ケンタッキー/5/2002
NA	99	ウマ/オハイオ/1/2003
NA	99	イヌ/フロリダ/242/2003
核タンパク質 (「NP」)	94	ウマ/マイアミ/1/63
NP	97	ウマ/ケンタッキー/1/81
NP	99	ウマ/ケンタッキー/5/02
NP	99	ウマ/オハイオ/1/2003
NP	99	イヌ/フロリダ/242/2003

10

20

30

【0311】

本特許（特許請求の範囲を含む）における「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、および「含む（comprising）」の語句は、排他的ではなく包括的に解釈されるべきである。この解釈は、これらの語句が米国特許法下で与えられる解釈と同一であることを意図する。

【0312】

好ましい態様の前記の詳細な説明は、専ら当業者に発明、その原理およびその実践応用を知らせることを意図するものであり、従って、当業者は、それらが特定の使用の要件に最適であり得るように、発明を多くの形式において採用および応用することが可能である。従って、本発明は前記の態様に限定されるものではなく、様々に修正され得る。

40

【0313】

本明細書に記載される実施例および態様は専ら例示目的であり、その観点において様々な修正または変更が当業者に示唆されて本出願の精神および範囲内に含まれるべきであることが理解されなければならない。

【0314】

参照

米国特許第5,106,739号

米国特許第5,034,322号

50

米国特許第6,455,760号
米国特許第6,696,623号
米国特許第4,683,202号
米国特許第4,683,195号
米国特許第4,800,159号
米国特許第4,965,188号
米国特許第5,994,056号
米国特許第6,814,934号
米国特許第6,436,408号
米国特許第6,398,774号
米国特許第6,177,082号

10

公開された米国特許出願第20040078841号
公開された米国特許出願第20040067506号
公開された米国特許出願第20040019934号
公開された米国特許出願第20030177536号
公開された米国特許出願第20030084486号
公開された米国特許出願第20040123349号

Greyhound Daily News, 1/28/99. National Greyhound Association (NGA), Abilene, Kansas.
<http://www.NGAgreyhounds.com>.

20

Personal communication, Dr. William Duggar, veterinarian at Palm Beach Kennel Club,
West Palm Beach, Florida.

Altschul, S. F. *et al.* (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" *J. Mol. Biol.* 215:402-410.

- Altschul, S. F. *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs" *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- An, G. (1987) "Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis" *Methods Enzymol.* 153:292-305.
- Beltz, G. A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H., Cherbas, P. T., Kafatos, F. C. (1983) "Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods" *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285.
- Burleson, F. *et al.* (1992) *Virology: A Laboratory Manual* (Academic Press).
- Byars, N.E., A.C. Allison (1987) "Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity" *Vaccine* 5:223-228.
- Crawford, P.C. *et al.* (2005) "Transmission of equine influenza virus to dogs" *Science* 310:482-485.
- Chang, C.P. *et al.* (1976) "Influenza virus isolations from dogs during a human epidemic in Taiwan" *Int J Zoonoses* 3:61-64.
- Dacso, C.C. *et al.* (1984) "Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections" *J Clin Microbiol* 20:833-835.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983) "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(1):21-25.
- Felsenstein, J. (1989) *Cladistics* 5:164.
- Fields *et al.* (1946) *Fields Virology*, 3rd ed., Lippincott-Raven publishers.
- Ford, R.B., Vaden, S.L. (1998) "Canine infectious tracheobronchitis" In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2nd edition, C.E. Greene, editor, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 33-38.
- Fouchier *et al.*, (2000) *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11):4096-4101.
- Good, X. *et al.* (1994) "Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase" *Plant Molec. Biol.* 26:781-790.
- Guan, Y. *et al.* (2004) "H5N1 influenza: a protean pandemic threat" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8156-8161.
- Guo, Y. *et al.* (1992) "Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China" *Virology* 188:245-255.
- Houser, R.E. *et al.* (1980) "Evidence of prior infection with influenza A/Texas/77 (H3N2) virus in dogs with clinical parainfluenza" *Can J Comp Med* 44:396-402.

