

(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2004-522697

(P2004-522697A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 39/21

A 6 1 K 39/21

Z N A

4 B O 2 4

A 6 1 P 1/14

A 6 1 P 1/14

4 B O 6 5

A 6 1 P 7/04

A 6 1 P 7/04

4 C O 8 5

A 6 1 P 7/06

A 6 1 P 7/06

A 6 1 P 7/10

A 6 1 P 7/10

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-524532 (P2002-524532)

(86) (22) 出願日 平成13年9月6日 (2001.9.6)

(85) 翻訳文提出日 平成15年3月7日 (2003.3.7)

(86) 国際出願番号 PCT/US2001/027599

(87) 国際公開番号 W02002/020049

(87) 国際公開日 平成14年3月14日 (2002.3.14)

(31) 優先権主張番号 09/659, 029

(32) 優先日 平成12年9月9日 (2000.9.9)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 301046776

アクゾ・ノベル・エヌ・ペー

オランダ国、エヌ・エルー 6800・エル

・エス・アーネム、ペー・オー・ボックス

・186、フエルペルウエヒ・76

(74) 代理人 100062007

弁理士 川口 義雄

(74) 代理人 100105131

弁理士 井上 満

(74) 代理人 100113332

弁理士 一入 章夫

(74) 代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E I A V キメラワクチンおよび診断

(57) 【要約】

本明細書ではレンチウイルスワクチンおよび診断並びに同一物を製造および使用する方法を開示し、これを安全に用いてレンチウイルス、例えばウマ伝染性貧血ウイルス (E I A V) により惹起される感染および/または疾患からの免疫を哺乳動物に効果的に提供することができ、ワクチンにより、ワクチン接種したおよびワクチン接種していないが暴露されている哺乳動物、とりわけウマを区別できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インビボでの複製能が欠如しているレンチウイルスキメラを含むレンチウイルスにより惹起される疾患および / または疾患を防御するワクチン。

【請求項 2】

レンチウイルスでの遺伝子欠失により、インビボでの複製能が欠如している請求項 1 のワクチン。

【請求項 3】

該レンチウイルスがウマ伝染性貧血ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV) またはサル免疫不全ウイルス (SIV) からなる群から選択される請求項 1 に記載のワクチン。 10

【請求項 4】

該遺伝子欠失がカプシド抗原の発現を阻害する 1 つまたはそれ以上の遺伝子内にある請求項 2 に記載のワクチン。

【請求項 5】

遺伝子欠失が gag 遺伝子の部分、gag 遺伝子の全ておよび gag 遺伝子の発現を制御する遺伝子からなる群から選択されるメンバーの欠失である請求項 4 に記載のワクチン。

【請求項 6】

該レンチウイルスキメラがさらにインビトロでの複製能が欠如している請求項 1 に記載のワクチン。 20

【請求項 7】

該レンチウイルスキメラが細胞系をトランスフェクトすることにより大量に産生される請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 8】

レンチウイルスキメラがレンチウイルスにより惹起される疾患および / または感染に対して哺乳動物を安全に免疫し、さらにワクチン接種された、ワクチン接種されていないおよび野生型に暴露された哺乳動物を区別することを可能にする請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 9】

レンチウイルスキメラが EIAV から誘導され、これが EIAV により惹起される疾患および / または感染に対してウマ科動物を安全に免疫し、ここでワクチンがワクチン接種された、ワクチン接種されていないおよび野生型に暴露されたウマ科動物を区別することを可能にする請求項 1 に記載のワクチン。 30

【請求項 10】

キメラが p26 抗原発現能を欠如する EIAV から誘導される請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 11】

gag 遺伝子における欠失の結果によって p26 抗原発現能の欠如がおこる請求項 10 のワクチン。

【請求項 12】

遺伝子欠失が gag 遺伝子の部分、gag 遺伝子の全ておよび gag 遺伝子の発現を制御する遺伝子からなる群から選択されるメンバーの欠失である請求項 11 に記載のワクチン。 40

【請求項 13】

さらにアジュバントを含む請求項 9 のワクチン。

【請求項 14】

EIAV が不活性化されている請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 15】

不活性化された EIAV およびアジュバントを含む請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 16】

EIAV レンチウイルスキメラが EIAV の gag 遺伝子の欠失を含み、さらに欠失され 50

た領域に別のレンチウイルス g a g 遺伝子の挿入を含む請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 17】

挿入される遺伝子が p 30 を発現するビスナウイルスから誘導される請求項 16 に記載のワクチン。

【請求項 18】

外来性遺伝子が遺伝子欠失領域に挿入され、該挿入された遺伝子がワクチン接種された哺乳動物において使用するための診断手段を提供し、ここで欠失された遺伝子に対する抗体が野生型 E I A V に暴露されたウマにおいて見出される、遺伝子欠失 E I A V マーカーワクチンを含む、E I A V により惹起される疾患および / または感染からウマを感染防御するためのワクチン。

