

95年1月24日修(更)正本

申請日期	89 年 7 月 17 日
案 號	89114246
類 別	C12N <sup>15/86</sup> , C07K <sup>14/08</sup> , 14/535

公告本

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

## 發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	貓杯狀病毒株 431 和 G1 之殼衣蛋白質、編碼彼之 DNA 片段及包含彼之致免疫製劑
	英 文	Capsid protein of feline calicivirus strain 431 and G1, DNA fragments encoding them and immunogenic preparation comprising the same.
二、發明 創作人	姓 名	(1) 歐登特 尚 克里斯多夫 Audonnet, Jean-Christophe Francis (2) 菲利普 鮑杜 Baudu, Philippe Guy Nicolas (3) 希薇 布魯奈特 Brunet, Sylvie Claudine (1) 法國 (2) 法國 (3) 法國
	國 籍	(1) 法國里昂克雷庫路一一九號 119, rue de Crequi, 69006 Lyon, France
	住、居所	(2) 法國可蘭坡艾道爾米勞德大街五十八號 58, avenue Edouard Millaud, 69290 Craponne, France  (3) 法國里昂皮爾賽茲路一一〇號 110, Quai Pierre Scize, 69005 Lyon, France
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 瑪利歐公司 Merial
	國 籍	(1) 法國
	住、居所 (事務所)	(1) 法國里昂伯格列特十七號 17 rue Bourgelat, 69002 Lyon, France
	代 表 人 姓 名	(1) 丹尼爾 古菲 Gouffe, Daniel

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6  
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： 有 無主張優先權

法國	1999年 7月 16日	99 09421	<input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權
法國	2000年 2月 11日	00 01761	<input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權

有關微生物已寄存於： 寄存日期： 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 1 )

本發明係關於貓科動物特定品系的杯狀病毒基因、此類基因編碼之蛋白質、以及使用彼之免疫製劑及重組或次單元疫苗以對抗貓科動物之杯狀病毒病症。此類免疫製劑以及疫苗亦可與其它貓科動物病原體之免疫製劑或疫苗合併，以產生多價的免疫製劑及疫苗。

貓科動物杯狀病毒 ( F C V ) 最先敘述於 1 9 5 7 ( Fastier L.B. Am. J. Vet. Res. 1957. 18, 382389 )。貓科動物杯狀病毒與貓科動物皰疹病毒為貓上呼吸道病毒疾病的二種主要的病毒來源。F C V 病毒可影響許多動物，F C V 之攜帶率約 1 5 至 2 5 %，以及抗 F C V 血清之流行率為 7 0 至 1 0 0 % ( Coutts et al. Vet. Rec. 1994. 135. 555-556; Ellis T.M. Australian Vet. J. 1981. 57. 115-118; Harbour et al. Vet. Rec. 1991. 128. 77-80; Reubel et al. Feline Dendistry 1992. 22. 13471360 )。於發生高熱起始相之後，一般而言此類呼吸疾病伴隨著口頰的潰瘍 ( 上顎、舌頭、嘴唇、鼻子 )、鼻炎、結膜炎、可能會發生神經性厭食症以及無力。F C V 病毒亦可引起肺炎、腸炎、以及關節疼痛 ( 不充足症候群 )。

F C V 病毒僅可進行水平地傳輸，無法在懷孕期間垂直的從母親傳輸至小貓 ( Johnson R.P. Res. Vet. Sci. 1984. 31. 114-119 )。F C V 之傳輸係經由感染動物以及健康動物之間的接觸傳染或經由打噴嚏之空氣傳染 ( Wardley R.C. Arch. Virol. 1976. 52. 243-249 )。

貓科動物杯狀病毒屬於裸露病毒之杯狀病毒家族；彼

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 2 )

93 (15)

具有單股的正性 R N A , 大小約 7 . 7 千 鹼 基 對 ( Carter M.J. Arch. Virol. 1994. 9. 429-439 ) 。

如同許多 R N A 病毒 , F C V 病毒之間存在著許多的異質性。其免疫性的變異 , 自 7 0 年代起即可用交叉血清中和實驗將 F C V 分成數個病毒的品系或類似的種類 ( Radfoord et al. Proc. 1St Int. Symp. Caliciviruses ESW 1997. 93-99 ) 。

數個 F C V 品系已被分離以及定序 , 包括品系 F 9 ( Carter et al. Arch. Virol. 1992. 122. 223-235 , 序列寄存於 GenBank 資料庫 , 寄存編號 M 8 6 3 7 9 ) 、 F C I ( Neill et al. J. Virol. 1991. 65. 54405447, GenBank 寄存編號 U13992 以及 M32819 ) 、 Urbana 或 U R B ( Sosnovtsev and Green Virology 1995. 210. 383-390, GenBank 寄存編號 L40021 ) 、 F 4 ( Tohya et al. Arch. Virol. 1991. 117. 173-181, GenBank 寄存編號 D31836 以及 D90357 ) 、 K C D ( Fastier L.B. Am. J. Vet. Res. 1957. 18. 882-889, GenBank 寄存編號 L09719 ) 、 L L K ( GenBank 寄存編號 U07131 ) 、 N A D C ( GenBank 寄存編號 L09718 ) 、 2 2 8 0 ( GenBank 寄存編號 X99445 ) 以及 2 5 5 ( Kahn and Gillepsie. Cornell Vet. 1970. 60. 669-683, GenBank 寄存編號 U07130 ) 。

於 7 0 年代末期起 , 即引入衰減的 F C V 品系進行接種對抗 FCV, 主要品系 F 9 係由 Bittle 在 1 9 5 8 年首度分離 ( Bittle et al. Am. J. Vet. Res. 1960. 21. 547-550 ) ,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

### 五、發明說明 ( 3 )

或為 F 9 之品系經活體外或活體中培養後產生的減毒株 ( " 類 F 9 " ) 。

疫苗亦可得自去活化的病毒。使用的病毒包括品系 2 5 5 以及 2 2 8 0 , 其分別地於 1 9 7 0 年分離自患有肺炎之貓 ( Kahn and 及 Gillepsie. Cornell Vet. 1970. 60. 669-683 ) 以及於 1 9 8 3 年分離自患有不充足症之貓 ( Pedersen et al. Fel. Prac. 1983. 13. 26-35 ) 。

基質上, 免疫的體液反應係直接的對抗病毒的殼衣蛋白質, 亦稱 p 6 5 ( Guiver et al. J. Gen. Virol. 1992. 73. 2429-2433 ) 。許多編碼貓科動物杯狀病毒之殼衣蛋白質基因已被定序以及作過序列間之比對, 其係可與特定序列作更清楚的區別 ( Glenn et al. Proc. 19t Int. Symp. Caliciviruses ESW 1997. 106-110; Geissler et al. Virus Res. 1997. 48. 193-206; Neill et al. Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESW 1997. 120-124 ) 。

殼衣蛋白質之編碼基因亦已在各種表現系統中進行選殖及表現, 例如在質體表現系統中選殖及表現 K S 2 0 F C V 病毒之殼衣蛋白編碼質基因 ( Geissler et al. J. Virol. 1999. 73. 834-838 ) , 在桿狀病毒系統中選殖及表現 C F I - 6 8 、 J O K 6 3 、 J O K 9 2 、 L S 0 1 2 以及 F 9 F C V 病毒之殼衣蛋白質編碼基因 ( DeSilver et al. Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESW 1997. 131-143 ) , 在第 1 型貓科動物胞疹病毒表現系統中選殖及表現 F 4 F C V 病毒之殼衣蛋白質編碼基因 ( Yokoyama et al. J.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 4 )

Vet. Med. Sci. 1998. 60. 717-723) 等。以上各種構築體均可產生重組之殼衣蛋白質。

因為免疫性可隨著時間而變化，對抗分離自 60 - 70 年代的老疫苗品系 ( 如品系 F 9、255 或 2280 ) 之抗血清僅能中和少數 90 年代之分離株。例如抗 - F 9 血清只能中和 1990 - 1996 期間 43% 之分離株，能對抗 1980 - 89 期間 56% 之分離株以及 1958 - 79 期間 86% 之分離株，以及僅能對抗 1990 - 96 期間 10% 之英國分離株 ( Lauritzen et al. Vet. Microbiol. 1997. 56. 55-63 ) 。

本發明之目標是偵測可引發在廣泛的範圍間進行交互中和的貓抗體之 F C V 品系。

本發明之目標尤其是由選擇品系開始，分離以及鑑定可以接種對抗貓科動物杯狀病毒病症之產生免疫蛋白質的編碼基因。

本發明之另一目標是提供活體外以及活體中之重組表現載體，其中內含以及表現至少一種該核苷酸序列。

本發明之另一目標是提供免疫製劑或疫苗對抗貓科動物杯狀病毒病症。

本發明之另一目標是提供產生免疫之多價製劑以及對抗貓科動物杯狀病毒病症以及對抗至少一種其它貓科動物病源的多價疫苗。

本發明本質上係關於兩種 F C V 品系，其係得自法國以及英國之感染貓科動物杯狀病毒並展現症候之貓的咽部

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 5 )

抹片。分別為品系 G 1 ( 寄存於法國巴黎的微生物及培養細胞保存中心, C N C M, 寄存編號 I - 2 1 6 7 ) 以及品系 4 3 1 ( 寄存於 C N C M, 寄存編號 I - 2 1 6 6 ) , 二者均於 1 2 March 1 9 9 9 寄存。分離自法國之 F C V G 1 品系與 1 9 7 8 年 Tohya 分離自英國之 F C V 品系不同 ( Tohya Y. et al. Jpn. J. Sci., 1990, 52, 955-961 ) , 但均稱為 G 1 。

篩選 F C V 4 3 1 以及 G 1 品系係使用血清交叉中和測試進行, 並與參考之 F C V 分離株進行比對。參考之 F C V 分離株由 1 8 個現行的 F C V 分離株組成, 其係來自感染貓科動物杯狀病毒展現症候之貓以及三個不同的地理區域。7 個分離株係來自美國, 此類分離株確認為 R M I 1、R M I 2、R M I 3、R M I 5、R M I 6、R M I 7 以及 R M I 9。7 個分離株來自法國, 稱為 A 2、F 1、G 1、G 3、F 3 0 3 1、H 3 - 2 以及 H 1 - 4。最後 4 個分離株來自英國, 稱為 4 3 1、3 8 8 b、3 3 7 以及 J 5。

只要透過簡單地要求, 即可向本申請者要到各品系之分離株。彼亦發表於回顧文獻 " Archives of Virology " ( Poulet et al. Arch. Virol. February 2000. 145(2). 243-261 ) , 在網路上可從編輯人員的建檔日期中查到。

進行 1 8 個 F C V 參考分離株之間的血清交叉中和測試時, 出人意外地發現, 分離株 4 3 1 之抗血清可中和 1 7 個異種的參考分離株中之 1 4 株 ( 同源血清之中和滴

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明( 6 )

定不列入計算)。比較之下，"傳統之"疫苗品系255以及F9抗血清僅能中和18個分離株中之2株。

申請者因此發現FCV 431品系是優質的品系，可以保護貓對抗大部分之FCV品系，避免貓病毒感染。因為FCV品系分離株已揭示於此，熟悉此技藝的專業人士可選擇其他的優質FCV品系進行測試。以等價性的觀點而言，本發明亦涵蓋與FCV 431品系等價之FCV品系(其具有廣泛交叉中和抗體之範圍)。

FCV品系之抗血清可血清中和18個異種的參考分離株中之至少13株時(其中包括FCV 431)才算是具有等價性，較佳者可血清中和18個異種的參考分離株中之至少14株，更佳者可血清中和18個異種的參考分離株中之至少15株。

一般而言，當異種血清之中和滴定濃度大於或等於 $1.2 \log_{10} VN_{50}$ 時即可認為FCV品系可血清中和另一FCV品系(Povey C. and Ingersoll J., Infection and Immunity, 1975, 11, 877-885)。本申請者將此數值視為正性的閾值。然而從FCV分離株得到的血清交叉中和測試結果顯示，其對同源血清之中和滴定濃度少於或等於 $2 \log_{10} VN_{50}$ 則是無法解釋。

第二種建立與FCV 431品系等價的FCV品系之方法，係使用抗FCV 431品系之專一的單株抗體，以及用間接的免疫螢光(IIF)測試篩選FCV之候選品系。本申請者成功的產生數個抗431品系之專一的單

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ( 7 )

株抗體。其中一個稱為 4 4。這些品系若與抗 4 3 1 的專一單株抗體 ( 例如單株抗體 4 4 ) 具有免疫螢光反應性，則可視為等價的品系。此單株抗體及對應的融合瘤只須透過簡單的要求，即可購自申請者，以及亦揭示於上述 Poulet et al. 之文獻。對應的融合瘤亦於 1 1 August 1 9 9 9 寄存於 C N C M，寄存編號 I - 2 2 8 2。無須贅言，熟悉此技藝的專業人士能用習見的技藝產生單株的抗體以及選擇 4 3 1 品系的等價品系。

選擇其它 F C V G 1 品系，係因其對 F C V 4 3 1 品系具有互補性，換言之組合 4 3 1 以及 G 1 抗血清可血清中和 1 0 0 % 之參考分離株，換言之相對於無法與 4 3 1 抗血清進行血清中和或血清中和很弱 ( 值少於  $1.2 \log_{10} \text{VN}_{50}$  ) 之 F C V 參考分離株，F C V G 1 品系對同源血清之中和滴定濃度大於等於  $2 \log_{10} \text{VN}_{50}$  以及對異種血清之中和滴定濃度大於或等於  $1.2 \log_{10} \text{VN}_{50}$ 。本發明亦涵蓋與 F C V 4 3 1 品系具有相同互補性之等價 F C V 品系。亦可產生以及選擇抗此品系專一的抗體，以測定等價性。

此外本申請者成功的分離、確認及定序 F C V 4 3 1 以及 F C V G 1 之殼衣基因、殼衣蛋白質、以及測定對應的 c D N A ( 互補的 D N A ) 序列。

本發明之主題因此為核酸片段，其係包含編碼 4 3 1 病毒殼衣蛋白質之所有或部分的核苷酸序列，其氨基酸序列示於 S E Q 識別號碼 7 或圖 2，或此蛋白質免疫活化的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

### 五、發明說明 ( 8 )

片段，即大體上保留可產生免疫活性的抗原決定部位之殼衣蛋白質、肽或多肽。

本發明之主題尤其是 D N A 片段，其係包含 S E Q 識別號碼：6 之互補 D N A 序列或完全保留本序列之片段，即大體上編碼保留產生免疫活性之殼衣蛋白質的肽、多肽或抗原決定部位。本發明之主題尤其是 D N A 片段，其係包含此互補 D N A 序列，尤其是可與轉錄調節元件耦合之序列。

不須贅言，本發明將自動地涵蓋等價的核酸片段、D N A 片段以及互補 D N A 序列，即不會改變上述序列或此序列編碼多肽之功能或品系特異性之 F C V 專一的殼衣核苷酸片段以及序列。所以編碼退化現象產生的不同序列亦包括在內。

本發明亦自動地涵蓋編碼 F C V 之殼衣蛋白質，或肽、多肽或與 F C V 殼衣蛋白質專一的抗原決定部位等價之同義核苷酸序列 ( R N A 、 D N A 、 互補 D N A ) ， 其能誘導活體中貓科動物 ( 尤其是貓 ) 產生大體上具有與 F C V 4 3 1 品系抗血清相同之交叉中和反應之抗體。彼尤其是依據以上定義之分離株及 / 或單株抗體 4 4 ， 得自等價 F C V 品系之序列。