10

20

30

40

- Karasin, A.I. *et al.* (2000) "Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada" *J Virol* 74:9322-9327.
- Karlin S. and Altschul, S. F. (1990) "Methods for Assessing the Statistical Significance of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268.
- Karlin S. and Altschul, S. F. (1993) "Applications and Statistics for Multiple High-Scoring Segments in Molecular Sequences" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.
- Kawaoka, Y. *et al.*, (1989) "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics" *J Virol* 63:4603-4608.
- Keawcharoen, J. *et al.* (2004) "Avian influenza H5N1 in tigers and leopards" *Emerg Infect Dis* 10:2189-2191.
- Kendal, A. P. *et al.* (1982) In Concepts and Procedures for Laboratory-based Influenza Surveillance. A. P. Kendal, M. S. Pereira, J. J. Skehel, Eds. (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and Pan-American Health Organization, Atlanta, GA, United States) pp. B17-B35.
- Kilbourne, E.D. *et al.* (1975) "Demonstration of antibodies to both hemagglutinin and neuraminidase antigens of H3N2 influenza A virus in domestic dogs" *Intervirology* 6:315-318.
- Kimura, K. *et al.* (1998) "Fatal case of swine influenza virus in an immunocompetent host" *Mayo Clin Proc* 73:243-245.
- Klimov, A. I. *et al.* (1992a) "Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus" *Virology* 186:795-797.
- Klimov A. *et al.* (1992b) "Subtype H7 influenza viruses: comparative antigenic and molecular analysis of the HA-, M-, and NS-genes" *Arch Virol.* 122:143-161.
- Kovacova, A. *et al.* (2002) "Sequence similarities and evolutionary relationships of influenza virus A hemagglutinins" *Virus Genes* 24:57-63.
- Kuiken, T. *et al.* (2004) "Avian H5N1 influenza in cats" *Science* 306:241.
- Kumar, S. *et al.* (2004) "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment" *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Lee, L.G. *et al.* (1993) "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes" *Nucleic Acids Res.* 21(16):3761-3766.
- Lewin, B. (1985) Genes II, John Wiley & Sons, Inc., p. 96.
- Lipatov, A.S. *et al.* (2004) "Influenza: emergence and control" *J Virol* 78:8951-8959.

10

20

30

40

- Livak, K. J. *et al.* (1995) "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization" *PCR Methods Appl.* 4(6):357-362.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook (1982) "Nuclease *Bal31*" *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Matrosovich, M. *et al.* (2000) "Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals" *J Virol* 74:8502-8512. 10
- Maertzdorf *et al.*, (2004) *Clin Microbiol.* 42(3):981-986.
- Merrifield, R.B. (1963) "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide" *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154.
- Nikitin, A. *et al.* (1972) "Epidemiological studies of A-Hong Kong-68 virus infection in dogs" *Bull World Health Organ* 47:471-479.
- Nobusawa, E. *et al.* (1991) "Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses" *Virology* 182:475-485. 20
- Patriarca, P.A. *et al.* (1984) "Lack of significant person-to person spread of swine influenza-like virus following fatal infection in an immunocompromised child" *Am J Epidemiol* 119:152-158.
- Payungporn S. *et al.* (2006a) "Detection of canine influenza A virus (H3N8) RNA by real-time RT-PCR" (in preparation for *Journal of Clinical Microbiology*).
- Payungporn S, *et al.* (2006b) "Isolation and characterization of influenza A subtype H3N8 viruses from dogs with respiratory disease in a shelter and veterinary clinic in Florida" (in preparation for *Emerging Infectious Diseases*). 30
- Peiris, M. *et al.* (1999) "Human infection with influenza H9N2" *Lancet* 354:916-917.
- Peiris, J.S. *et al.* (2004) "Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease" *Lancet* 363:617-619.
- Posnett, D. N. *et al.* (1988) "A Novel Method for Producing Anti-peptide Antibodies" *J. Biol. Chem.* 263(4):1719-1725. 40
- Putnam, Bob (February 10, 1999) "Two illnesses seen in death of dogs" *St. Petersburg Times*.
- Reid, A.H. *et al.* (2004) "Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus" *Nat Rev Microbiol* 2:909-914.

