

(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2004-512826

(P2004-512826A)

(43) 公表日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 39/27	A 6 1 K 39/27	2 G O 4 5
A 6 1 P 31/22	A 6 1 P 31/22	4 B O 2 4
C 1 2 N 7/00	C 1 2 N 7/00	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B O 6 5
		A
		4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-515303 (P2002-515303)	(71) 出願人	594063278
(86) (22) 出願日	平成13年7月27日 (2001.7.27)		リサーチ コーポレーション テクノロジ
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月27日 (2003.1.27)		ーズ, インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/023612		Research Corporation
(87) 国際公開番号	W02002/009750		n Technologies, Inc
(87) 国際公開日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		.
(31) 優先権主張番号	09/626, 748		アメリカ合衆国 アリゾナ 85711-
(32) 優先日	平成12年7月27日 (2000.7.27)		3335, トゥーソン, スイート 600
(33) 優先権主張国	米国 (US)		, ノース ウィルモット ロード 101
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,	(74) 代理人	100083806
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, JP, MX, NZ			弁理士 三好 秀和
		(74) 代理人	100068342
			弁理士 三好 保男
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウマヘルペスウイルス1型に対するワクチン：前初期遺伝子内に変異を有するウイルス

## (57) 【要約】

本発明は、変異ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) 分離株に関し、特に、ウイルスゲノムの前初期 (IE) 遺伝子に変異を有する EHV-1 分離株に関する。EHV-1 変異株のパネルについて記載されている。好適な EHV-1 分離株は、複製能を有し、かつ非病原性の分離株である。本発明に係る変異 EHV-1 分離株は、ウマの EHV-1 感染症を予防及び治療するためのワクチン組成物を調製する上で有用である。さらに、本発明は、本発明に係る非病原性 EHV-1 分離株で予め免疫されたウマ被験個体に存在する EHV-1 分離株の病原性を判定する方法も提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

表 1 から選択される変異を含む EHV - 1 分離株。

## 【請求項 2】

EHV - 1 分離株が、Ky A、Ky D、Ab 1、Ab 4、Rac L 1 1、Rac M、または Rac H から選択された株である、請求項 1 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 3】

Ky A SRT 1、Ky A SRT 2、Ky Ad 1 7 8 / 6 2 7、Ky A 5 5 2 / 8 9 7、Ky A 6 4 4 / 8 2 4、Ky An 6 2 7、Ky An 9 5 1、Ky An 1 0 2 9、Ky An 1 4 1 1、Ky Ain 6 2 8、Ky Ain 1 4 1 1、Ky AD 2 0 N、Ky AD 2 4 N、Ky AL 1 2 P、Kyn L 1 2 E、Ky AF 1 5 D、及び Ky AE 3 4 Q からなる群より選択される EHV - 1 分離株。 10

## 【請求項 4】

IE 遺伝子に変異を含む、複製能を有する EHV - 1 分離株。

## 【請求項 5】

変異が、アミノ酸番号 1 ~ 8 9、1 8 1 ~ 2 2 0、4 2 2 ~ 5 9 7、または 9 6 3 ~ 9 7 0 の中でのアミノ酸残基の置換である、請求項 4 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 6】

置換が、D 2 0 N、D 2 4 N、L 1 2 E、F 1 5 D、または E 3 4 Q から選択される、請求項 5 に記載の EHV - 1 分離株。 20

## 【請求項 7】

変異が、アミノ酸番号 9 0 ~ 1 8 0、2 2 1 ~ 4 2 1、5 9 8 ~ 9 6 2、または 9 6 3 ~ 1 4 8 7 の中における約 3 以上のアミノ酸残基の欠失または挿入である、請求項 4 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 8】

変異が、d 6 4 4 / 8 2 4、n 6 2 7、n 1 0 2 9、n 1 4 1 1、i n 6 2 8、または i n 1 4 1 1 から選択される、請求項 7 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 9】

EHV - 1 分離株が非病原性である、請求項 4 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 10】

EHV - 1 分離株が、Ky A、Ky D、Ab 1、Ab 4、Rac L 1 1、Rac M、または Rac H から選択された株である、請求項 9 に記載の EHV - 1 分離株。 30

## 【請求項 11】

EHV - 1 分離株の IE 遺伝子における変異が、アミノ酸番号 1 ~ 8 9、1 8 1 ~ 2 2 0、4 2 2 ~ 5 9 7、または 9 6 3 ~ 9 7 0 の中でのアミノ酸残基の置換である、請求項 10 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 12】

変異が、D 2 0 N、D 2 4 N、L 1 2 E、F 1 5 D、または E 3 4 Q から選択される、請求項 11 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 13】

Ky AD 2 0 N、Ky AD 2 4 N、Ky AL 1 2 E、Ky AF 1 5 D、または Ky AE 3 4 Q から選択される、請求項 12 に記載の EHV - 1 分離株。 40

## 【請求項 14】

EHV - 1 分離株の IE 遺伝子における変異が、アミノ酸番号 9 0 ~ 1 8 0、2 2 1 ~ 4 2 1、5 9 8 ~ 9 6 2、または 9 6 3 ~ 1 4 8 7 の中における約 3 以上のアミノ酸残基の欠失または挿入である、請求項 10 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 15】

分離株が、d 6 4 4 / 8 2 4、n 6 2 7、n 1 0 2 9、n 1 4 1 1、i n 6 2 8、または i n 1 4 1 1 から選択される、請求項 14 に記載の EHV - 1 分離株。

## 【請求項 16】

K y A d 6 4 4 / 8 2 4、K y A n 6 2 7、K y A n 1 0 2 9、K y A n 1 4 1 1、K y A i n 6 2 8、またはK y A i n 1 4 1 1 から選択される、請求項 1 5 に記載の E H V - 1 分離株。

【請求項 1 7】

医薬適合性の担体、及び非病原性で複製能を有する E H V - 1 分離株を含む免疫原性組成物であって、該 E H V - 1 分離株が I E 遺伝子に変異を含むものである免疫原性組成物。

【請求項 1 8】

E H V - 1 分離株が、K y A、K y D、A b 1、A b 4、R a c L 1 1、R a c M、または R a c H から選択された非病原性株である、請求項 1 7 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 9】

分離株の I E 遺伝子における変異が、アミノ酸番号 1 ~ 8 9、1 8 1 ~ 2 2 0、4 2 2 ~ 5 9 7、または 9 6 3 ~ 9 7 0 の中でのアミノ酸残基の置換である、請求項 1 8 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 0】

変異が、D 2 0 N、D 2 4 N、L 1 2 E、F 1 5 D、または E 3 4 Q のうちのひとつである、請求項 1 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1】

E H V - 1 分離株が、K y A D 2 0 N、K y A D 2 4 N、K y n L 1 2 E、K y A F 1 5 D、または K y A E 3 4 Q から選択される、請求項 2 0 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 2】

分離株の I E 遺伝子における変異が、アミノ酸番号 9 0 ~ 1 8 0、2 2 1 ~ 4 2 1、5 9 8 ~ 9 6 2、または 9 6 3 ~ 1 4 8 7 の中における約 3 以上のアミノ酸残基の欠失または挿入である、請求項 1 8 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 3】

変異が、d 6 4 4 / 8 2 4、n 6 2 7、n 1 0 2 9、n 1 4 1 1、i n 6 2 8、または i n 1 4 1 1 から選択される、請求項 2 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4】

分離株が、K y A d 6 4 4 / 8 2 4、K y A n 6 2 7、K y A n 1 0 2 9、K y A n 1 4 1 1、K y A i n 6 2 8、または K y A i n 1 4 1 1 から選択される、請求項 2 3 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5】

ウマ被験個体において、E H V - 1 に対する免疫応答を促進する方法であって、該被験個体に有効量の非病原性で複製能を有する E H V - 1 分離株であって、I E 遺伝子に変異を含む E H V - 1 分離株を投与することを含む方法。

【請求項 2 6】

E H V - 1 分離株が、K y A、K y D、A b 1、A b 4、R a c L 1 1、R a c M、または R a c H から選択された非病原性株である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

分離株の I E 遺伝子における変異が、アミノ酸番号 1 ~ 8 9、1 8 1 ~ 2 2 0、4 2 2 ~ 5 9 7、または 9 6 3 ~ 9 7 0 の中でのアミノ酸残基の置換である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

変異が、D 2 0 N、D 2 4 N、L 1 2 E、F 1 5 D、または E 3 4 Q のうちのひとつである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

E H V - 1 分離株が、K y A D 2 0 N、K y A D 2 4 N、K y n L 1 2 E、K y A F 1 5 D、または K y A E 3 4 Q から選択される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

分離株の I E 遺伝子における変異が、アミノ酸番号 9 0 ~ 1 8 0、2 2 1 ~ 4 2 1、5 9 8 ~ 9 6 2、または 9 6 3 ~ 1 4 8 7 の中における約 3 以上のアミノ酸残基の欠失または

10

20

30

40

50

挿入である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

変異が、d644/824、n627、n1029、n1411、in628、またはin1411から選択される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

分離株が、KyAd644/824、KyAn627、KyAn1029、KyAn1411、KyAin628、またはKyAin1411から選択される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

免疫応答が、細胞媒介性免疫応答または体液性免疫応答である、請求項 25 に記載の方法 10

【請求項 34】

医薬適合性の担体、及び非病原性で複製能を有するEHV-1分離株を含むワクチン組成物であって、該EHV-1分離株がIE遺伝子に変異を含むものであるワクチン組成物。

【請求項 35】

EHV-1分離株が、KyA、KyD、Ab1、Ab4、RacL11、RacM、またはRacHから選択された非病原性株である、請求項 34 に記載のワクチン組成物。

【請求項 36】

分離株のIE遺伝子における変異が、アミノ酸番号1~89、181~220、422~597、または963~970の中でのアミノ酸残基の置換である、請求項 35 に記載の 20  
ワクチン組成物。

【請求項 37】

変異が、D20N、D24N、L12E、F15D、またはE34Qのうちの一つである、請求項 36 に記載のワクチン組成物。

【請求項 38】

EHV-1分離株が、KyAD20N、KyAD24N、KynL12E、KyAF15D、またはKyAE34Qから選択される、請求項 37 に記載のワクチン組成物。

【請求項 39】

分離株のIE遺伝子における変異が、アミノ酸番号90~180、221~421、598~962、または963~1487の中における約3以上のアミノ酸残基の欠失または 30  
挿入である、請求項 35 に記載のワクチン組成物。

【請求項 40】

変異が、d644/824、n627、n1029、n1411、in628、またはin1411から選択される、請求項 39 に記載のワクチン組成物。

【請求項 41】

分離株が、KyAd644/824、KyAn627、KyAn1029、KyAn1411、KyAin628、またはKyAin1411から選択される、請求項 40 に記載のワクチン組成物。

【請求項 42】

ウマ被験個体においてEHV-1感染を予防または阻害する方法であって、該被験個体に 40  
治療上有効な量の非病原性で複製能を有するEHV-1分離株であって、IE遺伝子に変異を含むEHV-1分離株を投与することを含む方法。

【請求項 43】

EHV-1分離株が、KyA、KyD、Ab1、Ab4、RacL11、RacM、またはRacHから選択された非病原性株である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

分離株のIE遺伝子における変異が、アミノ酸番号1~89、181~220、422~597、または963~970の中でのアミノ酸残基の置換である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

変異が、D 2 0 N、D 2 4 N、L 1 2 E、F 1 5 D、またはE 3 4 Qのうちの一つである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

E H V - 1 分離株が、K y A D 2 0 N、K y A D 2 4 N、K y n L 1 2 E、K y A F 1 5 D、またはK y A E 3 4 Q から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

分離株の I E 遺伝子における変異が、アミノ酸番号 9 0 ~ 1 8 0、2 2 1 ~ 4 2 1、5 9 8 ~ 9 6 2、または 9 6 3 ~ 1 4 8 7 の中における約 3 以上のアミノ酸残基の欠失または挿入である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 8】

変異が、d 6 4 4 / 8 2 4、n 6 2 7、n 1 0 2 9、n 1 4 1 1、i n 6 2 8、または i n 1 4 1 1 から選択される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

分離株が、K y A d 6 4 4 / 8 2 4、K y A n 6 2 7、K y A n 1 0 2 9、K y A n 1 4 1 1、K y A i n 6 2 8、またはK y A i n 1 4 1 1 から選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

非病原性 E H V - 1 分離株を予め投与されたウマ被験個体に存在する E H V - 1 ウイルスの非病原性を判定する方法であって、該 E H V - 1 分離株が I E 遺伝子に変異を含み、該方法が、該ウイルスを該被験個体から分離すること、該ウイルスの中に該非病原性分離株の変異 I E タンパク質が存在し、野生型 I E タンパク質が存在しないことを検出し、それによって、該ウイルスが非病原性であると判定することを含む方法。

【請求項 5 1】

変異 I E タンパク質が、S D S - P A G E 上で、野生型 I E タンパク質の移動度とは異なる移動度をもつ、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

変異 I E タンパク質が、アミノ酸残基の欠失または挿入を含み、I E タンパク質の検出が、欠失または挿入が起きたアミノ酸残基に特異的な抗体に基づいている請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

非病原性 E H V - 1 分離株を予め投与されたウマ被験個体に存在する E H V - 1 ウイルスの非病原性を判定する方法であって、該 E H V - 1 分離株が I E 遺伝子に欠失を含み、該方法が、I E タンパク質の欠失部位に特異的な抗体が、該被験個体の血清に存在しないことを検出し、それによって、該ウイルスが非病原性であると判定することを含む方法。

【請求項 5 4】

非病原性 E H V - 1 分離株を予め投与されたウマ被験個体に存在する E H V - 1 ウイルスの非病原性を判定する方法であって、該 E H V - 1 分離株が I E 遺伝子に変異を含み、該方法が、該ウイルスを該被験個体から分離すること、野生型 I E の塩基配列が存在しないこと、及び変異 I E の塩基配列が存在すること検出し、それによって、該ウイルスが非病原性であると判定することを含む方法。

【請求項 5 5】

非病原性 E H V - 1 分離株を予め投与されたウマ被験個体に存在する E H V - 1 ウイルスの非病原性を判定する方法であって、該 E H V - 1 分離株が I E 遺伝子に変異を含み、該方法が、該ウイルスを該被験個体から分離すること、該ウイルスの温度感受性が、非病原性 E H V - 1 分離株の温度感受性と同じであると判定し、それによって、該ウイルスが非病原性であると判定することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、変異ウマヘルペスウイルス 1 型 ( E H V - 1 ) の分離株、特に、ウイルスゲノムの前初期 ( I E ) 遺伝子のみに変異を有する E H V - 1 分離株に関する。さらに、本発

10

20

30

40

50

明は、ワクチン組成物、及びEHV-1感染症の治療法に関する。EHV-1ウイルスの病原性を判定する方法も提供する。

【0002】

ウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)は、ウマの主要な病原体である。感染動物では、通常、上気道感染症を伴うが、神経後遺症をもたらすこともある。妊娠した雌ウマがEHV-1に感染すると流産性疾患を引き起こすため、世界中のウマ産業に重大な経済的打撃を与える。

【0003】

ウマは、ウマヘルペスウイルスの自然宿主であるが、さまざまな動物や組織培養系を用いて、このウイルスを増殖させることができる。EHV-1の実験動物には、ゴールデン・ハムスター、ベビー・ハムスター、ニワトリ胚、生まれたばかり又は成長したマウス、仔ネコなどがある。EHV-1を増殖させるために使用される初代組織培養系には、胎仔の肺、真皮、脾臓及び腎臓など、さまざまなウマ組織由来の細胞や、飼育用のネコ、イヌ、ハムスター、ウサギ、マウス、ヒツジ、及びブタに由来する細胞などがある。研究室において、EHV-1を培養するために広く用いられている永久培養系には、HeLa細胞、Verocell細胞、CV-1細胞、ウサギ腎(RK)細胞、マウスL-M細胞、及びウマEdmin337細胞などがある。

10

【0004】

ウマの呼吸器へのEHV-1の自然感染は、短期間の体液性反応をもたらすだけで、その後の感染に対する長期間の防御をもたらすことはない。EHV-1感染症を治療するためのワクチンが数多く開発されているが、その中には、主にEHV-1及びEHV-4の両者を含む不活化ワクチン(Pneumabort K(商標)、Resequin(商標)、Prestige(商標)、またはDuvaxyn(商標))、改変生ワクチン(Rhinomune(商標)またはPrevaccionol(商標))、及びサブユニットワクチン(Cavalon IR(商標))がある。

20

【0005】

しかしながら、EHVワクチンには、望ましくない副作用をもたらすものがあり、また、それらの殆どは、許容できるほどの防御レベルに達していない。EHV-1感染症に対する安全かつ有効なワクチンに対する需要がある。

【0006】

本発明は、ウイルスゲノムの前初期(IE)遺伝子に一個以上の変異を有するEHV-1分離株を目的とする。

30

【0007】

特に、本発明は、ウイルスゲノムのIE遺伝子に、表1に列挙した一個以上の変異を有するEHV-1分離株を提供する。

【0008】

好ましい実施形態において、本発明は、複製能をもつEHV-1分離株であって、IE遺伝子に一個以上の変異を有する分離株を提供する。

【0009】

特に、IE遺伝子における変異は、IEタンパク質の4つのドメインであって、ウイルス複製に必須のドメインTAD(1~89番アミノ酸(aa))、SRT(aa181~220)、DBD(aa422~597)、及びNLS(aa963~970)のいずれの構造及び/または機能を大きく阻害することはない。

40

【0010】

この実施形態において、本発明は、複製能をもつEHV-1分離株であって、TAD、SRT、DBD、またはNLSの中のアミノ酸残基が置換されているIE遺伝子変異をもつ分離株を提供する。好ましくは、この置換は、交換基グループ内、すなわち、タンパク質の構造に与える全体的な影響に関して類似したアミノ酸の間でアミノ酸を交換することを含む。より好ましくは、この置換は、D24N、D20N、F15D、L12E、またはE34Qである。

50

## 【0011】

特に好ましい変異は、90～180番目、221～421番目、598～962番目、または971～1487番目のアミノ酸の範囲内において、1個または2個、好ましくは3個以上、より好ましくは5個以上のアミノ酸残基の挿入または欠失を含む。最も好適な変異は、d644/824(644～824番アミノ酸の欠失)、n1029(1029番アミノ酸におけるナンセンス変異及び1030～1487番アミノ酸の欠失)、n1411(1411番アミノ酸におけるナンセンス変異及び1411～1487番アミノ酸の欠失)、in628(1411番アミノ酸における挿入)、及びin1411(1411番アミノ酸における挿入)などである。

## 【0012】

好ましい実施形態において、本発明は、IE遺伝子に一個以上の変異をもち、複製能を有するEHV-1分離株であって、本明細書において「非病原性」EHV-1分離株とも称される、病原力が低下しているか、病原力をもたない分離株を提供する。

## 【0013】

非病原性であって複製能を有するEHV-1分離株は、KyA、KyD、Ab4、Ab1、RacL11、RacH、及びRacMなどのEHV-1株であって、一個以上の変異がウイルスゲノムのIE遺伝子の中に導入されているEHV-1分離株であろう。好適な変異EHV-1分離株はKyA変異株である。

## 【0014】

さらに、本発明は、本明細書に記載された非病原性であって複製能を有する変異EHV-1分離株を一種類以上含む免疫原性組成物を目的としている。

## 【0015】

さらに、本発明は、本発明に係る免疫原性組成物を被験ウマに投与することによって、該ウマにおいてEHV-1に対する免疫反応を促進する方法を提供する。

## 【0016】

さらに、本発明は、本明細書に記載された非病原性であって複製能を有する変異EHV-1分離株を一種類以上含む弱毒化生ワクチン組成物を目的としている。

## 【0017】

さらに、本発明は、本発明に係る非病原性で複製能を有する変異EHV-1分離株を治療上有効な量、ウマ被験個体に投与することによって、該ウマにおけるEHV-1感染症を治療する方法も提供する。

## 【0018】

さらに、本発明は、本発明に係る非病原性EHV-1分離株を以前ワクチン接種した被験動物に存在するEHV-1分離株の病原性を判定する方法も提供する。この判定は、野生型EHV-1と、以前に被験動物に投与された非病原性EHV-1分離株とを区別するアッセイ法を行なって実施する。

## 【0019】

本発明の一側面は、ウイルスゲノムの前初期(IE)遺伝子に一個以上の変異を有する新規変異ウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)分離株を目的とするものである。

## 【0020】

EHV-1は、直鎖状の二本鎖DNAゲノムをもち、長短の独自配列(それぞれU<sub>S</sub>及びU<sub>L</sub>)と、短い独自配列に隣接する逆方向反復配列を特徴とする。EHV-1、Ab4株の全ゲノム配列を決定したところ、サイズが150,233bpであり、80個のオープンリーディングフレーム(ORF)が存在しうることが明らかになった。

## 【0021】

IE遺伝子は、EHV-1に唯一の前初期遺伝子で、ウイルスゲノムの逆方向反復配列の両方に存在している。IE遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)(配列番号:1)は、構造的にも抗原としても関連するタンパク質分子種を生じさせる6.0-kbにスプライシングされたmRNAへと転写される(Caugmanら、Virology 163:563-571, 1988)。1,487アミノ酸(配列番号:2)からなる

10

20

30

40

50

主なIEタンパク質分子種は、分散した機能ドメインからなる(図1)。強力な転写活性ドメイン(TAD)が、最初の89アミノ酸の中に位置している。セリンに富む領域(SRT; aa181~220)は、リン酸化部位を含んでいる可能性がある。DNA結合機能は、422~597番目のアミノ酸残基の中にある。963~970番目までのアミノ酸(NLS)は、タンパク質の核移行に必須である。

#### 【0022】

IEタンパク質は、培養細胞の中でウイルスを増殖させるのに必須であり、増殖性感染過程における初期遺伝子及び後期遺伝子が発現するに必要とされる(Smithら、J. Virol. 66:936-945, 1992)。IEポリペプチド合成後に、約45種類の初期転写物を検出することができる。これら初期タンパク質のうち3種類が調節タンパク質として働き、EICP22、EICP27、及びEICP0と名付けられている。初期遺伝子発現の後、約29種類の後期転写物が産生され、ウイルス複製が行なわれ、その後、成熟ウイルス粒子が生成される。

10

#### 【0023】

ここで、「変異」という用語は、IEタンパク質の一個以上のアミノ酸残基の置換、欠失、または挿入をもたらす、IEをコードする配列の一塩基対以上の置換、欠失、または挿入を含む。

#### 【0024】

本発明によって、IE遺伝子に変異を有するEHV-1分離株を、本明細書で提供されている組換え系によって作出することができる。このような系に基づいて、例えば、分子クローニングの最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Cloning)(Ausubelら、ニューヨーク、ジョンワイリー・アンド・サンズ社(John Wiley & Sons, New York))に記載されている多種多様な組換えクローニング技術のいずれかを用いて、IE遺伝子に変異を生じさせることができる。そして、一個以上の変異をもつ変異IEの塩基配列を、形質移入するのに適した組換えベクター上に配置し、例えば、RK-13細胞など、適当な宿主細胞に形質移入する。そして、形質移入された宿主細胞にIE遺伝子を欠失した無発現EHV-1ウイルスを感染させる。このようにして、無発現ウイルスのゲノムと、変異IE遺伝子を含む組換えベクターとの間における相対的組換えにより、変異ウイルスを作出する。この組換え系において使用する無発現EHV-1ウイルスは、例えば、KyA、KyD、Ab4、Ab1、RacL11、RacH、及びRacMなどのEHV-1株を用いて作出することができる。EHV-1のKyA株を、2000年7月20日にバージニア州20110-2209、マナッサス、ユニバーシティBlvd. 10801(10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)にあるアメリカン・ティシュー・タイプ・カルチャー(American Tissue Type Culture)に寄託した(ATCC寄託番号PTA-2253)。KyA株の無発現ウイルス、すなわちKyA IEは、Garko-Buczynskiら、(Virology 248:83-94, 1998)に記載された通りにして作成されている。この組換え系によって、IE遺伝子の2つのコピーに同一または異なる変異を有する変異EHV-1分離株を作出することもできる。好ましくは、本発明に係る変異EHV-1分離株は、ウイルスゲノムのIE遺伝子の2つのコピーに同一の変異を有する。

20

30

40

#### 【0025】

本発明の一実施形態は、ウイルスゲノムのIE遺伝子中に、表1に記載した変異を少なくとも一つもつEHV-1分離株を提供する。

#### 【0026】

#### 【表1】

欠失変異	変異の性質	影響を受けるドメイン
△SRT1	aa181-250欠失	SRTの欠失
△SRT2	aa88-243欠失	SRTの欠失
d178/627	aa178から627欠失	SRT及びDBDの欠失
d552/897	aa552から897欠失	DBDの一部欠失
d644/824	aa644から824欠失	
ナンセンス変異		
n627	aa628-1487欠失	NLS及びC末端の欠失
n951	aa952-1487欠失	NLS及びC末端の欠失
n1029	aa1030-1487欠失	C末端の欠失
n1411	aa1412-1487欠失	C末端の欠失
挿入変異		
in628	aa628における挿入	
in1411	aa1411における挿入	
点変異：アミノ酸置換		
D24N	Asp24からAsn	TADにおける点変異
D20N	Asp20からAsn	TADにおける点変異
F15D	Phe15からAsp	TADにおける点変異
L12P	Leu12からPro	TADにおける点変異
L12E	Leu12からGlu	TADにおける点変異
E34Q	Glu34からGln	TADにおける点変異

10

20

30

好ましい実施形態において、本発明は、複製能を有する変異EHV-1分離株を提供する。

【0027】

ここで「複製能」という用語は、宿主細胞において、トランス(*in trans*)に発現された補完IEタンパク質の不在下でウイルス分離株が増殖できることを意味する。

【0028】

本発明に従い、例えば、非補完細胞(IEタンパク質を発現しない細胞)を用いたブランクアッセイ法など、いくつかのアッセイ法によって変異ウイルス分離株の複製能を判定することができる。このアッセイ法では、単層となった細胞に、目的とする変異分離株を感染させた後、2%アガロースを適当な増殖培地と1:1の割合で混合したもので覆う。この目的に用いることのできる宿主細胞は、さまざまなウマ組織、例えば、胎仔の肺、真皮、脾臓、腎臓などに由来する細胞、また、飼育用のネコ、イヌ、ハムスター、ウサギ、マウス、ヒツジ、ブタなどに由来する細胞などである。一般的には、HeLa細胞、Verob細胞、CV-1細胞、ウサギ腎(RK)細胞、マウスL-M細胞、及びウマEdmin337細胞など、通常、組織培養でEHV-1を培養するために用いられている細胞が使用される。好ましくは、本アッセイ法においてはRK-13細胞が使用される。

40

【0029】

変異ウイルス分離株が非補完細胞上でブランクを形成することができれば、たとえ、その

50

ブランクが、野生型EHV-1が形成するブランクよりも小さいものであっても、そのような細胞は「複製能を有する」。複製能をもたない細胞は、例えば、IE13.1細胞のように、IEタンパク質をトランスで発現している補完細胞の中でブランクを形成できるにすぎない。

**【0030】**

本発明によれば、IEタンパク質の4つのドメイン、すなわち、TAD(aa1~89)、SRT(aa181~220)、DBD(aa422~597)、及びNLS(aa963~970)がウイルス複製には必須である。従って、これら4つのドメインの構造及び/または機能を有意に阻害するIE遺伝子変異は、複製能を持たないウイルス分離株を生じさせる可能性が高い。例えば、IEタンパク質のこれら4つのドメインのいずれかで5個以上のアミノ酸残基を連続して欠失させると、そのドメインの機能を破壊する可能性が高く、その結果生じた変異ウイルスは複製能を持たない可能性が高い。しかし、一個以上のアミノ酸残基を、サイズ及び/または疎水性が同じような残基に置換した場合には、それぞれのドメインの構造及び/または機能を破壊する程度は少なくなり、その結果生じた変異ウイルスは、依然複製能を有するものであろう。