10

【請求項 19】

請求項 18 の遺伝子欠失領域に挿入された外来性遺伝子を検出する診断試験。

【請求項 20】

請求項 16 の遺伝子欠失領域に挿入された外来性遺伝子により産生される生成物に対する抗体を検出する診断試験。

【請求項 21】

ウマ科動物が安全にワクチン接種され、コギンズ試験または p 26 抗体を測定するいずれか別の試験で抗体陽転しないで疾患および / または感染を防御することを可能にする E I A V ワクチン。

【請求項 22】

ワクチンが遺伝子欠失 E I A V を含み、該遺伝子欠失 E I A V により p 26 の発現能を欠如しており、これを用いてワクチン接種されたウマ科動物をワクチン接種されていないまたは感染したウマ科動物から区別できる、E I A V からウマ科動物を有効におよび安全に免疫するワクチン。

20

【請求項 23】

ワクチンが、外来性遺伝子が遺伝子欠失の領域に挿入された遺伝子欠失 E I A V を含有し、ここで挿入された遺伝子がマーカーおよび / または E I A V 以外の生物により惹起される疾患からの感染防御を提供する、E I A V を含む生物により惹起される疾患および / または感染からウマを感染防御するためのワクチン。

【請求項 24】

さらにアジュバントを含む請求項 1 のワクチンを哺乳動物に投与することを含む、E I A V により惹起される疾患に対して該哺乳動物を免疫する方法。

30

【請求項 25】

1) レンチウイルスから g a g 遺伝子の全てまたは部分を欠失して、欠失領域を提供すること ;
 2) 異なるレンチウイルスからの g a g 遺伝子を、得られた欠失領域に挿入してキメラを作製すること ;
 3) 得られたキメラで組織培養物をトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞培養物を産生すること ;
 4) トランスフェクトされた細胞培養物を成長させること ;
 5) トランスフェクトされた細胞培養物を収穫すること ;
 6) 収穫された細胞培養物を場合によって不活性化すること ; および
 7) 収穫された細胞培養物を場合によってアジュバント処理すること ;
 を含むレンチウイルスワクチンを調製する方法。

40

【請求項 26】

g a g 遺伝子の全てまたは部分が欠失されているレンチウイルスが E I A V である請求項 25 の方法。

【請求項 27】

異なるレンチウイルスがビスナウイルスである請求項 25 の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【0001】

(発明の分野)

本発明はレンチウイルスにより惹起される疾患の臨床上の徴候および/または感染からの免疫を提供するワクチン組成物に関する。より具体的には、本発明はウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)による疾患の臨床上の徴候および/または感染からの免疫を提供するウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)ワクチン組成物に関し、該組成物によりワクチン接種したおよびワクチン未接種で暴露されてまたは疾患を患っている哺乳動物を診断により区別でき、p26特異的抗体を検出するコギンズ試験またはその他の類似の試験を用いてワクチン接種した動物が陰性であると判断できる。

【0002】

先行技術の簡単な説明

レンチウイルスはヒト(HIV)、ウマ(EIA)、ネコ(FIV)、ウシ(BIV)およびサル(SIV)などの多くの型の哺乳動物における持続感染および慢性疾患を引き起こすレトロウイルスのサブファミリーである。その疾患は全て血液感染により伝播する。EIAVは全世界的にウマの持続感染および慢性疾患を惹起する。EIAVではウイルス粒子を担持するハエおよびその他の昆虫を噛むことによりあるウマから別のウマへと血液感染がおこる。感染したウマの最初の疾患サイクル(臨床症状の発現)は通常ウイルスに暴露された後42日以内に生じる。最初のサイクルは通常EIAの急性段階と称され、発熱、血小板減少症、食欲減退、抑うつおよび血漿高レベルのウイルス血症で特定される。貧血は通常この段階では検出されない。この最初の発熱性の症状発現は通常1から5日後に観察され、血漿随伴ウイルス量が劇的に低下することにより起こる。急性段階後、臨床正常のままの動物もいるが、重篤な貧血により発熱、血小板減少症、浮腫および劇的な体重減少、および死亡を伴う疾病の複合発作を起こす動物もいる。Payneら、Virology 161:321-331(1987)(出展明示により本明細書の一部とする)の報告によれば、レンチウイルスによる持続感染の例としてはEIAVで示されるように、ヌクレオチド配列データがレンチウイルスゲノムの変異率が高いことを示している。EIV感染では、一般に持続感染中に中和抗体が新規の抗原性ウイルス変異体を選別するのを補助すると考えられている。また、EIV感染では血清学的に区別されるEIV変異体は恐らく無作為にウイルスゲノム変異を起こす免疫選別強制力により出現する。いずれかの特別な理論に縛られることなく、疾患の臨床徴候をそれ以上示さないウマは、ウイルスおよびその既知の変異体に対して防御可能なほど免疫応答が発達していると考えられている。