- Rowe, T. *et al.* (1999) "Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays" *J Clin Microbiol* 37: 937-943.
- Saiki, R. (1985) "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia" *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook, J. *et al.* (1989) "Plasmid Vectors" In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Edition, pp. 1.82-1.104. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Subbarao, K. *et al.* (1998) "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness" *Science* 279:393-396.
- Suzuki, Y. *et al.* (2000) "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses" *J Virol* 74:11825-11831.
- Tam, J. P. (1988) "Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System" *PNAS USA* 85(15):5409-5413.
- Top, Jr., F.H. *et al.* (1977) "Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). IV. Summary and speculation" *J Infect Dis* 136 Suppl:S376-S380.
- Vines, A. *et al.* (1998) "The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction" *J Virol* 72:7626-7631.
- Wagner, R. *et al.* (2002) "N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication" *J Gen Virol* 83:601-609.
- Webby, R. *et al.* (2004) "Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens" *Nat Med* 10:S77-S81.
- Webster, R.G. (1998) "Influenza: an emerging disease" *Emerg Infect Dis.* 4:436-441.
- Webster, R.G. *et al.* (1992) "Evolution and ecology of influenza A viruses" *Microbiol Rev.* 56:152-179.
- Weis, W. *et al.* (1988) "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid" *Nature* 333:426-431.
- Womble, D.D. (2000) "GCG: The Wisconsin Package of sequence analysis programs" *Methods Mol Biol* 132:3-22.
- Xu, D., McElroy, D., Thornburg, R. W., Wu, R. *et al.* (1993) "Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants" *Plant Molecular Biology* 22:573-588.
- Yang, T. T. *et al.* (1996) "Optimized Codon Usage and Chromophore Mutations Provide Enhanced Sensitivity with the Green Fluorescent Protein" *Nucleic Acid Research* 24(22):4592-4593.
- Yoon K-Y. *et al.* (2005) "Influenza virus infection in racing greyhounds" *Emerg Infect Dis.* 11:1974-1975.

【0315】

【図1】ヘマグルチニン遺伝子の系統学的関連性を示す。図1Aは、A/セキセイインコ/ホッカイドウ/1/77 (H4) を外群として含む、代表的なイヌ、ヒト、トリ、ブタおよびウマ分離物から得られたHA遺伝子の系統樹を示す。図1Bは、A/アヒル/ウクライナ/63 (H3) を外群として用いた、現代および以前のウマHA遺伝子と共にイヌインフルエンザウイルスHA遺伝子の系統樹を示す。系統樹は近隣結合法によるヌクレオチド配列から推定され、90%のブーストラップ解析値を示す。バーは、水平方向の分枝の単位長さ当たりのヌクレオチド変化数を示す。

【図2】肺におけるインフルエンザH3抗原の免疫組織化学的検出を示す。H3ヘマグルチニンに対するマウスモノクローナル抗体を用いて肺組織切片を精査し、イムノペルオキシダーゼ反応（褐色の沈殿）により結合を検出した。図2Aは、自然発生疾患を伴うグレイハウンドから得られた気管支上皮を示す。ウイルスH3抗原は、気管支上皮細胞の細胞質ならびに気道腔および肺胞腔内のマクロファージに検出された。図2Bは、A/イヌ/フロリダ/43/2004 (H3N8) の接種5日後のイヌに由来する気管支上皮を示す。ウイルスH3抗原は、気管支上皮細胞の細胞質に検出された。メモリのバーは66 μm 。

【図3】インフルエンザ感染に関連する出血性肺炎のために死亡したグレイハウンドの気管支における特徴的な組織学的変化を示す。組織はH&Eで染色されている。上段：纖毛上皮細胞、粘液細胞および基底細胞を持つ正常な気管支。下段：自然発生性のインフルエンザに罹患したグレイハウンドの気管支。気管支纖毛上皮細胞に壊死およびびらんが見られる。メモリのバーは100 μm 。

【図4】H3ヘマグルチニン遺伝子の系統学的関連性を示す。図4Aは、イヌインフルエンザウイルスHA遺伝子ならびに現代および以前のウマHA遺伝子の系統樹を示す。図4Bは、イヌインフルエンザウイルスHAタンパク質ならびに現代および以前のウマHAの系統樹を示す。系統樹は近隣結合法による遺伝子またはアミノ酸配列から推定され、80%のブーストラップ解析値を示す。バーは、水平方向の分枝の単位長さ当たりのアミノ酸変化数を示す。

【図5】インフルエンザウイルス感染に伴う肺炎で死亡したイヌの肺における気管支および気管支腺の上皮細胞のインフルエンザウイルスH3タンパク質を示す。上段：気管支における気管支纖毛上皮細胞のびらん。組織はH&Eで染色された。下段：気管支（左）および気管支腺（右）の上皮細胞の細胞質におけるインフルエンザウイルスH3タンパク質。組織は、イムノペルオキシダーゼ反応（褐色の沈殿）により検出されるインフルエンザH3に対するモノクローナル抗体で染色し、ヘマトキシリンで対比染色した。