本發明之主題亦為核酸片段，包含 G 1 病毒編碼之殼衣蛋白質中的所有或部分核苷酸序列，示於 S E Q 識別號碼 5 或圖 1 ， 或此蛋白質的免疫活化片段，即大體上編碼保留殼衣蛋白質中產生免疫活性的抗原決定部位、肽或多

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ( 9 )

肽。

本發明之主題尤其是 D N A 片段，包含互補 D N A 序列 S E Q 識別號碼：4 或保留本質之完整序列的片段，即大體上編碼保留殼衣蛋白質中產生免疫活性的肽、多肽或抗原決定部位。本發明之主題尤其是含此與轉錄調節元件耦合之互補 D N A 序列的 D N A 片段。不須贅言，本發明自動地涵蓋等價的核酸片段、D N A 片段以及互補 D N A 序列，即不會改變上述序列或此序列編碼多肽之功能或品系特異性之核苷酸片段以及序列。所有編碼退化現象產生的不同序列亦包括在內。

本發明亦自動地涵蓋編碼肽、多肽或抗原決定部位等價之同義核苷酸序列 ( R N A 、 D N A 、 互補 D N A ) ，其能誘導活體中貓科動物 ( 尤其是貓 ) 產生大體上具有與 F C V G 1 品系抗血清相同之交叉中和反應之抗體。彼尤其是得自與上述同義序列互補的 F C V 品系核苷酸序列。

F C V 4 3 1 病毒殼衣蛋白質編碼基因之大小為 2 0 0 7 個核苷酸，F C V G 1 為 2 0 1 0 個核苷酸。F C V 4 3 1 殼衣蛋白質之大小為 6 6 8 個氨基酸，F C V G 1 為 6 6 9 個氨基酸，以及分子量約 6 0 - 6 5 k D a ( 蛋白質 p 6 5 ) 。

熟悉此技藝的專業人士可利用熟知的化學合成方法製作本文記述之互補 D N A ，例如敘述於 E. Kotsopoulou et al., J. Virol., 2000. 74.10. 4839-4852; J. Megede et al., J.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 10)

Virol., 2000. 74.6. 2628-2635 S. Andre et al., J. Virol., 1998. 72.2. 1497-1503; T. Holler et al., Gene, 1993. 136. 323-328; G. Kahnle et al., J. Virol., 2000. 72.5. 3804-3811 J. Schmitt et al., J. Gen. Virol., 1999. 80. 2839-2848 H. Apeler et al., Eur. J. Biochem., 1997. 247. 890-895; S. Brocca et al., Protein Science, 1998. 7. 1415-1422 以及 M. Alexeyev et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1999. 1419. 299-306。

本發明之主題亦為表現載體，其係包含至少一種依據本發明之 DNA 片段，尤其是 4 3 1 類型之互補 DNA 或 G 1 類型之互補 DNA，在許可表現之條件下於活體中進行表現。依據特定的特色，表現載體包含 4 3 1 類型之互補 DNA 以及 G 1 類型之互補 DNA。“類型”據瞭解為互補至考量之品系的 RNA 序列之 cDNA。

此類表現載體可為痘病毒，例如：牛痘病毒、鳥類痘病毒（金絲雀痘、禽痘），其中包括具有種類專一性的痘病毒（豬水痘、浣熊水痘以及駱駝水痘）、腺病毒以及皰疹病毒，如貓科動物皰疹病毒（例如

FR - A - 2 7 4 1 8 0 6）。熟悉此技藝的專業人士熟知的痘病毒可參見 WO - A - 9 2 1 5 6 7 2、WO - A - 9 5 2 6 7 5 1、WO - A 9 0 1 2 8 8 2 以及 WO - A - 9 5 2 7 7 8 0。

以相同之表現載體在活體中表現數個異種的核苷酸序列時可使用數個插入策略。此類插入策略（尤其是）可選用具有相反的方向的雙表現卡匣，或可選用具有相同之方

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 11 )

向之雙表現卡匣，或選用多重表現卡匣，於各插入體之間可具有 " I R E S " (內部的核醣體進入位點) 元件 (專利 E P - A 1 - 0 8 0 3 5 7 3 ) 。

插入的異種核苷酸序列可用轉錄調信號尤其是啓動子節加以控制，較佳者於插入期間同時引入。然而不排除使用表現載體上特定的控制信號，以引發此類異種核苷酸序列的表現。在金絲雀痘表現載體中，較佳的啓動子是 H 6 牛痘啓動子 ( Taylor J. et al. Vaccine, 1988, 6, 504-508; Guo P. et al. J. Virol., 1989, 63, 4189-4198; Perkus M. et al. J. Virol., 1989, 63, 3829-3836 ) 。

活體中之表現載體亦可為質體。本文之質體涵蓋任何多核苷酸序列形式之 D N A 轉錄單位，其中包含依據本發明之互補 D N A 序列以及活體中表現必須的元件。圓形的或超纏繞的質體形式較佳。線性的形式亦屬於本發明之範圍。

該質體不會在投用此質體之動物的寄主細胞中進行複製。可插入互補 D N A 的適當質體為任何熟悉此技藝的專業人士可得到的質體，例如 p c D N A 3 或 p R c / C M V (可購自 Invitrogen)。該質體亦如同以上之互補 D N A 般可由化學合成法進行製作，以及可與此類互補 D N A 同時進行合成製作。

各質體包含啓動子，能保證在其控制下於寄主細胞中表現插入的互補 D N A。一般而言強烈的真核啓動子係為來自人類或鼠科 (或可能為另一起源，如老鼠或天竺鼠)

## 五、發明說明 ( 12 )

的早期細胞巨大型病毒啓動子 C M V - I E 。一般而言，啓動子可來自病毒或來自細胞。病毒的啓動子除了 C M V - I E 外，尚有 S V 4 0 病毒早期或晚期啓動子或勞氏 ( Rous ) 肉瘤病毒之 L T R 啓動子。細胞的啓動子可為細胞骨骼基因之啓動子，例如：韌帶素 ( desmin ) 啓動子或肌動蛋白啓動子。本發明中之啓動子包括保留相同啓動子活性的啓動子次片段，例如依據

W O - A - 9 8 / 0 0 1 6 6 之縮短的 C M V - I E 啓動子。

當相同質體中存在數個異種序列 ( 互補 D N A 及 / 或 F C V 基因或其它貓科動物病原體 ) 時，此類序列可存在於相同之轉錄單位或於二種不同之單位。

質體亦可包含其它轉錄調節元件，例如：不表現序列類型之安定序列，較佳者為兔子  $\beta$  - 球蛋白基因之不表現序列 II ( van Ooyen et al. Science, 1979, 206:337-344 )、組織血纖維蛋白溶酶原活化劑基因蛋白質編碼之信號序列 ( tPA; Montgomery et al. Cell. Mol. Biol. 1997, 43:285-292 )，以及聚腺嘌呤核苷酸醯化 ( 聚 A ) 信號 ( 尤其是牛生長荷爾蒙基因 ( b G H ) ( U S - A - 5 , 1 2 2 , 4 5 8 ) 或兔子  $\beta$  - 球蛋白基因之信號 )。

本發明之主題亦為依據本發明之 c D N A 在活體外產生殼衣蛋白質或其片段以及活化免疫之抗原決定部位，以及將其併入免疫製劑以及次單元疫苗。

本發明之主題亦為對抗貓科動物杯狀病毒病症之免疫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 13 )

製劑或疫苗，其中包含至少一種依據本發明活體中表現之重組載體以及獸醫學上可接受的載劑或賦形劑，以及視需要地輔助劑。

免疫製劑涵蓋任何投用至貓後，可誘導至少一種直接的對抗貓科動物病源之免疫反應的製劑。據瞭解疫苗係指能誘導有效保護之製劑。

較佳者，此免疫製劑或此疫苗，包含插入類型 F C V 4 3 1 ( 及等價 ) 之互補 D N A ，或 F C V G 1 ( 及等價 ) 之互補 D N A 的活體中表現載體。

依據第一個非常有利的特色，此免疫的製劑或此疫苗包含插入 F C V 4 3 1 類型 ( 及等價 ) 之互補 D N A ，以及 F C V G 1 類型 ( 及等價 ) 之互補 D N A 的活體中之表現載體。

依據第二非常有利的特定特色，此免疫的製劑或此疫苗包含至少二種表現載體：第一種為插入的 F C V 4 3 1 類型 ( 及等價 ) 之互補 D N A ，以及第二種 F C V G 1 品系 ( 及等價 ) 之互補 D N A 。

依據本發明之製劑以及疫苗可添加入輔助劑，其可為任何熟悉此技藝的專業人士熟知的適當之輔助劑。然而較佳者可以調製成水包油乳狀液的形式，或加入丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物或順丁烯二酸酐共聚物以及烯基衍生物，或選擇性地內含四級銨鹽陽離子性的脂質。

聚合物之中，較佳者為丙烯酸或甲基丙烯酸與聚烯基醚類之糖或聚醇類交聯的聚合物。此類化合物在本文中稱

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

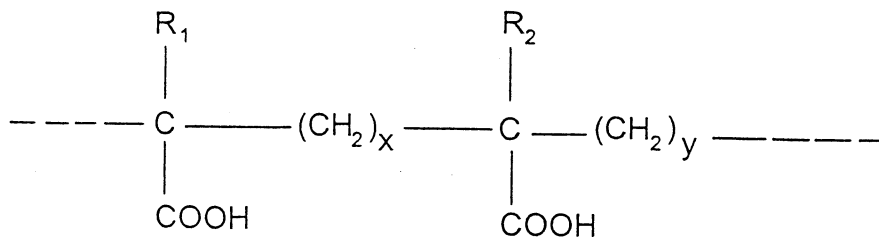
裝

訂

## 五、發明說明 ( 14)

為碳合物 ( carbomer ) ( Pharmeuropa vol. 8, No. 2, June 1996 ) 。熟悉此技藝的專業人士亦知 U S - A 2 , 9 0 9 , 4 6 2 ( 該方法併入參考文獻 ) 中所描述的丙烯酸與聚羥基化的化合物 ( 具有至少 3 個羥基 , 較佳者不多於 8 個 , 至少三個羥基的氫原子被具有至少 2 個碳原子的不飽和脂肪族的自由基取代 ) 交聯之聚合物。較佳的自由基內含 2 至四個碳原子 , 例如乙烯基、烯丙基以及其它乙烯系地不飽和基團。不飽和自由基可含有其它取代基 , 如甲基。商品 Carbopol® ( BF Goodrich, Ohio, USA ) 尤其是適當的產物。彼可與烯丙基蔗糖或烯丙基異戊四醇交聯。其中包括 Carbopol® 9 7 4 P , 9 3 4 P 以及 9 7 1 P 。

在順丁烯二酸酐以及烯基衍生物之共聚物中 , E M A ® 共聚物 ( Monsanto ) 為順丁烯二酸酐以及伸乙基之共聚物 , 其為線性的或交聯的共聚物 , 例如與二乙烯基醚交聯 ( 較佳的 ) 。參見 J. Fields et al., Nature, 186:778-740, 4 June 1960 ( 其方法併入參考文獻 ) 。從結構之觀點而言 , 丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物以及 E M A ® 共聚物中較佳者具有以下的基本單位形式 :



其中 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 15)

- R<sub>1</sub> 以及 R<sub>2</sub> , 其可為相同或不同之 H 或 C H<sub>3</sub>

- x = 0 或 1 , 較佳者 x = 1

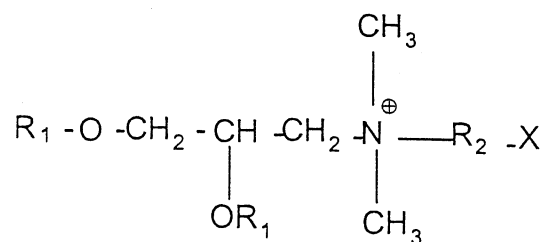
y = 1 或 2 , x + y = 2

E M A ® 共聚物中 , x = 0 以及 y = 2 。 碳合物 ( carbomer ) 中 , x = y = 1 。

此類聚合物可溶於水或生理的食鹽水 ( 20 克 / 升之 N a C l ) , 酸鹼度可用氫氧化鈉調至 7 . 3 - 7 . 4 , 以生成表現載體之輔助劑溶液或併入之次單位。

最終疫苗組合物之聚合物濃度介於 0 . 01 % 至 1 . 5 % W / V , 更明確的說是 0 . 05 至 1 % W / V , 較佳者為 0 . 1 至 0 . 4 % W / V 。

陽離子性脂質 , 其中內含四級銨鹽 , 尤其是適用於 ( 但非絕對 ) 質體表現載體 , 其分子式為 :



其中 R<sub>1</sub> 為飽和或不飽和、線性的脂肪族的自由基 , 其具有 12 至 18 個碳原子 , R<sub>2</sub> 為另一脂肪族的自由基 , 其中內含 2 或 3 個碳原子 , 以及 X 為羥基或胺基。

D M R I E ( N - ( 2 - 羥基乙基 ) - N , N - 二甲基 - 2 , 3 - 二 ( 十四碳烷氧基 ) - 1 - 丙銨 ;

W O - A - 9 6 3 4 1 0 9 ) ; 較佳者與中性的脂質耦合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 16 )

，尤其是 D O P E ( 二油 醯基 - 磷脂 醯基 - 乙醇 胺 ) ，以形成較佳之 D M R I E - D O P E 。較佳者，質體與此輔助劑在使用之前立即混合，較佳的在投藥至動物之前允許混合物在製備的時間內形成複合體，例如 1 0 至 6 0 分鐘的期間，尤其是 3 0 分鐘。

當 D O P E 存在時，D M R I E : D O P E 之莫耳比範圍介於 9 5 : 5 至 5 : 9 5 ，更明確的說是 1 : 1 。

質體：輔助劑 D M R I E 或 D M R I E - D O P E 之重量比例範圍可介於 5 0 : 1 至 1 : 1 0 ，尤其是 1 0 : 1 至 1 : 5 。較佳者為 1 : 1 至 1 . 2 。

依據本發明編碼 F C V 類型互補 D N A 之活體中表現載體亦可編碼貓科動物之 G M - C S F 或可合併編碼貓科動物 G M - C S F 之第二載體 ( 例如質體 p J P 0 8 9 以及 p J P 0 9 0 ，分別為圖 5 以及圖 6 ) 。當使用質體時，以混合二種質體為較佳。當為病毒的載體時，以單一的載體為較佳。此表現載體或此表現載體混合物亦可補充上述之輔助劑。

本發明之主題亦為多價的免疫製劑或多價的疫苗，以對抗貓科動物杯狀病毒病症以及對抗至少一種其它貓科動物病源，其係使用活體中相同的重組表現載體，其中內含以及表現至少一種依據本發明 F C V 類型之互補 D N A 以及至少一種抗原或另一貓科動物病源或此抗原免疫活化的片段之核苷酸序列。

本發明之主題亦為包含插入至少一種依據本發明

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 17 )

F C V 類型互補 D N A 之至少一種活體中表現載體之多價的免疫製劑或多價的疫苗，以及至少一種插入另一貓科動物病源之抗原、或免疫地活化的片段之編碼序列的第二表現載體。插入另一貓科動物病源抗原、或免疫活化的片段之序列編碼的適當質體，尤其是敘述於專利申請案