10

**【0031】**

したがって、本発明の一実施形態は、IE遺伝子に一個以上の変異を有する、複製能をもつEHV-1分離株であって、該変異が、TAD(aa1~89)、SRT(aa181~220)、DBD(aa422~597)、またはNLS(aa963~970)の内部のいずれかにある残基における置換であり、また、該変異によって、ウイルス複製におけるIEタンパク質の機能が実質的に破壊されていない分離株を提供する。

20

**【0032】**

特定の公式には限定されないが、本発明に係る好適な置換は、一つの交換基グループ内のアミノ酸同士、すなわち、タンパク質構造に対する全体的な影響が互いに似ているアミノ酸同士の置換であろう。例えば、芳香族のPhe、Tyr及びTrpは一つの交換基グループを形成し、正に荷電した残基Lys、Arg及びHisも、一つの交換基グループを形成し、大きな脂肪族非極性残基であるVal、Leu、及びIleが、僅かに極性を帯びるMet及びCysも包含する一つの交換基グループを形成する。その他の低分子残基Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Alaは、Glu、Gln、及びProとともにすべて一つの交換基グループに含まれる。

30

**【0033】**

より好ましくは、置換は、D24N、D20N、F15D、L12E、またはE34Qである。さらに好ましくは、これらの置換を一つ以上もつ変異EHV-1分離株は、KyA、KyD、Ab1、Ab4、RacL11、RacM、またはRacHから選択された株である。特に好適な変異EHV-1分離株は、KyAD24N、KyAD20N、KyAF15D、KyAL12E、及びKyAE34Qである。

**【0034】**

本発明の別の好ましい実施形態において、複製能を有する変異EHV-1分離株は、上記の4つのドメイン外に位置する変異であって、TAD(aa1-89)、SRT(aa181-220)、DBD(aa422-597)、及びNLS(aa963-970)ドメインのいずれの中にも置換、欠失、または挿入を生じさせない変異を持つ。

40

**【0035】**

特に好適な変異は、アミノ酸番号90~180、221~421、598~962、または971~1487の領域内のアミノ酸残基一個以上、好ましくは3個以上、より好ましくは5個以上の挿入または欠失などである。

**【0036】**

最も好適な変異は、d644/824(644~824番アミノ酸の欠失)、n1029(1029番アミノ酸におけるナンセンス変異及び1030~1487番アミノ酸の欠失)、n1411(1411番アミノ酸におけるナンセンス変異、従って1411~1487番アミノ酸の欠失)、in628(1411番アミノ酸における挿入)、及びin14

50

11(1411番アミノ酸における挿入)などである。これらの変異を一つ以上もつ変異EHV-1分離株は、好ましくは、KyA、KyD、Ab1、Ab4、RacL11、RacM、またはRacHから選択された株である。

【0037】

好ましい実施形態において、本発明は、病原性が低下しているか、非病原性であり、複製能を有する変異EHV-1分離株であって、本明細書において「非病原性」EHV-1分離株または「弱毒化」EHV-1分離株と称される分離株を提供する。

【0038】

ここで「病原力」または「病原性」という用語は、ウマにおいて、例えば、気道感染症、自然流産、また、神経疾患などのEHV-1関連疾患を惹き起こすEHV-1株の能力を意味する。病原性EHV-1が原因となる感染症は、一般的に、発熱、大量の鼻水、及び鼻粘膜のうっ血という特徴をもつ。したがって、ここで、EHV-1の「非病原性」または「弱毒化」株、または、「病原力が低下した」EHV-1株とは、病原性のEHV-1に較べて、EHV-1関連臨床疾患の発生を惹起する能力が実質的に低下している株のことである。

【0039】

本発明によれば、EHV-1分離株の病原性は、マウスモデルで適宜判定することができる。マウスにおけるEHV-1感染症の臨床症状には、例えば、Collera、Virus Res. 43:111-124(1996)、及びZhangら、Virus Res. 56:11-24(1998)に記載されているように、例えば、毛の逆立ち、体重減少、強制呼吸、嗜眠、及び群居などがある。また、下記の実施例に記載されているように、感染マウスの肺からウイルスを分離し、そのウイルスをRK-13細胞の単層上で培養し、形成されたプラーク数を測定することによって、感染症の程度を測定することもできる。

【0040】

本発明に係る非病原性変異EHV-1分離株は、本明細書に記載した組換え系によって、変異IE遺伝子を非病原性EHV-1株の無発現ウイルスに導入することによって作成することができる。このような天然の非病原性EHV-1株、または、実験処理によって非病原性にしたEHV-1株のいずれかを用いて、例えば、KyA、KyD、Ab4、Ab1、RacL11、RacH、及びRacMなどの無発現ウイルスを作出することができる。これら非病原性EHV-1株の無発現ウイルスは、例えば、Garko-Buczynskiら、(Virology 248:83-94, 1998)に記載された手順に従って作出することができる。

【0041】

本発明に係る変異株を作出するときに使用するのに適したEHV-1株はEHV-1のKyA株であり、その寄託は、2000年7月20日にバージニア州20110-2209、マナッサス、ユニバーシティBlvd. 10801(10801University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)にあるアメリカン・ティッシュ・タイプ・カルチャー(American Tissue Type Culture)に行われている(ATCC寄託番号PTA-2253)。

【0042】

したがって、本発明に係る、好適な非病原性で複製能を有する変異EHV-1分離株は、IE遺伝子に一個以上の変異を有するKyA分離株であって、その変異が、TAD(aa1-89)、SRT(aa181-220)、DBD(aa422-597)、またはNLS(aa963-970)の内部のいずれかの残基の置換であって、その変異が、ウイルス複製におけるIEタンパク質の機能を実質的に破壊することのないKyA分離株である。このような変異EHV-1分離株の例は、KyAD24N、KyAD20N、KyAF15D、KyAL12E、及びKyAE34Qである。

【0043】

本発明に係る、別の好適な非病原性で複製能を有する変異EHV-1分離株は、IE遺伝

10

20

30

40

50

子に一個以上の変異を有するKyA分離株であって、その変異が、上記の4つのドメイン外に位置する変異であって、TAD (aa1-89)、SRT (aa181-220)、DBD (aa422-597)、及びNLS (aa963-970)ドメインのいずれの中にも置換、欠失、または挿入を生じさせない変異をもつKyA分離株である。このような変異EHV-1分離株の例は、KyAd644/824、KyAn1029、KyAn1411、KyAin628、及びKyAin1411などである。

【0044】

さらなる本発明の側面において、本明細書において上記したような、本発明に係る、非病原性で複製能を有する変異EHV-1分離株は、免疫原性組成物に含まれる。

【0045】

「免疫原性」とは、主に細胞傷害性T細胞によってもたらされる細胞性免疫応答、または、抗体産生をもたらすB細胞を順次活性化するヘルパーT細胞によって主に媒介される体液性免疫応答のいずれかの免疫応答をウマ被験個体において誘発するEHV-1分離株の能力を意味する。

【0046】

本発明に係る免疫原性組成物は、少なくとも一種類の、すなわち一種類以上の上記した非病原性で複製能を有する変異EHV-1分離株を含む。免疫原性組成物に含まれるべき好適な変異EHV-1分離株には、例えば、IE遺伝子中にD24N、D20N、F15D、L12E、またはE34Qの一個以上の変異を有するEHV-1分離株、または、IEタンパク質のアミノ酸番号90~180、221~421、598~962、または971~1487の中に一個以上の変異を有するEHV-1分離株などがある。好ましくは、本発明に係る免疫原性組成物において使用される変異EHV-1分離株は、KyA、KyD、Ab4、Ab1、RacL11、RacH、及びRacMなどの非病原性EHV-1株である。免疫原性組成物において使用される特に好適な変異EHV-1分離株は、KyAD24N、KyAD20N、KyAF15D、KyAL12E、KyAE34Q、KyAd644/824、KyAn1411、及びKyAin1411などである。

【0047】

また、本発明に係る免疫原性組成物は、例えば、米国特許第5,707,629号に記載された免疫原性組成物(「ウマヘルペスウイルス1型に対する免疫原性組成物」)、及び米国特許第5,795,578号に記載された免疫原性組成物(「ウマヘルペスウイルス1型に対するワクチン」)、またはEHV-4に対する他の免疫原性組成物など、EHV-1に対する他の免疫原性組成物などの付加的な有効成分を含むこともできる。

【0048】

さらに、本発明に係る免疫原性組成物は、一種類以上の医薬適合性の担体を含むこともできる。

【0049】

ここで「医薬適合性の担体」には、溶媒、分散媒、被覆剤、アジュバント、ワクチン安定化剤、抗細菌剤及び抗菌剤、砂糖及び塩化ナトリウムなどの等張剤、吸収遅延剤などのいずれかまたはすべてがある。このような媒質及び薬剤を薬学的有効物質として使用することは当技術分野においてよく知られている。通常の媒質または薬剤が有効成分と非親和的である場合以外は、これらを免疫原性組成物において使用することが考えられる。補助的な有効成分も、該組成物の中に取り込むことができる。

【0050】

本発明に係る免疫原性組成物は、例えば、滅菌水溶液または分散液の状態など、注射に用いるのに適した状態にすることができ、または、真空乾燥及び凍結乾燥の技術を用いて、凍結乾燥状態にすることもできる。凍結乾燥させたワクチン組成物は、一般的には、約4で保持され、例えば、アジュバントを含むか含まない生理食塩水及び/またはHEPESなどの安定化溶液の中で再構成させることができる。すべての場合において、免疫原性組成物は滅菌状態になければならない。

【0051】

10

20

30

40

50

本発明に係る免疫原性組成物は、ウマに投与して、EHV-1に対する免疫応答を誘導することができる。したがって、本発明の別の実施形態は、上記した本発明に係る免疫原性組成物のいずれかを有効量投与することによって、ウマ被験個体において、EHV-1に対する免疫応答を促進する方法を提供する。

#### 【0052】

免疫応答を誘導するのに「有効」となる、投与すべき免疫原性組成物の量は、該免疫原性組成物に使用されるそれぞれのEHV-1分離株の免疫原性によって異なる可能性がある。本発明によれば、EHV-1分離株の免疫原性、すなわち、ウイルス分離株によって誘導される免疫応答の種類と程度は、ウマ被験個体の代わりとなるモデルとして一般的に認知されているマウスにおいて適宜測定することができる。さまざまな技術を、ウイルス分離株によってマウスの中で起きる免疫応答を解析するために用いることができる。例えば、当業者は、例えば、マウスの脾臓または他のリンパ性組織に応答するCTLが存在するか否かを検出することによって、あるウイルス分離株が細胞媒介性免疫応答を誘導するか否かを判定することができる。または、当業者は、例えば、血清中のEHV-1特異的抗体の中和力価、または血清における抗体分泌細胞の存在を検出することによって、あるウイルス分離株が、液性免疫応答を促進するか否かを容易に判定することができる。これらの技術は、例えば、Coliganら、「免疫学の最新プロトコール(Current Protocols in Immunology)」ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社(John Wiley & Sons Inc.)(1994)など、当技術分野において十分に記述されている。

10

20

#### 【0053】

免疫応答を引き起こすために、本発明に係る免疫原性組成物を、静脈、腹腔、筋肉内、もしくは粘膜内(例えば、点鼻または呼吸器用のスプレーまたは注射)という経路、または別の非経口投与方法によって、対象となるウマに投与することができる。また、免疫原性組成物は、インプラントまたは経口経路によって投与することもできる。

#### 【0054】

本発明の別の実施形態は、生の弱毒化ワクチン組成物を目的とする。

#### 【0055】

具体的には、本発明に係るワクチン組成物は、上記したような非病原性であって複製能を有する変異EHV-1分離株を一種類以上含む。

30

#### 【0056】

EHV-1の病原性株が細胞に感染すると、感染した対象の中で病原性ウイルス粒子が産生され、EHV-1関連疾患が生じる。これに対し、本発明に係る非病原性EHV-1株は、一般的に、病原力をもつまたは病原性のEHV-1株による感染に対して、対象個体を十分に防御できる程度まで複製する。

#### 【0057】

ここで「ワクチン」という用語は、感染リスクを防止または低下する組成物、または、感染症の症状を緩和する組成物を意味する。病原体に対するワクチン組成物の防御効果は、通常、対象個体において、細胞媒介性または体液性の免疫応答の一方または両方を含みうる免疫応答を刺激することによって発揮される。ワクチン組成物に含ませるEHV-1分離株の量を決定するときや、ワクチン接種計画を立てるときに、そのような分離株によって誘導される免疫応答の強さ及び存続期間を考慮することができる。一般的に言えば、EHV-1感染症の発生が消失または減少すること、症状の緩和、または、感染した被験個体からウイルスの消失が迅速になることは、ワクチン組成物の防御効果の指標となる。

40

#### 【0058】

好適な非病原性で複製能を有する変異EHV-1分離株であって、ワクチン組成物に使用することができる分離株は、例えば、IE遺伝子の中にD24N、D20N、F15D、L12E、またはE34Qを一つ以上有するEHV-1分離株などである。好ましくは、ワクチン組成物に使用される変異EHV-1分離株は、KyA、KyD、Ab4、Ab1、RacL11、RacH、及びRacMなどの非病原性EHV-1株である。ワクチン

50

組成物に使用される、特に好適なEHV-1分離株は、KyAD24N、KyAD20N、KyAF15D、KyAL12E、及びKyAE34Qを含む。

【0059】

他の好適な非病原性で複製能を有する変異EHV-1分離株であって、ワクチン組成物に使用することができる分離株は、IEタンパク質のアミノ酸番号90~180、221~421、598~962、または971~1487の範囲内に一個以上の変異、例えば、d644~824、n1411、及びin1411を有するEHV-1分離株などである。このワクチン組成物に使用することができる変異EHV-1分離株は、KyA、KyD、Ab4、Ab1、RacL11、RacH、及びRacMなどの非病原性EHV-1株である。ワクチン組成物に使用することができる、特に好適なEHV-1分離株は、KyAd644/824、KyAn1411、及びKyAin1411などである。

10

【0060】

また、本発明に係るワクチン組成物は、例えば、米国特許第5,707,629号に記載された免疫原性組成物(「ウマヘルペスウイルス1型に対する免疫原性組成物」)、及び米国特許第5,795,578号に記載された免疫原性組成物(「ウマヘルペスウイルス1型に対するワクチン」)、またはEHV-4に対する他の免疫原性組成物など、EHV-1に対する他の免疫原性組成物などの付加的な有効成分を含むこともできる。

【0061】

さらに、本発明に係るワクチン組成物は、上記した医薬適合性の担体を一種以上含むことができる。

20

【0062】

本発明に係るワクチン組成物は、例えば、滅菌水溶液または分散液の状態など、注射に用いるのに適した状態にすることができ、または、真空乾燥及び凍結乾燥の技術を用いて、凍結乾燥状態にすることもできる。凍結乾燥させたワクチン組成物は、一般的には、約4で保持され、例えば、アジュバントを含むか含まない生理食塩水及び/またはHEPESなどの安定化溶液の中で再構成させることができる。すべての場合において、ワクチン組成物は滅菌状態になければならない。

【0063】

本発明の別の実施形態において、上記本発明に係るワクチン組成物は、EHV-1感染症を治療するときに使用することができる。したがって、本発明は、本発明に係る非病原性EHV-1分離株を治療上有効な量、ウマ被験個体に投与することによって、ウマにおけるEHV-1感染症を治療する方法を提供する。

30

【0064】

「治療する」とは、EHV-1の病原性株による感染の危険を防止または低下させること、EHV-1感染症の症状を改善させること、または、EHV-1感染症からの回復を促進させることを意味する。

【0065】

治療上有効な非病原性EHV-1分離株の量は、分離株の性質、ウマの症状、及び/または感染の程度によって決めることができ、獣医師が決定することができる。

【0066】

本方法を実施する際に、本発明に係るワクチン組成物を、静脈、腹腔、筋肉内、もしくは粘膜内(例えば、点鼻または呼吸器用のスプレーまたは注射)という経路、または別の非経口投与方法によって、対象となるウマに投与することができる。また、ワクチン組成物は、インプラントまたは経口経路によって投与することもできる。追加免疫措置が必要になることもあり、また、投薬計画を調整して、最適な免疫を提供することもできる。交配させる前に雌ウマにワクチン接種し、妊娠中に再びワクチン接種すると、EHV-1が原因で起こる流産を防ぐことができる。または、別のウマには、例えば、年に約一回ワクチンを接種することもできる。仔ウマには、誕生後間もない時にワクチンを接種することができる。

40

【0067】

50

また、本発明に係る非病原性で複製能を有する変異EHV-1分離株は、ウマヘルペスウイルス4型(EHV-4)が原因で起こる感染症に対して免疫防御効果を示すこともある。したがって、EHV-4感染症を予防または阻害するために本発明に係る変異EHV-1分離株を免疫原性組成物またはワクチン組成物に使用することも、本発明が想定するところである。

【0068】

本発明に係るワクチン組成物は、それに含まれる非病原性EHV-1分離株が、通常、発現されるIEタンパク質の組成及びサイズに関して、または、温度に対する増殖感度に関して、野生型EHV-1株から識別可能であるという、さらなる特徴を有する。この特徴は、例えば、ある臨床試験において陽性であると検査された個体が、病原性EHV-1を

10

【0069】

従って、別の実施形態において、本発明は、事前に本発明に係る非病原性EHV-1分離株をワクチン接種した被験個体中に存在するEHV-1分離株の病原性を判定する方法を提供する。

【0070】

この方法は、野生型EHV-1と、その前に被験個体に投与された非病原性EHV-1分離株とを区別することを前提としているため、区別をつけるための測定法の選択は、非病原性EHV-1分離株の変異の性質によって決まる。

20

【0071】

事前に被験個体に投与された非病原性ウイルス分離株が、IE遺伝子に欠失を持つ場合、すなわち、d644/824、n1029、またはn1411をもつEHV-1である場合、IEタンパク質、または、IEタンパク質に対する血清中の抗体を検出する測定法を用いることができる。例えば、感染した細胞または組織を被験個体から分離することができる。そのような細胞または組織から細胞内抽出物を作成し、例えば、下記する実施例に記載されているようなウエスタンブロット解析を行なうことができる。低分子量のIEタンパク質が観察されれば、被験個体内に存在するEHV-1株の非病原性が示される。または、アミノ酸残基の欠失部位に特異的な抗体をウエスタンブロットで使用して、IEタンパク質のバンドが出現しなければ、被験個体内に存在するEHV-1株の非病原性が示

30

【0072】

以前ワクチン接種に用いられた非病原性ウイルス分離株が、野生型EHV-1に比べ、温度に対する感受性が異なっているとき、下記する実施例に記載されているような温度変化測定法を用いることもできる。例えば、このような測定法は、例えば、d644/824、n1029、n1411、in1411、D24N、L12E、F15D、またはE34QをもつEHV分離株、特に、n1029及びn1411をもつEHV分離株から野生

40

型EHV-1を区別するとき利用することができる。野生型KyAとは異なり、KyAn1411及びKyA1029は、39では増殖することができない。d644/824、in1411、D24N、L12E、F15D、またはE34QをもつKyAは、野生型KyAに較べると、増殖能力が劣っている。

病原性の判定は、被験個体から分離したウイルスのIE遺伝子における変異をスクリーニングするための、核酸を利用する測定法によって行うこともできる。これらの測定法には、サザンブロットまたはノザンブロット解析法、PCR、及び配列決定法などがある。

【0074】

IE遺伝子の変異によって、例えば、EICP0またはgDなど、別のEHV-1タンパ

50

ク質の発現低下がもたらされることがある。例えば、n1029は、EICP0とgD両方のmRNA量を有意に低下させる。この場合、このような別のタンパク質の発現低下を、mRNA量またはタンパク質量で検出することによって、被験個体内に存在するウイルスの非病原性が示される。

【0075】

上記測定法を改変したものも本発明に包含される。

【0076】

本発明を、以下の実施例によってさらに具体的に説明する。

【0077】

(実施例1)

材料と方法

マウスLM細胞を、0.12%メチルセルロース-12、100 $\mu$ g/mlストレプトマイシン、100U/mlペニシリン、及び5%ウシ胎児血清(FBS)を含むYELP培地(酵母抽出物、ラクトアルブミン加水分解物、ペプトンを添加したイーグルの最小必須培地[EMEM])による懸濁培養で増殖させた。

【0078】

ウサギ腎細胞(RK-13)を、100 $\mu$ g/mlストレプトマイシン、100U/mlペニシリン、非必須アミノ酸、及び5%FBSを添加した完全EMEMの中で維持した。Perdueら、Virology 59:201-216(1974)に記載されたようなブランクアッセイ法によって、感染性ウイルスを測定した。

【0079】

IE13.1細胞は、IEタンパク質をトランスで発現し、ウイルスゲノム上のIE遺伝子のコピーは、大腸菌(E.coli)由来のLacZによって置換されている。IE13.1細胞の作出法と特徴、及び、IEノックアウトウイルスKyA IEについては、Garko-Buczynskiら、Virology 248:83-94(1998)に記載されていた。

【0080】

(実施例2)

変異ウイルスの作出

プラスミド

KyA IEウイルスのゲノムと、プラスミドpBR322IEに由来するさまざまな組換えベクターとの相同組換えによって、変異ウイルスのパネルを作成するために、組換え系を確立した(図1~2)。

【0081】

最初の組換えベクターpBR322IEを作出するために、pBR322をEcoRV及びPvuIIで制限酵素消化し、得られた断片を再び連結させてプラスミドpBR322E/Pを作成した。IE遺伝子の塩基番号-215から+8140までのIEの全ORFを含む8.0-kbのNdeI断片(Grundyら、Virology 172:223-236, 1989)をpBR322E/Pに一つしかないNdeI部位にクロニングしてpBR322IEを得た。第二のベクターであるpIECassetteは、塩基番号-257から+1266までのIEのORFを含むEcoRV/BamHI断片を、pBR322のEcoRV/BamHI部位にクロニングして作出した。

【0082】

「ドメイン交換」法を用いて、ナンセンス変異、挿入変異、点変異、または欠失変異をもつ変異IE型を含む組換えプラスミドを作成した。組換えプラスミドpBR322n1411、pBR322d644/824、pBR322In628、及びpBR322n1029は、pBR322IEをBamHI及びPvuIIで制限酵素消化し、この断片を、Smithら、J.Virology 69:3857-3892(1995)に記載された変異体から得られた変異誘発されたBamHI-PvuII切断IE ORFの配列と置き換えて作成した。プラスミドpBR322d178/627及びpBR322d552

10

20

30

40

50

/ 897は、pBR322IEをNcoI及びPvuIIで制限酵素消化し、この断片を、Buczynskiら、Virus Res. 65:131-140(1995)、及びCaughmanら、J. Virol. 69:3024-3032(1995)に記載された変異体から得られた変異誘発されたNcoI-PvuII切断IE ORFの配列と置き換えて作成した。組換えプラスミドpBR322 SRT1は、pSVEIEをBspEIで制限酵素消化し(塩基番号1523~1733)、クレノウによってフィルイン(fill-in)して平滑末端を作出し、10重合体のEcoRIリンカーをインフレーム(in-frame)で挿入して作成した。pBR322IE SRT2ベクターを構築するために、まず、プラスミドpSVEIEをHindIIIとBamHIで制限酵素消化し、得られたHindIII-BamHI断片を、pUC10のHindIII-BamHI部位にクロニングして、プラスミドpUIEを作成した。pUIEをNaeIで制限酵素消化し、セルフライゲーションさせてプラスミドpUIE SRT2を作成した。プラスミドpUIE SRT2をNcoIで制限酵素消化し、得られた断片をpBR322IEのNcoI部位にクロニングした。IEのトランス活性化ドメイン(TAD)の中に点変異を含む変異体を作成するために、選択された変異を含むプライマーを利用して、PCRによる変異誘発法(ストラタジーン社(Stratagene))を行なった(オレゴン州ウィルソンビルにあるOligo's Etc.社; アイオワ州コーラルビルにあるIntegrated DNA Technologies社)。変異誘発されたTADは、pCR-Bluntベクター(カリフォルニア州カールスバッドにあるInvitrogen社)にクロニングされ、要求される変異の存在を確認するため、全体の配列解析を行った。変異誘発されたTADを、pIECassetteベクターに唯一のNcoI-NaeI部位の中にクロニングした。次に、さまざまな変異を起こしたTADを含むEcoRV及びBamHIで切断した断片を、pBR322IEベクターのEcoRV-BamHI部位にクロニングし、それによって、選択した変異を有する、再構築されたIEのORFを作出した。IE遺伝子にナンセンス変異、挿入変異、点変異、または欠失変異を含む組換えベクターを用いて、ウイルス複製に必須なIEタンパク質のドメインの同定を可能にする変異ウイルスを作成した。

#### 【0083】

DNA形質移入及び変異ウイルスの作出

RK-13細胞を、変異IE遺伝子を含むさまざまな組換えベクターで形質転換した後、無発現ウイルスKyA IEを感染させた。KyA IEウイルスのゲノムと、変異IE遺伝子を含む、さまざまな組換えベクターとの間の相同的組換えによって、変異ウイルスを作出した。

#### 【0084】

以下の通りにして、選択した組換えベクターをRK-13細胞に形質移入した。RK-13細胞を、完全EMEMに25cm<sup>2</sup>当たり2.5×10<sup>6</sup>の密度で播種し、5%CO<sub>2</sub>下37で一晚附着させた。翌日、RK-13の単層に対し、リポフェクチン(Lipofectin)試薬(ニューヨーク州グランドアイランドにあるライフテクノロジー社(Life Technologies, Grand Island, NY))を用い、製造業者の指示に従って、リポソームによるDNAトランスフェクションを行なった。具体的には、20µlのリポフェクチン試薬を230µlの無血清EMEMと混合し、混合液を室温で45分間インキュベートして、リポソームを調製した。250µlの無血清EMEMを含む別のチューブで調製した最大10µgまでのDNAを、予め作成しておいたリポソーム溶液の中に入れてゆっくりと混合した。リポソーム-DNA混合液を室温でさらに15分間インキュベートして、RK-13細胞の単層を無血清EMEMで3回洗浄した。このリポソーム-DNA混合液を一滴ずつ、1mlの無血清EMEMを含む各RK-13細胞単層に加えた。細胞を5%CO<sub>2</sub>下37で5時間インキュベートした。5時間後、5%FBSを添加した5~10mlのEMEMを形質転換した細胞に加え、細胞を、さらに、5%CO<sub>2</sub>下37で培養した。

#### 【0085】

形質転換してから約24時間後、KyA IEをMOI10で細胞に多重感染させた。細胞の細胞変性効果(CPE)を観察し、推定組換えウイルスを含む培養上清を10倍に希釈して、コンフルエントになったIE13.1細胞の上に蒔いた。2%アガロースを、6%FBS、及び、白色プラークと青色プラークとを区別するために1mMのBluogal(Life Technologies社)とを添加した2xEMEMと1:1の割合で混合したもので、IE13.1細胞を覆った。白色プラークを選び出して、IE13.1細胞でプラーク精製を5回行って、残留するKyA IEを確実に除去した。

#### 【0086】

ウイルス分離株のPCR解析

プラーク精製した保存液から単離した変異ウイルスに対し、各変異ウイルスのIEのORFが所望の変異を有していることを確認するため、LacZまたはIEに特異的なを用いてPCR解析とDNA配列解析を行った。 10