【図6】10倍段階希釈したインビトロにおいて転写させたRNA標準の増幅から得られたH3およびマトリックス遺伝子の増幅プロット（図6Aおよび6B）を示す。各希釈から得られた閾値サイクル（Ct）に対して開始時のRNA濃度の対数をプロットして作成したH3およびマトリックス遺伝子の標準曲線（図6Cおよび6D）。

【図7】Directigen Flu Aの感受性がA/ワイオミング/3/2003およびA/イヌ/FL/242/2003を含む10倍段階希釈したウイルスストックを用いて試験されたことを示す。紫色の三角は陽性の結果を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0316】

配列の簡単な説明

配列番号：1は、本発明に従って使用することができるPB2タンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（フロリダ/43/04）のヌクレオチド配列である。

配列番号：2は、配列番号：1によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：3は、本発明に従って使用することができるPB1タンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（フロリダ/43/04）のヌクレオチド配列である。

配列番号：4は、配列番号：3によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：5は、本発明に従って使用することができるPAタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（フロリダ/43/04）のヌクレオチド配列である。

配列番号：6は、配列番号：5によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：7は、本発明に従って使用することができるNSタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（フロリダ/43/04）のヌクレオチド配列である。

配列番号：8は、配列番号：7によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：9は、本発明に従って使用することができるNPタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（フロリダ/43/04）のヌクレオチド配列である。

配列番号：10は、配列番号：9によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：11は、本発明に従って使用することができるNAタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（フロリダ/43/04）のヌクレオチド配列である。

配列番号：12は、配列番号：11によってコードされるアミノ酸配列である。

10

配列番号：13は、本発明に従って使用することができるMAタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（フロリダ/43/04）のヌクレオチド配列である。

配列番号：14は、配列番号：13によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：15は、本発明に従って使用することができるHAタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（フロリダ/43/04）のヌクレオチド配列である。

配列番号：16は、配列番号：15によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：17は、本発明に従って使用することができるPB2タンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（FL/242/03）のヌクレオチド配列である。

配列番号：18は、配列番号：17によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：19は、本発明に従って使用することができるPB1タンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（FL/242/03）のヌクレオチド配列である。

20

配列番号：20は、配列番号：19によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：21は、本発明に従って使用することができるPAタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（FL/242/03）のヌクレオチド配列である。

配列番号：22は、配列番号：21によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：23は、本発明に従って使用することができるNSタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（FL/242/03）のヌクレオチド配列である。

配列番号：24は、配列番号：23によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：25は、本発明に従って使用することができるNPタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（FL/242/03）のヌクレオチド配列である。

30

配列番号：26は、配列番号：25によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：27は、本発明に従って使用することができるNAタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（FL/242/03）のヌクレオチド配列である。

配列番号：28は、配列番号：27によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：29は、本発明に従って使用することができるMAタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（FL/242/03）のヌクレオチド配列である。

配列番号：30は、配列番号：29によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：31は、本発明に従って使用することができるHAタンパク質をコードするイヌインフルエンザウイルス（FL/242/03）のヌクレオチド配列である。

配列番号：32は、配列番号：31によってコードされるアミノ酸配列である。

40

配列番号：33は、N末端の16のアミノ酸シグナル配列が除去されている配列番号：16に示すHAタンパク質の成熟型である。

配列番号：34は、N末端の16のアミノ酸シグナル配列が除去されている配列番号：32に示すHAタンパク質の成熟型である。

配列番号：35は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：36は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：37は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：38は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：39は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：41は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

50

配列番号：77は、本発明に従って使用することができるHAタンパク質をコードするインフルエンザウイルス（ジャクソンビル/2005）のヌクレオチド配列である。

配列番号：78は、配列番号：77によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号：79は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：80は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：81は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：82は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：83は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：84は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：85は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

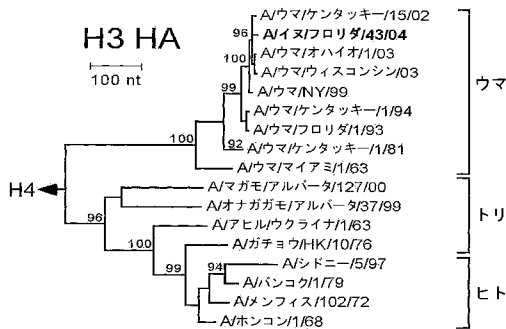
配列番号：86は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