W O - A - 9 8 0 3 6 6 0 之實施例 7 至 1 5 以及 1 7 至 1 9 ( p P B 1 7 9 、 p P B 1 8 0 、 p P B 1 8 1 、 p A B 0 0 9 、 p A B 0 5 3 、 p A B 0 5 2 、 p A B 0 5 6 、 p A B 0 5 8 、 p A B 0 2 9 、 p A B 0 3 0 、 p A B 0 8 3 、 p A B 0 4 1 ) 。

上述之單價或多價的重組疫苗亦可與至少一種習見的疫苗 ( 去活化的、衰減的活菌、次單元 ) 合併，直接的對抗至少一種相同或不同之貓科動物病源。

其它的貓科動物病原體，其係選自：貓科動物鼻氣管炎病毒或貓科動物皰疹病毒 ( F H V ) 、貓科動物白血病毒 ( F e L V ) 、貓科動物極小 D N A 病毒 ( F P V ) 、貓科動物感染性的腹膜炎病毒 ( F I P V ) 、貓科動物免疫不全病毒 ( F I V ) 、狂犬病病毒、衣原體。

本發明之主題亦為分離、純化的或合成 F C V

4 3 1 品系以及 F C V G 1 品系的殼衣蛋白質，其分別地具有 S E Q 識別號碼 7 、 S E Q 識別號碼 5 所代表之氨基酸序列。並自動的函蓋等價蛋白質，即源自依據以上定義 ( 使用十八個分離株及 / 或單株抗體，尤其是單株抗體 4 4 ) 與 F C V 4 3 1 以及 F C V G 1 品系等價品系

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 18 )

之蛋白質。此類殼衣蛋白質可組裝成空殼衣的形式。

本發明之主題亦為保留完整蛋白質之特異性以及免疫產生性之蛋白質片段以及抗原決定部位（至少約 8 至 10 氨基酸）。

殼衣蛋白質（視需要地可組裝成空殼衣的形式）以及其片段以及抗原決定部位均可由活體外之表現產生。對應的核苷酸序列可插入活體外的表現系統以及在此系統中表現，以及收集表現之產物，並視需要地使用已知的方法純化。

表現系統可源自病毒，尤其是桿狀病毒（U S - A - 4 , 7 4 5 , 0 5 1 ）。將編碼序列或片段（當作抗原決定部位或片段）插入桿狀病毒基因體（例如桿狀病毒 *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* AcNPV），然後在昆蟲細胞（例如草地黏蟲 S f 9，寄存於 A T C C C R L 1 7 1 1）進行繁殖。

活體外表現系統可來自原核生物，例如大腸桿菌，或來自真核生物，尤其是酵母菌，例如釀酒酵母，或哺乳動物的真核細胞，尤其是細胞株，如：C H O（倉鼠卵巢細胞）、H e L a、B H K 或昆蟲細胞，例如草地黏蟲（上述之），或供選擇地貓科動物細胞。

用於此類細胞構築體之啓動子，可為強烈的病毒啓動子，如：S V 4 0 病毒（Fiers et al., Nature, (1978) 273:113）以及人類（或鼠科或其它來源）之 C M V 病毒（C M V - I E）或細胞巨大型病毒早期啓動子（McGregor and

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 19 )

Caskey, Nucleic Acids Res. 17:2365, 1989 ) , 或桿狀病毒 A c N P V 多面體素 ( polyhedrin) 基因之啓動子 (Hooft van Iddekinge et al., 1983, Virology 131:561-565 ) 。

熟悉此技藝的專業人士熟知如何純化及 / 或分離蛋白質，組裝上述技藝之產物片段以及抗原決定部位的形式（或空殼衣）。例如熟悉此技藝的專業人士可用的各種方法，包含：基於蛋白質、片段以及抗原決定部位在生理食鹽水培養液中之溶解度的沈澱法、有機溶劑沈澱法、聚合物或其它材料的沈澱法、親和性沈澱以及選擇的變性、管柱色層分析法，包括：高效能液體色層分析法（H P L C）、離子交換色層分析法、親和性色層分析法、免疫親和性色層分析法、使用配體之色層分析法、免疫沈澱、凝膠過濾、電泳、過濾法、特定的超過濾、以及梯度超高速離心。

熟悉此技藝的專業人士可參見例如 K.Y. Green et al., J. Clin. Microb., July 1997, Vol 35, 7:1909-1914，繁殖 S f 9 細胞產生桿狀病毒殼衣以及在蔗糖梯度（10至50%）下超高速離心收集病毒。

殼衣蛋白質、其片段以及抗原決定部位，亦可使用熟悉此技藝的專業人士熟悉的方法由化學的合成加以製作，例如依據文獻 R. B. Merrifield in Angenwandte Chemie Int. Ed. Engl. 1985, vol 24, n° 10, 799-810 及 in Science (Research articles), April 18, 1986, vol. 232, 341 -347; 以及 to Marglin- Arnold and R. B. Merrifield in J. Am. Chem. Soc.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 20 )

1966, 88, 21, 5051- 5052 。

本發明之主題亦為包含至少一種殼衣蛋白質形成之次單元抗原的免疫製劑及疫苗，較佳者以空殼衣、F C V 4 3 1 及 / 或 F C V G 1、或對應的片段或抗原決定部位的形式組裝於獸醫學上可接受的載劑或賦形劑，以及（較佳之）輔助劑。較佳之依據本發明的製劑以及疫苗，包含源自二種品系 F C V 4 3 1 以及 F C V G 1 之次單元抗原。同樣地，製劑以及疫苗可包含未組裝之殼衣蛋白質及以組成裝空殼衣形式之蛋白質。

依據本發明之次單元疫苗以及免疫製劑中可添加輔助劑，可使用之輔助劑為（1）氫氧化鋁、（2）丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物，失水蘋果酸酐以及烯基衍生物之聚合物（上述之）、或（3）將免疫製劑或疫苗調製成水包油之乳狀液的形式，尤其是乳狀液 S P T，記述於

p 1 4 7 " Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995、以及記述於同一本書之 p 1 8 3 的乳狀液 M F 5 9 。

水包油乳狀液（尤其是）可為輕液體石蠟油（歐洲製藥類型）、類異戊二烯油，如：凡士林、鯊烯；寡聚合之烯屬烴（尤其是異丁烯或癸烯）的油類；內含線性烷基酸或醇類之酯類，更明確的說是植物油、油酸乙酯、丙二醇二（辛酸酯 / 己酸酯）、甘油基三（辛酸酯 / 己酸酯）、二油酸丙二醇酯；分枝的脂肪醇或酸之酯類，尤其是異硬

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 21)

脂酸之酯類。油類可合併乳化劑以形成乳狀液。較佳之乳化劑為非離子性界面活性劑，尤其是山梨糖醇酐之酯類、甘露糖醛、甘油、聚甘油、丙二醇以及油酸、異硬脂酸、蓖麻油酸或羥基硬脂酸（其可視需要地乙氧化）、聚氧丙烯聚氧伸乙基阻塞共聚物（尤其是 Pluronic® 共聚物，尤其是 L 1 2 1）。

本發明之主題亦為多價的疫苗以及免疫製劑，其中 F C V 之價位為上述之次單元價位。

本發明之主題亦為對貓進行免疫，以對抗經貓科動物杯狀病毒引起的病毒疾病的方法。

此方法包含對貓投用依據本發明的免疫製劑或疫苗。此投藥可為（尤其是）非經腸的路徑、皮下的、皮膚內的、肌肉內的或腹腔內的投藥。較佳之投藥為皮下的或肌肉內的路徑。

質體疫苗以及免疫製劑可使用各種方法投藥，尤其是可穿過患者皮膚細胞後釋出之塗覆金顆粒的 D N A（Tang et al. Nature 1992. 356. 152-154）以及可轉染皮膚細胞以及以組織的噴射液體注射（Furth et al. Analytical Bioch. 1992. 205, 365-368）以進行免疫的反應。

熟悉技藝之人有能力勝任上述之投藥以及估算各免疫方法之劑量。

本發明將用以下之具體實施例，以非限制實施例之方法以及圖示詳細說明，其中：

圖 1：F C V G 1 品系”殼衣”蛋白質互補 D N A

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 22)

序列

圖 2 : F C V 4 3 1 品系 " 殼衣 " 蛋白質互補

D N A 序列

圖 3 : 質體 p J C A 1 5 1 之限制酶水解圖

圖 4 : 金絲雀痘病毒 ( 品系 A L V A C ) 基因體

C 6 L 區域之序列

圖 5 : 質體 p J P 0 8 9 之限制酶水解圖

圖 6 : 3 R 3 貓科動物 G M - C S F 基因之序列

圖 7 : 質體 p J P 0 9 0 之限制酶水解圖

圖 8 : 3 R 4 貓科動物 G M - C S F 基因之序列

圖 9 : 血清交叉中和滴定濃度表

本發明構築體之序列表

S E Q 識別號碼 1 : 寡核苷酸 P B 3 3 1

S E Q 識別號碼 2 : 寡核苷酸 P B 3 3 3

S E Q 識別號碼 3 : 寡核苷酸 P B 3 3 2

S E Q 識別號碼 4 : F C V G 1 殼衣互補 D N A 之

序列

S E Q 識別號碼 5 : F C V G 1 殼衣蛋白質之序

列

S E Q 識別號碼 6 : F C V 4 3 1 殼衣互補

D N A 之序列

S E Q 識別號碼 7 : F C V 4 3 1 殼衣蛋白質之

序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 23)

S E Q 識別號碼 8 : 寡核苷酸 J C A 2 8 9

S E Q 識別號碼 9 : 寡核苷酸 J C A 2 9 0

S E Q 識別號碼 1 0 : 金絲雀痘病毒 ( 品系

A L V A C ) C 6 L 區域之序列

S E Q 識別號碼 1 1 : 寡核苷酸 C 6 A 1

S E Q 識別號碼 1 2 : 寡核苷酸 C 6 B 1

S E Q 識別號碼 1 3 : 寡核苷酸 C 6 C 1

S E Q 識別號碼 1 4 : 寡核苷酸 C 6 D 1

S E Q 識別號碼 1 5 : 寡核苷酸 J C A 2 9 1

S E Q 識別號碼 1 6 : 寡核苷酸 J C A 2 9 2

S E Q 識別號碼 1 7 : 寡核苷酸 J C A 2 9 3

S E Q 識別號碼 1 8 : 寡核苷酸 J C A 2 9 4

S E Q 識別號碼 1 9 : 寡核苷酸 J C A 2 9 5

S E Q 識別號碼 2 0 : 寡核苷酸 J P 5 7 8

S E Q 識別號碼 2 1 : 寡核苷酸 J P 5 7 9

S E Q 識別號碼 2 2 : 3 R 3 貓科動物 G M - C S F

基因之序列

S E Q 識別號碼 2 3 : 3 R 4 貓科動物 G M - C S F

基因之序列

實施例

所有質體之構築係使用標準分子生物學技藝進行 ( 選  
殖、限制酵素水解、合成單股的互補的 D N A、聚合酶鏈  
鎖放大反應、寡核苷酸與 D N A 聚合酶延長反應等 ) 描述

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 24 )

於 Sambrook J. et al. (Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. 1989) 。本發明所有之限制片段，與各種聚合酶鏈鎖反應放大 ( P C R ) 之片段均用 " GeneClean7 " 組套分離以及純化 ( BIO101 Inc. La Jolla, CA ) 。

實施例 1 : 分離以及培養貓科動物杯狀病毒 G 1 以及 4 3 1 品系

貓科動物杯狀病毒品系 G 1 之樣品來自法國，收集自展現杯狀病毒病症症候之貓。此 F C V G 1 品系於 1 2 March 1 9 9 9 存入法國巴黎的微生物及培養細胞保存中心 ( C N C M ) ，寄存編號為 I - 2 1 6 7 。

貓科動物杯狀病毒品系 4 3 1 之樣品來自英國，分離自展現杯狀病毒病症症候之貓。此 F C V 4 3 1 品系於 1 2 March 1 9 9 9 存入法國巴黎的微生物及培養細胞保存中心 ( C N C M ) ，寄存編號為 I - 2 1 6 6 。

放大病毒時，將貓科動物杯狀病毒品系培養於貓腎臟細胞株 ( Crandell-Reese 貓科動物腎臟或 CRFK, No. ATCC CCL-94, Crandell et al. In Vitro 1973, 9, 176-185 ) 。

將 C R F K 細胞培養在 9 6 孔微量滴定盤或 2 5 - c m <sup>2</sup> 之 F a l c o n 培養盤，內含補充 5 % 胎牛血清之 D M E M 培養液，其中約 1 0 0 , 0 0 0 細胞 / 毫升。細胞培養在 + 3 7 ° C 下含 5 % C O <sub>2</sub> 之大氣。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 25)

於 3 天之後，細胞層長滿細胞時。培養液用不含血清但補充 50 毫克 / 升之慶大黴素的 D M E M 培養液取代，以及加入分離的 F C V 病毒，其含量為每孔 100 微升體積的病毒，其為四倍系列稀釋自選殖於限制稀釋之 F C V 病毒或 1 毫升 / Falcon。

當細胞的病理效應 ( C P E ) 完成時 ( 於開始培養之後 24 - 48 小時 )，收集病毒的懸浮液以及冷凍在 - 70 °C 下。一般而言後續 3 至 4 次分盤後產生一批病毒。將批次產生的病毒儲存在 - 70 °C 下。

實施例 2：萃取貓科動物杯狀病毒 G 1 以及 431 品系病毒的 R N A

將 C R F K 細胞培養在 37 °C 下之 2 - 公升的旋轉燒瓶 ( 850 平方公分 )，內含修飾的 Eagle's 培養液 ( MEM, Gibco BRL ) 補充 2.5 % 乳白蛋白水解產物 ( Gibco BRL ) 以及 5 % 胎牛血清 ( Gibco BRL )。每個旋轉燒瓶中加入 300 毫升細胞懸浮液之 M E M 培養液，其中內含約 100,000 細胞 / 毫升。於 3 天之後，細胞層會長滿。

然後細胞培養液用不含血清之 M E M 培養液取代以及加入 F C V 病毒，感染多重性 ( M O L ) 為 0.5 C C I D<sub>50</sub> / 細胞。病毒的培養維持在 37 °C 下 24 至 48 小時，直到全部細胞的草原得到細胞病理的效應為止。收集病毒的懸浮液，然後離心澄清。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 26 )

上述製備的內含 1 0 0 毫升病毒懸浮液之 F C V G 1 品系的病毒 R N A ，用 ” High Pure™ Viral RNA 組套 ” ( Cat # 1 858 882, Roche Molecular Biochemicals ) 之組套溶液，依據供應商之萃取步驟萃取。萃取後得到 R N A 沈澱塊，再懸浮於 1 0 毫升滅菌之不含 R N A 酶之蒸餾水。

F C V 4 3 1 品系病毒的 R N A 用相同之條件萃取自對應品系的 1 0 0 毫升之病毒懸浮液。萃取後得到 R N A 沈澱塊，再懸浮於 1 0 毫升滅菌之不含 R N A 酶之蒸餾水。

實施例 3：合成互補至貓科動物杯狀病毒 G 1 以及 4 3 1 品系殼衣基因之 D N A s

對應於貓科動物杯狀病毒 G 1 以及 4 3 1 品系殼衣基因之互補的 D N A s 係用 ” Gene Amp RNA PCR 組套 ” ( Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA ) ，使用供應商提供之條件合成。