#### 【0087】

SW50.1ローター中、28,000rpmで2時間、4で超遠心して、培養上清からウイルスを単離した。上清を吸引し、残ったペレットを50µlのRIPA緩衝液(150mM NaCl, 50mMトリス塩酸[pH8.0], 0.1%SDS, 0.5%デオキシコール酸、1%NP40)に再懸濁し、ときどき混合しながら、室温で1時間インキュベートした。再懸濁したペレットは、PCR解析の鋳型として用いられた。IEフォワードプライマー(5'CCTTCCTTCTCGGTCTT3'(配列番号:3);塩基番号913~930)及びIEリバースプライマー(5'CTCCACCCCGAACATGTT3'(配列番号:4);塩基番号1155~1138)を用いて、IEに特異的なDNA断片を増幅した。IEフォワードプライマー(上記)及び大腸菌のLacZ遺伝子の5'側コード領域から得られたLacZ特異的プライマー(5'GGGTAAAGCCAGGGTTT3'(配列番号:5))を用いて、LacZに特異的なDNA断片を増幅した。プロメガ社(Promega)のfmolシーケンシング装置(ウイスクンシン州マディソン(Madison, WI))を用いて、配列解析によって変異を確認した。 20

#### 【0088】

変異ウイルスの場合、親ウイルスであるKyA IEのバクテリア由来のLacZ ORFの両コピーとも、組換えベクター由来の変異IE ORFで置き換えられていることが 30

#### 【0089】

(実施例3)

感染細胞におけるIEタンパク質の発現

ウエスタンブロット解析を行って、感染細胞の中でIEタンパク質が産生され、それが予測されたサイズをもつことを確認した。これらの解析は、IE遺伝子に大きな欠失をもつ変異ウイルスにとって特に重要であった。これらの欠失によって、非常に不安定なIEタンパク質合成がもたらされることがあるからである。

#### 【0090】

Garko-Buczynskiら、(Virology 248:83-94, 1998) 40

#### 【0091】

Patersonら、(Nuc. Acids. Res. 16:11005-11025, 1988)に記載された方法を修正した方法によって、EHV-1感染細胞の核抽出物を調製した。野生型EHV-1または変異型EHV-1をMOI10でRK-13細胞に感染させた。感染させてから6時間後に細胞を掻き取ってPBSに入れ、沈殿させて、4倍量の緩衝液A(10mM HEPES[pH7.0], 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.5%NP40、及び0.5mM TPCK)に再懸濁した。細胞を氷上で10分間保温した後、核を微量遠心機中14,000rpmで5分間沈殿させた。上清を捨て、核を2倍量の緩衝液B(20mM HEPES[pH 50

7.9], 25%グリセロール、0.42M NaCl<sub>2</sub>、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、10mM KCl、0.2mM EDTA、0.5mM PMSF、及び0.5mM TPCK)に再懸濁して、氷上で30分間保温した。核の細片を、微量遠心機中14,000rpmで15分間遠心分離することにより沈殿させ、上清を-80で保存した。

#### 【0092】

細胞または核抽出物中の全タンパク質を、ピシンコニン酸(BCA)タンパク質測定試薬(イリノイ州ロックフォード(Rockford, IL)にあるピアス社(Pierce))を使用して測定した。感染細胞抽出物のタンパク質試料を等量の2xレムリ(Laemmli)サンプル緩衝液(10%2-メルカプトエタノール、4%SDS、20%グリセロール、120mM Tris-HCl[pH6.8]、0.001%ブロモフェノールブルー)とともに5分間沸騰させた。4%スタッキングゲル及び8%分離ゲルによりタンパク質を分離し、4、100Vで1時間、電気泳動によってニトロセルロース膜(ニューハンプシャー州キーン(Keene, NH)にあるシュライヒャー・アンド・シュネル社(Schleicher & Schuell, Inc.))に転写した。転写後、この膜を、1%のゼラチン(シグマ社(Sigma))を含むTBST緩衝液(100mM Tris-HCl[pH7.5]、0.9%NaCl、0.1%Tween20)に入れて、室温で1時間ブロッキングした。そして、このニトロセルロース膜を抗IEペプチド特異的ポリクローナル抗血清(希釈率1:1000)とともにインキュベートした後、アルカリホスファターゼを結合したヤギ抗ウサギ抗体(Sigma;希釈率1:30,000)とともにインキュベートした。この抗IEペプチド抗体は、IEタンパク質のアミノ酸番号425~445の範囲のペプチドに対して作製されたもので、免疫蛍光検査法(IF)及びウエスタンブロット解析法において、IEタンパク質に対して非常に反応性が高いことが示されている(Smithら、Virology 202:760-770, 1994)。各抗体を0.1%のゼラチンを含むTBSTの中で、振とうしながら2時間インキュベートした後、0.1%のゼラチンを含むTBSTの中で15分間振とうしながら3回洗浄した。NBT緩衝液(100mM Tris-HCl[pH9.5]、100mM NaCl、5.0mM MgCl<sub>2</sub>、0.33mg/mlニトロブルーテトラゾリウム[NBT、Gibco-BRL]、及び0.165mg/ml5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート[BCIP]Gibco-BRL)の中で膜をインキュベートして、反応したタンパク質を可視化した。

#### 【0093】

17種類のIE変異ウイルスすべての場合に、感染RK-13細胞において、変異IEタンパク質が合成された。これらのIE変異ウイルスのうち4種類に関する代表的データを図3に示す。SDS-PAGEにおいて約190~200kDaのバンドとして移動する野生型IEタンパク質とは対照的に、KyAd644/824は、約180kDaのところに移動するIEタンパク質を産生した。変異KyA1029は、458個のカルボキシル末端側の残基をコードする配列を欠いたIEのORFをもつため、そのIE遺伝子産物は、約138kDaのところに移動する。KyA SRT2を唯一の例外とし、その他16種類のウイルスは、それぞれ、予測された分子量の位置に移動した。KyA SRT2のIEのORFは、アミノ酸番号88~243をコードする配列を持たないため、その推定IEタンパク質は、およそ179kDaのところに移動するはずであった。このサイズのIE遺伝子産物を検出することができたが、非常に少ない量しか検出されなかった。このことは、この変異体は非常に低濃度でしか得られなかったことを示している。または、KyA SRT2ウイルスによってコードされるIEタンパク質は、非常に不安定なのかもしれない。

#### 【0094】

##### (実施例4)

RK-13細胞における変異ウイルスの増殖  
変異ウイルスを、さまざまな希釈度でRK-13細胞及びIE13.1細胞に感染させた。6%FBSを添加した2xMEMと1:1の割合で混合した2%アガロースで感染細

10

20

30

40

50

胞を覆った。プラーク形成を観察した。

【0095】

RK-13細胞、及び補完IE13.1細胞株における17種類の変異ウイルスの増殖解析結果をまとめたものを表2に示す。重要なのは、すべての変異ウイルスが、IE13.1補完細胞株において複製することができたということである。アミノ酸番号3~89の中に位置する最小IE TAD内に点変異を含む6種類のウイルスは、RK-13細胞においても増殖することができた。ロイシン12やフェニルアラニン15など、IE TADの中にある高度に保存された残基に点変異をもつウイルスは、RK-13細胞において増殖することができた。同様に、アミノ酸番号12に、IE TADの二次構造を大きく変えると考えられる、ロイシンからプロリンへの置換を有するKyAL12Pも、RK-13細胞において増殖することができた。IEのORF内部に欠失を含む変異ウイルスのうち、KyA SRT1、KyA SRT2、KyA178/627、及びKyA552/897は、IE13.1細胞株によって産生される野生型IEタンパク質が存在しないと増殖することができなかった。KyA SRT1及びKyA SRT2はともにIEタンパク質の全SRT領域を欠失しているが、KyA SRT2のIEのORFにおける欠失(88~243番目の残基)は、IE TADの非常に近接した位置にあるので、この重要なドメインの機能及び/または立体構造に影響するかもしれない。KyAd644/824は、IEタンパク質の領域3に欠失をもつが、RK-13細胞における増殖に欠陥がないことが実証されたが、このことは、この領域が、ウイルス複製に必要な初期遺伝子をトランス活性化する、IEタンパク質にとって必須のドメインを含んでいないことを示している。上記の4種類の欠失変異体以外に、627番アミノ酸及び951番アミノ酸にナンセンス変異を含む変異EHV-1は、RK-13細胞上では複製することができなかった(これらの変異体はいずれも核移行シグナルを持たない)。ナンセンス変異が1141番アミノ酸にあるもの(KyAn1411)も、1029番アミノ酸にあるもの(KyAn1029)も、非補完細胞におけるこれらのウイルスの増殖に影響を与えなかった。しかし、KyAn1029が形成したプラークは、野生型KyAによって形成されるプラークよりも大きく、KyAn1029が形成したプラークの出現は、野生型KyAウイルスに較べて遅かった。最後に、KyAIn628及びKyAIn1411のIE ORFにおける挿入変異は、これら変異体のRK-13細胞における増殖または表現型に有害な影響を与えなかった。

10

20

30

【0096】

増殖曲線解析を行って、変異ウイルスがRK-13細胞内で増殖でき、また、野生型EHV-1に見られるウイルス力価に匹敵する力価を得ることができたかを判定した。野生型EHV-1または変異型ウイルスのいずれかをMOI1でRK-13細胞に感染させた。感染後さまざまな時点で培養上清の等量液を取り出し、RK-13細胞上でのプラーク測定法によって解析を行った。図4に示すように、KyAIn1411、KyAIn628、及びKyAd644/824は、野生型EHV-1と同程度に増殖した。しかし、KyAn1411及びKyAn1029の力価は、野生型ウイルスの力価よりも有意に低かった。このことは、IE ORF内におけるこれらの欠失が、IEの機能を損ない、最終的にウイルス増殖を低下させたことを示している。この観察結果は、IEタンパク質のカルボキシル末端にある配列が、IEタンパク質が最大のトランス活性化作用を示すために必須であるとの最近の知見(Buczynskiら、Virus Res. 65:131-140, 1999)と一致する。

40

【0097】

【表2】

## RK-13細胞及びIE13.1細胞株におけるIE変異株の増殖

ウイルス	IE ORFにおける変異	ウイルス増殖 <sup>a</sup>	
		RK-13細胞	IE 13.1細胞
WTKyA	無し	有	有
KyAΔSRT1	aa181-250におけるSRT欠失	無	有
KyAΔSRT2	aa88-243におけるSRT欠失	無	有
KyAd178/627	aa178-627におけるDNA結合ドメイン	無	有
KyAd552/897	aa552-897の欠失	無	有
KyA644/824	aa644-824の欠失	有	有
KyAn627	aa627におけるナンス変異	無	有
KyAn951	aa951におけるナンス変異	無	有
KyAn1029	aa1029におけるナンス変異	有	有
KyAn1411	aa1411におけるナンス変異	有	有
KyAln628	aa628における挿入	有	有
KyAln1411	aa1411における挿入	有	有
KyAD20N	IE TAD内部の点変異	有	有
KyAD24N	IE TAD内部の点変異	有	有
KyAL12P	IE TAD内部の点変異	無	有
KyAL12E	IE TAD内部の点変異	有	有
KyAF15D	IE TAD内部の点変異	有	有
KyAE34Q	IE TAD内部の点変異	有	有

<sup>a</sup>表は、RK-13細胞株、及び、IEタンパク質を産生する細胞株IE13.1における、IEタンパク質内に変異を有するさまざまなEHV-1ウイルスの増殖結果をまとめたものである。セリンに富む領域、DNA結合ドメイン、またはNLSの内部に欠失または変異をもつウイルスは、補完IEタンパク質が存在しないと増殖することができなかった。

## (実施例5)

## 変異ウイルスの温度感受性

温度を上昇させたり、低下させたりしたときに、IE ORF内における変異がウイルス増殖に影響するか否かを判定するために、温度変化実験を行なった。野生型EHV-1、または変異型ウイルスを段階希釈して、RK-13細胞上に、3回反復して播種した。プレートを33℃、37℃、または39℃で5日間インキュベートしてから、10%緩衝ホルマリン(ミズーリ州セントルイス(St. Louis, MO)にあるシグマ社)を用いて固定した。メチレンブルーで染色した後、プラークの数を数えて、さまざまな温度における培養効率を測定した。

## 【0098】

野生型EHV-1は、33℃でも37℃でも効率的に複製したが、39℃では、ウイルス収率が約70%低下した。さらに、野生型EHV-1のプラークの大きさは、39℃で有意に減少し、プラークが小さすぎて、培養効率を算定するのが困難になるほどであった。しかし、RK-13細胞上における、野生型EHV-1と変異型ウイルスの増殖における

違いを確認することができた。変異型ウイルスは、39℃における増殖能力の有無によって、2つのグループに分けられた(表3)。ウイルスKyAn1029、KyAIn628、KyAn1411、及びKyASRT2は、39℃でのRK-13細胞における増殖が、野生型KyAで見られる増殖と較べて、激しく損なわれることから、グループ1に分類された。KyAn1029とKyAn1411は両方とも、37℃(図4)と39℃(表3)において増殖阻害を示した。グループ2に分類されたウイルス(表3)は、KyAIn1411以外は、いくらかの増殖阻害は見られたものの39℃で増殖した。KyAIn1411は、33℃、37℃、及び39℃で、野生型EHV-1と外見上同程度に増殖することができた。

【0099】

【表3】

10

### 温度感受性表現型

グループI変異体		39℃におけるプラーク <sup>a</sup>
KyAn1029	aa1029におけるナセンス変異	無
KyAn1029	aa1029におけるナセンス変異	無
KyAn11411	aa11411におけるナセンス変異	無
KyAIn628	aa628における挿入	無
KyAΔSRT2	aa88-243の欠失	無
グループII変異体		
KyAd644/824	aa644-824の欠失	++
KyAIn1411	aa1411における挿入	+++
KyAD24N	IE TAD内での点変異	++
KyAL12P	IE TAD内での点変異	++
KyAL12E	IE TAD内での点変異	++
KyAF15D	IE TAD内での点変異	++
KyAE34Q	IE TAD内での点変異	++

20

<sup>a</sup>ウイルスは、野生型EHV-1と比較して、39℃で増殖できるか否かにより、2つのグループ(I及びII)に分けられた。39℃における増殖を、野生型EHV-1と対比して採点した。+++、 $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ の力価に対応する。++、 $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ の力価に対応する。

30

。

40

(実施例6)

選抜されたウイルス変異株の分子的表現型

KyAn1029、KyAn1411、KyASRT2、及びKyAd644/824という、いくつかのウイルス変異株を選抜して、それらの分子的表現型を特定するための実験を開始した。

【0100】

これらの変異型ウイルスの欠損を遺伝子発現のレベルで特徴づけるため、リボヌクレアーゼ保護アッセイ法(RPA)を行なった。RPAの感度なら、IE遺伝子、EICP0遺伝子(後期遺伝子の発現において重要な初期補助制御因子の遺伝子)、及びグリコプロテインD(gD)遺伝子(ウイルス複製に必須の重要な後期遺伝子)の発現レベルの違いを

50

識別できるはずである。R K - 13細胞を疑似感染させるか、野生型E H V - 1、K y A n 1 0 2 9、K y A n 1 4 1 1、K y A S R T 2、またはK y A d 6 4 4 / 8 2 4をM O I 1 0で感染させた。感染後、所定の時間(3、5、9時間後など)に細胞を回収し、製造業者のプロトコール通りにトリゾール試薬(T R I Z O L R E A G E N T)(ライフ・テクノロジー社(L i f e T e c h n o l o g i e s))を用いて、全RNAを単離した。R P Aを行なうには、製造業者の指示通りにR I B O Q U A N T R N A S E 保護アッセイ装置(R I B O Q U A N T R N A S E P R O T E C T I O N A S S A Y S Y S T E M)(カリフォルニア州サンディエゴ(S a n D i e g o , C A)にあるファルミンゲン社(P h a r m i n g e n))を利用した。各R P A反応につき、全RNAの約20 $\mu$ gを用いた。R P A解析用プローブは、プロメガ社(ウイスコンシン州マディソン)のリボプローブ・インビトロ転写装置(R I B O P R O B E I N V I T R O T R A N S C R I P T I O N S Y S T E M)を用いて作成した。I Eプローブ用には、プラスミドp G 3 I EをB a m H Iで制限酵素消化して、ランオフ(run-off)転写物を作成した。プラスミドp G 3 I Eは、4,773-塩基対のI E O R F全部を含むN h e I / D r a I断片を、プラスミドp G E M - 3 Z (P r o m e g a , M a d i s o n , W I)のX b a I / S m a I部位にクローニングして構築された。制限酵素消化されたp G 3 I Eプラスミドをフェノール-クロロフォルム抽出法及びエタノール沈殿法によって精製し、約1 $\mu$ gのプラスミドを用い、製造業者の指示に従って、リボプローブを作成した。E I C P 0特異的プローブには、プラスミドp G E M I C P 0 K (B o w l e s ら、J . V i r o l . 7 1 : 4 9 0 4 - 4 9 1 4 , 1 9 9 7 ; B o w l e s ら、J . V i r o l . 7 4 : 1 2 0 0 - 1 2 0 8 , 2 0 0 0)をN h e Iで制限酵素消化し、ランオフ(run-off)転写物を作成し、上記の通り精製した。グリコプロテインD特異的プローブには、プロメガのリボプローブ・インビトロ転写装置を用いて、プラスミドp 7 2 D 3 9 2 (Z h a n g ら、V i r u s R e s . 5 6 : 1 1 - 2 4 , 1 9 9 8)を直接転写した。モレキュラーダイナミクス社(カリフォルニア州サニーベール(S u n n y v a l e , C A))の分子動力学ホスフォイメージ装置(M O L E C U L A R D Y N A M I C S P H O S P H O I M A G E R Y S Y S T E M)を用いて、m R N A量を定量した。

#### 【0101】

遺伝子発現レベルを表4にまとめた。R P AによるK y A d 6 4 4 / 8 2 4の解析結果は、その遺伝子発現が、すべての時点において、野生型E H V - 1のレベルと同程度であることを示した。これらのデータは、K y A d 6 4 4 / 8 2 4の力価が、野生型E H V - 1の力価と同程度であるとの、増殖曲線解析から得られた結果と一致する。しかし、K y A n 1 0 2 9、K y A n 1 4 1 1、及びK y A S R T 2を感染させたR K - 13細胞におけるこれらの代表遺伝子の発現を調べたところ、これらのウイルス転写産物量が、特に感染後期の時点で減少することが明らかになった。K y A n 1 0 2 9に感染した細胞におけるI E遺伝子の発現は、感染してから3時間後と5時間後で変化しないのに対し、感染9時間後のI E m R N A量は、ほぼ3倍減少した。さらに、K y A n 1 0 2 9感染細胞においては、調査したすべての時点でE I P C 0 m R N Aの合成が低下し、ここでも、I Eタンパク質のカルボキシル末端が、この制御タンパク質の完全な活性に重要であることを示唆していた。また、g D m R N A合成が感染の後期に3倍以上低下したことから明らかなように、E I C P 0遺伝子発現の低下は、後期遺伝子の発現に大きな影響を与えた。R P AによるK y A S R T 2の遺伝子発現解析結果は、S R T領域の欠失が、I E遺伝子の発現には影響しないことを明確に示したが、E I C P 0及びg D遺伝子とも、感染9時間後には、ほとんど検出できない程度にまで発現が低下した。初期遺伝子及び後期遺伝子の両方の発現に欠陥があると、ウイルスに回復不能な障害を与えるため、K y A S R T 2ウイルスは、R K - 13細胞の中で増殖できなくなった。

#### 【0102】

#### 【表4】

## RPA解析のまとめ

ウイルス変異株	KyA野生型mRNA発現に対する割合 (%) <sup>a</sup>		
	感染後3時間	感染後5時間	感染後9時間
KyAd644/824			
IE	98%	99%	97%
EICPO	99%	92%	95%
gD	_b	98%	89%
KyAn1029			
IE	99%	92%	34%
EICPO	46%	57%	36%
gD	_b	78%	29%
KyAn1411			
IE	98%	97%	98%
EICPO	98%	88%	86%
gD	_b	85%	80%
KyAΔSRT2			
IE	98%	97%	92%
EICPO	99%	42%	3%
gD	_b	7%	5%

<sup>a</sup>表中の数値は、検出されたmRNAを、野生型EHV-1のIE、EICPO、及びgDのmRNA発現で得られたmRNAと比較して示したものである。

<sup>b</sup>gDは後期遺伝子であるため、野生型ウイルスまたは変異型ウイルスのいずれを感染させた細胞においても、前初期にはgDの転写産物は検出されなかった。

## (実施例7)

## マウスにおける変異型ウイルスの試験

変異型ウイルスKyAd644/824、KyAn1411、KyAin1411、及びKyAE34Qをマウスで試験した。

## 【0103】

3～6週齢のメスのCBA(H-2k)マウスをインディアナ州インディアナポリス(Indianapolis, Ind.)にあるハーラン・スプレーグ・ドーリー社(Harlan Sprague Dawley)、またはメイン州バーハーバー(Bar Harbor, Maine)にあるジャクソン研究所(Jackson Laboratory)から入手した。マウスは、シュリーブポート(Shreveport)にあるルイジアナ州立大学メディカル・センターの動物資源施設(Animal Resource Facility of the Louisiana State University Medical Center)において、上部がフィルターになったケージの中で飼育された。マウスはすべて、使用前最低一週間は静置した。

## 【0104】

マウスをハロタン（ミズーリ州セントルイスにあるシグマケミカル社（Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.））で麻酔して、 $2 \times 10^6$  PFUのEHV-1 KyAまたは変異型ウイルスを50  $\mu$ l鼻腔内（i.n.）接種した。対照マウスには、50  $\mu$ lの培地のみを投与した。

## 【0105】

## 弱毒化

免疫したマウスを毎日観察して、例えば、Colleら、Virus Res. 43: 111-124 (1996)、及びZhangら、Virus Res. 56: 11-24 (1998)に記載されているような、例えば、毛の逆立ち、体重減少、強制呼吸、嗜眠、及び群居など、EHV-1感染症の臨床症状が見られないかを調べた。試験した4種類の変異型ウイルスのいずれに感染したマウスも、何ら臨床疾患を示さなかった。

## 【0106】

また、接種後2日、5日、8日目に、RK-13細胞単層上のブランク密度によって、肺に存在するウイルス量を測定した。Colleら (1996)、及びSmithら、J. Virol. 72: 5366-5372 (1998)に記載された通りに、ウイルスを肺から単離した。

## 【0107】

## CTL反応

主要なCTL反応を測定するために、接種後5日目に、縦隔リンパ節（MLN）からリンパ球を単離し、また、60ゲージのワイヤーメッシュ網でリンパ組織を圧迫して、単細胞の懸濁液を得た。リンパ球を洗浄して、12ウェル平底プレート（ニューヨーク州コーニングにあるコーニング社（Corning Inc., Corning, N.Y.）中、5% FCS、20  $\mu$ Mメルカプトエタノール、20 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、及び抗生物質を含む完全RPMI 1640（Sigma）培地で5% CO<sub>2</sub> 下37 で3日間培養した（1ウェル当たり $10^7$ 細胞）。96ウェルのV底プレート（デンマークにあるヌンク社（Nunc））の中で、 $10^4$ 個の<sup>51</sup>Cr-標的した、感染または非感染の標的LM細胞に対して、さまざまなエフェクター対標的の割合で、標準的な4時間の<sup>51</sup>Cr放出アッセイ法により細胞溶解活性を測定した。

## 【0108】

図5A～5Cに示されている通り、調査した4種類の変異型ウイルス、KyAd644/824、KyAn1411、KyAi1411、及びKyAE34Qはすべて、親株であるKyAウイルスによって誘導されるのと同程度のCTL反応を誘導した。

## 【0109】

メモリーCTL反応を測定するために、上記した通りにマウスを感染させて、2～26週間飼育した。脾臓組織を60ゲージのワイヤーメッシュ網で圧迫し、37 でトリス緩衝0.83 NH<sub>4</sub>Clに短時間曝露して、赤血球を溶解させた。次に、得られたリンパ球を、Jenningsら、Cell. Immunol. 133: 234-252 (1991)に記載されているようにして、マイトマイシンCで処理した $3 \times 10^5$ の刺激細胞存在下、12ウェル平底プレート中で5日間、5% CO<sub>2</sub> 下37 で完全RPMI 1640培地において培養した（1ウェル当たり $10^7$ 細胞）。刺激細胞は、後期ウイルス遺伝子産物を発現させるためにEHV-1 KyAを感染効率10で18時間感染させたL-Mマウス線維芽細胞である。 $10^4$ 個の<sup>51</sup>Cr-標的した、感染または非感染の標的LM細胞に対する、標準的な4時間の<sup>51</sup>Cr放出アッセイ法により、96ウェルのV底プレート（デンマークにあるヌンク社（Nunc））の中で細胞溶解活性を測定した。

## 【0110】

## 免疫したマウスの血清中のEHV-1特異的抗体

免疫した対照マウスから血清試料を採取して、中和抗体（nAb）の存在量を測定した。簡単に説明すると、血清を56 で1時間加熱して補体を不活性化した後、連続的に2倍希釈した血清（1:20から1:1028）を $3 \times 10^3$  pfuのEHV-1 KyAと

10

20

30

40

50

ともに37℃で1時間インキュベートした。RK-13細胞単層上でプラークアッセイ法によって、感染性ウイルスについて、各試料を3回反復して測定した。p.f.u.の50%低下をもたらす血清の希釈度で最も高いものの逆数としてn.A.b.の力価を測定した。免疫前の血清を対照として用いた。

#### 【0111】

EHV-1特異的抗体分泌細胞(ASC)

抗原投与後所定の日マウスを殺し、肺、MLN、及びCLNを取り出して、ELISPOT測定法によってASCの分布範囲を測定した。肺組織から単細胞懸濁液を作成するには、はさみで組織を切り刻んでから、60ゲージの網で圧迫した。遠心分離後、10mlのコラゲナーゼ型L/デオキシリボヌクレアーゼL溶液(250:50U/ml; Gibco-BRL)に細胞を懸濁し、振とう器に入れて37℃で90分間インキュベートした。そして、トリス緩衝した0.83%のNH<sub>4</sub>Cl溶液3mlによって37℃で5分間処理して、血液細胞を溶解させた。細胞は、5%仔ウシ血清と抗生物質を添加したダルベッコの修正イーグル培地(DMEM-5)に再懸濁した。MLN及びCLNから単細胞懸濁液を作成するには、余計な処理を行なうことなく、60ゲージの網で組織を圧迫した。脾臓から単細胞懸濁液を作成するには、脾臓組織を60ゲージの網で圧迫して、前記したように、トリス-NH<sub>4</sub>Clで処理した。

10

#### 【0112】

ELISPOT測定法

簡単に説明すると、リン酸緩衝食塩水(PBS)中のEHV-1 KyA感染細胞溶解液(10~200µg/ml)で、ニトロセルロース製の96ウェルのマイクロタイタープレート(Millititer-HA; マサチューセッツ州ベッドフォードにあるミリポア社(Millipore Corporation, Bedford, MA)を被覆し、加湿チャンバー内において4℃で一晩インキュベートするか、37℃で2時間インキュベートした。被覆されたプレートは、使用時まで4℃で保存した。各実験測定ごとに、コーティング用緩衝液(PBS)を捨て、プレートをPBSで濯いで3回洗浄した。残った結合部位の可能性のある部位を、PBS中5%ウシ胎児血清、またはPBS中1%ウシ血清アルブミン((ミズーリ州セントルイスにあるシグマケミカル社)によって、37℃で30分間飽和させた。さらに洗浄した後、DMEM-5の中で適当な濃度(10<sup>3</sup>~10<sup>6</sup>細胞/ウェル)になるようリンパ球を希釈してから、被覆プレートに加えた。B細胞の非特異的活性化因子として、リポポリサッカライド(LPS、5µg/well; カリフォルニア州ラホヤ(La Jolla, CA)にあるカルバイオケム-ノババイオケム社(Calbiochem-Novabiochem)を加えた。また、この測定法では、非感染細胞の対照用プレートも使用し、EHV-1感染細胞のプレートと同じように処理した。