【0003】

レトロウイルスのレンチウイルスサブファミリーのメンバーであるEIAVは病原性、免疫学、ワクチン学、HIVの処置および予防のモデルとして有用である。血中抗体試験により測定されるように(コギンズ試験または類似のp26検出試験)EIVへの暴露が示されたウマは屠殺かまたは厳密な隔離のいずれかを必要とするので疾患はそれ自体重要である。コギンズ試験はとりわけ米国に輸入または米国から輸出されるウマの施行試験に全世界的に広く用いられている。従って、有効なEIAVワクチンはウマをコギンズ試験またはp26を検出するいずれか別の試験で抗体陽転しないことが重大である。従って、EIAVに対する感染防御に有用なワクチンではp26を発現する遺伝子の全てもしくは部分を欠失するかまたはレギュレーター遺伝子を欠失するかもしくは停止コドンもしくは外来遺伝子を挿入することによりその発現を阻害することが重要である。本明細書で記載する方法の使用により、有効かつウイルス感染から区別できる免疫応答を引き出すことができるその他のレンチウイルス(HIV、FIV、BIVおよびSV)のワクチンを提供することができる。と予測される。

【0004】

その他のレンチウイルス、例えばHIV、BIV、FIVおよびSIVと同様EIAVの遺伝学的構成ではそれは複合レトロウイルスと分類される。EIAVゲノムは全てのレトロウイルスに共通のgag、pol、およびenv規定遺伝子および3つのアクセサリー

10

20

30

40

50

遺伝子 (S 1、S 2 および S 3) を含有する。g a g 遺伝子はマトリックス抗原 (M A)、カプシド抗原 (C A)、ヌクレオカプシド (N C) および p 9 として同定されるタンパク質と称されるウイルスのコアタンパク質をコードする。e n v 遺伝子はウイルスエンベロップタンパク質 (g p 9 0 および g p 4 5) をコードする。p o l 遺伝子はデオキシ U T P アーゼ (D U)、逆転写酵素 (R T) およびインテグラーゼ (I N) と称する、ウイルスゲノムを複製する酵素をコードする。S 1 オープン・リーディング・フレーム (O R F) は、全てのウイルス遺伝子の発現を刺激するウイルス長末端反復 (L T R) プロモーターエレメントに作用するウイルス T a t タンパク質、すなわち転写トランスアクチベーターをコードする。S 3 O R F は、ウイルス構造遺伝子発現を制御する R e v 応答エレメント (R R E) と称するその標的 R N A 配列と相互作用することにより作用する転写後アクチベーターである R e v タンパク質をコードしてウイルス構造遺伝子発現を制御する。S 2 遺伝子は T a t の第 2 のエクソンに直後の、E n v タンパク質のアミノ末端と重複する p o l - e n v 遺伝子間領域に位置する (図 1 参照)。これは算定分子量 7.2 k D a の 65 個のアミノ酸タンパク質をコードする。ウイルス複製サイクルの後期で T a t、S 2 タンパク質および E n v タンパク質を各々コードするトリシストロン m R N A のリボソームリーキスキャニングにより S 2 が合成されるようである。

10

【0005】

g a g コード化カプシド抗原 (C A) または p 2 6 タンパク質はウイルスエンベロップに包まれ、ウイルス R N A ゲノムを含有するビリオンのカプシドシェルを含む。相同性 C A タンパク質は H I V、F I V、B I V および S I V に存在し、また各々の g a g 遺伝子によりコードされる。前記したように、p 2 6 抗原に対する抗体の検出はコギンズ試験およびウマの E I A を診断するために用いられる特定のその他の市販の試験に基づく。現在の規制ガイドラインに適合させるために E I A V p 2 6 に対する血清抗体の検出に基づくこれらの診断アッセイでは E I A V ワクチンが抗体陽転を引き起こしてはならないことが重大である。p 2 6 抗原は、ワクチンにおける極めて少量のその存在が抗体応答を刺激し、診断アッセイにおいて抗体陽転し得る点で高度に抗原性である。E I A V のブールから p 2 6 抗原を抽出または削除する試みはワクチン製造には現実的ではなかった。従って、p 2 6 の発現に干渉する g a g 遺伝子、g a g 遺伝子のセグメントの排除または p 2 6 の発現を制御する調節遺伝子の欠失もしくは不活性化によりそれを排除できると思われる。しかしながら、g a g 遺伝子またはそのセグメントの欠失によりインビトロ (組織培養) またはインビボで複製できない E I A V 粒子が生成されることが発明者により決定された。従って、p 2 6 の発現を単純に欠失または阻害することにより、不可能でないにしても非現実的であるワクチン製造のために E I A V を成長させる。