於 F C V G 1 品系中，先用逆轉轉錄反應，接著聚合酶連鎖反應 ( ” R T P C R ” 反應 ) 進行，其內含 1 毫升 F C V G 1 病毒的 R N A 懸浮液 ( 實施例 2 ) 以及以下之寡核苷酸：

PB331(33 mer)(SEQ 識別號碼 1)

5'TTGCGGCCGCTGTGATGTGTTCTGAATTTGAGC3'以及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 27)

PE3333(36 mer)(SEQ 識別號碼 2)

5'TTGGCGCCGYTGACCMAGTGCAGCYTTRTCCAATTC3'

合成第一股互補 DNA 的條件為溫度在 42 °C 下 15 分鐘，然後在 99 °C 下 5 分鐘，以及最後在 4 °C 下 5 分鐘。PCR 反應的條件為溫度在 95 °C 下 2 分鐘，然後進行 35 個循環（95 °C 下 1 分鐘，62 °C 下 1 分鐘，以及 72 °C 下 2 分鐘），以及最後在 72 °C 下 7 分鐘，產生之 RT-PCR 片段約 2000 個鹼基對（bp），確認為 "G1-4"。

於 FCV 431 品系中，先用逆轉轉錄反應，接著聚合酶連鎖反應（"RT-PCR" 反應）進行，其內含 1 毫升 FCV 431 病毒的 RNA 懸浮液（實施例 2）以及以下之寡核苷酸：

PB331(33 mer)(SEQ 識別號碼 1)

以及 P13332(38 mer)(SEQ 識別號碼 3)

5'TTGGCGCCAAYWGTRTTWGHTACAGTRTCAATYARRCC3'

合成第一股互補 DNA 的條件為溫度在 42 °C 下 15 分鐘，然後在 99 °C 下 5 分鐘，以及最後在 4 °C 下 5 分鐘。PCR 反應的條件為溫度在 95 °C 下 2 分鐘，然後進行 35 個循環（95 °C 下 1 分鐘，62 °C 下 1 分鐘，以及 72 °C 下 2 分鐘），以及最後在 72 °C 下 7 分鐘，產生之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 28)

R T - P C R 片段約 2 0 0 0 個 鹼 基 對 ( b p ) , 確 認 為 " 4 3 1 - 2 " 。

實施例 4 : 選 殖 編 碼 貓 科 動 物 杯 狀 病 毒 G 1 品 系 殼 衣 蛋 白 質 基 因

將 R T - P C R 片 段 " G 1 - 4 " 依 序 用 N a r I 以 及 N o t I 水 解 , 於 瓊 脂 糖 凝 膠 電 泳 分 離 之 後 得 到 N a r I - N o t I 片 段 約 2 0 0 0 個 鹼 基 對 。 此 片 段 與 先 前 用 N o t I 以 及 C l a I 水 解 以 及 然 後 去 磷 酸 化 的 載 體 pBlueScript® I I K S + ( Cat # 212208 Stratagene Inc., La Jolla, CA 92037, USA ) 連 結 , 以 生 成 質 體 p G 1 - 4 - 5 ( 5 0 3 3 b p ) 。

N o t I - N a r I 片 段 選 殖 入 質 體 後 測 定 二 股 殼 衣 基 因 完 整 的 序 列 。 F C V G 1 品 系 殼 衣 基 因 之 序 列 ( 2 0 1 0 個 鹼 基 對 ) ( S E Q 識 別 號 碼 4 ) , 與 編 碼 殼 衣 蛋 白 質 ( p 6 5 ) ( 6 6 8 氨 基 酸 ) 基 因 之 序 列 ( S E Q 識 別 號 碼 5 ) 示 於 圖 1 。

實施例 5 : 選 殖 編 碼 貓 科 動 物 杯 狀 病 毒 4 3 1 品 系 殼 衣 蛋 白 質 基 因

將 R T - P C R 片 段 " 4 3 1 - 2 " 依 序 用 N a r I 以 及 N o t I 水 解 , 於 瓊 脂 糖 凝 膠 電 泳 分 離 之 後 得 到 N a r I - N o t I 片 段 約 2 0 0 0 個 鹼 基 對 。 此 片 段 與 先 前 用 N o t I 以 及 C l a I 水 解 以 及 然 後 去 磷 酸 化 的 載 體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 29 )

pBlueScript® I I K S + ( Cat # 212208 Stratagene Inc., La Jolla, CA 92037, USA ) 連結，以生成質體 p 4 3 1 - 2 - 1 ( 4 9 8 5 鹼基對 ) 。

N o t I - N a r I 片段選殖入質體後測定二股殼衣基因完整的序列。F C V 4 3 1 品系之殼衣基因序列 ( 2 0 0 7 鹼基對 ) ( S E Q 識別號碼 6 ) 。與編碼殼衣蛋白質 ( p 6 5 ) ( 6 6 8 氨基酸 ) 基因之序列 ( S E Q 識別號碼 7 ) 示於圖 2 . 。

實施例 6 : 構築質體 p J C A 1 5 1

爲了放大約 2 0 3 0 鹼基對之 P C R 片段，P C R 反應進行係使用質體 p 4 3 1 - 2 - 1 ( 實施例 5 ) 作模板以及以下之寡核苷酸：

JCA289 SEQ 識別號碼 8(36 mer):

5'AAACGCGTCGACATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTG3'

以及 JCA290 SEQ 識別號碼 9(33 mer):

5'TTTTGATATCTCATATTTTAACCATTCCACTCC3'

此片段用限制酵素 S a l I 以及 E c o R V 水解，於瓊脂糖凝膠電泳分離之後得到 2 0 1 4 鹼基對之 S a l I - E c o R V 片段。然後限制片段與先前用 S a l I 以及 E c o R V 水解之質體 p V R 1 0 1 2 連結 ( Hartikka J. et al. Human Gene Therapy. 1997. 7. 1205-1217 ) ，以生成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 30 )

質體 p J C A 1 5 1 ( 6 9 0 8 鹼基對 ) ( 圖 3 ) 。

實施例 7 : 構築插入金絲雀痘病毒 C 6 L 位點之供體質體  
圖 4 ( S E Q 識別號碼 1 0 ) 顯示 3 7 0 0 鹼基對片  
段之金絲雀痘病毒基因體 D N A 之序列。分析此序列後揭  
露之開放閱讀框架 ( O R F ) 稱為 C 6 L , 其起始自位置  
3 7 7 以及終止於位置 2 2 5 4 。刪除 O R F C 6 1 並  
以鄰邊含多重選殖位點之轉錄以及轉譯終止信號取代以構  
築插入質體 , 其進行之方法記述下。

使用金絲雀痘病毒基因體 D N A 組成之模板以及以下  
之寡核苷酸進行 P C R 反應 :

C6A1(SEQ 識別號碼 11)(42 mer)

5'ATCATCGAGCTCGCGGCCGCCTATCAAAAGTCTTAATGAGT  
T3'以及 C6B1(SEQ 識別號碼 12)(73 mer)

5'GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGT  
CATTTTTTCGT AAGTAAGTATTTTTATTTAA3'

得到 4 3 2 b p 之 P C R 片段 ( 片段 A ) 。

使用金絲雀痘病毒基因體 D N A 組成之模板以及以下  
之寡核苷酸進行 P C R 反應 :

C6C1(SEQ 識別號碼 13)(72 mer)

5'CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTTATTGATTAAGTAG

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 31 )

TCAAATGAGTA TATATAATTGAAAAAGTAA3 '

以及 C6D1(SEQ 識別號碼 14)(45 mer)

5'GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAAACTTAA  
GTTG31

爲了得到 1 2 1 0 鹼基對之 P C R 片段 ( 片段 B ) 。

將片段 A 以及 B 雜交後作爲模板與寡核苷酸 C 6 A 1 ( S E Q 識別號碼 1 1 ) 以及 C 6 D 1 ( S E Q 識別號碼 1 4 ) 進行 P C R 反應產生 1 6 3 0 鹼基對之 P C R 片段。此片段用限制酵素 S a c I 以及 K p n I 水解，於瓊脂糖凝膠電泳分離之後得到 1 6 1 3 鹼基對之 S a c I - K p n I 片段。此片段與先前用 S a c I 以及 K p n I 水解之載體 pBlueScript® I I K S + ( Cat # 212208 Stratagene Inc., La Jolla, CA 92037, USA ) 連結，以生成質體 p C 6 L。序列分析証實此質體之序列。此質體含有位於 O R F C 6 L 上游之 3 7 0 鹼基對序列 ( " C 6 左臂 " )、牛痘早期轉錄終止之信號、6 個閱讀框架之終止密碼子、內含 S m a I、P s t I、X h o I 以及 E c o R I 限制位點之多重選殖位點、以及最後 1 1 5 6 鹼基對之 O R F C 6 L 下游序列 ( " C 6 右臂 " )。

以質體 p M P 5 2 8 H R H ( Perkus M. et al. J. Virol. 1989. 63. 3829-3836 ) 作爲模板與以下寡核苷酸放大完整的 H 6 牛痘啓動子序列 ( GenBank 寄存編號 M 2 8 3 5 1 )

:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 32)

JCA291(SEQ 識別號碼 15)(34 mer)

5'AAACCCGGGTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTG3'

以及 JCA292(SEQ 識別號碼 16)(43 mer)

5'AAAAGAATTCGTCTGACTACGATACAACTTAACGGATATCG  
CG3'

以放大 1 4 9 鹼基對之 P C R 片段。將此片段用限制酵素  
S m a I 以及 E c o R I 水解，於瓊脂糖凝膠電泳分離之  
後得到 S m a I - E c o R I 之 1 3 8 鹼基對限制片段。  
然後此將片段與先前用 S m a I 以及 E c o R I 水解的質  
體 p C 6 L 連結，以生成質體 p J C A 1 5 0 。

實施例 8：建築重組病毒 v C P 1 7 1 0 (表現 F C V  
4 3 1 品系殼衣基因之重組金絲雀痘病毒)

進行 P C R 反應係使用質體 p 4 3 1 - 2 - 1 (實施  
例 5) 為模板以及以下之寡核苷酸：

JCA293(SEQ 識別號碼 17)(55 mer):

5'AAATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTGCTCAAC  
CTGCGCTAACG TG3'

以及 JCA294(SEQ 識別號碼 18)(33 mer)

5'TTTTGTCTGACTCATATTTTAACCATTCCTCC3'

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 33 )

放大約 2 0 5 0 鹼基對之 P C R 片段。此片段用限制酵素 N r u I 以及 S a l I 水解，於瓊脂糖凝膠電泳分離之後得到 2 0 3 5 鹼基對之 N r u I - S a l I 片段 ( 片段 A ) 。質體 p J C A 1 5 0 ( 實施例 7 ) 用限制酵素 N r u I 以及 S a l I 水解，於瓊脂糖凝膠電泳分離之後得到約 4 5 0 0 鹼基對之 N r u I - S a l I 限制片段 ( 片段 B ) 。然後將片段 A 以及 B 連結以生成質體 p J C A 1 5 2 。

質體 p J C A 1 5 2 用 N o t I 線性化，然後依據先前記述之磷酸鈣沈澱技藝轉染入感染金絲雀痘病毒 ( 品系 A L V A C ) 的雞胚初級細胞 ( Panicali and Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982. 79. 4927-4931; Piccini et al. In Method in Enzymology. 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. and Grossman L. Academic Press ) 。與特定的 F C V 4 3 1 品系專一的殼衣基因放射性探針雜交後選擇正性菌斑。此類菌斑經後續 4 次選擇 / 純化，直到得到純菌斑為止。然後將代表活體外重組供體質體 p J C A 1 5 2 以及金絲雀痘病毒 A L V A C 基因體之菌斑放大，得到的重組病毒標準液稱為 v C P 1 7 1 0 。

實施例 9 : 構築重組病毒 v C P 1 7 1 1 ( 表現 F C V G 1 品系殼衣基因之重組金絲雀痘病毒 )

進行 P C R 反應係使用質體 p G 1 - 4 - 5 ( 實施例 4 ) 作模板以及以下之寡核苷酸 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 34 )

JCA293(SEQ 識別號碼 17)

以及 JCA295(SEQ 識別號碼 19)(33 mer)

5'TTTTGTCGACTCATAGTTTTGTCATAGTACTCC3'

得到約 2050 鹼基對之 PCR 片段。此片段用限制酵素 N r u I 以及 S a l I 水解，於瓊脂糖凝膠電泳分離之後得到約 2035 鹼基對之 N r u I - S a l I 片段 ( 片段 A ) 。將質體 p J C A 1 5 0 ( 實施例 7 ) 用限制酵素 N r u I 以及 S a l I 水解，於瓊脂糖凝膠電泳分離之後得到約 4500 鹼基對之 N r u I - S a l I 限制片段 ( 片段 B ) 。然後將片段 A 以及 B 連結以生成質體 p J C A 1 5 3 。

將質體 p J C A 1 5 3 用 N o t I 線性化，然後依據先前記述之磷酸鈣沈澱技藝轉染入感染金絲雀痘病毒 ( 品系 A L V A C ) 的雞胚初級細胞 ( Panicali and Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982. 79. 4927-4931; Piccini et al. In Method in Enzymology. 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. and Grossman L. Academic Press ) 。與特定的 F C V G 1 品系專一的殼衣基因放射性探針雜交後選擇正性菌斑。此類菌斑經後續 4 次選擇 / 純化，直到得到純菌斑為止。然後將代表活體外重組供體質體 p J C A 1 5 2 以及金絲雀痘病毒 A L V A C 基因體之菌斑放大，得到的重組病毒標準液稱為 v C P 1 7 1 1 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 35 )

實施例 10 : 質體編碼貓科動物 GM - CSF

收集貓血液至內含 EDTA 之試管。以 Ficoll 梯度離心收集單核細胞，然後培養於 60 毫米直徑之培垂氏皿。然後用刀豆素 (ConA) (最終濃度約 4 微克 / 毫升) 以及植物血球凝集素 (PHA) (最終濃度約 10 微克 / 毫升) 刺激貓的單核細胞。於 "ConA" 以及 "PHA" 刺激之後刮刮培養盤收集淋巴母細胞，以及使用 "mRNA isolation Kit for White Blood Cell" (Boehringer Mannheim / Roche Cat # 1934325) 組套萃取細胞中之總 RNA。

用萃取自 ConA 以及 PHA 刺激的貓淋巴母細胞之總 RNA 作為模板，合成第一股互補的 DNA。此第一股互補的 DNA 係用寡核苷酸 p(dT)15 (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 814270) 進行延長反應加以製作。然後以得到的單股互補的 DNA 作為模板與以下寡核苷酸進行 PCR 反應：

JP578 (SEQ 識別號碼 20) (33 mer)

5'TATGCGGCCGCCACCATGTGGCTGCAGAACCTG3'

以及 JP579 (SEQ 識別號碼 21) (36 mer)

5'TATGCGGCCGCTACGTATCACTTCTTGACTGGTTTC3'

以放大約 450 鹼基對之 PCR 片段。此片段用 Not I 水解，於瓊脂糖凝膠電泳分離之後得到約 450 鹼基對之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