20

30

#### 【0113】

細胞は、5%CO<sub>2</sub>下37℃で3~4時間インキュベートした後、0.005%Tween 20(PBST)を含むPBSで洗浄して廃棄した。100mlのアルカリホスファターゼ結合抗体を各ウェルに加えてから、プレートを加湿チャンバー内で室温下2~3時間インキュベートした。徹底的に洗浄した後、製造業者の指示に従って、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸p-トルイジン塩(BCIP、Gibco-BRL)、及びニトロブルー・塩化テトラゾリウム(NBT、Gibco-BRL)を基質として加えて、青色になるまで5~30分間置いて、EHV-1特異的ASCに対応するスポットを可視化した。ニトロセルロース膜を水で数秒間洗浄して、反応を停止した。2~24時間後に、光学顕微鏡下低倍率(10~30倍)でEHV-1特異的ASCの数を数えた。

40

#### 【0114】

防御免疫の誘導

免疫したマウスをハロタン(ニュージャージー州リバーエッジ(River Edge, NJ)にあるハロカーボン・ラボラトリーズ社(Halocarbon Laboratories))で軽く麻酔してから、PBSで2×10<sup>6</sup>p.f.u.に希釈した病原性EHV

50

- 1 株 (全量 50  $\mu$ l / マウス) を鼻腔内に接種した。

【0115】

マウスを毎日観察して、毛の逆立ち、体重減少、強制呼吸、嗜眠、及び群居など、EHV-1 感染症の臨床症状が発生していないかを調べた。

【0116】

さらに、ウイルス投与したマウスの肺におけるウイルス量を測定した。投与後 2 日目、5 日目、及び 10 日目にウイルスを投与した動物から肺を分離した。以前、Awanら、J. Gen. Virol. 71: 1131-1140 (1990) によって記載されているとおり、マウス肺組織からウイルスを回収した。2 ml のホイートン社ドゥンス型 (Wheaton Dounce) ホモジナイザーを用いて、1 ml のイーグル最小必須培地の中で組織をホモジナイズした。次に、超音波処理装置 (ニューヨーク州ファーマーミンデール (Farmingdale, NY) にあるヒートシステムズ - ウルトラソニックス社 (Heat Systems - Ultrasonics, Inc.) の中で各試料を 1 分間超音波破碎してから、3,000 rpm で 10 分間遠心分離して細胞残滓を取り除いた。RK 細胞上でプラーク測定法によってウイルスを定量するまで、試料は -70 で保存した。SigmaStat ソフトウェア (カリフォルニア州サンラファエル (San Rafael, CA) にあるジャンデル社 (Jandel, Corp.)) を用いて、統計解析を行なった。

10

【表 5】

配列番号：1 (ウマヘルペスウイルス1型前初期遺伝子、  
遺伝子バンクアセション番号 J04366)

1 cccggggagg agacgcatgc agatgagatg tgcacgaggg tgcatggcg tccagggggc  
 61 ttcacottta tgcacatgag aggcgctatt cggcatcccg ttggcgcgac gcgcttccct  
 121 gggaggagac atacgcaa atagaaacgac acacgggttc taattggttg gagcgggggg  
 181 gaggggaaaa gcgcatgcaa atgcaaagcg cgggaccggg ccccataggc tagagccgct  
 241 acacgccccac cgcccatcat caacggccaa tcacaatcga tagtgtgggc tggccactcc  
 301 cactaggggg aaggcaaac tccctcgtag tagtataaag caccctgttc ttaccatcgc  
 361 tagcatcgcg gactagagag cctttcagct cactggacca gccagccttc gaggactatc  
 421 gatcgcatct tggaaagctt acccgctctt ggcactcctt ctteggcttg cggaggttaag  
 481 agctccccgg ggacacgacc ggcttcgata tgctttctct cccggggaga gcgttagaga  
 541 acggggcgag tgccaaaaag gccatggaac cctccaaca acgatgtccc gagggggtgg  
 601 ctccgagggc cgcttcgacc tagcggtcga agcgcggtgg ggatacttac ctggaagccg  
 661 gcgaaggcta taccttccc gggcagacc gggcggttc tgcttcggcg gagctcggcg  
 721 cggaagcctg gatatactgac gggcggtgg taccacccaa gcgggggaga ggccccggcc  
 781 gcccgggttc ccttttacca ttccgctccg ctccaactca acatcttttc cgctctgct  
 841 tttccagggg agagaagcgg cgcccgctct ccgagcggcc gccgcggaac cccgccaccg  
 901 gccacccgcc aaccttccct tctcggctct ccgagcggcg ctctctcgtgc ggttggtct  
 961 cgacccccgaa gccggagcta gcacgccatg gccagccagc gcagcgaact cgccccggac  
 1021 ctctacgact tcatcgagag caacgacttc ggcgaggacc cctcactccg cgcagccagc  
 1081 ggggcccgaag aggggttcac ccagccccgc gcgccccgacc tgctgtacgg cagccagaac  
 1141 atgttcgggg tggacgacgc tccgctctcc accccggtgg ttggtcatccc tccgctct  
 1201 ccgctccccg agcccccggg agggaaaggcg aagcggctgc cctcggccgc cggcagcggc  
 1261 ggtcctccta ccccgccggc tgcgcgccag cggcgctccc cggcaccag cccgctccg  
 1321 gggctcggcg cgatgctgaa gatggctcac tctcctggtg ccccggggaa cggctcggcg  
 1381 gccacgggct cctcatcacc cggcggtggg gacgcgccg acccggctgc cctcagacagc  
 1441 gataccgaga cctgccccgg gtccccgcag cccgagtttc catcctcggc ctccccgggc  
 1501 ggagggctcc cggcaccocg ggtccggagc atctccatct catcgtcgtc ctctcctcg  
 1561 tctcogatgg acgaggacga ccaggcggat ggtgcccggg cgagtagctc ctctcgtcg  
 1621 tctcggacg acagcgacag cgacgaaggc ggcgaggagg agacccctcg cccgcccac  
 1681 tcgcagaacg ccgcgaagac cccgctggcc gccggtctc cgggcccgtc ctccggaggg  
 1741 gatcgcggcg ccgctggggc cgccaccccg aagagctgac gctccggcgc cgcttcccc  
 1801 ggcgcaccgc ctccggctcc agcttcggcg cccgctccca gcgccccggg aggaggctc

10

20

30

40

1861 ctccctccgg gggctcgc at tttagagtac ctggagggcg tccgcgagge caatctggcc  
 1921 aagacgctgg agaggcccga accgcccgcg gggatggctt ctccgcccgg cgggagccct  
 1981 caccggctcc ccaaggacca gcgtccgaaa tgggctctgg cgggagcgtc gaagcgcaag  
 2041 cgggccaacc ccagaccag accccagacc cagaccagc caccggccga ggaggccccg  
 2101 cagacggccg tgtgggactt gctggacatg aactcatccc aggctaccgg ggcggcggca  
 2161 gcagcagcat cggcccggc gggggcttcg tgcgcccgg gcgctacca gcgcgagccg  
 2221 cttctcacc cgtccgggga cccctggccc gggctcggatc caccaccgat ggggagggtg  
 2281 cgatacgggg ggaccgggga ctgcggggac gggctgtggg acgaccccga gatagtccctg  
 2341 gccgcctcgc gctacgccga ggcgcaggcc ccagtaccgg tcttcgtgcc ggagatgggg  
 2401 gactccacca agcagtacaa cgctctggtc cgcctgggtg tcgagagccg cgaagccatg  
 2461 tcctggctgc agaactctaa gctcagcggg caagaccaga acctggcgca gttctgccag  
 2521 aagttcatcc acgctccgcg cggacacggg tccttcatca cggggagcgt ggccaacccc  
 2581 ctgccccaca tgggggacgc catggcggcc gggaaacgdc tctgggcccct gccacacgcg  
 2641 gccgcctcgg tggccatgag ccgcccctac gatcgcactc agaagagcct catcctccag  
 2701 agcctccggc gcgcctacgc ggacatggcc taccgagag acgagggggg gaggcggac  
 2761 tactcgcgc ccgtggccgg ctgcccggcc caggccggcc ctgcccggcc cagccagcaa  
 2821 cagcccaggg ccccggcgc ctcggtccgc gtcgcggaag cgtacaccgg ggtctgcgcg  
 2881 gccctcgggc cccgacgcaa ggctgcgcgc gccgcggccg ctccggggac cagggcgcgc  
 2941 aggcctccg ccttcagact cagggagctc ggggacgcct gcgtgctggc ctgccagggc  
 3001 gtcttcgagg cctcctcgc cctccgcggc ggggcgtccg ccgtcccgg actggacccc  
 3061 agcagatcc cctctcccgc ctgcccctcc gaggcgctgt gctccaaccc ggccgggctg  
 3121 gagacggcgg cctctccct ctacgaactc agggacctgg tcgagcgggc caggctcctc  
 3181 ggggactctg accctaccca ccgcctgggc tccgacgagc tgcgcctcgc ggtgcgcgc  
 3241 gttctgggtg tggcccggac cgtggcgcgc ctggtgcgct acaacgccga gggggcccgg  
 3301 gcccgggcct cggcctggac cgtcaccag gccgtgttca gcataccag cctggtcggg  
 3361 gggatggtgg gggaggccgt gtccctgctg gcccaccga ctcgggtcca gcagccctca  
 3421 tcgtcctcgc ccggcggcga gcccttctcc ggtccgcgg ccgcccgggg gagccttcag  
 3481 accctgcgc cctgtggcc caccgtccc ggaagcagt ccgcgacggc cccctcgtcc  
 3541 cactcccagt cccccagca ctcccagagc ggcggagggc cgggggctac gaccgccacc  
 3601 tgctcccgg ccaaccagac aaacgcccgc tcccgggggc agcagcacca gccgcagaag  
 3661 gccgctccc ctcaggcggc cgcctcccgc gccacctca gccaggagge gatgccggc  
 3721 tcctcctcgc acgaccgtgc catccacggg cgcgccaggg gcaagagcgg caagcggcgc  
 3781 tccgagcccc tggagccggc ggcccaggcc ggagcctcgg cctccttctc ctgctccgc  
 3841 cgggggtacg atccctcggg gccggctgac agccctccgg cccccaagcg caggggtggc  
 3901 accccgggccc accaggctcc ccgggcccctg ggacccatgc cagccgaggg ccccgaccgt

10

20

30

40

3961 cggggcggat tcaggcgcgt tccccgcgga gactgccaca ctccgcggcc cagcgacgcg  
 4021 gcttgccggg cctactgtcc ccccagactg gtggcggagc tcatcgacaa ccagctgttc  
 4081 cccgaggcct ggcgcccggc gctcaccttc gatccccagg cctggccac catcgcgcc  
 4141 cgctgcagcg gccccccggc ccgggacggc gcgcgcttag gggagctggc ggcagcggc  
 4201 ccgctgagac ggagggccgc ctggatgcac cagatccccg accccgagga cgtgaagggtg  
 4261 gtggtcctct actccccgct ccaggacgag gacctgctgg gggactccc ggcctcccgc  
 4321 cccggcggct ctccggcgga gcccctctgg tccgacctca aggggggact ctccggcctg  
 4381 ctggcggccc tggggaaccg catcctcacc aagcgggtccc acgcctgggc cggcaactgg 10  
 4441 accggggccc cggacgtctc ggccctcaac gccagggggg tctgctgct gtcgaccggg  
 4501 gacctggcct tcaccggctg cgtcgagtac ctctgcctgc gctgggctc cgcagggcg  
 4561 aagctcctgg tgetggacgc ggtctccacc gaggattggc ccaggacgg tcccgcgatc  
 4621 agccagtacc acatctacat gcgggcccgc ctgactccgc gggtcgcctg cgcctgccc  
 4681 tggcccgggg agcgcacact cagccgcgcg gtcctcact ccagcacct ctccggccc  
 4741 ggactgttcg cgagggccga ggcgcgcttc gcgcgctgt acccggactc tgcgccctg  
 4801 aggctgtgcc gctcctcaa cgtggcctac acgggtggaca ctgcgcggc cgagcgcacc  
 4861 cgcgttcccc tggctccgag ggagtaccgc cagcgcgtcc tgcccgacta cgacggctgc 20  
 4921 aaggacatgc gggcccaggc cgagggcctc gggttccacg acccggactt tgaggagggc  
 4981 gccgcgcaga gccaccgcgc ggccaaccga tggggactcg gggcctggct gcgcccgctg  
 5041 tacctcgcct ggggcggcg cggcgctggg gccgtggagc cctcggagct tctgatcccc  
 5101 gagctgctga gcgagtctc cggggtggcg ctgctggagc ccgacgcoga ggccgagccc  
 5161 ctggtgctgc ccataccga ggtccccgc cgcgagccc cgcgggtcga ctgggagccc  
 5221 gggttcggct ctgcctccac ctccgctctg cacatggggg ccacggagct gtgcctgccg  
 5281 gagcccagcg acgagctcga gatcgacggg gccggcgatg tggagctggt ggttgagcac  
 5341 cccggcccga gcccggcgt gcccaggcc ctccgcgcg ctcccatcaa gatcgaggtg  
 5401 gtgtcggacg acgaggacgg aggagactgg tgcaatcgt acctctctg aacacgatgg 30  
 5461 agcgcctccc tgcggccgaa aacaagaaaa atcagtacat ccacaactat gtgtccgccc  
 5521 agcacaacgc agactccgc tagactcccg cctccatccg ctgacgctga accccgccc  
 5581 gccctctgct gacgcgaaga caaggccctc cccggacgac atgtgaggaa cgaagggggc  
 5641 gttgtatcta gcagcccacg ttccttattg ctcacatgtc tgcccactcg gtgggcaact  
 5701 ccaggcttcc ccctatcgt gagtgggtgt ttttaataaa gttttttta aattttgatt  
 5761 gaccgcgtgg tctttgttta ctgggcccgt tgatgggccc gttgatgggc gggttgatgg  
 5821 gccgggtgat gggcgggttg atgggcccgt tgatgggccc gttgatgggc gggttgatgg  
 5881 gccgggtgat gggcgggttg atgggcccgt tgatgggccc gttgatgggc gggttgatgg  
 5941 gccgggtgat gggcgggttg atgggcccgt tgatgggccc gttgatgggc gggttgatgg  
 6001 gccgggtgat gggcgggttg atgggtcctg ctccctccc tctgctcct cccttctg 40

6061 ctctccccct tctgtctcct ccccttctctg ctctccccct tctgtctcct ccccttctctg  
 6121 ctctccccct tctgtctcct ccccttctctg ctctccccct tctgtctcct ccccttctctg  
 6181 ctctccccct tctgtctcct ccccttctctg tacgtcacta ccgctactgt cactaccgga  
 6241 ctctccccct tccgcttccg gccacgcccc ttccgggtgag ccccagcata gcagtgagcc  
 6301 ccagcatagc agtgacgtca ctttgacccc cccctttaga ccacgcccc ctattcaaat  
 6361 ggggggggga gacgcgggct gggggggcca ggctctctct cgggcgcggg cccgtgacct  
 6421 ttgaccagat atggccccgg gccaggtctt ctctcgggcg cgggcccgtg acccttgacc  
 6481 agatatggcc cggggccagg ctctctctctg ggcgcgggcc cgtgacctt gaccagatat  
 6541 ggcccggggc caggctctct ctcgggcgcg ggcccgtgac ccttgaccag atatggcccc  
 6601 gggccaggct ctctctcggg cgcgggcccc tgacccttga ccagatatgg cccggggcca  
 6661 ggctctctct cgggcgcggg cccgtgacct ttgaccagat atggccccgg gccaggtctt  
 6721 ctctcgggcg cgggcccgtg acccttgacc agatatggcc cggggccagg ctctctctctg  
 6781 ggcgcgggcc cgtgacctt gaccagatat ggccccgggc caggctctct ctcgggcgcg  
 6841 ggcccgtgac ccttgaccag atatggcccc gggccaggct ctctctcggg cgcgggcccc  
 6901 tgacccttga ccagatatgg cccggggcca ggctctctct cgggcgcggg cccgtgacct  
 6961 ttgaccagat atggccccgg gccaggtctt ctctcgggcg cgggcccgtg acccttgacc  
 7021 agatatggcc cggggccagg ctctctctctg ggcgcgggcc cgtgacctt gaccagatat  
 7081 ggcccggggc caggctctct ctcgggcgcg ggcccgtgac ccttgaccag atatggcccc  
 7141 gggccaggct ctctctcggg cgcgggcccc tgacccttga ccagatatgg cccggggcca  
 7201 ggctctctct cgggcgcggg cccgtgacct ttgaccagat atggccccgg gccaggtctt  
 7261 ctctcgggcg cgggcccgtg acccttgacc agatatggcc cggggccagg ctctctctctg  
 7321 ggcgcgggcc cgtgacctt gaccagatat ggccccgggc caggctctct ctcgggcgcg  
 7381 ggcccgtgac ccttgaccag atatggcccc gggccaggct ctctctcggg cgcgggcccc  
 7441 tgacccttga ccagatatgg cccgggttaga gagagactgg gttcagaaga gccagagtgg  
 7501 gtctgtaaag acaagggagt gggacgcggg tgggtgggaag tggctcaaca ccgtggcccc  
 7561 agatggttgg ggagggggaa aatgggggaa atatagtaa ctagtact actggtacta  
 7621 ttccacgggt atagcatttc taagctggtc cgaggaggag agtagaaagg actcaatgtg  
 7681 tccatttgtg tgatataatag tctgtgacct ctagttaaac tactgccatt agtttctccc  
 7741 cactatatgc tcagcttgtc tataaccgcg tcacactcag gaggttaggt gtgctaatag  
 7801 gccaatcggg gggggggggg ggtgtggtgg taaatagcgg catccccct agagcagata  
 7861 aactggagtt taatagggtt agggcagggg gctagggcag ggggctaggg cagggggcta  
 7921 gggcaggggg ctagggcagg gggctagggc agggggctag ggcagggggc tagggcaggg  
 7981 ggctagggca gggggctagg gcagggggct agggcagggg gctagggcag ggggctaggg  
 8041 cagggggcta gggcaggggg ctagggcagg gggctagggc agggggctag ggcagggggc  
 8101 tagggcaggg ggctagggca gggggctagg gcagggggct agggcagggg gctagggcag  
 8161 ggggctaggg cagg

10

20

30

40

【表 6】

配列番号：2 (ウマヘルペスウイルス1型前初期タンパク質、  
1487アミノ酸)

```

1   masqrdfap dlydfiesnd fgedpliraa saaeegftcp aapdllygsq nmfgvddapl
61  stpvvviPPP spapeprgk akrpsaags ggpptpaaaa qpaspapspa pglamlkmv
121 hssvapgngr ratgssspgg gdaadpvald sdtetcpqsp qfefpssasp gggspaprvr
181 sisissssss sssmdeeddqa dgagasssss sssdsdsde ggeeetprpr hsqnaaktps
241 aagspgpssg gdrpaagaat pkscrsgaas pgapapapas apapsrpggg llppgarile
301 ylegvreanl aktlerpepp agmasppgrs phrlpkdgrp ksalagaskr kranprprpq
361 tqtqapaeaa pqtavwdlld mnssqatgaa aaaasapaaa scapgvvyqre plltpsgdpw
421 pgsdpppmgr vryygtgdsr dglwddpeiv laasryaeaq apvpvfvpem gdstkqynal
481 vzwvfesrea mswlqnskls ggdqnlagfc qkfihaprgh gsfitgsvan plphigdama
541 agnalwalph aaasvamsrr ydrtqksfil qslrrayadm ayprdeagrp dsLaavagcp
601 aqaaaaaasq qgpeapapsv rvreaytrvc aalgprkaa aaaaapgtra prpsafrlre
661 lgdacvlacq avfeallrlr ggasavpgld pseipspacp pealcsnpag letaalslye
721 lrdlverarl lgdsdpthrl gsdelrlavr avlvvartva plvrynaega rarasawtvt
781 qavfsipslv ggmigeavsl laptrsqqp sssspgqepf sgsaaaegsl qtlpplwptv
841 pgkqsatvps shsqspqhsq sgggagatta tccratqtna rrrgqghqpq karspqaaas
901 pahlsqeamp gssddraih grprgksgkr rseplepaaq agasafsss argydpsgpv
961 dsppapkrrv atpghqapra lgpmpaegpd rrggfrvpr gdchtprpsd aacaaycppe
1021 lvaelidnql fpeawrpalt fdpqalata arcspppard garlgelaas gplrarraawm
1081 hqipdpedvk vvlvysplqd edllgglpas rpggsrrepl wsdlkglisa llaalgnril
1141 tkrshawagn wtgapdvsal naqgvlllst gdlaftgcve ylclrlgsar rkllvlldavs
1201 tedwpqdgpa isqyhiymra altprvacav rwpgerhlsr avltsstlfg pglfaraeaa
1261 farlypdsap lrlcrssnva ytvdrager trvplaprey rqrvlpdydg ckdmrageeg
1321 lghfdpfdfee gaaqshraan rwlglawlrp vylacgrrga gavepselli pellsefcrv
1381 allepdaeae plvlpiteap rrrraprvdwe pgfgsrstsv lhmgatelcl pepddeleid
1441 gagdvelvve hpgpspgvaq alrrapikie vvsddedggd wcnpyls

```

## 【表7】

配列番号：3 5' CCTTCCCTTCTCGGTCTT3'

## 【表8】

配列番号：4 5' CTCCACCCCGAACATGTT3'

## 【表9】

配列番号：5 5' GGGTAACGCCAGGGTTTT3'

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1はEHV-1ゲノムの構造と前初期遺伝子の位置を示す。EHV-1ゲノムの概略を上図に示す。図の下部にIEタンパク質(1,487アミノ酸)の機能的ドメインを示す：トランス活性化ドメイン(TAD、aa3~89)、セリンリッチドメイン(SRT、aa181~220)、DNA結合ドメイン(DBD、aa422~597)、核移行シグナル(NLS、aa963~970)。

## 【図2】

図2はIE遺伝子に変異を生じさせるための組換え系を示す。左図：コンストラクトpIEカセットは、IE遺伝子の5'側部位を含んでいる。一箇所しかないNcoI及びNaeI制限酵素部位によって、3~89番目のアミノ酸を含む変異TADをコードする配列のクロニングが容易になる。右図：コンストラクトpBR322IEは、IEのORF全域を含む。変異TADを含む、さまざまなpIEカセットコンストラクトから得られたEcoRV/BamHI断片を簡単にpBR322IEにクロニングして、IEタンパ

ク質の変異型をコードするORFを再構築した。または、野生型配列をさまざまな変異配列で置き換えて、さまざまなドメインを交換した。このベクターを用いて、組換えウイルスを作出した。組換えプラスミドをIE13.1細胞に形質移入し、移入してから24時間後にKyA IEを重感染させた。上清をRK-13細胞上でスクリーニングして、補完IEタンパク質不在で増殖可能なウイルスを調べた。

【図3】

図3はEHV-1変異株のウエスタン解析結果を示す。図A、感染効率(MOI)10でEHV-1のKyA(レーン1)、KyAd644/824(レーン2)、KyAn1411(レーン3)、またはKyAIn1411(レーン4)に感染したRK-13細胞から得られた感染細胞抽出物(ICE)。ICEにSDS-PAGEを行い、タンパク質をニトロセルロース上にプロットし、ポリクローナル抗IEペプチド抗体で染色した。レーン1、3、及び4では、IEタンパク質に相当する200-kDaのバンドがはっきりと検出された。KyAd644/824に感染した細胞から得られた175-kDaのバンドがレーン2に見える。図B：レーン1は、EHV-1 KyAに感染したRK-13細胞の核抽出物において検出された200-kDaのIEタンパク質のバンドを示している。レーン2は、KyAn1029に感染したRK-13細胞の核抽出物で検出された138-kDaのIEタンパク質のバンドを示している。

10

【図4】

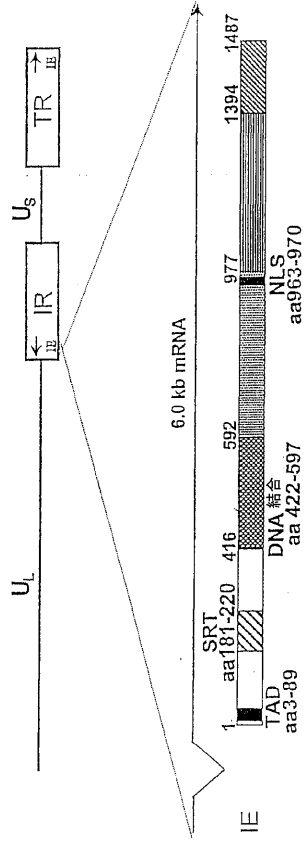
図4は選択されたIE変異ウイルスの増殖解析結果を示す。RK-13細胞に野生型EHV-1 KyAまたは選ばれたEHV-1 IE変異ウイルスを感染効率1で感染させ、ウイルスを付着させるため、5%CO<sub>2</sub>中37℃で1時間インキュベートした。付着後、FBS無添加のイーグル培地で細胞を3回洗浄して、付着しなかったウイルスを除去し、5%CO<sub>2</sub>中37℃でインキュベートした。付着期間後所定の時間に、RK-13細胞を用いたブランクアッセイ法によって、培養上清中のウイルス力価を測定した。