配列番号：87は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

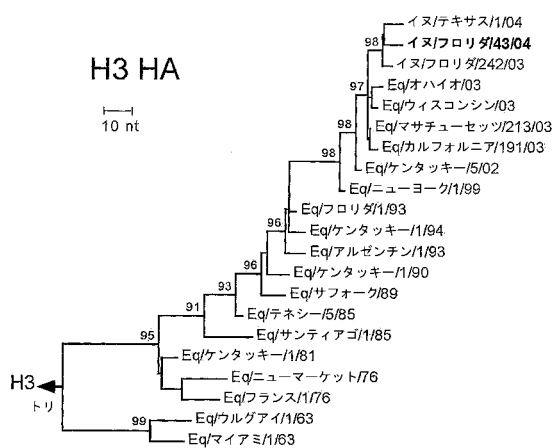
配列番号：88は、本発明に従って用いることができるオリゴヌクレオチドである。

10

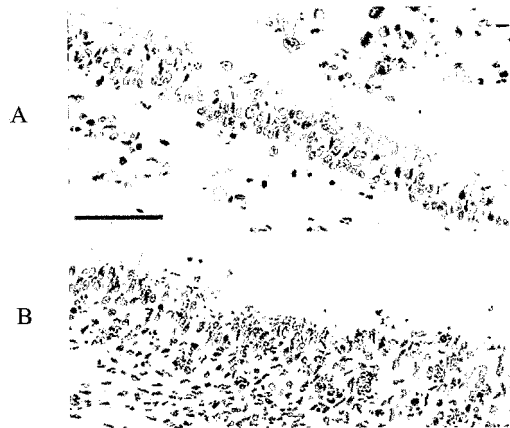
【図1A】



【図1B】



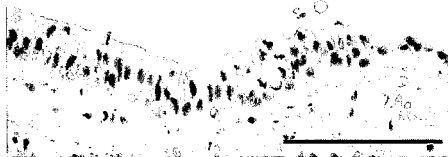
【図2】



【図 3】

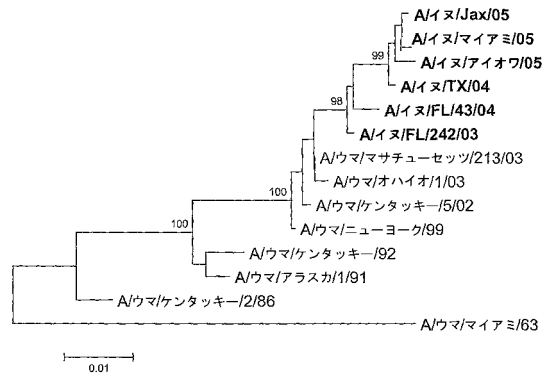


A

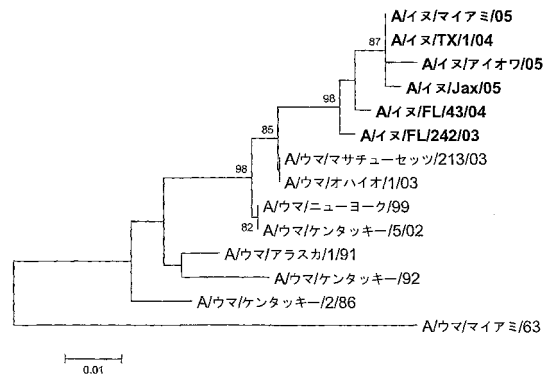


B

【図 4】

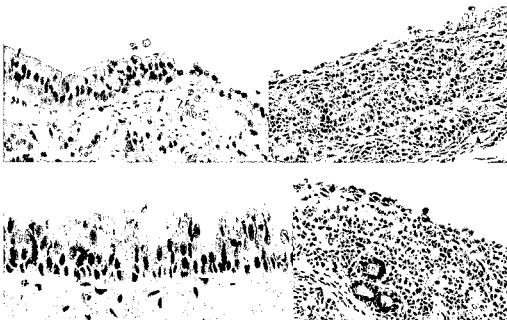


A

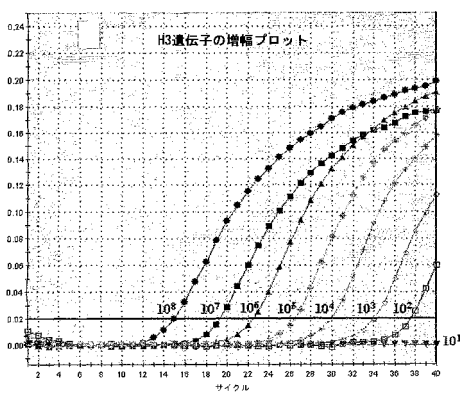


B

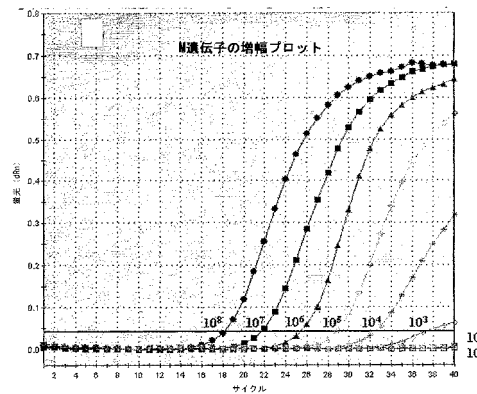
【図 5】



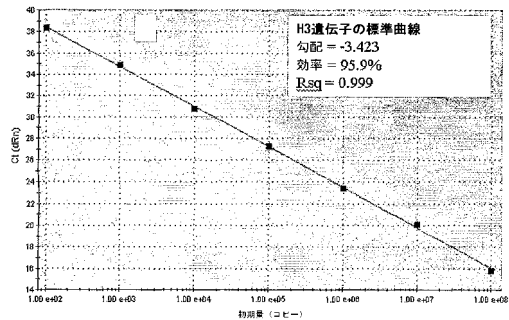
【図 6 A】



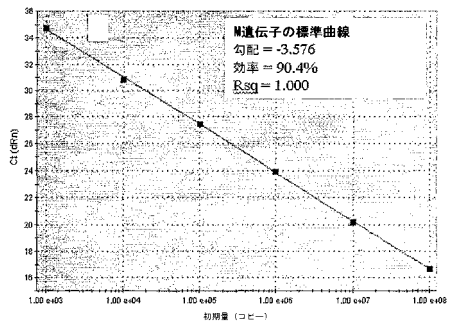
【図 6 B】



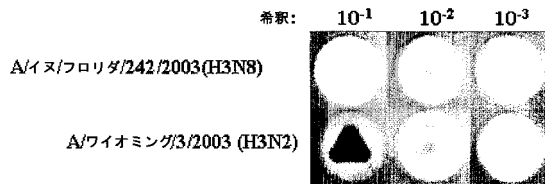
【図 6 C】



【図 6 D】



【図 7】



【配列表】

2009512449000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/041061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/11 A61K39/145 C12N7/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CRAWFORD P C ET AL: "Transmission of Equine influenza virus to dogs" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 310, no. 5747, 21 October 2005 (2005-10-21), pages 482-485, XP003003531 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-6, 8-114
X	& SCIENCEEXPRESS (10.1126/SCIENCE.1117950), 29 September 2005 (2005-09-29),	1-6, 8-114
P,X	& Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/1117950/DC1, published 29 September 2005> [retrieved on 2007-12-07] --	1-6, 8-114