結

### 五、發明說明 ( 36 )

N o t I - N o t I 片段。然後此片段與質體 p V R 1 0 1 2 連結 ( Hartikka J. et al. Human Gene Theraphy. 1997. 7. 1205-1217 )。得到二個內含貓科動物 G M - C S F 序列 ( S E Q 識別號碼 2 2 以及 S E Q 識別號碼 2 3 )，相對於 h C M V / I E 啓動子之正確方向的菌落，分別地稱爲 p J P 0 8 9 以及 p J P 0 9 0。此二質體之大小爲 5 3 6 4 鹼基對 ( 圖 5 以及 7 )。

將貓科動物 G M - C S F 基因序列 ( 與 GenBank ( 寄存編號 A F 0 5 3 0 0 7 ) 得到的貓科動物 G M - C S F 序列有 1 3 個核苷酸之差異 ) 選殖入質體 p J P 0 8 9。大部分重要的改變爲 C 至 T 之改變，其可導致白氨酸至苯基丙氨酸之改變 ( 氨基酸 # 1 0 7 第一個密碼子之鹼基；圖 6 )。除了氨基酸 # 1 0 7 上不存在白氨酸至苯基丙氨酸之改變之外，選殖入質體 p J P 0 9 0 之貓科動物 G M - C S F 基因序列與質體 p J P 0 8 9 內含之序列相等 ( 圖 8 )。在相同的貓身上，用 3' R A C E 組套証實貓科動物 G M - C S F 基因之 3' 序列在氨基酸位置 1 0 7 上爲白氨酸或苯基丙氨酸。

#### 實施例 1 1：生產合併之質體疫苗

混合各種生產合併疫苗之質體。此類質體尤其是敘述於專利申請案 W O A - 9 8 0 3 6 6 0 ( p P B 1 7 9、p P B 1 8 0、p P B 1 8 1、p A B 0 0 9、p A B 0 5 3、p A B 0 5 2、p A B 0 5 6、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

### 五、發明說明 ( 37 )

p A B 0 5 8 、 p A B 0 2 9 、 p A B 0 3 0 、  
p A B 0 8 3 、 p A B 0 4 1 ) 之實施例 6 至 1 0 (   
p J C A 1 5 1 、 p J P 0 8 9 以及 p J P 0 9 0 ) 以及  
實施例 7 至 1 5 以及 1 7 至 1 9 。製備之混合物中各質體  
最終濃度相當於各質體的有效劑量。疫苗可用 0 . 9 %  
N a C l 溶液，或 P B S 緩衝溶液調整溶液之最終濃度。

#### 實施例 1 2 : 質體疫苗的調製劑

將內含一個或更多個如實施例 1 1 之質體的 D N A 溶  
液用乙醇沈澱濃縮，敘述於 Sambrook et al.(1989)。將  
D N A 沈澱塊溶於 0 . 9 % N a C l 溶液，得到 1 毫克  
/ 毫升之濃度。製備 0 . 7 5 毫莫耳濃度之 D M R I E -  
D O P E 溶液係將冷凍乾燥之 D M R I E - D O P E 產物  
與適當體積的滅菌之 H<sub>2</sub>O 混合。

形成質體 D N A - 脂質錯合物係將等部份之 0 . 7 5  
毫莫耳濃度 D M R I E - D O P E 溶液與 1 毫克 / 毫升  
0 . 9 % N a C l 之 D N A 溶液稀釋。將 D N A 溶液逐  
步地用縫合的 2 6 G 針頭沿著內含陽離子性脂質溶液之小  
玻璃瓶壁引入以避開泡沫之形成。當二種溶液已混合時即  
開始溫和的搖動。最後得到包含 0 . 3 7 5 毫莫耳濃度  
D M R I E - D O P E 以及 5 0 0 微克 / 毫升質體之組合  
物。

上述之所有溶液須要在室溫下操作。D N A / D M R  
I E - D O P E 複合體在免疫動物之前 3 0 分鐘在室溫下

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂

## 五、發明說明 ( 38 )

形成。

### 實施例 1 3 : 金絲雀痘載體疫苗的調製劑

製備疫苗時，重組金絲雀痘病毒 v C P 1 7 1 0 ( 實施例 8 ) 以及 v C P 1 7 1 1 ( 實施例 9 ) 中可補充碳化合物 ( carbomer ) 溶液作為輔助劑。較佳的碳化合物 ( carbomer ) 為 Carbopol™ 9 7 4 P 產自 BF Goodrich, Ohio, US A ( 分子量約 3 , 0 0 0 , 0 0 0 ) 。

內含 1 . 5 % Carbopol™ 9 7 4 P 之標準溶液，最初係製備於內含 1 克 / 升氫化鈉之蒸餾水中。然後用此標準溶液製備內含 4 毫克 / 毫升 Carbopol™ 9 7 4 P 之生理食鹽水溶液。標準溶液與適當體積的生理食鹽水混合，單一的階段或數個連續階段，各階段用 1 當量 ( 或供選擇地更濃的 ) 氫氧化鈉溶液調整 p H 值，得到最終 p H 值為 7 . 3 - 7 . 4 。

如此得到即用之 Carbopol™ 9 7 4 P 溶液，可用於重組冷凍乾燥之病毒 ( 例如 v C P 1 7 1 0 ， v C P 1 7 1 1 ) 或稀釋濃縮標準溶液重組病毒 ( 例如 v C P 1 7 1 0 ， v C P 1 7 1 1 ) 。例如，得到病毒的懸浮液，其中內含  $10^8$  p f u / 毫升劑量，可稀釋病毒的標準溶液得到滴定濃度  $10^{8.3}$  p f u / 毫升，然後等體積地與 4 毫克 / 毫升之該即用 Carbopol™ 9 7 4 P 溶液稀釋。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 39 )

實施例 1 4 : 間接的免疫螢光 ( I I F ) 測試

I I F 測試係在 9 6 孔微量滴定盤，其中內含單層感染 F C V 病毒的 C R F K 細胞中進行測試。

將每孔 2 0 0 微升之 C R F K 細胞懸浮液，內含 9 0 , 0 0 0 細胞 / 毫升之 F 1 5 培養液 ( Gibco BRL, Cat # 045-1075 )，內含 5 % 胎牛血清，培養在 9 6 孔之微量滴定盤。細胞長滿時，接種 3 2 0 C C I D<sub>50</sub> 之 F C V，1 0 0 微升之 F 1 5 培養液。當 C P E 病灶出現時，細胞用不含鈣或鎂之冰冷的 P B S ( P B S, Sigma ) 清洗，然後在 - 2 0 ° C 下於冰冷的丙酮 ( 其中內含 5 % v / v 水 ) 固定 3 0 分鐘。於乾燥之後，感染以及固定的細胞在 3 7 ° C 下與 1 0 0 微升 / 孔對應於抗 - F C V 4 3 1 單株抗體 4 4 ( 融合瘤 4 3 1 2 0 1 7 E 9 T，寄存於 C N C M，寄存編號 I - 2 2 8 2 ) 之腹水 ( 大約 1 / 5 0 0 0 稀釋於 5 0 毫莫耳濃度 T r i s - H C l 緩衝溶液，酸鹼值 7 . 6 ) 接觸 3 0 分鐘。

於 P B S 清洗二次之後，附著的抗體用聯接螢光素異硫氰酸鹽的山羊抗 - 老鼠免疫球蛋白 G 抗體 ( Biosys，共軛結合 F I T C，2 毫克 / 毫升 ) 以及 1 / 1 5 0 稀釋於 5 0 毫莫耳濃度 T r i s . H C l 緩衝溶液，酸鹼度 7 . 6，在相同的條件下反應呈現。以光學顯微鏡於 U V 光之下計讀。

此單株抗體用十八個分離株測試。彼僅附著至感染 F C V 4 3 1 的 C R F K 細胞。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 五、發明說明 ( 40 )

此測試可測定 F C V 4 3 1 品系之等價力。此類等價力代表與單株抗體 4 4 之反應性。

### 實施例 1 5 : 活體外血清交叉中和

對 1 8 個分離株進行血清交叉中和測試，7 株係來自法國，得自展現貓科動物杯狀病毒病症症候的貓之咽部塗片，分離株確認為 A 2、F 3 0 3 1、G 1、G 3、F 1、H 3 - 2 以及 H 1 - 4。4 株係來自英國，分離株確認為 J 5、3 3 7、3 8 8 b 以及 4 3 1。最後 7 株係來自美國，分離株確認為 R M I 1、R M I 2、R M I 3、R M I 5、R M I 6、R M I 以及 R M I 9。

各 F C V 病毒中，抗血清之製作係從小貓的口鼻路徑接種  $10^{6.0}$  C C I D<sub>50</sub> 之相關的 F C V 病毒。特定的不含病原之 ( S P F ) 小貓為 1 0 至 1 4 週大。於感染一個月之後收集各動物之血清。血清用熱去活化 ( 3 0 分鐘，5 6 ° C )，分裝以及儲存在 - 2 0 ° C 下。

測試得自分離株之血清中和 1 8 個分離株之能力。將血清用 D M E M 培養液在 9 6 孔細胞培養板系列的稀釋三次。添加 0 . 0 5 毫升內含大約 1 0 0 C C I D<sub>50</sub> 之選擇的病毒品系培養液至 0 . 0 5 毫升的稀釋血清。此混合物在 3 7 ° C 含 5 % C O<sub>2</sub> 大氣之培養箱中反應 2 小時。

然後將 0 . 1 5 毫升 C R F K 細胞之懸浮液，其中內含約 1 0 0 , 0 0 0 細胞 / 毫升添加至各混合物。在 3 7 ° C、5 % C O<sub>2</sub> 大氣下培養 4 天之後用相位差顯微鏡檢查

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 五、發明說明 ( 41 )

觀察到細胞的病理效應。各血清之中和滴定濃度係依據 Karber 之方計算法。滴定濃度為各孔中，抑制 50% 細胞病理的效應之最大稀釋倍數。滴定濃度用  $\log_{10}$  表示。如此發現最小滴定濃度為  $0.7 \log_{10} VN_{50}$ 。各血清至少滴定兩次，較佳者三次。

圖 9 為此類 18 F C V 品系以及此類 18 血清之間於進行血清交叉中和期間得到的所有之中和滴定濃度。

寡核苷酸由 DNA 合成儀製作以及經逆相色層分析法之 O P C 卡匣或凝膠電泳純化。

### 實施例 16：使用合成的寡核苷酸產生基因

完整基因之構築係用 (1) 經降溫結合重疊的約 80-mer 之寡核苷酸，對應於此二品系之基因 DNA 序列以及設計成具有 18-22 個鹼基重疊，(2) 從合成自互補至基因 5' 以及 3' 端之短的 PCR 引子進行遞歸的 PCR 放大。另一策略是合成僅代表 DNA 之一股約 80-mer 之寡核苷酸以及對應於另一股約 40-mer 之寡核苷酸，其設計具有大約 20mer 之重疊。PCR 反應中含有 4 微微莫耳之各寡核苷酸、100 微微莫耳之各 PCR 引子、200 微微莫耳濃度之各 dNTP 以及 2.5 單位之 taq 聚合酶。不含聚合酶之反應混合物在 94°C 下加熱 5 分鐘，然後冷卻至 80°C。加入聚合酶以及反應 5 分鐘，接著進行 30 個循環 (94°C 下 1 分鐘，50°C 下 1 分鐘以及 72°C 下 1 分鐘)。放大之混合物用 1.2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 五、發明說明 ( 42 )

% 瓊脂糖凝膠分析。

爲了增進大型基因之組裝，編碼區域可細分成 4 0 0 - 6 0 0 個鹼基對之片段，其可利用基因編碼退化的優點（未改變到氨基酸序列），分別地自各末端獨特的限制位點引入進行組裝。各片段次選殖入質體，即 pBlue script II SK，以及在組裝成完整基因之前進行序列分析（M. Alexeyev et al., Biochimica et Biophysica, Acta 1999, 1419, 299-306）。

據瞭解本發明以下之申請專利範圍並非限於以上描述的特定具體實施例，其變異仍不脫離本發明之範圍或精神。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

四、中文發明摘要 (發明之名稱：貓杯狀病毒株 431 和 G1 之殼衣蛋白質、編碼彼之 DNA 片段及包含彼之致免疫製劑)

本發明係關於優質 FCV 品系 (FCV 431) 之殼衣基因序列以及對應的 cDNA 序列。本發明亦關於互補的 G1 品系之殼衣基因序列與互補 DNA 序列。互補 DNA 序列可被引入表現載體以製備免疫的製劑以及重組或次單元疫苗，用以接種對抗貓科動物之杯狀病毒病症。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱：)

**Capsid protein of feline calicivirus strain 431 and G1, DNA fragments encoding them and immunogenic preparation comprising the same**

The invention relates to the sequence of the capsid gene and a corresponding cDNA sequence, of a dominant FCV strain called FCV 431. It also relates to the sequence of the capsid gene as well as the cDNA sequence of a complementary strain called G1. The cDNA sequences may be incorporated into expression vectors for the preparation of immunogenic preparations and of recombinant or subunit vaccines allowing vaccination against feline calicivirosis.

訂

## 六、申請專利範圍

## 公告本

附件 2A :

第 89114246 號專利申請案

中文申請專利範圍替換本

民國 96 年 7 月 12 日修正

1. 一種核酸片段，其包含 SEQ ID NO: 6 所示之核苷酸序列。

2. 一種 SEQ ID NO: 6 所示之核苷酸序列之核酸片段，其編碼抗原決定部位、肽或多肽，該抗原決定部位、肽或多肽實質上保留由全部序列所編碼之蛋白質的致免疫活性。

3. 一種核酸片段，其編碼 SEQ ID NO: 7 所示之殼衣蛋白質。

4. 一種核酸片段，其編碼 SEQ ID NO: 7 所示之殼衣蛋白質的免疫活性片段，該免疫活性片段實質上保留該蛋白質的致免疫活性。

5. 一種拮抗貓杯狀病毒(FCV)之致免疫製劑，其包含以空殼衣之型式組裝的 FCV 株 431 之殼衣蛋白質，該殼衣蛋白質具有 SEQ ID NO: 7 所示之序列。

6. 一種拮抗貓杯狀病毒(FCV)之致免疫製劑，其包含 SEQ ID NO: 7 之免疫活性片段或抗原決定部位，該免疫活性片段或抗原決定部位實質上保留具有該 SEQ ID NO: 7 之蛋白質的致免疫活性。

7. 如申請專利範圍第 5 或 6 項之致免疫製劑，其另包含以空殼衣之型式組裝的 FCV 株 G1 之殼衣蛋白質，該殼衣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 六、申請專利範圍

蛋白質具有 SEQ ID NO：5 之序列。

8.如申請專利範圍第 5 或 6 項之致免疫製劑，其另包含 SEQ ID NO：5 之免疫活性片段或抗原決定部位，該免疫活性片段或抗原決定部位實質上保留具有該 SEQ ID NO：5 之蛋白質的致免疫活性。

9.一種經分離、純化或合成之殼衣蛋白質，其具有 SEQ ID NO：7 之序列且係以空殼衣之型式組裝。

10.一種 SEQ ID NO：7 序列之免疫活性片段或抗原決定部位，該免疫活性片段或抗原決定部位實質上保留具有該 SEQ ID NO：7 之蛋白質的致免疫活性。

11.一種致免疫製劑，其包含申請專利範圍第 9 項之經分離、純化或合成之殼衣蛋白質或申請專利範圍第 10 項之免疫活性片段或抗原決定部位以及獸醫上可接受之載體。

12.如申請專利範圍第 11 項之致免疫製劑，其另包含其他貓病原體之免疫原或另包含含有其他貓病原體之免疫原的核苷酸序列之表現載體。

13.如申請專利範圍第 12 項之致免疫製劑，其中該其他貓病原體係貓鼻氣管炎病毒(亦稱為貓疱疹病毒，FHV)、貓白血病病毒(FeLV)、貓小 DNA 病毒(FPV)、貓感染性腹膜炎病毒(FIPV)、貓免疫缺失病毒(FIV)、狂犬病病毒或衣原體。