20

【図5】

図5A~5Cは、野生型EHV-1、またはIE遺伝子に変異をもつEHV-1によって免疫されたCBAマウスから単離したリンパ球のCTL活性を解析した結果を示す。

【 図 1 】



【 図 2 】

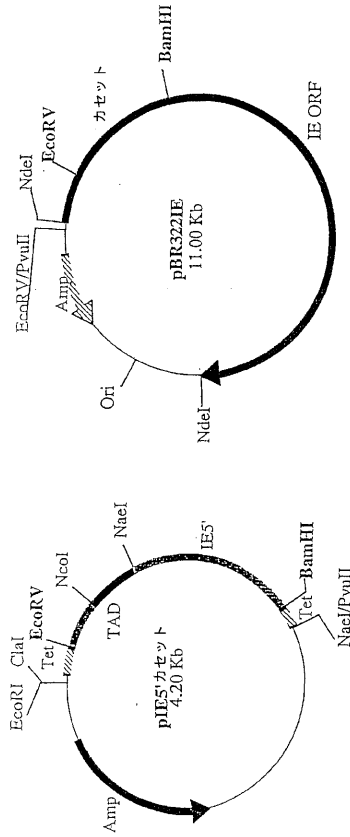


Fig. 1

Fig. 2

【 図 4 】

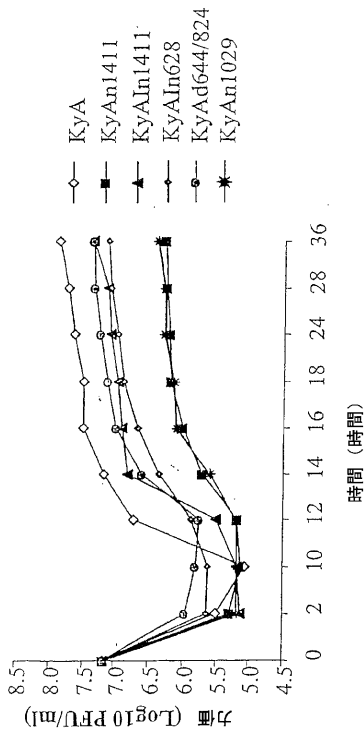


Fig. 4

【 図 5 】

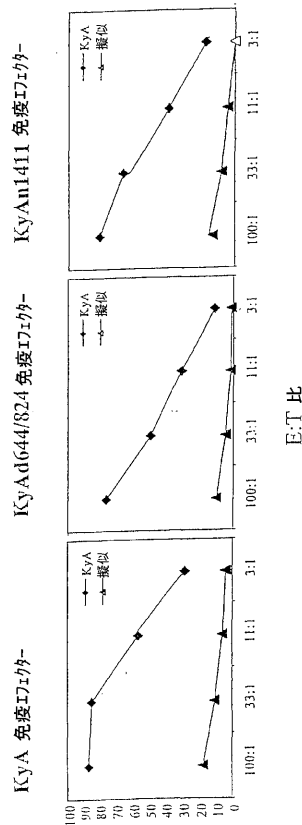


Fig. 5A

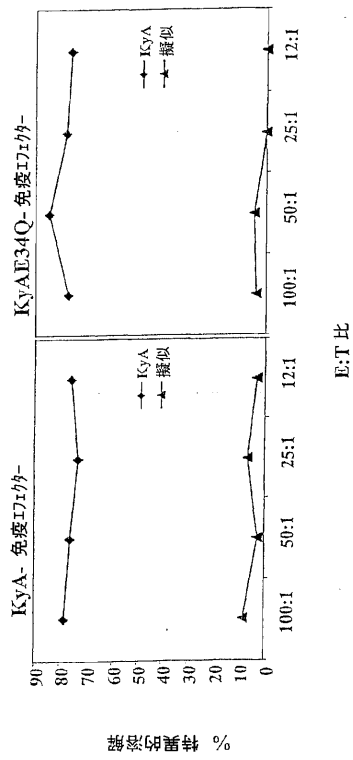


Fig. 5B

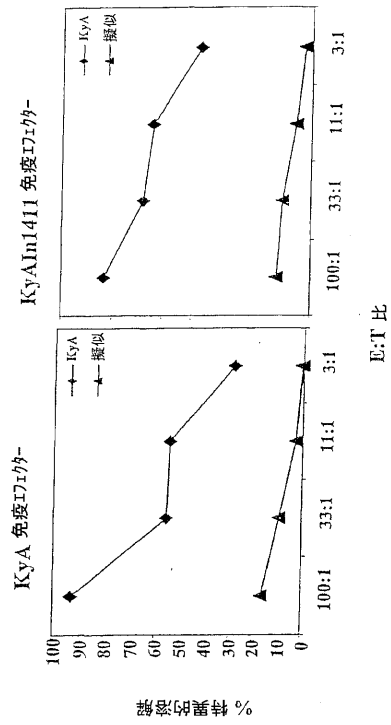


Fig. 5C

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/09750 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 39/12 (74) Agent: GROLZ, Edward, W., Scully, Scott, Murphy & Presser, 400 Garden City Plaza, Garden City, NY 11530 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/23612
- (22) International Filing Date: 27 July 2001 (27.07.2001) (81) Designated States (national): AU, CA, JP, MX, NZ.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/626,748 27 July 2000 (27.07.2000) US Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (71) Applicant: RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES, INC. [US/US]; 101 N. Wilmot Road, Suite 600, Tucson, AZ 85711-3355 (US).
- (72) Inventor: O'CALLAGHAN, Dennis, J.; 5615 Willow Crest Drive, Shreveport, LA 71119 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/09750 A2

(54) Title: VACCINES FOR EQUINE HERPESVIRUS TYPE-1: VIRUSES HARBORING MUTATIONS WITHIN THE IMMEDIATE EARLY GENE

(57) Abstract: This invention relates to mutant Equine herpesvirus type-1 (EHV-1) isolates, and in particular, EHV-1 isolates carrying mutations in the immediate-early (IE) gene of the viral genome. A panel of EHV-1 mutant isolates have been described. Preferred EHV-1 isolates are those which are replication-competent and nonpathogenic. The mutant EHV-1 isolates of the present invention are useful in formulating vaccine compositions for preventing and treating EHV-1 infections in horses. The present invention further provides methods of determining the pathogenicity of an EHV-1 virus present in a horse subject which has been previously immunized with a non-pathogenic EHV-1 isolate of the present invention.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

5                    Vaccines For Equine Herpesvirus Type-1:  
                    Viruses Harboring Mutations Within the Immediate Early Gene

10                    This invention relates to mutant Equine herpesvirus  
                    type-1 (EHV-1) isolates, and in particular, EHV-1 isolates  
                    carrying mutations in the sole immediate-early (IE) gene of  
                    the viral genome. The present invention further relates to  
                    vaccine compositions and methods of treating EHV-1 infections.  
15                    Methods of determining the pathogenicity of an EHV-1 virus are  
                    also provided.

                    Equine herpesvirus type-1 (EHV-1) is a major  
                    pathogen in horses. In infected animals, it is usually  
20                    associated with upper respiratory tract infections, but may  
                    also cause neurological sequelae. EHV-1 infection in pregnant  
                    mares causes abortigenic disease and has an important economic  
                    impact on the worldwide equine industry.

                    Although the horse is the natural host of the equine  
25                    herpesviruses, a variety of animals and tissue culture systems  
                    can be used to propagate the viruses. Experimental animals  
                    for EHV-1 include Syrian hamsters, baby hamsters, chick  
                    embryos, baby and adult mice, and kittens. Primary tissue  
                    culture systems used to propagate EHV-1 include cells from a  
30                    variety of equine tissues such as fetal lung, dermis, spleen  
                    and kidney, as well as cells from domestic cats, dogs,  
                    hamsters, rabbits, mice, sheep and swine. In the laboratory,

WO 02/09750

PCT/US01/23612

permanent tissue culture systems commonly used to cultivate EHV-1 include HeLa, Vero, CV-1, rabbit kidney (RK), mouse L-M and equine Edmin337 cells.

Natural respiratory EHV-1 infection of the horse only results in a short-lived humoral response and does not confer long-term protection against subsequent infection. A number of vaccines have been developed to combat EHV-1 infections, among them inactivated vaccines which mostly contain both EHV-1 and EHV-4 (Pneumabort K™, Resequin™, Prestige™ and Duvaxyn™), modified live vaccines (Rhinomune™ or Prevaccinol™) and subunit vaccines (Cavalon IR™). However, some EHV vaccines cause undesirable side effects, and most do not afford acceptable levels of protection. There is a need for safe and effective vaccines against EHV-1 infection.

The present invention is directed to mutant equine herpesvirus type-1 (EHV-1) isolates carrying one or more mutations in the immediate-early (IE) gene of the viral genome.

In particular, the present invention provides EHV-1 isolates carrying in the IE gene of the viral genome, at least one of the mutations listed in Table 1.

In a preferred embodiment, the present invention provides replication-competent EHV-1 isolates carrying one or more mutations in the IE gene.

In particular, the mutation in the IE gene does not significantly interfere with the structure and/or function of any of the four domains of the IE protein, TAD (aa 1-89), SRT (aa 181-220), DBD (aa 422-597) and NLS (aa 963-970), which are essential for viral replication.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

In this embodiment, the present invention provides replication-competent EHV-1 isolates which carry a mutation in the IE gene that involves a substitution of an amino acid residue within TAD, SRT, DBD or NLS. Preferably, the substitution involves an exchange of amino acids within an exchange group, i.e., amino acids that resemble each other with respect to their overall impact on protein structure. More preferably, the substitution is one of D24N, D20N, F15D, L12E or E34Q.

Particularly preferred mutations include insertions or deletions of one or more, preferably, at least three, more preferably at least five, amino acid residues within amino acid 90-180, 221-421, 598-962, or 971-1487. Most preferred mutations include d644/824 (deletion of aa 644-824), n1029 (nonsense mutation at 1029 and deletion of aa 1030-1487), n1411 (nonsense mutation at 1411 and deletion of aa 1411-1487), in628 (insertion at 1411) and in1411 (insertion at 1411).

In a preferred embodiment, the present invention provides replication-competent EHV-1 isolates which carry one or more mutations in the IE gene and which have reduced virulence or no virulence, also referred herein as "non-pathogenic" EHV-1 isolates.

Non-pathogenic, replication competent EHV-1 isolates can be of an EHV-1 strain such as KyA, KyD, Ab4, Ab1, RacL11, RacH and RacM wherein one or more mutations have been introduced into the IE gene of the viral genome. Preferred mutant EHV-1 isolates are KyA mutant isolates.

The present invention is further directed to immunogenic compositions which include one or more of the non-

WO 02/09750

PCT/US01/23612

pathogenic, replication-competent mutant EHV-1 isolates described herein.

The present invention further provides methods of stimulating an immune response against EHV-1 in a horse subject by administering to the horse an immunogenic composition of the present invention.

Still further the present invention is directed to live attenuated vaccine compositions which include one or more of the non-pathogenic, replication-competent mutant EHV-1 isolates described herein.

Still even further, the present invention provides methods of treating EHV-1 infections in a horse by administering to the horse subject, a therapeutically effective amount of a non-pathogenic, replication-competent mutant EHV-1 isolate of the present invention.

Yet even further, the present invention provides methods for determining the pathogenicity of an EHV-1 strain present in a subject previously vaccinated with a non-pathogenic EHV-1 isolate of the present invention. The determination is achieved by carrying out assays which distinguish the wild type EHV-1 and the non-pathogenic EHV-1 isolate previously administered to the subject.

25

**Figure 1** depicts the structure of the EHV-1 genome and location of the immediate-early gene. A schematic of the EHV-1 genome is shown at the top. The lower portion of the figure depicts the functional domains of the IE protein (1,487 amino acids): the transactivation domain (TAD, aa 3-89), a serine rich tract (SRT, aa 181-220), the DNA-binding domain

WO 02/09750

PCT/US01/23612

(DBD, aa 422-597), nuclear localization signal (NLS, aa 963-970).

**Figure 2** depicts the recombination system to generate mutations in the IE gene. *Left panel:* Construct pIECassette contains the 5' portion of the IE gene. Unique NcoI and NaeI restriction sites facilitate the cloning of sequences encoding mutagenized TADs spanning amino acids 3-89. *Right panel:* Construct pBR322IE contains the entire IE ORF. EcoRV/BamHI fragments from various pIECassette constructs containing mutagenized TADs were easily cloned into pBR322IE to reconstitute an ORF that encodes a mutant form of the IE protein. Alternatively, various domains were swapped, replacing the wild-type sequences with various mutagenized sequences. This vector was used to generate recombinant viruses. Recombination plasmids were transfected into IE13.1 cells which were superinfected with KyAAIE at 24 h post-transfection. Supernatants were screened on RK-13 cells for viruses that were able to propagate in the absence of complementing IE protein.

**Figure 3** depicts the Western analyses of EHV-1 mutants. *Panel A*, infected-cell extracts (ICE) derived from RK-13 cells infected with EHV-1 KyA (Lane 1), KyAd644/824 (Lane 2), KyAn1411 (Lane 3), or KyAIn1411 (Lane 4) at an MOI of 10. ICE were subjected to SDS-PAGE, and the proteins were blotted to nitrocellulose and were stained with the polyclonal anti-IE peptide antibody. The 200-kDa band representing the IE protein was clearly detected in Lanes 1, 3, and 4. The 175-kDa band derived from KyAd644/824-infected cells is shown in Lane 2. *Panel B*, Lane 1 shows the 200-kDa IE protein band detected in nuclear extracts of RK-13 cells infected with EHV-

WO 02/09750

PCT/US01/23612

1 KyA. Lane 2 shows the 138 kDa IE protein band detected in nuclear extracts of RK-13 cells infected with KyAn1029.

Figure 4 depicts the growth analyses of selected IE mutant viruses. RK-13 cells were infected with either wild-type EHV-1 KyA or selected EHV-1 IE mutant viruses at an MOI of 1 and incubated for 1 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> to permit virus attachment. After attachment, the cells were washed three times with Eagle's without FBS to remove unattached virus and were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. At the times indicated after the attachment period, virus titers in the culture supernatant were determined by plaque assay using RK-13 cells.

Figure 5A-5C depict the analysis of the CTL activity of the lymphocytes isolated from CBA mice immunized with wild type EHV-1 or EHV-1 containing mutations in the IE gene.

15

One aspect of the present invention is directed to novel mutant equine herpesvirus type-1 (EHV-1) isolates carrying one or more mutations in the immediate-early (IE) gene of the viral genome.

20

EHV-1 has a linear, double-stranded DNA genome, characterized by short and long unique sequences (U<sub>s</sub> and U<sub>L</sub> respectively), and inverted repeats which flank the unique short sequences. The entire genome of EHV-1, strain Ab4, has been sequenced and shown to be 150,223 bp in size and contain 80 potential open reading frames (ORFs).

25

The IE gene is the sole immediate-early gene of EHV-1 and is present in both inverted repeats of the viral genome. The open reading frame (ORF) of the IE gene (SEQ ID NO: 1) is transcribed to a 6.0-kb spliced mRNA that gives rise to both structurally and antigenically-related protein species

30

WO 02/09750

PCT/US01/23612

(Caughman et al. *Virology* 163:563-571, 1988). The predominant IE protein species of 1,487 amino acids (SEQ ID NO: 2) is comprised of discrete, functional domains (Figure 1). A potent transcriptional activation domain (TAD) maps within the first 89 amino acids. A serine rich tract (SRT; aa 181-220) may contain a site(s) for phosphorylation. The DNA-binding function lies within amino acid residues 422-597. Amino acids spanning 963-970 (NLS) are necessary for nuclear localization of the protein.

The IE protein is essential for viral growth in cell culture and is required for both early and late gene expression during the course of a productive infection (Smith et al. *J. Virol.* 66:936-945, 1992). Following IE polypeptide synthesis, approximately 45 early transcripts can be detected. Three of these early proteins serve as regulatory proteins and are designated EICP22, EICP27 and EICP0. Early gene expression is followed by the production of approximately 29 late transcripts and viral replication, after which mature virions are generated.

The term "mutation" as used herein includes substitution, deletion or insertion of one or more base pairs in the IE coding sequence which results in a substitution, deletion or insertion of one or more amino acid residues in the IE protein.

According to the present invention, EHV-1 isolates carrying mutations in the IE gene can be generated by a recombination system provided herein. In accordance with such system, mutations in the IE gene can be generated by employing any of the myriad recombinant cloning techniques, e.g., those described in *Current Protocols in Molecular Cloning* (Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York). A mutant IE nucleotide

WO 02/09750

PCT/US01/23612

sequence carrying one or more mutations is then placed on a recombination vector appropriate for transfection and transfected into an appropriate host cell, e.g., RK-13 cells. Transfected host cells are then infected with a null EHV-1 virus devoid of the IE gene. Mutant viruses are thus generated by homologous recombination between the genome of the null virus and the recombination vector containing the mutant IE gene. Null EHV-1 viruses for use in this recombination system can be generated using any EHV-1 strain, e.g., KyA, KyD, Ab4, Ab1, RacL11, RacH and RacM. A deposit of the EHV-1 KyA strain was made with the American Tissue Type Culture, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, on July 20, 2000 (ATCC deposit # PTA-2253). Null virus of strain KyA, i.e., KyAΔIE, has been generated as described by Garko-Buczynski et al. (*Virology* 248: 83-94, 1998). By way of this recombination system, mutant EHV-1 isolates carrying identical or different mutations in the two copies of the IE gene can be generated. Preferably, the mutant EHV-1 isolates of the present invention carry identical mutation(s) in both copies of the IE gene in the viral genome.

One embodiment of the present invention provides EHV-1 isolates carrying in the IE gene of the viral genome, at least one of the mutations listed in Table 1.

25

Table 1

Deletion Mutations	Nature of Mutation	Domain Affected
ASRT1	aa 181-250 deleted	Deletion of SRT
ASRT2	aa 88-243 deleted	Deletion of SRT
d178/627	aa 178 to 627 deleted	Deletion of SRT and DBD
d552/897	aa 552 to 897 deleted	Deletion of part of DBD

WO 02/09750

PCT/US01/23612

d644/824 aa 644 to 824 deleted

**Nonsense Mutations**

n627 aa 628-1487 deleted Deletion of NLS and C-term

n951 aa 952-1487 deleted Deletion of NLS and C-term

n1029 aa 1030-1487 deleted Deletion of C-term

n1411 aa 1412 - 1487 deleted Deletion of C-term

**Insertion Mutations**

in628 insertion at aa 628

in1411 insertion at aa 1411

**Point Mutations: Amino Acid Substitutions**

D24N Asp 24 to Asn Point mutation in TAD

D20N Asp 20 to Asn Point mutation in TAD

F15D Phe 15 to Asp Point mutation in TAD

L12P Leu 12 to Pro Point mutation in TAD

L12E Leu 12 to Glu Point mutation in TAD

E34Q Glu 34 to Gln Point mutation in TAD

In a preferred embodiment, the present invention provides mutant EHV-1 isolates that are replication-competent.

The term "replication competence" as used herein refers to the ability of a viral isolate to propagate in a host cell in the absence of a complementing IE protein expressed in trans.

According to the present invention, the replication competence of a mutant viral isolate can be determined by a number of assays, e.g., a plaque assay using non-complementing cells (cells that do not express IE protein). In this assay, cells of a monolayer are infected with a mutant isolate of interest and are subsequently overlaid with 2% agarose mixed in a 1:1 ratio with appropriate growth medium. Host cells which can be employed for this purpose include cells from a

WO 02/09750

PCT/US01/23612

variety of equine tissues such as fetal lung, dermis, spleen and kidney, as well as cells from domestic cats, dogs, hamsters, rabbits, mice, sheep and swine. Typically, cells commonly used to cultivate EHV-1 in tissue culture are used, including HeLa, Vero, CV-1, rabbit kidney (RK), mouse L-M and equine Edmin337 cells. Preferably, RK-13 cells are used in the assay.

A mutant viral isolate is "replication competent" if such mutant isolate can form plaques on the non-complementing cells, even if the plaques may be of a smaller size than those formed by wild type EHV-1. Replication-incompetent cells can only form plaques in complementing cells where the IE protein is expressed in trans e.g., IE13.1 cells.

According to the present invention, four domains of the IE protein, TAD (aa 1-89), SRT (aa 181-220), DBD (aa 422-597) and NLS (aa 963-970), are essential for viral replication. Thus, mutations in the IE gene that significantly interfere with the structure and/or function of these four domains likely produce replication incompetent viral isolates. For example, a deletion of five or more contiguous amino acid residues within any of these four domains of the IE protein is likely disruptive to the function of such domain, and the resulting mutant virus is likely to be replication-incompetent. However, substitution of one or more amino acid residues to residues similar in size and/or hydrophobicity can be less disruptive to the structure and/or function of the respective domain and thus, the resulting mutant virus can still be replication-competent.

Accordingly, one embodiment of the present invention provides replication-competent EHV-1 isolates harboring at least one mutation in the IE gene, wherein the mutation is a

WO 02/09750

PCT/US01/23612

substitution at a residue anywhere within TAD (aa 1-89), SRT (aa 181-220), DBD (aa 422-597) or NLS (aa 963-970) and wherein the mutation does not substantially disrupt the function of the IE protein in viral replication.

5           Although not limited to any specific formula, a preferred substitution according to the present invention can be between amino acids within an exchange group, i.e., amino acids that resemble each other with respect to their overall impact on protein structures. For example, aromatics Phe, Tyr  
10 and Typ form an exchange group; the positively charged residues Lys, Arg and His form an exchange group; the large aliphatic non-polar residues Val, Leu and Ile form an exchange group which also contains the slightly polar Met and Cys. All  
15 small residues Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, as well as Glu, Gln and Pro are also within an exchange group.

More preferably, the substitution is one of D24N, D20N, F15D, L12E or E34Q. Even more preferably, the mutant EHV-1 isolates carrying one or more of these substitutions are of a strain selected from KyA, KyD, Ab1, Ab4, RacL11, RacM or  
20 RacH. Particularly preferred mutant EHV-1 isolates are KyAD24N, KyAD20N, KyAF15D, KyAL12E and KyAE34Q.

In another preferred embodiment of the present invention, the replication-competent mutant EHV-1 isolates harbor a mutation that is localized outside of any of the four  
25 domains described above and does not cause any substitution, deletion or insertion within any of the TAD (aa 1-89), SRT (aa 181-220), DBD (aa 422-597) and NLS (aa 963-970) domains.

Particularly preferred mutations include insertions or deletions of one or more, preferably, at least three, more  
30 preferably at least five, amino acid residues within the region of amino acid 90-180, 221-421, 598-962, or 971-1487.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

Most preferred mutations include d644/824 (deletion of aa 644-824), n1029 (nonsense mutation at 1029 and deletion of aa 1030-1487), n1411 (non-sense mutation at 1411, and thus deletion of aa 1411-1487), in628 (insertion at 1411) and  
5 in1411 (insertion at 1411). The mutant EHV-1 isolates carrying one or more of these mutations are preferably of a strain selected from KyA, KyD, Ab1, Ab4, RacL11, RacM or RacH, and more preferably, KyA.

In a preferred embodiment, the present invention  
10 provides replication-competent mutant EHV-1 isolates that have reduced virulence or no virulence, also referred herein as "non-pathogenic" or "attenuated" EHV-1 isolates.

The term "virulence" or "pathogenicity" as used herein refers to the capacity of a strain of EHV-1 to induce  
15 EHV-1-related diseases in horses, e.g., infection in the respiratory tracts, spontaneous abortions as well as neurological diseases. Infections caused by pathogenic EHV-1 are typically characterized by fever, profuse nasal discharge and congestion of the nasal mucosa. Accordingly, a "non-  
20 pathogenic" or "attenuated" strain of EHV-1, or an EHV-1 strain with "reduced virulence" as used herein is a strain having a substantially reduced capacity, as compared to a pathogenic EHV-1, in inducing the development of EHV-related clinical diseases.

25 According to the present invention, the pathogenicity of an EHV-1 isolate can be conveniently determined in mouse models. Clinical signs of EHV-1 infection in mice include, e.g., ruffled fur; loss of body weight, labored breathing, lethargy and huddling, as described by,  
30 e.g., Colle et al. Virus Res. 43: 111-124 (1996) and Zhang et al. Virus Res. 56: 11-24 (1998). In addition, the degree of

WO 02/09750

PCT/US01/23612

infection can also be assessed by isolating the viruses from the lungs of infected mice, plating the viruses on RK-13 cell monolayers and determining the number of plaques formed, as described in the Examples that follow.

5 The non-pathogenic mutant EHV-1 isolates of the present invention can be generated by introducing a mutant IE gene into null viruses of a non-pathogenic EHV-1 strain via the recombinant system described herein. Any of those naturally non-pathogenic EHV-1 strains or EHV-1 strains that  
10 are made non-pathogenic by laboratory procedures can be used for generating null-viruses, e.g., KyA, KyD, Ab4, Ab1, RacL11, RacH and RacM. Null viruses of any of these non-pathogenic EHV-1 strains can be generated, e.g., by following the procedure described by Garko-Buczynski et al. (Virology 248:  
15 83-94, 1998).

A preferred EHV-1 strain for use in generating the mutant isolates of the present invention is the EHV-1 KyA strain, a deposit of which was made with the American Tissue Type Culture, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209,  
20 on July 20, 2000 (ATCC deposit # PTA-2253).

Accordingly, preferred non-pathogenic, replication competent mutant EHV-1 isolates of the present invention include KyA isolates carrying at least one mutation in the IE gene, wherein the mutation is a substitution at a residue  
25 anywhere within TAD (aa 1-89), SRT (aa 181-220), DBD (aa 422-597) or NLS (aa 963-970) and wherein the mutation does not substantially disrupt the function of the IE protein in viral replication. Examples of such mutant EHV-1 isolates are KyAD24N, KyAD20N, KyAF15D, KyAL12E and KyAE34Q.

30 Other preferred non-pathogenic, replication competent mutant EHV-1 isolates of the present invention

WO 02/09750

PCT/US01/23612

include KyA isolates carrying at least one mutation in the IE gene, wherein the mutation is localized outside of any of the four domains described above and does not cause any substitution, deletion or insertion within any of the TAD (aa 1-89), SRT (aa 181-220), DBD (aa 422-597) and NLS (aa 963-970) domains. Examples of such mutant EHV-1 isolates are KyAd644/824, KyAn1029, KyAn1411, KyAin628 and KyAin1411.

In a further aspect of the invention, the non-pathogenic, replication-competent mutant EHV-1 isolates of the present invention as described hereinabove are included in immunogenic compositions.

By "immunogenic" is meant the capacity of an EHV-1 isolate in provoking a immune response in a horse subject, either a cellular immune response mediated primarily by cytotoxic T-cells, or a humoral immune response mediated primarily by helper T-cells which in turn activate B-cells leading to antibody production.

The immunogenic compositions of the present invention include at least one, i.e., one or more of the non-pathogenic replication competent mutant EHV-1 isolates described hereinabove. Preferred mutant EHV-1 isolates to be included in the immunogenic compositions include, e.g., an EHV-1 isolate harboring one or more of the mutations D24N, D20N, F15D, L12E or E34Q in the IE gene, or an EHV-1 isolate harboring one or more mutations within aa 90-180, 221-421, 598-962 or 971-1487 of the IE protein. Preferably, the mutant EHV-1 isolates for use in an immunogenic composition of the present invention are of a non-pathogenic EHV-1 strain such as KyA, KyD, Ab4, Ab1, RacL11, RacH and RacM. Particularly preferred mutant EHV-1 isolates for use in an immunogenic

WO 02/09750

PCT/US01/23612

composition include KyAD24N, KyAD20N, KyAF15D, KyAL12E, KyAE34Q, KyAd644/824, KyAn1411 and KyAin1411.

The immunogenic compositions of the present invention can also include additional active ingredient such as other immunogenic compositions against EHV-1, e.g., those described in U.S. Patent 5,707,629 ("Immunogenic composition against equine herpesvirus type 1") and U.S. Patent 5,795,578 ("Vaccine against equine herpesvirus type 1), or immunogenic compositions against EHV-4.

In addition, the immunogenic compositions of the present invention can include one or more pharmaceutically-acceptable carriers.

As used herein "a pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvant, vaccine stabilizing agents, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents such as sugar and sodium chloride, adsorption delaying agents, and the like. The use of such media gents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, use thereof in the immunogenic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

The immunogenic compositions of the present invention can made in forms suitable for injectable use, e.g., in the form of sterile aqueous solutions or dispersions, or can be made in lyophilized forms using vacuum-drying and freeze-drying techniques. Lyophilized vaccine compositions are typically maintained at about 4°C, and can be reconstituted in a stabilizing solution, e.g., saline or and

WO 02/09750

PCT/US01/23612

HEPES, with or without adjuvant. In all cases the form of the immunogenic compositions must be sterile.

The immunogenic compositions of the present invention can be administered to a horse to induce an immune response against EHV-1. Accordingly, another embodiment of the present invention provides methods of stimulating an immune response against EHV-1 in a horse subject by administering an effective amount of any one of the above-described immunogenic compositions of the present invention.

The amount of an immunogenic composition to be administered to be "effective" in inducing an immune response may depend on the immunogenicity of the particular EHV-1 isolate used in the immunogenic composition. According to the present invention, the immunogenicity of an EHV-1 isolate, i.e., the type and extent of an immune response induced by a viral isolate can be conveniently assessed in mice, which are generally accepted as models representative of horse subjects. A variety of techniques may be used for analyzing the immune responses induced in mice by a viral isolate. For example, one skilled in the art can determine whether a viral isolate induces a cell-mediated immune response by, e.g., detecting the presence of responding CTLs in the mouse spleen or other lymphoid tissues. One skilled in the art can also readily determine whether a viral isolate stimulates a humoral immune response by, e.g., detecting the neutralizing titer of EHV-1 specific antibody in the serum or the presence of antibody secreting cells in the serum. These techniques are well described in the art, e.g., Coligan et al. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc. (1994).

For inducing an immune response, an immunogenic composition of the present invention can be administered to a

WO 02/09750

PCT/US01/23612

horse subject via intravenous, intraperitoneal, intramuscular, or intramucosal (e.g. nasal or respiratory spray or injection) routes, or by other forms of parenteral administration. An immunogenic composition can also be administered via an  
5 implant or orally.

Another embodiment of the present invention is directed to live attenuated vaccine compositions.