<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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 December 2007		31/01/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Stich, David

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/041061

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	& DATABASE EMBL 6 December 2005 (2005-12-06), "MATRIX PROTEIN 1" Database accession no. Q30B62 abstract	1-6, 8-114
A	PEEK SIMON F ET AL: "Acute respiratory distress syndrome and fatal interstitial pneumonia associated with equine influenza in a neonatal foal" JOURNAL OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 18, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 132-134, XP008080707 ISSN: 0891-6640 & DATABASE EMBL 8 November 2005 (2005-11-08), "M1" Database accession no. Q3I3U6 the whole document	
X	WO 2004/057021 A (UNIV LAVAL [CA]; BOIVIN GUY [CA]) 8 July 2004 (2004-07-08) page 72; table 10; sequence 140	16-18, 21
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2003, CATTOLI G ET AL: "Plaque morphology of Italian H7N1 LPAI isolates in MDCK cells and in primary cells of different avian species." XP002461905 Database accession no. PREV200300495526 abstract & AVIAN DISEASES, vol. 47, no. Special Issue, 2003, pages 1161-1163, ISSN: 0005-2086	1, 8-11, 14-20, 22, 23, 25-27, 30, 31, 33, 35, 38-47, 50-57, 67-78, 80, 81, 83-100, 102, 104-114
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/041061