14.如申請專利範圍第 11 至 13 項中任一項之致免疫製劑，其進一步包含具有 SEQ ID NO：5 之序列的經分離、純化或合成之殼衣蛋白質。

## 六、申請專利範圍

15.如申請專利範圍第 11 至 13 項中任一項之致免疫製劑，其進一步包含經分離、純化或合成之蛋白質，該蛋白質包含 SEQ ID NO：5 之免疫活性片段或抗原決定部位，該免疫活性片段或抗原決定部位實質上保留具有該 SEQ ID NO：5 之蛋白質的致免疫活性。

16.如申請專利範圍第 11 至 13 項中任一項之致免疫製劑，其進一步包含表現載體，該表現載體含有編碼具有 SEQ ID NO：5 之序列的蛋白質之核酸分子。

17.如申請專利範圍第 11 至 13 項中任一項之致免疫製劑，其進一步包含表現載體，該表現載體含有編碼 SEQ ID NO：5 之免疫活性片段或抗原決定部位之核酸分子，該免疫活性片段或抗原決定部位實質上保留具有該 SEQ ID NO：5 之蛋白質的致免疫活性。

18.一種核酸片段，其包含 SEQ ID NO: 4 所示之核苷酸序列。

19.一種 SEQ ID NO: 4 所示之核苷酸序列之核酸片段，其編碼抗原決定部位、肽或多肽，該抗原決定部位、肽或多肽實質上保留由全部序列所編碼之蛋白質的致免疫活性。

20.一種經分離之殼衣蛋白質，其包含 SEQ ID NO：5 所示之胺基酸序列。

21.一種包含 SEQ ID NO：5 之免疫活性片段或抗原決定部位之蛋白質，其中該免疫活性片段或抗原決定部位實質上保留具有該 SEQ ID NO：5 之蛋白質的致免疫活性。

## 六、申請專利範圍

22. 一種拮抗 FCV 之致免疫製劑，其包含獸醫上可接受之載體或賦形劑及申請專利範圍第 20 或 21 項之蛋白質。

23. 一種致免疫製劑，其包含寄存於 CNCM 且寄存編號為 I-2166 的滅活之 FCV 株 431。

24. 一種致免疫製劑，其包含寄存於 CNCM 且寄存編號為 I-2167 的滅活之 FCV 株 G1。

25. 一種致免疫製劑，其包含寄存於 CNCM 且寄存編號為 I-2166 的滅活之 FCV 株 431 及寄存於 CNCM 且寄存編號為 I-2167 的滅活之 FCV 株 G1。

26. 如申請專利範圍第 5 至 6、11 至 13、22 及 25 項中任一項之致免疫製劑，其另包含佐劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

93年1月5日 修正 補充

圖 1

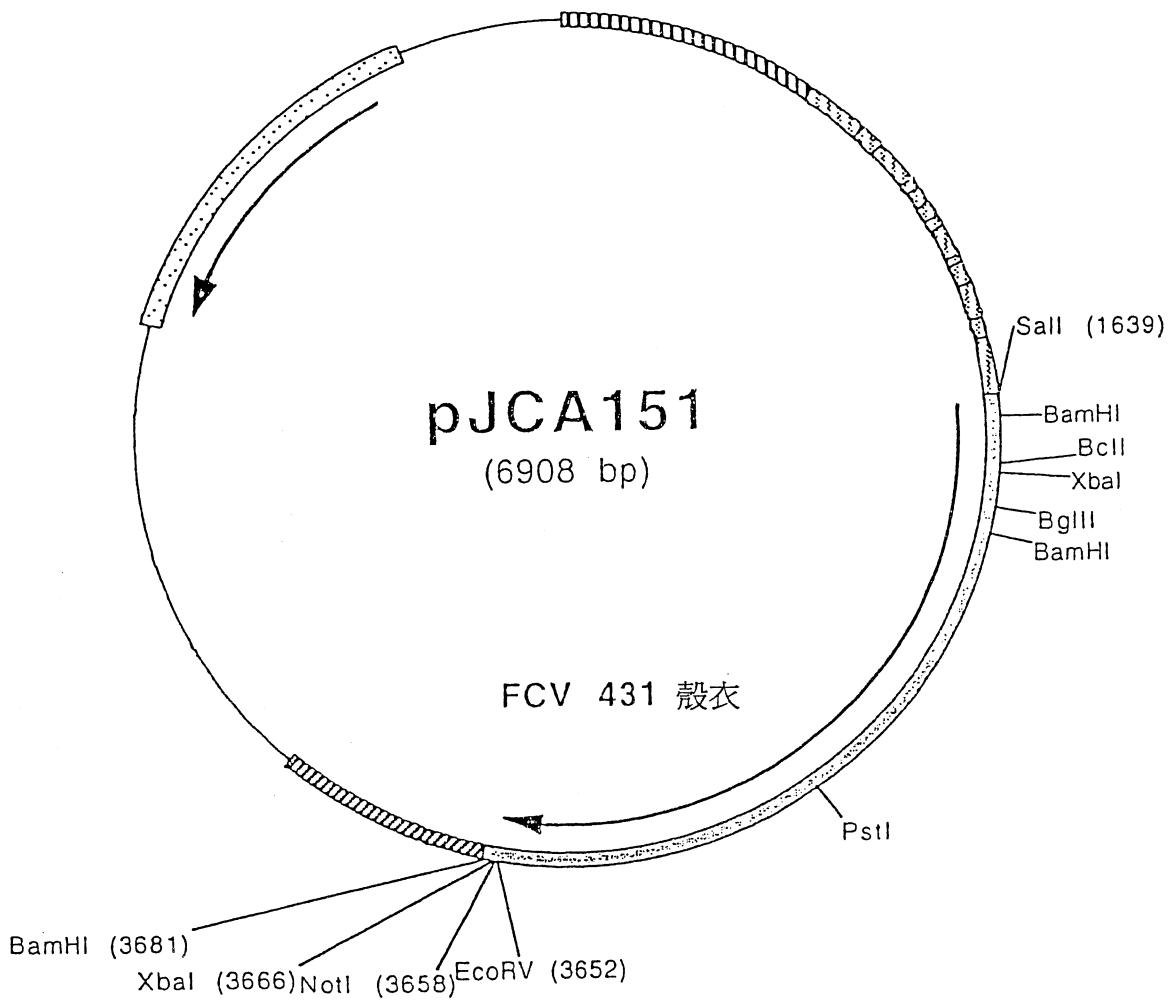
1 ATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTGCTTAAATACTATGATTGGGATCCCCACACAAAATTGGTTATTGACCCCAATAAA  
1 MetCysSerThrCysAlaAsnValLeuLysTyrTyrAspTrpAspProHisThrLysLeuValIleAspProAsnLys  
79 TTCCTTTCTCTAGGCTTCTGCGATAAACCGCTTTTATGCTGCTACCCAGAAGCTTCTCCAGAATTTGGAACAGTGTGG  
27 PheLeuSerLeuGlyPheCysAspLysProLeuLeuCysCysTyrProGluLeuLeuProGluPheGlyThrValTrp  
157 GATTGTGACCAATCCCCTCTACAAATTTACCTTGAATCTATCCTTGGTGATGATGAATGGAGCTCGACATTTGATGCT  
53 AspCysAspGlnSerProLeuGlnIleTyrLeuGluSerIleLeuGlyAspAspGluTrpSerSerThrPheAspAla  
235 ATCGATCCTGTTGTTCCCTCCCATGCATTGGGACAAGGCTGGGAAATCTTCCAGCCTCATCTGGTGTCTAATGCAC  
79 IleAspProValValProProMetHisTrpAspLysAlaGlyLysIlePheGlnProHisProGlyValLeuMetHis  
313 CACCTCATCAATGAAGTTGCAAAGCTTGGGATCCAAATCTCCCCATCTCCGATTGGAAGCTGACGGGGATTCATCC  
105 HisLeuIleAsnGluValAlaLysAlaTrpAspProAsnLeuProIlePheArgLeuGluAlaAspGlyAspSerSer  
391 ATCACGACCCCTGAGCAAGGAACATTGGTCCGGTGGTGTATTGCCGAGCCAGCGCTCAAATGGCAACTGCTGCTGAC  
131 IleThrThrProGluGlnGlyThrLeuValGlyGlyValIleAlaGluProSerAlaGlnMetAlaThrAlaAlaAsp  
469 GCAGCAACTGGCAAGAGTGTGACTCGGAATGGGAGTCTTCTTCTCATTCCATACTAGTGTGAATGGAGTACATCT  
157 AlaAlaThrGlyLysSerValAspSerGluTrpGluSerPhePheSerPheHisThrSerValAsnTrpSerThrSer  
547 GAAACCCAGGGAAAAGATCCTCTTTAAACAATCTTTAGGACCCCTACTTAATCCTTACCTTGAACACCTTTCTAAATTA  
183 GluThrGlnGlyLysIleLeuPheLysGlnSerLeuGlyProLeuLeuAsnProTyrLeuGluHisLeuSerLysLeu  
625 TACGTTGCTTGGTCTGGATCAGTGGATGTAAGGTTCTCTATTTCTGGCTCCGGTGTCTTCGGGGGAAATGGCTGCC  
209 TyrValAlaTrpSerGlySerValAspValArgPheSerIleSerGlySerGlyValPheGlyGlyLysLeuAlaAla  
703 ATTGTTGTGCCTCCAGGGTTGACCCCGTCCAGAGCACGTCAATGCTCCAGTATCCCCATGTCTCTTTGATGCTCGC  
235 IleValValProProGlyValAspProValGlnSerThrSerMetLeuGlnTyrProHisValLeuPheAspAlaArg  
781 CAAGTTGAACCTGTTATATTTCAATCCCCGATTTAAGGAGCACTCTATCACCTAATGTCTGATACTGATACTACA  
261 GlnValGluProValIlePheSerIleProAspLeuArgSerThrLeuTyrHisLeuMetSerAspThrAspThrThr  
859 TCCCTTGTATCATGGTATATAATGATCTTATTAACCCTTATGCTAATGATTCCAATCTTCTGGGTGTATTGTTACC  
287 SerLeuValIleMetValTyrAsnAspLeuIleAsnProTyrAlaAsnAspSerAsnSerSerGlyCysIleValThr  
937 GTTGAGACCAAACCTGGACCTGACTTCAAATTTACCTCCTGAAACCACCTGGATCAATGTTAACTCATGGCTCTATT  
313 ValGluThrLysProGlyProAspPheLysPheHisLeuLeuLysProProGlySerMetLeuThrHisGlySerIle  
1015 CCCTCTGACTTGATTCCAAAATCTTCATCCCTTTGGATTGGAAATCGATATTGGTCTGACATAACTGATTTTGTAAAT  
339 ProSerAspLeuIleProLysSerSerSerLeuTrpIleGlyAsnArgTyrTrpSerAspIleThrAspPheValIle  
1093 CGGCCATTCGTTTCAAGCCAATCGTCACTTTGACTTCAACCAAGAAGACGGCTGGATGGAGCACACCAAGATTTCGA  
365 ArgProPheValPheGlnAlaAsnArgHisPheAspPheAsnGlnGluThrAlaGlyTrpSerThrProArgPheArg  
1171 CCCATAACAATAACTATTAGTGAAAGTAATGGATCAAACCTGGGAAGTGGCGTGGCCACAGATTACATTTGCCCCGGC  
391 ProIleThrIleThrIleSerGluSerAsnGlySerLysLeuGlyThrGlyValAlaThrAspTyrIleValProGly  
1249 ATACCTGATGGTTGGCCTGACACCACAATTGGTGAGGAATTGACACCAGCTGGAGATTACTCAATCACAACGGTAGT  
417 IleProAspGlyTrpProAspThrThrIleGlyGluGluLeuThrProAlaGlyAspTyrSerIleThrAsnGlySer  
1327 GGCAATGACATTGCAACAGCTAATGCTTATGACAGTGTGATGTGATCACAAACACCACAAAATTTCCAGGGGGATGTAC  
443 GlyAsnAspIleAlaThrAlaAsnAlaTyrAspSerAlaAspValIleThrAsnThrThrAsnPheArgGlyMetTyr  
1405 ATTTGTGGAGCACTCCAGAGGGCTTGGGGCGATAAGAAGATCTCAAGTACAGCTTTCATAACCACTGCTATTAAGGAA  
469 IleCysGlyAlaLeuGlnArgAlaTrpGlyAspLysLysIleSerSerThrAlaPheIleThrThrAlaIleLysGlu  
1483 GGTAATACGCTTAAACCATCAAATACAATTGACATGACAAAATTTGCTGTGTACCAGGACACTCATGTTGGCAGGGAT  
495 GlyAsnThrLeuLysProSerAsnThrIleAspMetThrLysIleAlaValTyrGlnAspThrHisValGlyArgAsp  
1561 GTTCAAACATCTGATGATACACTGGCAATCCTTGGTTACACTGGAATTGGTGAACAGGCAATTGGATCTAATAGGGAT  
521 ValGlnThrSerAspAspThrLeuAlaIleLeuGlyTyrThrGlyIleGlyGluGlnAlaIleGlySerAsnArgAsp  
1639 AGTGTGGTTTCGCATTAGCATGCTGCCGGAAACTGGTGGCCGCGGGGAATCACCCAATTTTCTACAAAATTTCTATT  
547 SerValValArgIleSerMetLeuProGluThrGlyAlaArgGlyGlyAsnHisProIlePheTyrLysAsnSerIle  
1717 AAGTTAGGATATGTACTCAGGTCAATTGATGTGTTCAACTCACAAATTTCTCCACACATCTAGACAAGTCCCTCAAT  
573 LysLeuGlyTyrValLeuArgSerIleAspValPheAsnSerGlnIleLeuHisThrSerArgGlnLeuSerLeuAsn  
1795 CATTACTTGCTACCACCTGACTCATTTGCTGTTTATAGGATTATAGACTCTAATGGATCTTGGTTTGATGTAGGGATT  
599 HisTyrLeuLeuProProAspSerPheAlaValTyrArgIleIleAspSerAsnGlySerTrpPheAspValGlyIle  
1873 GATAGTGATGGTTTTTCTTTGTTGGTGTCTTAGTATCCCTAAACTTGAGTTTCTCTTTCTGCCTCCTACATGGGA  
625 AspSerAspGlyPheSerPheValGlyValSerSerIleProLysLeuGluPheProLeuSerAlaSerTyrMetGly  
1951 ATTACAGCTGGCAAAGATTGCACTTGCTCTAACATTAGGAGTACTATGACAAAATATGA  
651 IleGlnLeuAlaLysIleArgLeuAlaSerAsnIleArgSerThrMetThrLysLeu\*\*\*