More specifically, the vaccine compositions of the present invention include one or more of the non-pathogenic,  
10 replication-competent mutant EHV-1 isolates as described hereinabove.

The infection of a cell or cells by a pathogenic strain of EHV-1 leads to the production of pathogenic virions in the infected subjects and the EHV-1 related diseases. In  
15 contrast, a non-pathogenic EHV-1 strain of the present invention generally replicates to an extent to sufficient to protect the subject against challenge by a virulent or pathogenic EHV-1 strain.

The term "vaccine" as used herein refers to a  
20 composition which prevents or reduces the risk of infection or which ameliorates the symptoms of infection. The protective effects of a vaccine composition against a pathogen are normally achieved by stimulating an immune response in the subject which may involve either or both of cell-mediated or  
25 humoral immune response. The strength and duration of the immune responses induced by an EHV-1 isolate can be taken into consideration in determining the amount of such isolate that should be included in a vaccine composition, as well as the vaccination schedules. Generally speaking, abolished or  
30 reduced incidences of EHV-1 infection, amelioration of the symptoms, or accelerated elimination of the viruses from the

WO 02/09750

PCT/US01/23612

infected subjects are indicative of the protective effects of a vaccine composition.

Preferred non-pathogenic, replication competent mutant EHV-1 isolates which can be used in a vaccine composition include, e.g., an EHV-1 isolate harboring one or more of D24N, D20N, F15D, L12E or E34Q in the IE gene. Preferably, the mutant EHV-1 isolate for use in a vaccine composition is of a non-pathogenic EHV-1 strain such as KyA, KyD, Ab4, Ab1, RacL11, RacH and RacM. Particularly preferred EHV-1 isolates for use in a vaccine composition include KyAD24N, KyAD20N, KyAF15D, KyAL12E and KyAE34Q.

Other preferred non-pathogenic, replication competent mutant EHV-1 isolates which can be used in a vaccine composition include an EHV-1 isolate harboring one or more mutations within aa 90-180, 221-421, 598-962, or 971-1487 of the IE protein, for example, d644-824, ni1411 and in1411. Preferably, the mutant EHV-1 isolate for use in a vaccine composition is of a non-pathogenic EHV-1 strain such as KyA, KyD, Ab4, Ab1, RacL11, RacH and RacM. Particularly preferred EHV-1 isolates for use in a vaccine composition include KyAd644/824, KyAn1411 and KyAin1411.

The vaccine compositions of the present invention can also include additional active ingredient such as other immunogenic compositions against EHV-1, e.g., those described in U.S. Patent 5,707,629 ("Immunogenic composition against equine herpesvirus type 1") and U.S. Patent 5,795,578 ("Vaccine against equine herpesvirus type 1), or immunogenic compositions against EHV-4.

Furthermore, the vaccine compositions of the present invention can include one or more pharmaceutically-acceptable carriers as described hereinabove.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

The vaccine compositions of the present invention can be made in forms suitable for injectable use, e.g., in the form of sterile aqueous solutions or dispersions, or can be made in lyophilized forms using vacuum-drying and freeze-drying techniques. Lyophilized vaccine compositions are typically maintained at about 4°C, and can be reconstituted in a stabilizing solution, e.g., saline or and HEPES, with or without adjuvant. In all cases the form of the vaccine compositions must be sterile.

In another embodiment of the present invention, the above vaccine compositions of the present invention are used in treating EHV-1 infections. Accordingly, the present invention provides methods of treating EHV-1 infections in a horse by administering to the horse subject, a therapeutically effective amount of a non-pathogenic EHV-1 isolate of the present invention.

By "treating" is meant preventing or reducing the risk of infection by a pathogenic strain of EHV-1, ameliorating the symptoms of an EHV-1 infection, or accelerating the recovery from an EHV-1 infection.

The amount of a non-pathogenic EHV-1 isolate that is therapeutically effective may depend on the nature of the isolate, the condition of the horse and/or the degree of infection, and can be determined by a veterinary physician.

In practicing the present methods, a vaccine composition of the present invention can be administered to a horse subject via intravenous, intraperitoneal, intramuscular, or intramucosal (e.g. nasal or respiratory spray or injection) routes, or by other forms of parenteral administration. A vaccine composition can also be administered via an implant or orally. Boosting regimens may be required and the dosage

WO 02/09750

PCT/US01/23612

regimen can be adjusted to provide optimal immunization. The vaccination of a mare prior to breeding and again during her pregnancy may prevent abortions caused by EHV-1. Other horses can be vaccinated, for example, about once a year. Foals can  
5 be vaccinated shortly after birth.

Non-pathogenic, replication competent mutant EHV-1 isolates of the present invention can also have immune protective effects against infections caused by equine herpesvirus type 4 (EHV-4). Thus, the use of the mutant EHV-1  
10 isolates of the present invention in immunogenic or vaccine compositions for preventing or inhibiting EHV-4 infections is also contemplated by the present invention.

The vaccine compositions of the present invention have the additional feature that the non-pathogenic EHV-1  
15 isolate included therein is generally discernable from wild type EHV-1 strains in terms of the composition and size of the IE protein expressed, or the sensitivity of growth to temperature. This feature is useful, e.g., in determining whether a subject tested positive for EHV-1 in certain  
20 laboratory tests carries a pathogenic EHV-1 or a previously inoculated non-pathogenic EHV-1.

Accordingly, in another embodiment, the present invention provides methods of determining the pathogenicity of an EHV-1 strain present in a subject previously vaccinated  
25 with a non-pathogenic EHV-1 isolate of the present invention.

As the methods are premised on a distinction between the wild type EHV-1 and the non-pathogenic EHV-1 isolate previously administered to the subject, the choice of assays for making the distinction depends on the nature of the  
30 mutation of the non-pathogenic EHV-1 isolate.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

When the non-pathogenic viral isolate previously administered to the subject contains a deletion in the IE gene, EHV-1 having d644/824, n1029 or n1411, assays based on detection of IE proteins or antibodies in serum against IE proteins can be employed. For example, infected cells or tissues can be isolated from the subject. Intracellular extracts can be made from such cells or tissues and can be subjected to, e.g., Western Blot analysis, as described in the Examples hereinbelow. The observation of an IE protein of a lower Mw is indicative of the non-pathogenicity of the EHV-1 strain present in the subject. Alternatively, an antibody specific for the deleted portion of amino acid residues can be used in Western Blot, and absence of an IE protein band is also indicative of the non-pathogenicity of the EHV-1 strain present in the subject. Additionally, the absence of antibodies in the serum against the deleted or truncated portion of the IE protein, may also be an indication of the non-pathogenicity of the virus in the subject. The presence or absence of antibodies in the serum of the subject can be determined by using a peptide corresponding to the deleted portion in an appropriate immunoassay, e.g., ELISPOT.

When the non-pathogenic viral isolate previously used in vaccination has a different sensitivity to temperature as compared to wild type EHV-1, temperature shift assays can also be used, as described in the Examples hereinbelow. For example, such assays can be applied in distinguishing wild type EHV-1 from, e.g., EHV isolates having d644/824, n1029, n1411, in1411, D24N, L12E, F15D or E34Q, and in particular, n1029 and n1411. Unlike wide type KyA, KyAn1411 and KyA1029 fail to grow at 39 C. KyA carrying d644/824, in1411, D24N,

WO 02/09750

PCT/US01/23612

L12E, F15D or E34Q has a reduced capacity to grow as compared to wild type KyA.

The determination of the pathogenicity can also be achieved by using nucleic acid-based assays to screen for mutations in the IE gene of the viruses isolated from the subject. These assays include Southern or Northern blot analysis, PCR, and sequencing.

A mutation in the IE gene may result in a reduced expression of another EBV-1 protein, e.g., EICP0 or gD. For example, n1029 causes significant reduction in the mRNA levels of both EICP0 and gD. In this case, detection of the reduced expression of such other proteins, either at the mRNA level or the protein level is indicative of the non-pathogenicity of the virus in the subject.

Any variations of the foregoing assays are also encompassed by the present invention.

The present invention is further illustrated by the following examples.

20

25

WO 02/09750

PCT/US01/23612

Example 1**Materials and Methods**

5 Mouse LM cells were propagated in suspension culture with YELP medium (Eagle's minimum essential medium [EMEM] supplemented with yeast extract, lactalbumin hydrolysate, peptone) containing 0.12% methylcellulose-12, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 5% fetal bovine serum (FBS).

10 Rabbit kidney cells (RK-13) were maintained in complete EMEM supplemented with 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, nonessential amino acids and 5% FBS. Infectious virus was measured by a plaque assay as described by Perdue et al. Virology 59: 201-216 (1974).

15 IE13.1 cells express the IE protein in *trans* and both copies of the IE gene on the viral genome are replaced with LacZ sequences from *E. coli*. Generation and characterization of IE13.1 cells as well as the IE knock-out virus KyAIE were described by Garko-Buczynski et al. Virology  
20 248: 83-94 (1998).

WO 02/09750

PCT/US01/23612

Example 2  
Generation of Mutant Viruses

**Plasmids**

5           A recombination system was established (Figures 1-2)  
so that a panel of mutant viruses could be generated by  
homologous recombination between the KyAΔIE viral genome and  
various recombination vectors derived from plasmid pBR322IE.

To generate the first recombination vector pBR322IE,  
10 pBR322 was digested with *EcoRV* and *PvuII*, and the resulting  
fragment was re-ligated to generate plasmid pBR322E/P. An  
8.0-kb *NdeI* fragment containing the entire IE ORF from nt -215  
to nt +8140 of the IE gene (Grundy et al., *Virology* 172: 223-  
236, 1989) was cloned into the sole *NdeI* site of pBR322E/P to  
15 generate pBR322IE. A second vector, pIECassette, was  
generated by cloning an *EcoRV/BamHI* fragment that harbors nt -  
257 to +1266 of the IE ORF into the *EcoRV/BamHI* sites of  
pBR322.

A "domain swap" strategy was used to generate  
20 recombination plasmids containing mutant IE forms with  
nonsense, insertion, point, or deletion mutations.  
Recombination plasmids pBR322n1411, pBR322d644/824,  
pBR322In628, and pBR322n1029 were generated by digesting  
pBR322IE with *BamHI* and *PvuII* and replacing this fragment with  
25 mutagenized *BamHI-PvuII* IE ORF sequences derived from mutants  
described by Smith et al. *J. Virol.* 69: 3857-3862 (1995).  
Plasmids pBR322d178/627 and pBR322d552/897 were generated by  
digesting pBR322IE with *NcoI* and *PvuII* and replacing this  
fragment with mutagenized *NcoI-PvuII* IE ORF sequences derived  
30 from mutants described by Buczynski et al., *Virus Res.* 65:  
131-140 (1995) and by Caughman et al. *J. Virol.* 69: 3024-3032

WO 02/09750

PCT/US01/23612

(1995). Recombination plasmid pBR322ASRT1 was generated by digestion of pSVIE with *BspEI* (nt 1523 to nt 1733) followed by fill-in with Klenow to generate blunt-ends and insertion of an in-frame 10-mer *EcoRI* linker. To construct the pBR322IEASRT2  
5 vector, plasmid pSVIE was first digested with *HindIII* and *BamHI*, and the resultant *HindIII*-*BamHI* fragment was cloned into the *HindIII*-*BamHI* sites of pUC10 to generate plasmid pUIE. pUIE was digested with *NaeI* and self-ligated to generate plasmid pUIEASRT2. Plasmid pUIEASRT2 was digested  
10 with *NcoI*, and the resultant fragment was cloned into the *NcoI* site of pBR322IE. To generate mutants containing point mutations within the IE transactivation domain (TAD), PCR mutagenesis (Stratagene) was performed utilizing primers harboring the mutation of choice (Oligo's Etc. Wilsonville,  
15 OR; Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). Mutagenized TADs were cloned into the pCR-Blunt vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and were sequenced in their entirety to confirm the presence of the desired mutation. Mutagenized TADs were cloned into unique *NcoI*-*NaeI* sites of  
20 the vector pIECassette. *EcoRV* and *BamHI* fragments housing various mutagenized TADs were then cloned into the *EcoRV*-*BamHI* sites of the pBR322IE vector, thereby generating a reconstituted IE ORF with the mutation of choice. The recombination vectors containing nonsense, insertion, point,  
25 or deletion mutations in the IE gene were used to generate mutant viruses that allowed domains of the IE protein essential for virus replication to be identified.

**DNA Transfections and Production of Mutant Viruses.**

WO 02/09750

PCT/US01/23612

RK-13 cells were transfected with various recombination vectors containing a mutant IE gene, followed by infection with the null virus KyAAIE. Mutant viruses were thus generated by homologous recombination between the KyAAIE viral genome and various recombination vectors containing mutant IE genes.

The recombination vector of choice was transfected into RK-13 cells as follows. RK-13 cells were plated at a density of  $2.5 \times 10^6$  cells per  $25\text{cm}^2$  in complete EMEM and permitted to attach overnight at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . The following day, RK-13 monolayers were subjected to liposome-mediated DNA transfection using Lipofectin reagent (Life Technologies, Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions. More specifically, liposomes were prepared by mixing  $20\mu\text{l}$  Lipofectin reagent with  $230\mu\text{l}$  serum-free EMEM and incubating the mixture at room temperature for 45 min. Up to  $10\mu\text{g}$  DNA prepared in a separate tube containing  $250\mu\text{l}$  serum-free EMEM was gently mixed into the preformed liposome solution. The liposome-DNA mixture was incubated at room temperature for an additional 15 min, and the RK-13 cell monolayers were washed three times with serum-free EMEM. The liposome-DNA solution was added drop-wise to each RK-13 cell monolayer containing 1 ml serum-free EMEM. The cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  for 5 h. Five to ten ml of EMEM supplemented with 5% FBS were added to transfected cells after 5 h, and the cells were further cultured at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ .

At approximately 24 h post-transfection, cells were superinfected at an MOI of 10 with KyAAIE. Cells were monitored for cytopathic effects (CPE), and culture supernatants containing putative recombinant virus were plated

WO 02/09750

PCT/US01/23612

in 10-fold dilutions on confluent IE13.1 cells. IE13.1 cells were overlaid with 2% agarose mixed in a 1:1 ratio with 2X EMEM supplemented with 6% FBS and 1 mM BlueGal (Life Technologies) to distinguish between white and blue plaques. 5 White plaques were picked and subjected to five rounds of plaque purification on IE13.1 cells to ensure the removal of residual KyAΔIE.

**PCR analyses of virus isolates.**

10 Mutant viruses isolated from plaque-purified stocks were subjected to both PCR and DNA sequence analyses using the *lacZ*- or IE-specific to confirm that both IE ORFs of each mutant virus harbored the desired mutation.

Viruses were isolated from culture supernatants by 15 ultracentrifugation in an SW50.1 rotor at 29,000 rpm for 2 h at 4°C. Supernatants were aspirated, and the remaining pellet was resuspended in 50 μl of RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1% NP40) and incubated at room temperature for 1 h with occasional mixing. 20 Resuspended pellets served as templates for PCR analyses. IE-specific DNA fragments were amplified using an IE forward primer (5'CCTTCCCTTCCTCGGTCTT3' (SEQ ID NO: 3); nt 913-930) and an IE reverse primer (5'CTCCACCCCGAACATGTT3' (SEQ ID NO: 4); nt 1155-1138). The *lacZ*-specific DNA fragments were amplified 25 using the IE forward primer (above) and a *lacZ*-specific primer (5'GGGTAACGCCAGGGTTTT3' (SEQ ID NO: 5)) derived from the 5' coding region of the *E. coli lacZ* gene. The mutations were confirmed by sequence analyses using Promega's *fmol* Sequencing System (Madison, WI).

WO 02/09750

PCT/US01/23612

In the case of the mutant viruses, it was found that both copies of the bacterial *lacZ* ORF of KyAAIE parent virus were replaced with the mutated IE ORF derived from the recombination vectors.

5

WO 02/09750

PCT/US01/23612

**Example 3****Expression of Mutant IE Proteins in Infected Cells**

Western blot analyses were performed to confirm that the IE protein was produced in infected cells and was of the predicted size. These analyses were especially important for mutant viruses containing large deletions in the IE gene since these deletions could result in the synthesis of IE proteins that are highly unstable.

Infected cell extracts were prepared according to the protocol described by Garko-Buczynski et al. (*Virology* 248: 83-94, 1998).

Nuclear extracts of EHV-1 infected cells were prepared by a modification of the procedures described by Paterson et al. (*Nuc. Acids. Res.* 16:11005-11025, 1988). RK-13 cells were infected with wild-type EHV-1 or mutant EHV-1 at an MOI of 10. Six h post-infection, cells were scraped into PBS, pelleted, and resuspended into 4 volumes of buffer A (10 mM HEPES [pH 7.0], 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5% NP40, and 0.5 mM TPCK). Cells were incubated 10 min on ice, and the nuclei were pelleted at 14,000 rpm for 5 min in a microcentrifuge. The supernatant was discarded, and the nuclei were resuspended in 2 volumes of buffer B (20 mM HEPES [pH 7.9], 25% glycerol, 0.42 M NaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, and 0.5 mM TPCK) and incubated on ice for 30 min. Nuclear debris was pelleted by centrifugation at 14,000 rpm for 15 min in a microcentrifuge, and supernatants were stored at -80°C.

Total protein in cell or nuclear extracts was determined by use of the bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL). Protein samples of

WO 02/09750

PCT/US01/23612

infected cell extracts were boiled for 5 min with an equal volume of 2X Laemmli sample buffer (10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 20% glycerol, 120 mM Tris-HCl [pH 6.8], 0.001% bromophenol blue). Proteins were separated through a 4% stacking gel and  
5 an 8% resolving gel and were electrophoretically-transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH) at 100V for 1 h at 4°C. After transfer, the membrane was blocked for 1 h at room temperature in TBST buffer (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)  
10 containing 1% gelatin (Sigma). The nitrocellulose membrane was then incubated with a polyclonal anti-IE peptide-specific antiserum (1:1000 dilution), followed by incubation with goat anti-rabbit antibody (Sigma; 1:30,000 dilution) conjugated to alkaline phosphatase. This anti-IE peptide antibody was  
15 generated to a peptide spanning amino acids 425 to 445 of the IE protein and had been demonstrated to be highly reactive to the IE protein in immunofluorescence (IF) and Western blot analyses (Smith et al., *Virology* 202: 760-770, 1994). Each antibody was incubated in TBST containing 0.1% gelatin for 2 h  
20 with shaking, followed by three washes with TBST containing 0.1% gelatin for 15 min with shaking. The reactive proteins were visualized by incubating the membrane in NBT buffer (100 mM Tris-HCl [pH 9.5], 100 mM NaCl, 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33 mg/ml nitroblue tetrazolium [NBT, Gibco-BRL], and 0.165 mg/ml 5-  
25 bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate [BCIP] Gibco-BRL).

In the case of all 17 IE mutant viruses, the mutant IE protein was synthesized in infected RK-13 cells. Representative data for four of the IE mutant viruses are shown in **Figure 3**. In contrast to the wild type IE protein  
30 which migrates on SDS Page as a band at about 190-200 kDa, KyAd644/824 produced an IE protein that migrates at about 180

WO 02/09750

PCT/US01/23612

kDa. Mutant KyAn1029 harbors an IE ORF that lacks sequences encoding the 458 carboxyl terminal residues and thus, its IE gene product migrates at about 138 kDa. With the sole exception of the KyAASRT2 virus, the IE protein generated by each of the other 16 viruses migrated at the predicted molecular weight. The IE ORF of the KyAASRT2 virus lacks sequences encoding amino acids 88-243 and thus its predicted IE protein would migrate at approximately 179 kDa. An IE gene product of this size was detectable but at very low levels. This indicated that only very low titers of this mutant could be obtained. Alternatively, the IE protein encoded by the KyAASRT2 virus could be very unstable.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

**Example 4****Growth of Mutant Viruses on RK-13 Cells**

5 RK-13 cells and IE13.1 cells were infected with  
mutant viruses at a range of dilutions. Infected cells were  
overlaid with 2% agarose mixed in a 1:1 ratio with 2X EMEM  
supplemented with 6% FBS. Plaque formation was observed.

10 A summary of the growth analyses of the 17 mutant  
viruses on RK-13 cells and the complementing IE13.1 cell line  
is depicted in Table 2. Importantly, all mutant viruses were  
capable of replication on the IE13.1 complementing cell line.  
The six viruses containing point mutations within the minimal  
15 IE TAD that maps within amino acids 3-89 were able to grow on  
RK-13 cells. Viruses containing point mutations at highly  
conserved residues within the IE TAD such as at leucine 12 and  
at phenylalanine 15 were able to grow on RK-13 cells.  
Similarly, KyAL12P, which contains a leucine to proline  
substitution at amino acid 12 that would be expected to  
20 severely alter the secondary structure of the IE TAD, was also  
able to propagate on RK-13 cells. Of the mutant viruses that  
contain deletions within the IE ORF, KyAASRT1, KyAASRT2,  
KyAd178/627, and KyA552/897 were unable to grow in the absence  
of the wild-type IE protein produced by the

**TABLE 2**  
**Growth of IE Mutants on RK-13 and IE13.1 Cell Lines**

Virus	Mutation In IE ORF	Virus Growth <sup>a</sup>	
		RK-13 Cells	IE 13.1 Cells
WTKyA	None	Yes	Yes
KyAΔSRT1	SRT Deletion aa 181-250	No	Yes
KyAΔSRT2	SRT Deletion aa 88-243	No	Yes
KyAd178/627	DNA Binding Domain aa 178-627	No	Yes
KyAd552/897	Deleted aa 552-897	No	Yes
KyA644/824	Deleted aa 644-824	Yes	Yes
KyAn627	Nonsense Mutation @ aa 627	No	Yes
KyAn951	Nonsense Mutation @ aa 951	No	Yes
KyAn1029	Nonsense Mutation @ aa 1029	Yes	Yes
KyAn1411	Nonsense Mutation @ aa 1411	Yes	Yes
KyAln628	Insertion @ aa 628	Yes	Yes
KyAln1411	Insertion @ aa 1411	Yes	Yes
KyAD20N	Point Mutation Within the IE TAD	Yes	Yes
KyAD24N	Point Mutation Within the IE TAD	Yes	Yes
KyAL12P	Point Mutation Within the IE TAD	No	Yes
KyAL12E	Point Mutation Within the IE TAD	Yes	Yes
KyAF15D	Point Mutation Within the IE TAD	Yes	Yes
KyAE34Q	Point Mutation Within the IE TAD	Yes	Yes

<sup>a</sup>Table depicts a summary of the growth of various EHV-1 viruses harboring mutations within the IE protein propagated on RK-13 cell line and the IE protein-producing cell line, IE13.1. Viruses that have deletions or mutations within the serine-rich tract, the DNA binding domain, or the NLS failed to grow in the absence of a complementing IE protein.

IE13.1 cell line. Both KyAΔSRT1 and KyAΔSRT2 delete the entire SRT region of the IE protein, although the deletion within the IE ORF of KyAΔSRT2 (residues 88-243) is in very close proximity to the IE TAD and may affect the function and/or conformation of this critical domain. KyAd644/824 contains a deletion within region 3 of the IE protein and demonstrated no defect in growth on RK-13 cells, indicating that this region contains no domains essential for the IE protein to transactivate early genes required for virus replication. In addition to the four deletion mutants described above, mutant EHV-1 that contain nonsense mutations at amino acids 627 and 951 were not able to

WO 02/09750

PCT/US01/23612

replicate on RK-13 cells (both of these mutants lack the nuclear localization signal). Nonsense mutations at amino acids 1411 (KyAn1411) and 1029 (KyAn1029) had no effect on the growth of these viruses on non-complementing cells. However, plaques generated by KyAn1029 were larger than those produced by wild-type KyA, and the appearance of plaques generated by KyAn1029 was delayed as compared to the wild-type KyA virus. Finally, insertion mutations within the IE ORF of KyAIn628 and KyAIn1411 had no deleterious effect on the growth or the phenotype of these mutants on RK-13 cells.

Growth curve analyses were performed to determine whether mutant viruses could grow in RK-13 cells and yield virus titers comparable to those observed with wild-type EHV-1. RK-13 cells were infected with either wild-type EHV-1 or mutant virus at an MOI of 1. Aliquots of the culture supernatants were removed at various times post-infection and analyzed by plaque assay on RK-13 cells. As shown in **Figure 4**, KyAIn1411, KyAIn628, and KyAd644/824 grew to levels comparable to that of wild-type EHV-1. However, the titers of KyAn1411 and KyAn1029 were significantly lower than that of wild-type virus, demonstrating that these deletions within the IE ORF impaired IE function and, ultimately, growth of the virus. This observation is consistent with the recent findings (Buczynski et al., *Virus Res.* 65: 131-140, 1999) that sequences within the carboxyl-terminus of the IE protein are essential for the IE protein to display maximal transactivation function.

**Example 5****Temperature Sensitivity of Mutant Viruses**

To determine whether mutations within the IE ORF affect virus growth at elevated or depressed temperatures, temperature shift experiments were performed. Wild-type EHV-1 or mutant viruses were serially diluted and plated in triplicate onto RK-13 cells. Plates were incubated at 33°C, 37°C, or 39°C for five days and fixed using 10% buffered formalin (Sigma, St. Louis, MO). Following staining with methylene blue, plaques were enumerated to determine plating efficiency at the various temperatures.

Wild-type EHV-1 replicated efficiently at both 33°C and 37°C, but virus yield was reduced by approximately 70% at 39°C. Additionally, the plaque size of wild-type EHV-1 was significantly reduced at 39°C to an extent that the very small plaque size made plating efficiency difficult to calculate. However, differences between the growth of wild-type EHV-1 and mutant viruses on RK-13 cells could be established. Mutant viruses were divided into two groups based on their ability or inability to grow at 39°C (Table 3). Viruses KyAn1029, KyAIn628, KyAn1411 and KyAΔSRT2 were categorized into Group 1 based on a severe impairment of growth in RK-13 cells at 39°C as compared to growth observed for wild-type KyA. Both KyAn1029 and KyAn1411 displayed impaired growth at both at 37°C (Figure 4) and at 39°C (Table 3). Viruses categorized into Group 2 (Table 3), with the exception of KyAIn1411, grew at 39°C, although some impairment of growth was observed. KyAIn1411

WO 02/09750

PCT/US01/23612

was able to grow at 33°C, 37°C and 39°C to levels that appeared to be comparable to those of wild-type EHV-1.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

**TABLE 3**  
**Temperature Sensitive Phenotype**

<b>Group I Mutants</b>		Plaques @ 39°C <sup>a</sup>
KyAn1029	Nonsense Mutation @ aa 1029	None
KyAn1029	Nonsense Mutation @ aa 1029	None
KyAn11411	Nonsense Mutation @ aa 11411	None
KyAln628	Insertion @ aa 628	None
KyAΔSRT2	Deleted aa 88-243	None
<b>Group II Mutants</b>		
KyAd644/824	Deleted aa 644-824	++
KyAln1411	Insertion @ aa 1411	+++
KyAD24N	Point Mutation Within IE TAD	++
KyAL12P	Point Mutation Within IE TAD	++
KyAL12E	Point Mutation Within IE TAD	++
KyAF15D	Point Mutation Within IE TAD	++
KyAE34Q	Point Mutation Within IE TAD	++

<sup>a</sup>Viruses were divided into two groups (I and II) based on their ability or inability to grow at 39°C as compared to wild-type EBV-1. Growth at 39°C scored as comparable to wildtype EBV-1. +++ corresponds to titers that range from 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup>. ++ corresponds to titers that range from 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

Example 6**Molecular Phenotype of Selected Virus Mutants**

Several viral mutants, KyAn1029, KyAn1411, KyAASRT2 and KyAd644/824 were selected for initial studies to define their molecular phenotype.