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; January 2005 (2005-01), FONI EMANUELA ET AL: "Detection of influenza A virus by RT-PCR and standard methods in experimental infection of Ducks." XP002461906 Database accession no. NLM15782624</p> <p>abstract & THE NEW MICROBIOLOGICA : OFFICIAL JOURNAL OF THE ITALIAN SOCIETY FOR MEDICAL, ODONTOIATRIC, AND CLINICAL MICROBIOLOGY (SIMMOC) JAN 2005, vol. 28, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 31-35, ISSN: 1121-7138</p>	<p>1,8-11, 14-20, 22,23, 25-27, 30,31, 33,35, 38-47, 50-57, 67-78, 80,81, 83-100, 102, 104-114</p>
X	<p>WOOD J M ET AL: "The standardization of inactivated equine influenza vaccines by single-radial immunodiffusion" JOURNAL OF BIOLOGICAL STANDARDIZATION, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 11, no. 2, April 1983 (1983-04), pages 133-136, XP002418529 ISSN: 0092-1157</p> <p>the whole document</p>	<p>1,8-11, 14-20, 22,23, 25-27, 30,31, 33,35, 38-47, 50-57, 67-78, 80,81, 83-100, 102, 104-114</p>
A	<p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1980, HOUSER R E ET AL: "EVIDENCE OF PRIOR INFECTION WITH INFLUENZA A-TEXAS-77 H-3-N-2 VIRUS IN DOGS WITH CLINICAL PARAINFLUENZA" XP002461907 Database accession no. PREV198171055734 abstract & CANADIAN JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE, vol. 44, no. 4, 1980, pages 396-402, ISSN: 0008-4050</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/041061

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2006/116082 A (UNIV FLORIDA [US]; CT S FOR DISEASE CONTROL & PRE [US]; CORNELL CT FOR) 2 November 2006 (2006-11-02) page 31, line 15 - page 64, line 6 claims 1-58 -----	1-114
P,X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; March 2006 (2006-03), CASTLEMAN WILLIAM L ET AL: "Pathologic findings in dogs infected with newly emerged canine H3N8 influenza virus" XP002442668 Database accession no. PREV200600343510 abstract & FASEB JOURNAL, vol. 20, no. 4, Part 1, March 2006 (2006-03), page A214, EXPERIMENTAL BIOLOGY 2006 MEETING; SAN FRANCISCO, CA, USA; APRIL 01 05, 2006 ISSN: 0892-6638 -----	1-6, 8-114
P,X	WO 2006/073436 A (NEW YORK THE TRUSTEES OF COLUM [US] UNIV COLUMBIA [US]) 13 July 2006 (2006-07-13) sequence 9 -----	16-18,21
T	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 2007 (2007-04), HANSHAW DAREN ET AL: "Canine H3N8 influenza virus infection in mice" XP002442669 Database accession no. PREV200700333940 abstract & FASEB JOURNAL, vol. 21, no. 5, April 2007 (2007-04), page A406, EXPERIMENTAL BIOLOGY 2007 ANNUAL MEETING; WASHINGTON, DC, USA; APRIL 28 -MAY 02, 2007 ISSN: 0892-6638 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/041061

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 31-44 and 70-99 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international searching authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /041061

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6, 8-20, 22-114, all partially; claim 21 completely

An influenza virus able to infect a canid, said virus being that having the designation A/canine/Florida/43/2004, compositions comprising said virus, subject matter related thereto

2. claims: 1-6, 8-20, 22-114, all partially

An influenza virus able to infect a canid, said virus being that having the designation A/canine/Florida/242/2003, compositions comprising said virus, subject matter related thereto, and insofar as not relating to subject matter of invention 1

3. claims: 1-5, 7-20, 22-114, all partially

An influenza virus able to infect a canid, said virus being that having the designation canine/Jax/05, compositions comprising said virus, subject matter related thereto, and insofar as not relating to subject matter of either of inventions 1 and 2

4. claims: 1-5, 7-20, 22-114, all partially

An influenza virus able to infect a canid, said virus being that having the designation canine/Miami/05, compositions comprising said virus, subject matter related thereto, and insofar as not relating to subject matter of any of inventions 1-3

5. claims: 1, 8-11, 14-20, 22, 23, 25-27, 30, 31, 33, 35, 38-47, 50-57, 67-78, 80, 81, 83-100, 102, 104-114, all partially