煩請委員明示，本案修正後之圖式變更

## 圖 2

1 ATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTGCTTAAATACTATGATTGGGATCCCCACTTTAGATTGATTATTAACCCCAACAAA  
 1 MetCysSerThrCysAlaAsnValLeuLysTyrTyrAspTrpAspProHisPheArgLeuIleIleAsnProAsnLys  
 79 TTTCTTTCCGTTGGCTTCTGTGATAATCCTCTTATGTGTTGTTATCCCGAATTACTCCCTGAATTTGGAAGTGTGTGG  
 27 PheLeuSerValGlyPheCysAspAsnProLeuMetCysCysTyrProGluLeuLeuProGluPheGlyThrValTrp  
 157 GACTGTGATCAGTCACCCTCCAAATTTATCTAGAGTCCATCCTTGGTGATGACGAATGGGCTTCCACTTACGAAGCA  
 53 AspCysAspGlnSerProLeuGlnIleTyrLeuGluSerIleLeuGlyAspAspGluTrpAlaSerThrTyrGluAla  
 235 GTGACCCAGTGGTGCCACCAATGCATTGGGATAGTGCTGGAAAGATCTTCAGCCACATCCTGGTGTATTGATGCAC  
 79 ValAspProValValProProMetHisTrpAspSerAlaGlyLysIlePheGlnProHisProGlyValLeuMetHis  
 313 CATCTGATTGGTGAAGTTGCTAAGGCCTGGGATCCAAACTTACCCTCTTCGCTGGAAGCGGATGATGGATCTGTG  
 105 HisLeuIleGlyGluValAlaLysAlaTrpAspProAsnProLeuPheArgLeuGluAlaAspAspGlySerVal  
 391 ACCACGCCTGAACAAGGAACACTGGTGGGAGTCATTGCTGAGCCTAATGCCCAAATGTCAGCTGTTGCTGACGTG  
 131 ThrThrProGluGlnGlyThrLeuValGlyGlyValIleAlaGluProAsnAlaGlnMetSerAlaValAlaAspVal  
 469 GCCACTGGCAAAGTGTGACTCTGAGTGGGAAGCATTCTTCTCTTCCACACCAGTGTCAATTGGAGCACATCTGAA  
 157 AlaThrGlyLysSerValAspSerGluTrpGluAlaPhePheSerPheHisThrSerValAsnTrpSerThrSerGlu  
 547 ACCAAGGGAAAATCCTTTTAAACAATCTCTAGGTCCCCTACTTAACCCTTACCTTACTCATCTCGCAAAACTTTAT  
 183 ThrGlnGlyLysIleLeuPheLysGlnSerLeuGlyProLeuLeuAsnProTyrLeuThrHisLeuAlaLysLeuTyr  
 625 GTTGCATGGTCTGGTCTATTGAGGTTAGATTTTCAATTTCTGGATCTGGTGTCTTTGGTGGAAAAGTGGCTGCTATT  
 209 ValAlaTrpSerGlySerIleGluValArgPheSerIleSerGlySerGlyValPheGlyGlyLysLeuAlaAlaIle  
 703 GTTGTGCCACCCGGGATCGATCCCGTGCAAAGCACATCAATGTTGCAGTACCCCATGTTCTGTTTGTATGCTCGTCAA  
 235 ValValProProGlyIleAspProValGlnSerThrSerMetLeuGlnTyrProHisValLeuPheAspAlaArgGln  
 781 GTTGAACCTGTTATCTTCACTATCCCTGATTTGAGAAATAGTCTATATCACCTTATGTCTGACACTGATACTACATCT  
 261 ValGluProValIlePheThrIleProAspLeuArgAsnSerLeuTyrHisLeuMetSerAspThrAspThrThrSer  
 859 CTTGTCATTATGATATACAATGATCTCATTAAATCCCTATGCTAATGATTCTAACTCATCTGGATGCATTGTTACTGTG  
 287 LeuValIleMetIleTyrAsnAspLeuIleAsnProTyrAlaAsnAspSerAsnSerSerGlyCysIleValThrVal  
 937 GAGACAAAACCTGGCCCCGATTTCAAATTTACCTCTGAAACCGCTGGGTCTATGTTAACTCATGGGTCAATTTCA  
 313 GluThrLysProGlyProAspPheLysPheHisLeuLeuLysProProGlySerMetLeuThrHisGlySerIlePro  
 1015 TCCGACCTTATCCCAAATCTTCTCTTTGGATTGGCAACCGACACTGGTCTGATATAACTGATTTTGTTCATCAAA  
 339 SerAspLeuIleProLysSerSerSerLeuTrpIleGlyAsnArgHisTrpSerAspIleThrAspPheValIleLys  
 1093 CCTTTTGTTTTCCAGGCTAATCGACATTTTGACTTCAATCAAGAGACTGCAGGCTGGAGCACTCCAGATTTAGACCC  
 365 ProPheValPheGlnAlaAsnArgHisPheAspPheAsnGlnGluThrAlaGlyTrpSerThrProArgPheArgPro  
 1171 ATAACCATCACAGTTTCTGAGAAGGGAGGATCAAATTTGGTATTGGTGTGCAACTGACTCTATTGTCCCTGGCATA  
 391 IleThrIleThrValSerGluLysGlyGlySerLysLeuGlyIleGlyValAlaThrAspSerIleValProGlyIle  
 1249 CCAGACGGCTGGCCGATAACCACCTCCAGAAAACCTTACCCAGCAGGTGACTATGCAATCACAATGGGGGAAAC  
 417 ProAspGlyTrpProAspThrThrIleProGluLysLeuThrProAlaGlyAspTyrAlaIleThrAsnGlyGlyAsn  
 1327 AATGACATCACCCTGCTGCGGACTATGATGGGCAAGTATAATCAAAAACAATACAATTTCAAGGGTATGTATATT  
 443 AsnAspIleThrThrAlaAlaAspTyrAspGlyAlaSerIleIleLysAsnAsnThrAsnPheLysGlyMetTyrIle  
 1405 TGTGGTGTCTTTCAAAAGAGCTTGGGGTGACAAGAAAATTTCAAACACTGCCTTTTACTACTACCGCAATCAGAGAGGGT  
 469 CysGlyAlaLeuGlnArgAlaTrpGlyAspLysLysIleSerAsnThrAlaPheIleThrThrAlaIleArgGluGly  
 1483 AACTCAATAAAACCATCTAATGTAATTGACATGACAAAACCTGCCGTTTATCAAGATGCTCATGTTGGTGCAGAACTT  
 495 AsnSerIleLysProSerAsnValIleAspMetThrLysLeuAlaValTyrGlnAspAlaHisValGlyAlaGluLeu  
 1561 CAAACCTCTGACATCACCTTAGCAATCCTTGGTTATACCGGGATTGGTGAAGAAGCTATAGGCCTGGATAGGGACAAA  
 521 GlnThrSerAspIleThrLeuAlaIleLeuGlyTyrThrGlyIleGlyGluGluAlaIleGlyLeuAspArgAspLys  
 1639 GTGGTGCATATTAGCATACTCCAGAAACTGGTGTCTCGTGGCGGAAATCACCCCTATTTTCTATATGAACAAAATTTAA  
 547 ValValArgIleSerIleLeuProGluThrGlyAlaArgGlyGlyAsnHisProIlePheTyrMetAsnLysIleLys  
 1717 TTAGTTTATGTTATTAGATCAATAGATGTGGCAAACCTCCCAAATTTTACATACATCTAGGCAATTATCACTCAATAAT  
 573 LeuGlyTyrValIleArgSerIleAspValAlaAsnSerGlnIleLeuHisThrSerArgGlnLeuSerLeuAsnAsn  
 1795 TATCTACTGGCTCCTGACTCCTTTGCAGTTTACAGAATTATTGATTCTGGCGGCTCTTGGTTTGATATTGGTATTGAT  
 599 TyrLeuLeuAlaProAspSerPheAlaValTyrArgIleIleAspSerGlyGlySerTrpPheAspIleGlyIleAsp  
 1873 AGTGATGGTTTTTCTTTTGTGGTGTATCTCAAATTTGGAAAATTTGGAGTTTCCACTAACTGCCTCCTACATGGGAATT  
 625 SerAspGlyPheSerPheValGlyValSerGlnIleGlyLysLeuGluPheProLeuThrAlaSerTyrMetGlyIle  
 1951 CAATTGGCAAAGATTCGACTTGCCCTCAAACATTAGGAGTGGAAATGGTTAAAATATGA  
 651 GlnLeuAlaLysIleArgLeuAlaSerAsnIleArgSerGlyMetValLysIle\*\*\*

圖 3



## 圖 4

AAGCTTCTAT	CAAAAGTCTT	AATGAGTTAG	GTGTAGATAG	TATAGATATT	ACTACAAAGG	60
TATTCATATT	TCCTATCAAT	TCTAAAGTAG	ATGATATTAA	TAACTCAAAG	ATGATGATAG	120
TAGATAATAG	ATACGCTCAT	ATAATGACTG	CAAATTTGGA	CGGTTCACAT	TTTAATCATC	180
ACGCGTTCAT	AAGTTTCAAC	TGCATAGATC	AAAATCTCAC	TAAAAAGATA	GCCGATGTAT	240
TTGAGAGAGA	TTGGACATCT	AACTACGCTA	AAGAAATTAC	AGTTATAAAT	AATACATAAT	300
GGATTTTGT	ATCATCAGTT	ATATTTAACA	TAAGTACAAT	AAAAAGTATT	AAATAAAAAT	360
ACTTACTTAC	GAAAAAATGT	CATTATTACA	AAAACATAT	TTTACAGAAC	AATCTATAGT	420
AGAGTCCTTT	AAGAGTTATA	ATTTAAAAGA	TAACCATAAT	GTAATATTTA	CCACATCAGA	480
TGATGATACT	GTTGTAGTAA	TAAATGAAGA	TAATGTACTG	TTATCTACAA	GATTATTATC	540
ATTTGATAAA	ATTCTGTTTT	TTAACTCCTT	TAATAACGGT	TTATCAAAAT	ACGAACTAT	600
TAGTGATACA	ATATTAGATA	TAGATACTCA	TAATTATTAT	ATACCTAGTT	CTTCTTCTTT	660
GTTAGATATT	CTAAAAAAA	GAGCGTGTGA	TTAGAAPTA	GAAGATCTAA	ATTATGCGTT	720
AATAGGAGAC	AATAGTAACT	TATATTATAA	AGATATGACT	TACATGAATA	ATTGGTTATT	780
TACTAAAGGA	TTATTAGATT	ACAAGTTTGT	ATTATTGCGC	GATGTAGATA	AATGTTACAA	840
ACAGTATAAT	AAAAAGAATA	CTATAATAGA	TATAATACAT	CGCGATAACA	GACAGTATAA	900
CATATGGGTT	AAAAATGTTA	TAGAATACTG	TTCTCCTGGC	TATATATTAT	GGTTACATGA	960
TCTAAAAGCC	GCTGCTGAAG	ATGATTGGTT	AAGATACGAT	AACCGTATAA	ACGAATTATC	1020
TGCGGATAAA	TTATACACTT	TCGAGTTCAT	AGTTATATTA	GAAAATAATA	TAAAACATTT	1080
ACGAGTAGGT	ACAATAATTG	TACATCCAAA	CAAGATAATA	GCTAATGGTA	CATCTAATAA	1140
TATACTTACT	GATTTTCTAT	CTTACGTAGA	AGAACTAATA	TATCATCATA	ATTCATCTAT	1200
AATATTGGCC	GGATATTTTT	TAGAATTCTT	TGAGACCACT	ATTTTATCAG	AATTTATTTT	1260
TTCATCTTCT	GAATGGGTAA	TGAATAGTAA	CTGTTTAGTA	CACCTGAAAA	CAGGGTATGA	1320

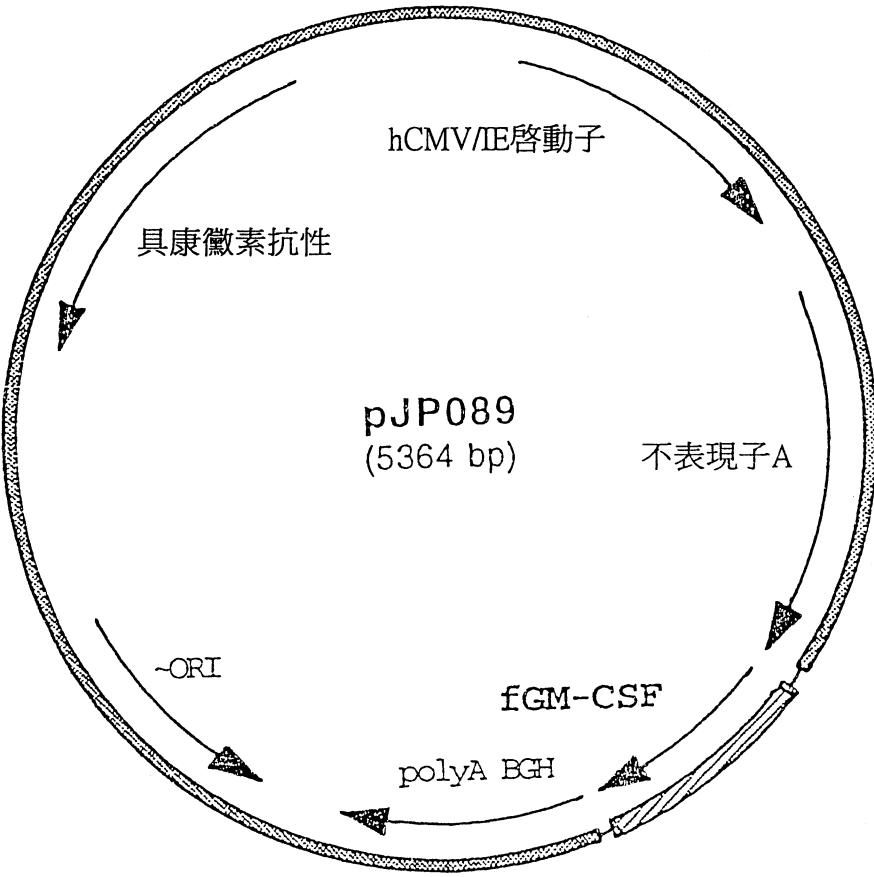
## 圖4(續)