To characterize the defects of these mutant viruses at the level of gene expression, ribonuclease protection assays (RPA) were performed. The sensitivity of the RPA would allow identification of differences in the levels of expression of the IE gene, the EICP0 gene (an early auxiliary regulatory gene important in the expression of late genes), and the glycoprotein D (gD) gene (an important late gene essential for virus replication). RK-13 cells were mock-infected or infected with wild-type EHV-1, KyAn1029, KyAn1411, KyAASRT2 or KyAd644/824 at an MOI of 10. Cells were harvested at specific times (such as 3, 5, 9 hours) post-infection, and total RNA was isolated using TRIZOL REAGENT (Life Technologies) as per the manufacturer's protocol. For RPA, the RIBOQUANT RNASE PROTECTION ASSAY SYSTEM (Pharmingen, San Diego, CA) was utilized as per the manufacturer's instructions.

Approximately 20 µg of total RNA was used for each reaction of the RPA. Probes for RPA analyses were generated using Promega's (Madison, WI) RIBOPROBE IN VITRO TRANSCRIPTION SYSTEM. For IE probes, plasmid pG3IE was digested with BamHI to generate run-off transcripts. Plasmid pG3IE was constructed by cloning an NheI/DraI fragment containing the entire 4,773-bp IE ORF into the XbaI/SmaI sites of plasmid pGEM-3Z (Promega, Madison, WI). Digested pG3IE plasmid was purified by phenol-chloroform extraction and ethanol

WO 02/09750

PCT/US01/23612

precipitation, and approximately 1 µg of plasmid was used for riboprobe generation as per the manufacturer's instructions. For EICP0-specific probes, plasmid pGEMICP0K (Bowles et al. *J. Virol.* 71:4904-4914, 1997; Bowles et al., *J. Virol.* 74: 1200-1208, 2000) was digested with *NheI*, and run-off transcripts were generated and purified as described above. For glycoprotein D-specific probes, plasmid p72D392 (Zhang et al. *Virus Res.* 56:11-24, 1998) was transcribed directly using the Promega's RIBOPROBE *IN VITRO* TRANSCRIPTION SYSTEM. mRNA levels were quantitated by using the MOLECULAR DYNAMICS PHOSPHOIMAGERY SYSTEM (Sunnyvale, CA).

The levels of gene expression are summarized in Table 4. Analyses of KyAd644/824 by RPA clearly showed that gene expression at all time points was comparable to that obtained for wild-type EHV-1. These data are concordant with data obtained from growth curve analyses in that titers of KyAd644/824 were similar to those obtained for wild-type EHV-1. However, examination of the expression of these representative genes in RK-13 cells infected with KyAn1029, KyAn1411 and KyAASRT2 viruses revealed reduced levels of these viral transcripts especially at later time points during infection. While the expression of the IE gene in KyAn1029-infected cells was unaffected at both 3 and 5 h post-infection, the level of IE mRNA at 9 h post-infection was reduced almost three-fold. Furthermore, EICP0 mRNA synthesis was reduced at all time points tested in KyAn1029-infected cells, suggesting again that the carboxyl-terminus of the IE protein is important for full activity of this regulatory protein. The reduction in EICP0 gene expression also significantly

WO 02/09750

PCT/US01/23612

impacted late gene expression, as seen from the gD mRNA synthesis which was reduced by more than three-fold at late times during infection. Analyses of KyAΔSRT2 gene expression by RPA clearly demonstrated that deletion of the SRT region did not affect IE gene expression, but both EICPO and gD gene expression was reduced to levels barely detectable at 9 h post-infection. Defects in both early and late gene expression irrevocably impaired the virus, thereby making the KyAΔSRT2 virus unable to propagate in RK-13 cells.

**TABLE 4**  
Summary of RPA Analyses

Virus Mutant	%KyA WT mRNA Expression*		
	3hr p.i.	5hr p.i.	9hr p.i.
<b>KyAd644/824</b>			
IE	98%	99%	97%
EICPO	99%	92%	95%
gD	_b	98%	89%
<b>KyAn1029</b>			
IE	99%	92%	34%
EICPO	46%	57%	36%
gD	_b	78%	29%
<b>KyAn1411</b>			
IE	98%	97%	98%
EICPO	98%	88%	86%
gD	_b	85%	80%
<b>KyAΔSRT2</b>			
IE	98%	97%	92%
EICPO	99%	42%	3%
gD	_b	7%	5%

WO 02/09750

PCT/US01/23612

<sup>a</sup> Values shown are depicted as the percent mRNA detected as compared to those obtained for wild-type EHV-1 IE, EICPO, and gD mRNA expression.  
<sup>b</sup> gD is a late gene and no gD transcript was detected at immediate-early times in cells infected with wild-type virus or any of the mutant viruses.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

**Example 7****Testing Mutant Viruses in Mice**

Mutant viruses KyAd644/824, KyAn1411, KyAin1411 and KyAE34Q were tested in mice.

Female CBA (H-2k) mice, 3 to 6 weeks of age, were obtained from Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, Ind., or Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine. Mice were maintained in the Animal Resource Facility of the Louisiana State University Medical Center, Shreveport, in cages equipped with filter tops. All mice were rested for a minimum of 1 week prior to use.

Mice were anesthetized with Halothane (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) and inoculated intranasally (i.n.) with  $2 \times 10^6$  PFU of EHV-1 KyA or a mutant virus in a volume of 50  $\mu$ l. Control mice received 50  $\mu$ l of culture medium alone.

**Attenuation**

Immunized mice were monitored daily for development of clinical signs of EHV-1 infection such as ruffled fur, loss of body weight, labored breathing, lethargy and huddling, as described by, e.g., Colle et al. Virus Res. 43: 111-124 (1996) and Zhang et al. Virus Res. 56: 11-24 (1998). No clinical disease was observed with mice infected with any of the four mutant viruses tested.

In addition, the levels of virus present in the lungs on days 2, 5 and 8 post-innoculation were determined by plaque titration on RK-13 cell monolayers. Virus were isolated from the lung as described by Colle et al. (1996) and by Smith et al. J. Virol. 72: 5366-5372 (1998).

WO 02/09750

PCT/US01/23612

**CTL Response**

To assess primary CTL responses, lymphocytes were isolated from the mediastinal lymph nodes (MLN) 5 days postinoculation, and a single-cell suspension was obtained by pressing the lymphoid tissues through a 60-gauge wire mesh screen. The lymphocytes were washed and cultured ( $10^7$  cells per well) for 3 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in 12-well flat-bottom plates (Corning Inc., Corning, N.Y.) in complete RPMI 1640 (Sigma) containing 5% FCS, 20 μM -mercaptoethanol, 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamine and antibiotics. Cytolytic activity was assessed in a standard 4-h <sup>51</sup>Cr release assay in 96-well V-bottom plates (Nunc, Denmark) at a range of effector-to-target ratios against  $10^4$  <sup>51</sup>Cr-labeled, infected or uninfected target LM cells.

As indicated in **Figures 5A-5C**, all four mutant viruses tested, KyAd644/824, KyAn1411, KyAin1411 and KyAE34Q, induced a CTL response at a level similar to that induced by parent KyA virus .

To assess memory CTL responses, mice were infected as described above and maintained for 2-26 weeks. Spleen tissues were pressed through a 60-gauge wire mesh screen, and the cell suspension was subjected to a brief exposure at at 37°C to Tris-buffered 0.83 NH<sub>4</sub>Cl to lyse erythrocytes. The resulting lymphocytes were then cultured ( $10^7$  cells per well) in complete RPMI 1640 at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, for 5 days in 12-well flat-bottom plates in the presence of  $3 \times 10^5$  mitomycin C-treated stimulator cells, as described by Jennings et al. Cell. Immunol. 133: 234-252 (1991). The stimulator cells were L-M mouse fibroblasts cells that had been infected with EHV-1 KyA at a multiplicity of infection of 10 for 18 h to allow the expression of late viral gene products. Cytolytic activity

WO 02/09750

PCT/US01/23612

was assessed in a standard 4-h  $^{51}\text{Cr}$  release assay in 96-well V-bottom plates (Nunc, Denmark) against  $10^4$   $^{51}\text{Cr}$ -labeled, infected or uninfected LM cells.

#### **EHV-1 Specific Antibody in the Serum of Immunized Mice**

Serum samples from immunized and control mice were assayed for the presence of neutralizing antibody (nAb). Briefly, after the sera were heated to  $56^\circ\text{C}$  for 1 h to inactivate complement, serial, two-fold serum dilutions (1:20 to 1:1028) were incubated with  $3 \times 10^3$  pfu EHV-1 KyA for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . Each sample was assayed in triplicate for infectious virus by plaque assay on RK-13 cell monolayers. The nAb titer was determined as the reciprocal of the highest dilution of serum resulting in a 50% reduction in pfu. Preimmune serum was employed as a control.

#### **EHV-Specific Antibody Secreting Cells (ASC)**

On specified days postchallenge, the mice were terminated, and the lungs, MLN, and CLN were removed, and the spectrum of ASC was determined by ELISPOT assay. To generate a single-cell suspension from the lung tissue, the tissue was fragmented with scissors and then pressed through a 60-gauge screen. After centrifugation, the cells were resuspended in 10 ml collagenase type L/deoxyribonuclease L solution (250:50 U/ml; Gibco-BRL) and incubated in a shaker at  $37^\circ\text{C}$  for 90 min. The cells were then treated with 3 ml of Tris-buffered 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution for 5 min at  $37^\circ\text{C}$  to lyse red blood cells. The cells were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplement with 5% calf serum and antibiotics (DMEM-5). To generate a single-cell suspension from MLN and CLN, the tissues were pressed through a 60-gauge screen without

WO 02/09750

PCT/US01/23612

additional treatment. To generate a single-cell suspension from spleens, splenic tissue was pressed through a 60-gauge screen and treated with Tris-NH<sub>4</sub>Cl, as before.

**ELISPOT assay.** Briefly, nitrocellulose-based microtiter 96-well plates (Millititer-HA, Millipore Corporation, Bedford, MA) were coated with EHV-1 KyA-infected cell lysate (10-200 µg/ml) in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in humidified chambers at 4°C overnight, or at 37°C for 2 h. Coated plates were stored at 4°C until use. For each experimental determination, the coating buffer (PBS) was decanted and the plates were washed three times by rinsing with PBS. Potential remaining binding sites were saturated with 5% fetal calf serum in PBS or 1% bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in PBS for 30 min at 37°C. Following additional washes, the lymphocytes, diluted to the appropriate concentration (10<sup>3</sup> to 10<sup>6</sup> cells/well) in DMEM-5, were added to the coated plates. Lipopolysaccharide (LPS, 5 µg/well; Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA) was added as a nonspecific activator of B cells. A control plate of uninfected cells was also used for the assays and was treated in the same manner as the plates of EHV-1 infected cells.

The cells were incubated for 3 to 4 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and then were discarded by washing with PBS containing 0.005% Tween 20 (PBST). One hundred microliters of alkaline phosphatase-conjugated antibody was added to each well, and the plates were incubated for 2 to 3 h at room temperature in humidified chambers. After thorough washing, the spots corresponding to EHV-1-specific ASC were visualized by adding 5-bromo-4chloro-3-indolyphosphate p-toluidine salt (BCIP, Gibco-BRL) and Nitroblue tetrazolium

WO 02/09750

PCT/US01/23612

chloride (NET, Gibco-BRL) as substrate, according to the manufacturer's instructions, for 5 to 30 min until the blue color developed. The nitrocellulose membranes were washed for a few seconds in water to stop the reaction. After 2 to 24 h, EHV-1-specific ASC were counted under low (10-30X) magnification in a light microscope.

#### **Induction of Protective Immunity**

Immunized mice were lightly anesthetized with Halothane (Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ) and then inoculated intranasally with a pathogenic EHV-1 strain at  $2 \times 10^6$  pfu diluted into PBS (50  $\mu$ l total volume/mouse).

Mice were monitored daily for the development of clinical signs of EHV-1 infection such as ruffled fur, loss of body weight, labored breathing, lethargy and huddling.

In addition, the level of virus in the lungs of challenged mice were determined. Lungs from the challenged animals were isolated at days 2, 5 and 10 post-challenge. Virus was recovered from mouse lung tissue as described previously by Awan, et al. J. Gen. Virol. 71: 1131-1140 (1990). Tissues were homogenized in 1 ml Eagles minimal essential medium using a 2 ml Wheaton Dounce homogenizer. Each sample was then sonicated in an Ultrasonic processor (Heat Systems-Ultrasonics, Inc., Farmingdale, NY) for one minute and then centrifuged at 3,000 rpm for ten minutes to remove cell debris. Samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until virus was quantitated by plaque assay on RK cells. Statistical analyses were done using the SigmaStat software (Jandel, Corp., San Rafael, CA).

WO 02/09750

PCT/US01/23612

SEQ ID NO: 1 (Equine herpesvirus type 1 immediate-early gene,  
GENEBANK Accession number J04366)

```

1   cccggggagg agacgcatgc agatgagatg tgcctcgagg tgcctatggcg tccaggggag
61  ttcaccttta tgcataatgag agcgctatt cggcatcccg ttggcgcgac gcgcttccct
121 gggaggagac atacgcaaat tagaaacgac acacgggtto taattggttg gagggggggg
181 gaggcgaaaa gcgcatgcaa atgcaaaagcg cgggaccggg ccccataggg tagagccgct
241 acacgcccac cgcccatcat caacggccaa tcacaatcga tagtgtgggc tggccactcc
301 cactaggggg aaggcaaaaac tccctcgtag tagtataaag cactgttgc ttaccctcgc
361 tagcatcgcg gactagagag cctttcagct cactggacca gccagccttc gaggactatc
421 gatcgcatct tggaaagctt acccgctctt ggcactcctt cttcggcttg cggaggttaag
481 agctccccgg ggacacgacc ggcttcgata tgcctcttct cccggggaga gcgttagaga
541 acggggcgag tgccaaaaag gccatggaac cctccaaca acgatgtccc gagggggtgg
601 ctccgaggcc cgcttcgacc tagcgttcca agcgggtgg ggatactac ctogaagccg
661 gcgaaggcta taccttcccc gggcagacc gggcggcttc tgcctcggcg gagctcggcg
721 cggaaacctg gatatactgac ggggcgtggt taccaccaa gcgggggaga ggcgccggcc
781 gcccgcttc ccttttaaca ttcggtccg ctccaactca acatctttc cgcctctgct
841 tttccagggt agagaagcgg ccccgtcgt ccgagccccc gccgcggaac cccgccaccg
901 gccaccgcc aaccttccct tctcgttct ccgagcgagc cttctcgtgc ggttggttct
961 gcaccgccaa gccggagcta gcacgccatg gccagccagc gcagcgaact cgcgccggac
1021 ctctacgact tcatcgagag caacgacttc ggcgaggacc cctcaccgc gcagccagc
1081 gcgcccgaag aggggttcc cagcccccgc gcccccgaac tgcgtgacgg cagccagaa
1141 atgttcgggg tggacgacgc tccgctctcc acccgggtgg tggtoatccc tccgctct
1201 ccggtcccc agcccccg agggaaaggc aagcggctgc cctcggccgc cggcagcggc
1261 ggtcctccta ccccgccggc tgcgcccaag ccggcgtccc cggcaccag cccgctccg
1321 gggctcggcg cgatgctgaa gatggtccac tctcctgtyg ccccggggaa cggctcggcg
1381 gccacggct cctcatcacc cggcgggtgg gacgcggccg acccggctgc cctcgcacgc
1441 gataccgaga cctgccccgg gtccccgag cccgagtttc catcctcggc ctcccgggc
1501 ggagggtccc cggcaccggc ggtccggagc atctccatct catcgtctc ctctcctcg
1561 tctcagatgg acgaggacga ccagcggat ggtgcggggg cagtagctc ctctcgtcg
1621 tctcctcagc acagcgcagc cgaagaaggc ggcgaggagg agaccctcg cccgcggcgc
1681 tgcagaaac ccgcaagac cccgtcggcc gccggctctc cggggcctc ctccggaggg
1741 gatcgcggcg ccgctggggc cgcaccccg aagagctgac gctcgggccc cgttcccc
1801 ggcgaccgc ctccgctcc agcttcggcg cccgctccca gccgccggg aggagcctc

```

47

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/09750

PCT/US01/23612

1861 ctccctccgg gggctcgcct tttagagtac ctggaggcgg tccgcgagge caatctggcc  
 1921 aagacgctgg agaggcccga accgcccggg gggatggctt ctccgcccgg ccggagccct  
 1981 caccggctcc ccaaggacca gcgtccgaaa tcggctctgg cgggagcgtc gaagcgcaag  
 2041 cgggccaacc ccagaccagc accccagacc cagaccagg caccggccga ggaggccccg  
 2101 cagacggccg tgtgggaact gctggacatg aactcatccc aggctaccgg ggcggcggca  
 2161 gcagcagcat cggcccggc ggcggtctcg tgcgcccgg gcgtctacca gcgcgagccg  
 2221 ctctccacc cgtccgggga cccctggccc gggctggatc caccaccgat ggggagggtg  
 2281 cgataccggg ggaccgggga ctgcgaggac gggctgtgg acgaccccga gatagctctg  
 2341 gcgcctcgc gctacgcgga ggcgcaggcc ccagtaccgg tcttctgccc ggagatgggg  
 2401 gactccacca agcagtaaaa cgtctggctc cgcattggtt tcgagagccg cgaagccatg  
 2461 tcctggctgc agaactctaa gctcagcggg caagaccaga acctggcgca gttctgcccg  
 2521 aagttcatcc acgctccggc cggacacggg tccttcatca ccgggagcgt ggccaacccc  
 2581 ctgcccaca tcggggagc catggcggcc gggaaacgcc tctggcccct gccacacggc  
 2641 gcgcctcgg tggccatgag ccgcctgac gatgcactc agaagagott catcctccag  
 2701 agcctccggc gcgctacgc ggacatggcc tacccgagag acgagggcggg gaggcgggac  
 2761 tcactcgccc ccgtggcggc ctgcccggcc caggccggcg ctgcccggc cagccagcaa  
 2821 cagcccaggg ccccgggccc ctccgtccgc gtcgcggaag cgtacacccc ggtctgcccg  
 2881 gccctcgggc cccgacgcaa ggtcggcggc gcccgggccc ctccggggac cagggcggcc  
 2941 aggcggtccg ccttcagact caggagctc ggggacgccc gcgtgctggc ctgcccggcc  
 3001 gctctcgagg cctcctgccc cctccgccc ggggctcgg ccgtcccggc actggaaccc  
 3061 agcgagatcc cctctcccgc ctgcccctcc gagcgcctgt gctccaaccc gcccgggctg  
 3121 gagcggcggc cctctcctct ctacgaactc agggacctgg tcgagcgggc caggctcctc  
 3181 ggggactctg acctaccaca ccgcctgggc tccgacgagc tggcctcgc ggtgcccggc  
 3241 gtctctgggg tggcccggac cgtggcggc ctggtgcgct acaacgcccga gggggcccgg  
 3301 gcccgggcct cggcctggac cgtcaaccag gccgtgttca gcataaccag cctggtcggg  
 3361 gggatgttgg gggaggcctg gtcctgctg gcccaaccga ctgggtacca gcagccctca  
 3421 tcgtcctcgc ccggcggcga gccctctccc ggtcccggc ccgagggagg gagcctcag  
 3481 acctgcccgc cctgtggccc caccgtcccc gggaaagcgt ccgagcggg cccctcgtcc  
 3541 cactcccagc cccccagca ctcccagagc gggggaggcg ccggggctac gaccgcaacc  
 3601 tgcctcgggg ccaccagac aaacgcccgc tcccgggggc agcagaccca gccgcagaag  
 3661 gcccgctccc ctacggcggc cgcctcccgc gcccaacctc gccaggaggc gatgcccggc  
 3721 tctcctcggc acgaccgtgc catccacggg cgcgccaggg gcaagagcgg caagcggcgc  
 3781 tcgagccccc tggagccggc ggcaccggcc ggagcctcgg cctcctctc ctgctccggc  
 3841 cgggggtacg atccctcggg gccggtcagc agccctccgg cccccaggc caggggtggc  
 3901 accccgggccc accaggctcc ccggccctg ggaccatgc cagccgaggc ccccagccgt

WO 02/09750

PCT/US01/23612

3961 cggggcggat tcaggcgcgt tccccgcgga gaactgccaca ctccgcggcc cagcgaacgcg  
 4021 gcttgccgcg cctactgtcc ccccgagctg gtggcggagc tcctcgacaa ccagctgttc  
 4081 cccgaggcct ggcccccggc gctaaccttc gatccccagg cctggccac catcgcggcc  
 4141 cgtgcagcgc gcccccggc ccgggacggc gcgcgcttag gggagctggc ggccagcggc  
 4201 ccgtgagac ggaggccgc ctggatgac cagatcccc accccgagga cgtgaagtg  
 4261 gtggtcctct actcccgcct ccaggacgag gaactgctgg gcggactccc ggcctcccgc  
 4321 cccggcggct ctccgcgca gccccctctg tccgaacctc aggggggact ctccgcgctg  
 4381 ctggcggccc tggggaacc catcctcacc aagcgtccc acgctgggc cggcaactgg  
 4441 accggggccc cggacgtctc ggcctcaac gccccgggg tectgctgct gtcgaccggg  
 4501 gaactggcct tcaccggctg cgtcgagtac ctctgctgc gctgggctc cgcaggcgc  
 4561 aagctcctgc tgcgggacgc ggtctccacc gaggattggc cccaggacgg tcccgcgctc  
 4621 agccagtacc acatctacat gcgggcgcgc ctgactcgc gggctgcctg cgcctgctgc  
 4681 tggcccgggg agcgcacact cagccgcgcg gtcctcaact ccagcaccct ctccggccc  
 4741 ggaactgttg cagggccoga ggccgcgttc gcgcgctgt acccgactc tgcgccctg  
 4801 aggtgtgccc gctcctcaa cgtggcctac accggtggaca ctccgcggc cgaagcacc  
 4861 cgcgttcccc tggctccgag ggaagtacc gcgcgctcc tgcgccacta cgaagcctgc  
 4921 aagacatgc gggccacggc caggggcctc gggttccacg acccgactt tgaggaggcc  
 4981 gccgcgcaga gccaccgcg gcccaaccga tggggactcg gggcctggct gcgccccgtg  
 5041 tacctgcct gcgcgcggc cggcgtggg gccgtggag cctcggact tctgatcccc  
 5101 gagctgtga gcgagtctg ccgggtggcg ctgctggagc ccgacgcga ggcgagccc  
 5161 ctggtgctgc ccaccacca ggtccccgc gcocgagccc cgcgggtcga ctgggagccc  
 5221 gggttcggct ctgcctccac ctccgtcctg cacatgggg ccacggact gtcctgccc  
 5281 gagcccgac acgagctcga gatcgacgg gccggcgat tggagctggt ggttgagcac  
 5341 cccggcccga gccccggcgt gccccaggcc ctccgcgcg ctccatcaa gatcgaggtg  
 5401 ggtcggcag acgaggacgg aggagactgg tgcaatcct acctctctg aacagatgg  
 5461 agcgcctccc tgcggccgaa aacaagaaa atcagtaact ccacaactat gtcctccc  
 5521 agcacaacgc agactccgc tagactccgc cctccatcc ctgacgtga acccccgcc  
 5581 gccctctgct gacgcgaaga caaggccctc cccggacgac atgtgaggaa cgaagggggc  
 5641 gttgtatota goagcccacg ttcttattg ctacatgct tgcoccaatg gtggcaactt  
 5701 ccaggtttc cctatcgtc gagtggttgt ttttaataaa gttttttta aattttgatt  
 5761 gaccgcgtgg totttgtta ctggcgggt tgatggcgg gttgatggc gggttgatgg  
 5821 gggggtgat gggcgggtg atggcgggt tgatggcgg gttgatggc gggttgatgg  
 5881 gggggtgat gggcgggtg atggcgggt tgatggcgg gttgatggc gggttgatgg  
 5941 gggggtgat gggcgggtg atggcgggt tgatggcgg gttgatggc gggttgatgg  
 6001 gggggtgat gggcgggtg atggcgggt ctctcccct tccctcctc cccctcctc

WO 02/09750

PCT/US01/23612

6061 ctctctccct tctgctctt ccccttctg ctctctccct tctgctctt ccccttctg  
 6121 ctctctccct tctgctctt ccccttctg ctctctccct tctgctctt ccccttctg  
 6181 ctctctccct tctgctctt ccccttctg taactacta ccgctactg cactaccgga  
 6241 ctctctccct tctgctctt gccaagcccc ttccggtgag cccagcata gcagttagcc  
 6301 ccagcatagc agtgacgta ctttgacccc cccctttaga ccagcccccc ctattcaaat  
 6361 ggggggggga gacgcggtct gggggggcca ggtctctctt cgggccccgg cccgtgacc  
 6421 ttgaccagat atggccccg gccaggctct ctctcgggcy cggccccgtg acccttgacc  
 6481 agatatggcc cggggccagg ctctctctcg ggcgcccccc cgtgacctt gaccagatat  
 6541 gggccccggc caggctctct ctccggcgcy ggccttgac ccttgaccag atatggcccc  
 6601 gggccaggct ctctctcggg cggggccccg tgaccttga ccagatatg cccggggcca  
 6661 ggtctctctt cgggccccgg cccgtgacc ttgaccagat atggccccgg gccaggctct  
 6721 ctctcgggcy cgggccccgt acccttgacc agatatggcc cggggccagg ctctctctcg  
 6781 ggcgcccccc cgtgacctt gaccagatat ggcccccggc caggctctct ctccggcgcy  
 6841 ggccttgacc ccttgaccag atatggcccc gggccaggct ctctctcggg cgggcccccc  
 6901 tgaccttga ccagatatg cccggggcca ggtctctctt cgggccccgg cccgtgacc  
 6961 ttgaccagat atggccccg gccaggctct ctctcgggcy cgggccccgt acccttgacc  
 7021 agatatggcc cggggccagg ctctctctcg ggcgcccccc cgtgacctt gaccagatat  
 7081 gggccccggc caggctctct ctccggcgcy ggccttgac ccttgaccag atatggcccc  
 7141 gggccaggct ctctctcggg cggggccccg tgaccttga ccagatatg cccggggcca  
 7201 ggtctctctt cgggccccgg cccgtgacc ttgaccagat atggccccgg gccaggctct  
 7261 ctctcgggcy cgggccccgt acccttgacc agatatggcc cggggccagg ctctctctcg  
 7321 ggcgcccccc cgtgacctt gaccagatat ggcccccggc caggctctct ctccggcgcy  
 7381 ggccttgacc ccttgaccag atatggcccc gggccaggct ctctctcggg cgggcccccc  
 7441 tgaccttga ccagatatg cccgggtaga gagagactg gttcagaaga gccagagtgg  
 7501 gctctgaaag acaagggagt gggacgcyg tgggggaaag tggctcaaca ccgtggcccc  
 7561 agatggttgg ggggggggaa aatgggggaa atatagtaa ctagttaact actggtacta  
 7621 ttccacggtt atagcatttc taagctggtc cgaggaggag agtagaaagg actcaatgtg  
 7681 tccatttgtg tgatatatag tctgtgacct ctagtacac tactgccatt agtttctccc  
 7741 cactatatgc tcagcttctc tataccgcyg tcaactcag gaggttaggt gtgtaatatg  
 7801 gccaatcggg gggggggggg ggtgtggtgg taaatagcgg catccccct agagcagata  
 7861 aactggagtt taataggctt agggcagggg gctagggcag ggggctaggg cagggggcta  
 7921 gggcaggggg ctagggcagg gggctagggc aggggctag ggcagggggc tagggcaggg  
 7981 ggtcagggca gggggctagg gcagggggct agggcagggg gctagggcag ggggctaggg  
 8041 cagggggcta gggcaggggg ctagggcagg gggctagggc aggggctag ggcagggggc  
 8101 tagggcaggg ggtcagggca gggggctagg gcagggggct agggcagggg gctagggcag