An influenza virus able to infect a canid, said virus having at least one H7 influenza virus antigen, compositions comprising said virus, subject matter related thereto, and insofar as not relating to subject matter of any of inventions 1-4

6. claims: 1-3, 8-11, 14-20, 22, 23, 25-27, 30, 31, 33, 35-48, 50-57, 67-78, 80, 81, 83-100, 102, 104-114, all partially

International Application No. PCT/US2006 /041061

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An influenza virus able to infect a canid, compositions comprising said virus, subject matter related thereto, and insofar as not relating to subject matter of any of inventions 1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/041061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004057021 A	08-07-2004	AU 2003294533 A1 US 2006014140 A1	14-07-2004 19-01-2006
WO 2006116082 A	02-11-2006	AU 2006240038 A1	02-11-2006
WO 2006073436 A	13-07-2006	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/10 (2006.01)		A 6 1 K 39/10		4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/235 (2006.01)		A 6 1 K 39/235		4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/155 (2006.01)		A 6 1 K 39/155		4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12		4 H 0 4 5
C 1 2 N 7/00 (2006.01)		C 1 2 N 7/00		
C 0 7 K 14/11 (2006.01)		C 0 7 K 14/11		
C 0 7 K 14/115 (2006.01)		C 0 7 K 14/115		
C 0 7 K 16/10 (2006.01)		C 0 7 K 16/10		
C 1 2 N 5/06 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	E	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	N	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569	L	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z	
		G 0 1 N 33/15	Z	

- (31)優先権主張番号 60/761,451
 (32)優先日 平成18年1月23日(2006.1.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/779,080
 (32)優先日 平成18年3月3日(2006.3.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 11/409,416
 (32)優先日 平成18年4月21日(2006.4.21)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (71)出願人 507408121
 コーネル リサーチ ファンデーション インコーポレーティッド
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 イサカ ソーンウッド ドライブ 20 スイート 105
 (71)出願人 508119714
 インターベット インコーポレーティッド
 アメリカ合衆国 デラウェア州 ミルズボーロ インターベット レーン 29160 ピー・オー
 ー・ボックス 318
 (74)代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74)代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (72)発明者 クローフォード パッティ シー .
アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビル ノースウエスト 第79 ドライブ 210
- (72)発明者 ギブス ポール ジェー .
アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビル ノースウエスト 第30 プレース 3650
- (72)発明者 ドゥボーヴィー エドワード ジェー .
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 イサカ チェルシーズ ウォーク 33
- (72)発明者 ドニス ルーベン オー .
アメリカ合衆国 ジョージア州 アトランタ エモリー ドライブ ノースイースト 429
- (72)発明者 カッツ ジャクリン
アメリカ合衆国 ジョージア州 アトランタ ハーデンドルフ アベニュー ノースイースト 447
- (72)発明者 クリモフ アレクサンダー アイ .
アメリカ合衆国 ジョージア州 アトランタ アンブルウッド コート 3197
- (72)発明者 ラクシュマナン ナラカンヌ ピー .
アメリカ合衆国 デラウェア州 ミルズボーロ ピー . オー . ボックス 318
- (72)発明者 ラム メリッサ アン
アメリカ合衆国 デラウェア州 ミルズボーロ ピー . オー . ボックス 318
- (72)発明者 ゲーヴァールツ ダニール ギスリーナ エミール
オランダ ボクスメール ウィム デ コルベルストラート 35
- (72)発明者 メレンキャンプ マーク ウィリアム
アメリカ合衆国 カンザス州 デソト ウェスト 第91 ストリート 35500
- (72)発明者 コックス ナンシー ジェー .
アメリカ合衆国 ジョージア州 アトランタ オークデール ロード 857
- (72)発明者 キャッスルマン ウィリアム エル .
アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビル サウスウエスト 第77 ストリート 4330

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA14 BA32 BA51 CA02 CA09 DA02 HA12
4B063 QA07 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ98 QR08 QR32 QR55 QR62
QR77 QS24 QS25 QS34 QX02
4B065 AA90X AA95Y AC20 BA22 BA30 CA24 CA25 CA45
4C084 AA02 BA03 CA53 DC50 NA14 ZB332
4C085 AA03 BA17 BA55 BA57 BA77 CC04 DD22
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 NA14 ZB33
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA01 DA76 DA86 EA31 FA74