AGCTATACTC	TTTGATGCTA	GTTTATTTTT	CCAACCTCTCT	ACTAAAAGCA	ATTATGTAAA	1380
ATATTTGGACA	AAGAAAACCTT	TGCAGTATAA	GAACCTTTTTT	AAAGACGGTA	AACAGTTAGC	1440
AAAATATATA	ATTAAGAAAG	ATAGTCAGGT	GATAGATAGA	GTATGTTATT	TACACGCAGC	1500
TGTATATAAT	CACGTAACCTT	ACTTAATGGA	TACGTTTAAA	ATTCCTGGTT	TTGATTTTAA	1560
ATTCTCCGGA	ATGATAGATA	TACTACTGTT	TGGAATATTG	CATAAGGATA	ATGAGAATAT	1620
ATTTTATCCG	AAACGTGTTT	CTGTAACATA	TATAATATCA	GAATCTATCT	ATGCAGATTT	1680
TTACTTTATA	TCAGATGTTA	ATAAATTCAG	TAAAAAGATA	GAATATAAAA	CTATGTTTCC	1740
TATACTCGCA	GAAAACACT	ATCCAAAAGG	AAGGCCCTAT	TTTACACATA	CATCTAACGA	1800
AGATCTTCTG	TCTATCTGTT	TATGCGAAGT	AACAGTTTGT	AAAGATATAA	AAAATCCATT	1860
ATTATATTCT	AAAAAGGATA	TATCAGCAAA	ACGATTCATA	GGTTTATTTA	CATCTGTCTGA	1920
TATAAATACG	GCTGTTGAGT	TAAGAGGATA	TAAAATAAGA	GTAATAGGAT	GTTTLAGAATG	1980
GCCTGAAAAG	ATAAAAATAT	TTAATTCTAA	TCCTACATAC	ATTAGATTAT	TACTAACAGA	2040
AAGACGTTTA	GATATTCTAC	ATTCCTATCT	GCTTAAATTT	AATATAACAG	AGGATATAGC	2100
TACCAGAGAT	GGAGTCAGAA	ATAATTTACC	TATAATTTCT	TTTATCGTCA	GTTATTGTAG	2160
ATCGTATACT	TATAAATTAC	TAAATTGCCA	TATGTACAAT	TCGTGTAAGA	TAACAAAGTG	2220
TAAATATAAT	CAGGTAATAT	ATAATCCTAT	ATAGGAGTAT	ATATAATTGA	AAAAGTAAAA	2280
TATAAATCAT	ATAATAATGA	AACGAAATAT	CAGTAATAGA	CAGGAACTGG	CAGATTCTTC	2340
TTCTAATGAA	GTAAGTACTG	CTAAATCTCC	AAAATTAGAT	AAAATGATA	CAGCAAATAC	2400
AGCTTCATTC	AACGAATTAC	CTTTTAATTT	TTTCAGACAC	ACCTTATTAC	AAACTAACTA	2460
AGTCAGATGA	TGAGAAAGTA	AATATAAATT	TAACTTATGG	GTATAATATA	ATAAAGATTC	2520
ATGATATPAA	TAATTTACTT	AACGATGTTA	ATAGACTTAT	TCCATCAACC	CCTTCAAACC	2580
TTTCTGGATA	TTATAAAATA	CCAGTTAATG	ATATTAAAAT	AGATTGTTTA	AGAGATGTAA	2640
ATAATTATTT	GGAGGTAAAG	GATATAAAAT	TAGTCTATCT	TTCACATGGA	AATGAATTAC	2700
CTAATATTAA	TAATTATGAT	AGGAATTTTT	TAGGATTTAC	AGCTGTTATA	TGTATCAACA	2760

## 圖4(續及結束)

ATACAGGCAG ATCTATGGTT ATGGTAAAAC ACTGTAACGG GAAGCAGCAT TCTATGGTAA	2820
CTGGCCTATG TTTAATAGCC AGATCATTTT ACTCTATAAA CATTTTACCA CAAATAATAG	2880
GATCCTCTAG ATATTTAATA TTATATCTAA CAACAACAAA AAAATTTAAC GATGTATGGC	2940
CAGAAGTATT TTCTACTAAT AAAGATAAAG ATAGTCTATC TTATCTACAA GATATGAAAG	3000
AAGATAATCA TTTAGTAGTA GCTACTAATA TGGAAAGAAA TGTATACAAA AACGTGGAAG	3060
CTTTTATATT AAATAGCATA TTACTAGAAG ATTTAAAATC TAGACTTAGT ATAACAAAAC	3120
AGTTAAATGC CAATATCGAT TCTATATTTT ATCATAACAG TAGTACATTA ATCAGTGATA	3180
TACTGAAACG ATCTACAGAC TCAACTATGC AAGGAATAAG CAATATGCCA ATTATGTCTA	3240
ATATTTTAAAC TTTAGAACTA AAACGTTCTA CCAATACTAA AAATAGGATA CGTGATAGGC	3300
TGTTAAAAGC TGCAATAAAT AGTAAGGATG TAGAAGAAAT ACTTTGTTCT ATACCTTCGG	3360
AGGAAAGAAC TTTAGAACAA CTTAAGTTTA ATCAAACCTG TATTTATGAA CACTATAAAA	3420
AAATTATGGA AGATACAAGT AAAAGAATGG ATGTTGAATG TCGTAGTTTA GAACATAACT	3480
ATACGGCTAA CTTATATAAA GTGTACGGAC AAAACGAATA TATGATTACT TATATACTAG	3540
CTCTCATAAG TAGGATTAAT AATATTATAG AAACTTTAAA ATATAATCTG GTGGGGCTAG	3600
ACGAATCTAC AATACGTAAT ATAAATTATA TAATTTTACA AAGAACAAAA AAAAATCAAG	3660
TTTCTAATAC CTTATAGATA AACTATATTT TTTACCACTG A	3701

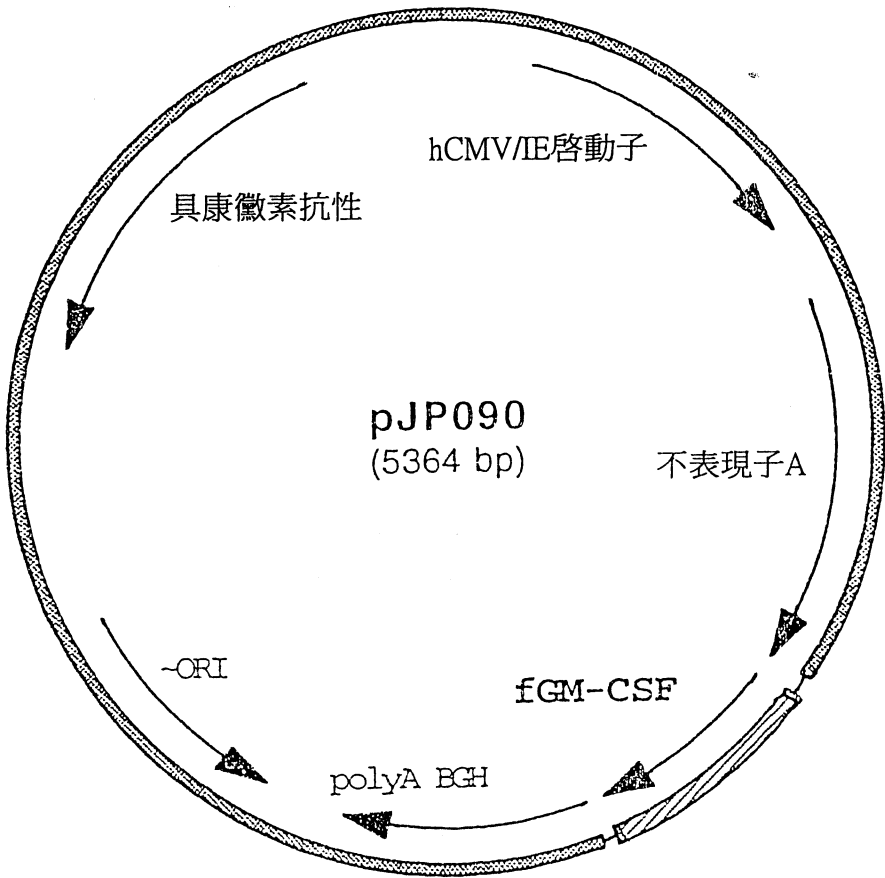
圖5



## 圖6

1909 ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT TTC CTG GGC ACT GTG GTC TGC AGC ATC TCT GCA CCC  
 TAC ACC GAC GTC TTG GAC GAA AAG GAC CCG TGA CAC CAG ACG TCG TAG AGA CGT GGG  
 1▶ Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Thr Val Val Cys Ser Ile Ser Ala Pro  
 1966 ACC AGT TCA CCC AGC TCT GTC ACT CGG CCC TGG CAA CAC GTG GAT GCC ATC AAG GAG  
 TGG TCA AGT GGG TCG AGA CAG TGA GCC GGG ACC GTT GTG CAC CTA CGG TAG TTC CTC  
 20▶ Thr Ser Ser Pro Ser Ser Val Thr Arg Pro Trp Gln His Val Asp Ala Ile Lys Glu  
 2023 GCT CTG AGC CTT CTG AAC AAC AGT AGT GAA ATA ACT GCT GTG ATG AAT GAA GCA GTA  
 CGA GAC TCG GAA GAC TTG TTG TCA TCA CTT TAT TGA CGA CAC TAC TTA CTT CGT CAT  
 39▶ Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Ser Glu Ile Thr Ala Val Met Asn Glu Ala Val  
 2080 GAA GTC GTC TCT GAA ATG TTT GAC CCT GAG GAG CCG AAA TGC CTG CAG ACT CAC CTA  
 CTT CAG CAG AGA CTT TAC AAA CTG GGA CTC CTC GGC TTT ACG GAC GTC TGA GTG GAT  
 58▶ Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp Pro Glu Glu Pro Lys Cys Leu Gln Thr His Leu  
 2137 AAG CTG TAC GAG CAG GGC CTA CGG GGC AGC CTC ATC AGC CTC AAG GAG CCT CTG AGA  
 TTC GAC ATG CTC GTC CCG GAT GCC CCG TCG GAG TAG TCG GAG TTC CTC GGA GAC TCT  
 77▶ Lys Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Ile Ser Leu Lys Glu Pro Leu Arg  
 2194 ATG ATG GCC AAC CAT TAC AAG CAG CAC TGC CCC TTT ACT CCG GAA ACG CCC TGT GAA  
 TAC TAC CGG TTG GTA ATG TTC GTC GTG ACG GGG AAA TGA GGC CTT TGC GGG ACA CTT  
 96▶ Met Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Phe Thr Pro Glu Thr Pro Cys Glu  
 2251 ACC CAG ACT ATC ACC TTC AAA AAT TTC AAA GAG AAT CTG AAG GAT TTT CTG TTT AAC  
 TGG GTC TGA TAG TGG AAG TTT TTA AAG TTT CTC TTA GAC TTC CTA AAA GAC AAA TTG  
 115▶ Thr Gln Thr Ile Thr Phe Lys Asn Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Phe Asn  
 2308 ATC CCC TTT GAC TGC TGG AAA CCA GTC AAG AAG TGA  
 TAG GGG AAA CTG ACG ACC TTT GGT CAG TTC TTC ACT  
 134▶ Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Lys Lys ...

圖 7



## 圖 8

1909 ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT TTC CTG GGC ACT GTG GTC TGC AGC ATC TCT GCA CCC  
 TAC ACC GAC GTC TTG GAC GAA AAG GAC CCG TGA CAC CAG ACG TCG TAG AGA CGT GGG  
 1▶ Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Thr Val Val Cys Ser Ile Ser Ala Pro

1966 ACC AGT TCA CCC AGC TCT GTC ACT CGG CCC TGG CAA CAC GTG GAT GCC ATC AAG GAG  
 TGG TCA AGT GGG TCG AGA CAG TGA GCC GGG ACC GTT GTG CAC CTA CGG TAG TTC CTC  
 20▶ Thr Ser Ser Pro Ser Ser Val Thr Arg Pro Trp Gln His Val Asp Ala Ile Lys Glu

2023 GCT CTG AGC CTT CTG AAC AAC AGT AGT GAA ATA ACT GCT GTG ATG AAT GAA GCA GTA  
 CGA GAC TCG GAA GAC TTG TTG TCA TCA CTT TAT TGA CGA CAC TAC TTA CTT CGT CAT  
 39▶ Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Ser Glu Ile Thr Ala Val Met Asn Glu Ala Val

2080 GAA GTC GTC TCT GAA ATG TTT GAC CCT GAG GAG CCG AAA TGC CTG CAG ACT CAC CTA  
 CTT CAG CAG AGA CTT TAC AAA CTG GGA CTC CTC GGC TTT ACG GAC GTC TGA GTG GAT  
 58▶ Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp Pro Glu Glu Pro Lys Cys Leu Gln Thr His Leu

2137 AAG CTG TAC GAG CAG GGC CTA CGG GGC AGC CTC ATC AGC CTC AAG GAG CCT CTG AGG  
 TTC GAC ATG CTC GTC CCG GAT GCC CCG TCG GAG TAG TCG GAG TTC CTC GGA GAC TCC  
 77▶ Lys Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Ile Ser Leu Lys Glu Pro Leu Arg

2194 ATG ATG GCC AAC CAT TAC AAG CAG CAC TGC CCC CTT ACT CCG GAA ACG CCC TGT GAA  
 TAC TAC CGG TTG GTA ATG TTC GTC GTG ACG GGG GAA TGA GGC CTT TGC GGG ACA CTT  
 96▶ Met Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Leu Thr Pro Glu Thr Pro Cys Glu

2251 ACC CAG ACT ATC ACC TTC AAA AAT TTC AAA GAG AAT CTG AAG GAT TTT CTG TTT AAC  
 TGG GTC TGA TAG TGG AAG TTT TTA AAG TTT CTC TTA GAC TTC CTA AAA GAC AAA TTG  
 115▶ Thr Gln Thr Ile Thr Phe Lys Asn Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Phe Asn

2308 ATC CCC TTT GAC TGC TGG AAA CCA GTC AAG AAG TGA  
 TAG GGG AAA CTG ACG ACC TTT GGT CAG TTC TTC ACT  
 134▶ Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Lys Lys ...

圖9

分離株/血清	SrA2	SrF1	SrG1	SrH3-2	SrG3	rF303	SrH1-4	Sr388b	Sr431	Sr337	SrJ5	SrRM11	SrRM12	SrRM13	SrRM15	SrRM16	SrRM17	SrRM19	SrZ55	SrF9
A2 (FR)	3.5	0.8	2.5	1.2	1.0	1.8	1.3	0.7	0.8	1.1	0.9	0.7	0.7	0.7	2.0	1.2	0.7	1.7	1.2	1.8
F1 (FR)	1.2	3.0	2.2	1.9	0.9	1.1	1.0	1.9	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0
G1 (FR)	1.6	0.8	2.9	1.2	1.0	1.7	0.7	0.9	2.6	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	1.3	1.1
H3-2 (FR)	0.7	0.7	0.7	2.8	0.7	0.7	0.9	0.8	1.3	0.7	1.1	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
G3 (FR)	1.0	1.1	2.4	1.7	3.5	1.6	1.3	0.9	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7
F3031 (FR)	2.4	1.5	2.0	1.7	1.2	3.8	1.1	1.2	2.0	0.7	1.2	0.8	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	1.2	1.1	2.0
H1-4 (FR)	0.7	0.7	1.1	1.2	0.7	0.7	3.2	0.7	1.3	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7
388b (UK)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	3.3	2.1	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
431 (UK)	0.7	0.7	0.9	0.7	0.7	0.8	0.8	1.3	3.5	1.0	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7
337 (UK)	1.0	0.7	1.1	0.7	0.7	0.9	1.1	1.2	2.2	3.2	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.9	0.7
J5 (UK)	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	1.1	0.8	1.6	0.7	3.3	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
RM11 (US)	0.7	0.7	1.0	1.2	0.7	0.7	0.7	1.1	1.6	0.7	1.0	2.7	0.7	0.7	0.7	1.0	1.3	0.7	0.7	0.7
RM12 (US)	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	0.7	1.3	0.7	2.3	0.7	0.7	1.3	1.3	1.8	0.7	0.7
RM13 (US)	0.7	0.7	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	1.3	1.5	1.8	1.0	2.6	2.2	3.1	2.0	1.3	1.8	1.2	0.7	0.7
RM15 (US)	1.2	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	1.5	1.9	0.7	0.9	0.8	0.7	0.7	2.4	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7
RM16 (US)	1.2	0.7	1.2	0.7	0.7	1.3	0.7	0.7	1.0	0.7	1.4	1.1	1.2	0.7	0.7	2.5	0.7	2.5	0.7	0.7
RM17 (US)	1.1	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	1.3	0.7	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	3.0	0.7	0.7	0.7
RM19 (US)	1.1	0.7	1.2	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	2.5	0.7	2.4	0.7	0.7