WO 02/09750

PCT/US01/23612

8161 ggggctaggg cagg

SEQ ID NO: 2 (Equine herpesvirus type 1 immediate-early protein, 1487 amino acid)

```

1  masqrdfap dlydfiesnd fgedpliraa saaeegftqp aapdllygsq nmfgvddapl
61  stpvvviPPP spapeprggk akrspsaags ggpptpaaaa qpaspspsa pglaaamkmv
121 hssvapgngR ratgssppgy gdaadpvald sdtetcpqsp qpefpssasp gggspaprvr
181 sisissssss sssmdeddqa dgagasssss ssddedsde ggeetprpr hsqnaaktps
241 aagspgpgsg gdrpaagaat pkscrsgaas pgapapapas apapsrpggg llppgarile
301 ylegvreaanl aktlerpepp agmasppgrs phrlpkdqrp kealagaskr kranprprpq
361 tqtcapaeaa pqtavwdlld mnssgatgaa aaaasapaaa scapgvvqre plltpsgdpw
421 pgsdppmgR vrygtgdsr dglwddpeiv laasryaeaq apvpvfvpea gdstkqynal
481 vrmvfesrea mswlqnskls ggdqnlqafc gkflhaprgh gsfitgsvan plphigdama
541 aqnalwalph aaasvamsrr ydrtqksfil gslrrayadm ayprdeagrp dsaaavagcp
601 aqaaaaaaq qpeapapsv rvreaytrvc aalgprrkaa aaaaapetra prpsafllre
661 lgdacvlaeq avfeallrlr ggasavpugd pseiPspacp pealcsnpag letaalslye
721 lrdlverarL lgdsdpthrl gsdelrlavr avlvvartva plvrynaega rarasawtvt
781 qavfsipslv gmlgeavsl lapptrsqpp sssspgpepf sgsaaegsl qlplplwptv
841 pkqatsvps shsqspqhsq gggagatta tccratqtna rrrgqhgqg karspgaaas
901 pahlegamp gssddraih grprgksgkr rseplepaag agaaafsss argydpagpv
961 dpppapkrrv atpghqapra lgpwpaegpd rrggfrvpr gdchtprpsd aacaaycpe
1021 lvaelidnql fpeawrpalt fdpgalatia arcsgppard garlgelaas gplrrraawm
1081 hqipdpedvk vvlvysplqd edllgglpas rpggerrepl wsdikgglisa llaalgnril
1141 tkrshawnagN wtgapdvsaI naqgvillst gdlafstgcv eYlcrlgsar rkllvldavs
1201 tedwpgdga isqyhiymra altprvacav zwpggerhlsr avltsstlEg pglfaraaaa
1261 farlypdsap lrIcrssnva ytvdrager trvplaprey rqrvlpdyg ckdmdzaqag
1321 lgfhndpfee gaaqshraan rwglgawlrp vylacgrrga gavepselli pellsefcrv
1381 allepdaaeE plvlpitaep rrraprwdwe pgfgrstsv lhmgatelcl pepddeleld
1441 gagdvelvve hpqpepvag alrrapikie vvsddedggd wcnpyls

```

SEQ ID NO: 3 5' CCTTCCTCTCTCGGTCTT3'

SEQ ID NO: 4 5' CTCCA CCCCGAACATGTT3'

SEQ ID NO: 5 5' GGGTAACGCCAGGGTTT3'

WO 02/09750

PCT/US01/23612

## We claim:

1. An EHV-1 isolate comprising a mutation selected from Table 1.
2. The EHV-1 isolate of claim 1, wherein said EHV-1 isolate is of a strain selected from KyA, KyD, Ab1, Ab4, RacL11, RacM or RacH.
3. An EHV-1 isolate selected from the group consisting of KyAASRT1, KyAASRT2, KyAd178/627, KyA552/897, KyA644/824, KyAn627, KyAn951, KyAn1029, KyAn1411, KyAin628, KyAin1411, KyAD20N, KyAD24N, KyAL12P, KynL12E, KyAF15D and KyAE34Q.
4. A replication-competent EHV-1 isolate comprising a mutation in the IE gene.
5. The EHV-1 isolate of claim 4, wherein said mutation is a substitution of an amino acid residue within aa 1-89, 181-220, 422-597 or 963-970.
6. The EHV-1 isolate of claim 5, wherein said substitution is selected from D20N, D24N, L12E, F15D or E34Q.
7. The EHV-1 isolate of claim 4, wherein said mutation is a deletion or insertion of at least about three amino acid residues within aa 90-180, 221-421, 598-962 or 963-1487.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

8. The EHV-1 isolate of claim 7, wherein said mutation is selected from d644/824, n627, n1029, n1411, in628 or in1411.
9. The EHV-1 isolate of claim 4, wherein said EHV-1 isolate is non-pathogenic.
10. The EHV-1 isolate of claim 9, wherein said EHV-1 isolate is of a strain selected from KyA, KyD, Ab1, Ab4, RaCL11, RacM or RacH.
11. The EHV-1 isolate of claim 10, wherein the mutation in the IE gene of said EHV-1 isolate is a substitution of an amino acid residue within aa 1-89, 181-220, 422-597 or 963-970.
12. The EHV-1 isolate of claim 11, wherein said mutation is selected from D20N, D24N, L12E, F15D or E34Q.
13. The EHV-1 isolate of claim 12, selected from KyAD20N, KyAD24N, KyAL12E, KyAF15D or KyAE34Q.
14. The EHV-1 isolate of claim 10, wherein the mutation in the IE gene of said EHV-1 isolate is a deletion or insertion of at least about three amino acid residues within aa 90-180, 221-421, 598-962 or 963-1487.
15. The EHV-1 isolate of claim 14, wherein said isolate is selected from d644/824, n627, n1029, n1411, in628 or in1411.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

16. The EHV-1 isolate of claim 15 selected from KyAd644/824, KyAn627, KyAn1029, KyAn1411, KyAin628 or KyAin1411.
17. A immunogenic composition comprising a pharmaceutical-acceptable carrier and a nonpathogenic, replication-competent EHV-1 isolate, wherein said EHV-1 isolate comprises a mutation in the IE gene.
18. The immunogenic composition of claim 17, wherein said EHV-1 isolate is of a non-pathogenic strain selected from KyA, KyD, Abl, Ab4, RacL11, RacM or RacH.
19. The immunogenic composition of claim 18, wherein the mutation in the IE gene of said isolate is a substitution of an amino acid residue within aa 1-89, 181-220, 422-597 or 963-970.
20. The immunogenic composition of claim 19, wherein said mutation is one of D20N, D24N, L12E, F15D or E34Q.
21. The immunogenic composition of claim 20, wherein said EHV-1 isolate is selected from KyAD20N, KyAD24N, KynL12E, KyAF15D or KyAE34Q.
22. The immunogenic composition of claim 18, wherein the mutation in the IE gene of said isolate is a deletion or insertion of at least about three

WO 02/09750

PCT/US01/23612

amino acid residues within aa 90-180, 221-421,  
598-962 or 963-1487.

23. The immunogenic composition of claim 22, wherein said mutation is selected from d644/824, n627, n1029, n1411, in628 or in1411.
24. The immunogenic composition of claim 23, wherein said isolate is selected from KyAd644/824, KyAn627, KyAn1029, KyAn1411, KyAin628 or KyAin1411.
25. A method of stimulating an immune response against EHV-1 in a horse subject, comprising administering to said subject an effective amount of a nonpathogenic, replication-competent EHV-1 isolate, wherein said EHV-1 isolate comprises a mutation in the IE gene.
26. The method of claim 25, wherein said EHV-1 isolate is of a non-pathogenic strain selected from KyA, KyD, Ab1, Ab4, RacL11, RacM or RacH.
27. The method of claim 26, wherein the mutation in the IE gene of said isolate is a substitution of an amino acid residue within aa 1-89, 181-220, 422-597 or 963-970.
28. The method of claim 27, wherein said mutation is one of D20N, D24N, L12E, F15D or E34Q.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

29. The method of claim 28, wherein said EHV-1 isolate is selected from KyAD20N, KyAD24N, KynL12E, KyAF15D or KyAE34Q.
30. The method of claim 26, wherein the mutation in the IE gene of said isolate is a deletion or insertion of at least about three amino acid residues within aa 90-180, 221-421, 598-962 or 963-1487.
31. The method of claim 30, wherein said mutation is selected from d644/824, n627, n1029, n1411, in628 or in1411.
32. The method of claim 31, wherein said isolate is selected from KyAd644/824, KyAn627, KyAn1029, KyAn1411, KyAin628 or KyAin1411.
33. The method of claim 25, wherein said immune response is a cell-mediated immune response or a humoral immune response.
34. An vaccine composition comprising a pharmaceutical-acceptable carrier and a nonpathogenic, replication-competent EHV-1 isolate, wherein said EHV-1 isolate comprises a mutation in the IE gene.
35. The vaccine composition of claim 34, wherein said EHV-1 isolate is of a non-pathogenic strain selected from KyA, KyD, Abl, Ab4, RacL11, RacM or RacH.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

36. The vaccine composition of claim 35, wherein the mutation in the IE gene of said isolate is a substitution of an amino acid residue within aa 1-89, 181-220, 422-597 or 963-970.
37. The vaccine composition of claim 36, wherein said mutation is one of D20N, D24N, L12E, F15D or E34Q.
38. The vaccine composition of claim 37, wherein said EHV-1 isolate is selected from KyAD20N, KyAD24N, KynL12E, KyAF15D or KyAE34Q.
39. The vaccine composition of claim 35, wherein the mutation in the IE gene of said isolate is a deletion or insertion of at least about three amino acid residues within aa 90-180, 221-421, 598-962 or 963-1487.
40. The vaccine composition of claim 39, wherein said mutation is selected from d644/824, n627, n1029, n1411, in628 or in1411.
41. The vaccine composition of claim 40, wherein said isolate is selected from KyAd644/824, KyAn627, KyAn1029, KyAn1411, KyAin628 or KyAin1411.
42. A method of preventing or inhibiting an EHV-1 infection in a horse subject, comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of a nonpathogenic, replication-

WO 02/09750

PCT/US01/23612

competent EHV-1 isolate, wherein said EHV-1 isolate comprises a mutation in the IE gene.

43. The method of claim 42, wherein said EHV-1 isolate is of a non-pathogenic strain selected from KyA, KyD, Ab1, Ab4, RacL11, RacM or RacH.
44. The method of claim 43, wherein the mutation in the IE gene of said isolate is a substitution of an amino acid residue within aa 1-89, 181-220, 422-597 or 963-970.
45. The method of claim 44, wherein said mutation is one of D20N, D24N, L12E, F15D or E34Q.
46. The method of claim 45, wherein said EHV-1 isolate is selected from KyAD20N, KyAD24N, KynL12E, KyAF15D or KyAE34Q.
47. The method of claim 43, wherein the mutation in the IE gene of said isolate is a deletion or insertion of at least about three amino acid residues within aa 90-180, 221-421, 598-962 or 963-1487.
48. The method of claim 47, wherein said mutation is selected from d644/824, n627, n1029, n1411, in628 or in1411.
49. The method of claim 48, wherein said isolate is selected from KyAd644/824, KyAn627, KyAn1029, KyAn1411, KyAin628 or KyAin1411.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

50. A method of determining the non-pathogenicity of an EHV-1 virus present in a horse subject previously administered with a non-pathogenic EHV-1 isolate, wherein said EHV-1 isolate comprises a mutation in the IE gene, said method comprising isolating said virus from said subject, detecting the presence of the mutant IE protein of said non-pathogenic isolate and the absence of a wild type IE protein in said virus, thereby determining said virus as non-pathogenic.
51. The method of claim 50, wherein the mutant IE protein has a mobility on SDS PAGE different from that of a wild type IE protein.
52. The method of claim 51, wherein the mutant IE protein comprises a deletion or insertion of amino acid residues, and wherein said detection of the IE protein is based on an antibody specific for the deleted or inserted amino acid residues.
53. A method of determining the non-pathogenicity of an EHV-1 virus present in a horse subject previously administered with a non-pathogenic EHV-1 isolate, wherein said EHV-1 isolate comprises a deletion in the IE gene, said method comprising detecting the absence in the serum of said subject of an antibody specific for the deleted portion of the IE protein, thereby determining said virus as non-pathogenic.

WO 02/09750

PCT/US01/23612

54. A method of determining the non-pathogenicity of an EHV-1 virus present in a horse subject previously administered with a non-pathogenic EHV-1 isolate, wherein said EHV-1 isolate comprises a mutation in the IE gene, said method comprising isolating said virus from said subject, detecting the absence of the wild type IE nucleotide sequence and the presence of the mutant IE nucleotide sequence, thereby determining said virus as non-pathogenic.
55. A method of determining the non-pathogenicity of an EHV-1 virus present in a horse subject previously administered with a non-pathogenic EHV-1 isolate, wherein said EHV-1 isolate comprises a mutation in the IE gene, said method comprising isolating said virus from said subject, determining the temperature sensitivity of said virus as identical to that of said non-pathogenic EHV-1 isolate, thereby determining said virus as non-pathogenic.

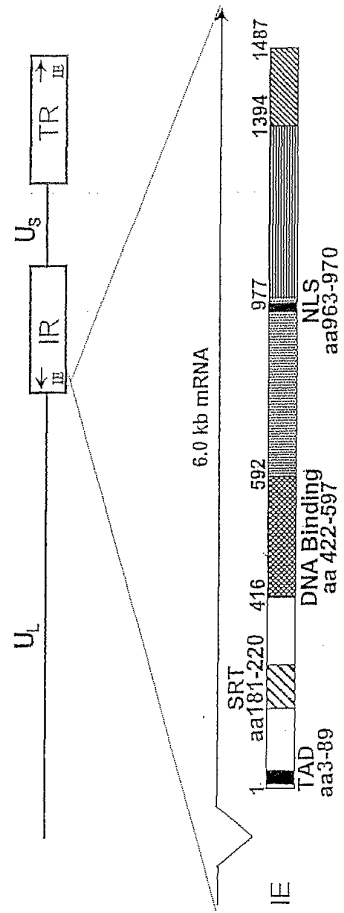


Fig. 1

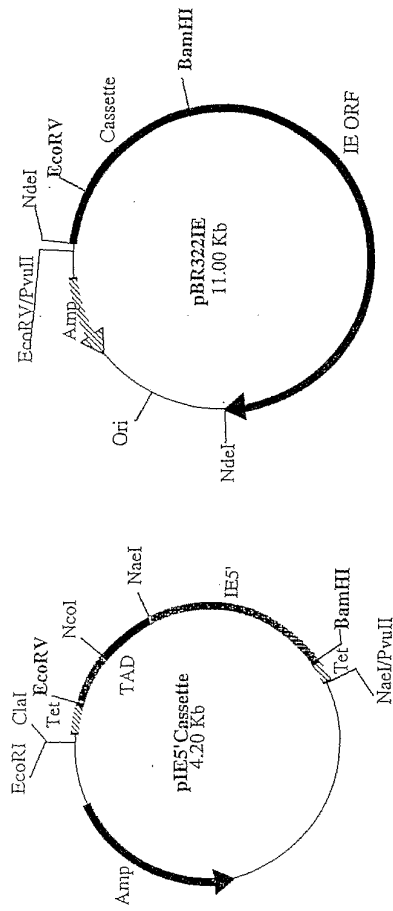


Fig. 2

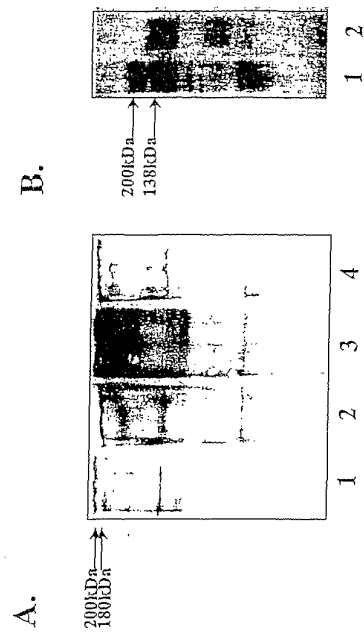


Fig. 3

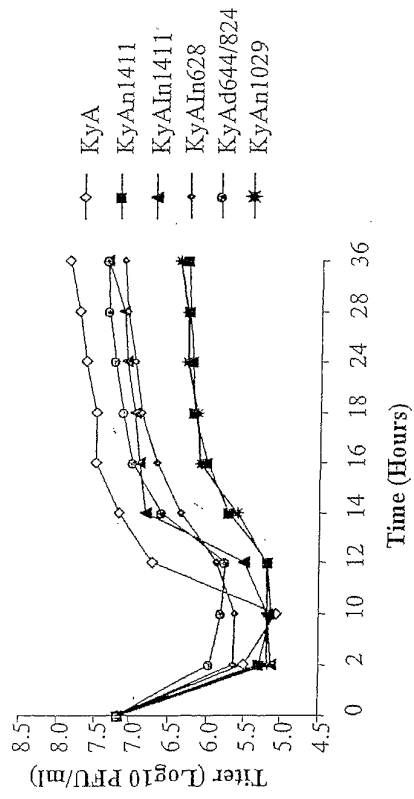


Fig. 4

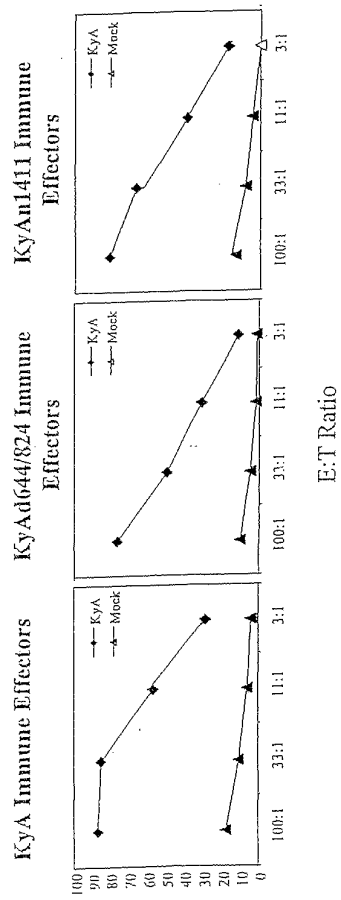


Fig. 5A

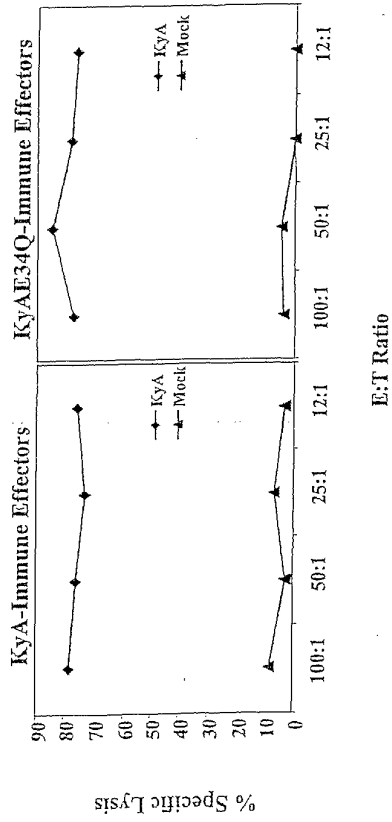


Fig. 5B

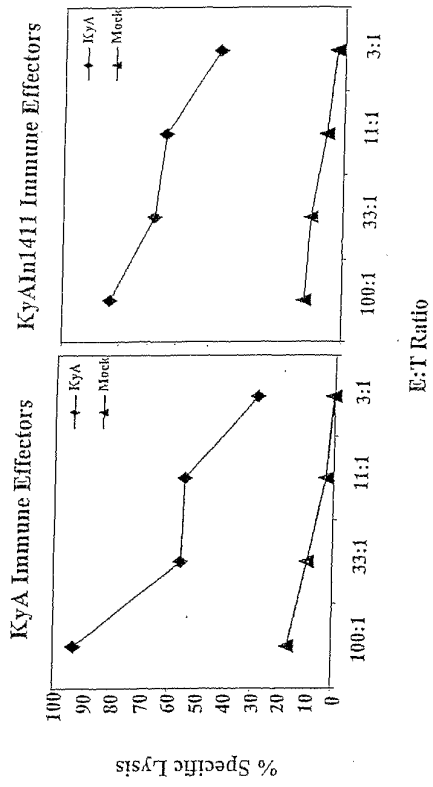


Fig. 5C

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/009750 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/03, A61K 39/245, C12N 7/00 (74) Agent: GROLZ, Edward, W.; Scully, Scott, Murphy & Presser, 400 Garden City Plaza, Garden City, NY 11530 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/23612 (81) Designated States (national): AU, CA, JP, MX, NZ.
- (22) International Filing Date: 27 July 2001 (27.07.2001) (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Filing Language: English (85) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (26) Publication Language: English (86) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Priority Data: 09/626,748 27 July 2000 (27.07.2000) US (87) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) Applicant: RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES, INC. (US/AUS); 101 N. Wilmot Road, Suite 600, Tucson, AZ 85711-3355 (US). (88) Date of publication of the international search report: 27 March 2003
- (72) Inventor: O'CALLAGHAN, Dennis, J.; 5615 Willow Crest Drive, Shreveport, LA 71119 (US).

Published:  
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/009750 A3

(54) Title: VACCINES FOR EQUINE HERPESVIRUS TYPE-1: VIRUSES HARBORING MUTATIONS WITHIN THE IMMEDIATE EARLY GENE

(57) Abstract: This invention relates to mutant Equine herpesvirus type-1 (EHV-1) isolates, and in particular, EHV-1 isolates carrying mutations in the immediate-early (IE) gene of the viral genome. A panel of EHV-1 mutant isolates have been described. Preferred EHV-1 isolates are those which are replication-competent and nonpathogenic. The mutant EHV-1 isolates of the present invention are useful in formulating vaccine compositions for preventing and treating EHV-1 infections in horses. The present invention further provides methods of determining the pathogenicity of an EHV-1 virus present in a horse subject which has been previously immunized with a non-pathogenic EHV-1 isolate of the present invention.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/23612
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/03 A61K39/245 C12N7/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K C07K 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) WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, SCISEARCH, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 1999 BUCZYNSKI, KIMBERLY ANN: "Characterization of equine herpesvirus 1 harboring mutant forms of the immediate - early protein" retrieved from STM Database accession no. 132:234179 HCA YP002221717 abstract & (1999) 224 PP. AVAIL.: UMI, ORDER NO. DA9942077 FROM: DISS. ABSTR. INT., B 2000, 60(8), 3715, --- -/--	1-55
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 claims 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 principles 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 20 November 2002		Date of mailing of the international search report 06/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentaan 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Niemann, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 01/23612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUCZYNSKI KIMBERLY A ET AL: "Characterization of the transactivation domain of the equine herpesvirus type 1 immediate-early protein." VIRUS RESEARCH, vol. 65, no. 2, 15 December 1999 (1999-12-15), pages 131-140, XP002221714 ISSN: 0168-1702 cited in the application the whole document ---	1-55
X	GARKO-BUCZYNSKI KIMBERLY ET AL: "Complementation of a replication-defective mutant of equine herpesvirus type 1 by a cell line expressing the immediate-early protein." VIROLOGY, vol. 248, no. 1, 15 August 1998 (1998-08-15), pages 83-94, XP002221715 ISSN: 0042-6822 cited in the application the whole document ---	1-55
A	SMITH PATRICK M ET AL: "Characterization of the cytolytic T-lymphocyte response to a candidate vaccine strain of equine herpesvirus 1 in CBA mice." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 7, July 1998 (1998-07), pages 5366-5372, XP002221716 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document ---	
A	EP 0 668 355 A (AKZO NOBEL NV) 23 August 1995 (1995-08-23) abstract -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) July 1992

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/US 01/23612
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 25-33, 42-49 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.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 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:</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p>	
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/23612

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 0668355	A	23-08-1995	EP 0668355 A1	23-08-1995
			AT 178654 T	15-04-1999
			DE 69417717 D1	12-05-1999
			DE 69417717 T2	07-10-1999
			ES 2132330 T3	16-08-1999
			JP 7236489 A	12-09-1995
			US 5674499 A	07-10-1997

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/70	C 1 2 Q 1/70	4 H 0 4 5
G 0 1 N 27/447	G 0 1 N 33/483	F
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	J
// C 0 7 K 14/035	G 0 1 N 27/26 3 1 5 Z	
	C 0 7 K 14/035	

(72)発明者 オキアラハン、 デニス ジェイ .

アメリカ合衆国 ルイジアナ州 7 1 1 1 9 シュレブポート ウィロー クレスト ドライブ  
5 6 1 5

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB10 BB20 BB41 BB50 BB51 CB01 CB30  
DA13 DA36 FB02  
4B024 AA01 BA32 CA04 CA05 CA06 CA09 DA02 EA04 GA11 GA18  
GA19 HA08 HA12 HA14  
4B063 QA01 QA07 QA13 QA18 QQ03 QQ10 QQ42 QQ79 QR08 QR14  
QR32 QR41 QR42 QR55 QR77 QR79 QR82 QS10 QS12 QS16  
QS25 QS34 QS39 QX02  
4B065 AA95X AB01 AC14 AC20 BA02 BA24 CA24 CA45  
4C085 AA03 BA84 DD21 DD62  
4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 EA31 FA72 FA74

专利名称(译)	马痘疹病毒1型疫苗：早期早期基因突变的病毒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004512826A</a>	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2002515303	申请日	2001-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	翔升科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	研究公司技术公司		
[标]发明人	オキャラハンデニスジェイ		
发明人	オキャラハン、 デニス ジェイ.		
IPC分类号	G01N33/483 A61K39/245 A61K39/27 A61P31/22 C07K14/03 C07K14/035 C12N7/00 C12N7/04 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N27/447 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/12 A61K39/245 A61K2039/5254 A61K2039/543 C12N7/00 C12N2710/16722 C12N2710/16734 C12N2710/16761		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/27 A61P31/22 C12N7/00 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/483.F G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.J G01N27/26.315.Z C07K14/035		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB41 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/CB30 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/BA84 4C085/DD21 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/EA31 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	三好秀 三好康夫		
优先权	09/626748 2000-07-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

技术领域本发明涉及1型突变型马痘疹病毒(EHV-1)分离株,具体涉及在病毒基因组的早期(IE)基因中具有突变的EHV-1分离株。描述了一组EHV-1突变株。优选的EHV-1分离株是有复制能力和非致病性分离物。根据本发明的突变EHV-1分离物可用于制备用于预防和治疗马中EHV-1感染的疫苗组合物。此外,本发明还提供了一种测定先前用本发明非致病性EHV-1分离株免疫的马测试个体中存在的EHV-1分离株的致病性的方法。

欠失変異	変異の性質	影響を受けるドメイン
△SRT1	aa181-250欠失	SRTの欠失
△SRT2	aa88-243欠失	SRTの欠失
d178/627	aa178から627欠失	SRT及びDBDの欠失
d552/897	aa552から897欠失	DBDの一部欠失
d644/824	aa644から824欠失	
ナンセンス変異		
n627	aa628-1487欠失	NLS及びC末端の欠失
n951	aa952-1487欠失	NLS及びC末端の欠失
n1029	aa1030-1487欠失	C末端の欠失
n1411	aa1412-1487欠失	C末端の欠失
挿入変異		
in628	aa628における挿入	
in1411	aa1411における挿入	
点変異: アミノ酸置換		
D24N	Asp24からAsn	TADにおける点変異
D20N	Asp20からAsn	TADにおける点変異
F15D	Phe15からAsp	TADにおける点変異
L12P	Leu12からPro	TADにおける点変異
L12E	Leu12からGlu	TADにおける点変異
E34Q	Glu34からGln	TADにおける点変異