20

30

【0006】

エンベロップタンパク質 (E n v) は感染中の優性な免疫標的であるので、疾患からの感染防御および感染からの感染防御を提供するのに最適のタンパク質であると考えられる。疾患からの感染防御とはウイルスに暴露された哺乳動物が臨床徴候 (発熱、昏睡、貧血、死亡等) を示さないが、その血液中にウイルス粒子を担持し、この粒子は逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応試験 (R T - P C R) により検出可能であることを意味する。感染からの感染防御とはウイルスに暴露された哺乳動物が E I A の臨床徴候を示さないが、血液中に R T - P C R 検出可能なウイルス粒子を含有しないことを意味する。E I A V の主要なエンベロップタンパク質は g p 9 0 および g p 4 5 である。これらは E I A V の感染防御抗原または感染防御成分と考えられている。感染防御成分なる用語は前記したような疾患からの感染防御または感染からの感染防御のいずれかを生み出す抗原を意味する。従って、いずれかの有効なレンチウイルスワクチンはレンチウイルスにより惹起される疾患から哺乳動物を有効に感染防御するレンチウイルス E n v タンパク質 (例えば g p 1 2 0、g p 9 0 および g p 4 5) の量を含有することが重要である。E I A V からの感染防御成分には非限定例としては g p 9 0 および g p 4 5 などがある。

40

【0007】

E n v タンパク質、とりわけ E I A V の g p 9 0 および g p 4 5 の精製によりワクチンを

50

調製できることは明白であると思われる。実際に g p 9 0 および g p 4 5 が E I A V から精製されている調製物を含むワクチンが試みられたが、成功には至らなかった。I s s e l ら (J . V i r o l . 3 3 9 8 - 3 4 0 8 、 1 9 9 2 年 6 月) は g p 9 0 / g p 4 5 ワクチンが相同性 E I A V (サブユニットを対抗に用いたのと同じの E I A V 株から誘導した) により引き起こされた感染からポニーを防御したと報告している。しかしながら、これらのサブユニット含有ワクチンは変異性 E I A V 株に対する疾患または感染のいずれからもウマを防御しなかった。実際に後者では疾患徴候が増強された。サブユニット E I A V ワクチンによる疾患の増強は対抗後に疾患を増強すると思われる S I V および F I V サブユニットワクチンでの知見をうらずけるものである。I s s e r ら (前出) は、サブユニット増強効果のためレンチウイルス (例えば H I V 、 F I V 、 E I A 、 B I V および S I V) のサブユニットワクチンを完全なものにすれば明らかに惹起を起こすと結論づけた。

10

【 0 0 0 8 】

I s s e l ら (前出) はまたウイルス全体の E I A V ワクチンによる感染の予防をも報告している。しかしながら、このワクチンでウマをワクチン接種することによりコギンズ試験陽性 (p 2 6 陽性) であるウマが産生する。前記したように、米国で実施されている撲滅計画により p 2 6 に関して試験して陽性であったウマは安楽死させるか厳密に隔離するかのいずれかである。加えて該ワクチンに含まれるウイルス量は 1 ミリグラムであり、商業的には現実的でない値である。従って、このウイルス全体ワクチンは法的な要求事項または商業化に適合しない。

20

【 0 0 0 9 】

ロバウイルスワクチンが中国により 2 0 年以上用いられている。このワクチンはロバ白血球弱毒化 E I A V 感染細胞からの全 E I A V 遺伝物質および感染したロバからのロバ適合性 E I A V の末梢血のウイルスからのリボ核酸を用いてワクチンを発達させた (X i n h u a N e w s A g e n c y 、 1 9 9 9 年 5 月 6 日 参 照) 。 予 想 さ れ る よ う に 、 こ の ワクチンはワクチン接種したウマまたはその他のワクチン接種したウマ科の動物において p 2 6 陽性応答 (コギンズ試験陽性) を生み出す。かかるワクチンはウマ科の動物がコギンズアッセイまたはその他の p 2 6 特異抗体試験により試験されているこれらの国々では認められていない。加えて多くの国々で動物薬として適用される生ワクチンは認められていない。

30

【 0 0 1 0 】

レンチウイルスにより惹起される疾患または感染に対して哺乳動物、とりわけ E I A に対してウマ科の動物を免疫する有効で安全な方法がないこと、およびレンチウイルス疾患とりわけ H I V 、 F I V および E I A はこのような世界中に伝播した著名な疾患であるので、長い間かかるワクチンを調製することが必要とされている。

【 0 0 1 1 】

本発明のワクチンはレンチウイルスにより惹起される疾患から哺乳動物を有効におよび安全に免疫するワクチン組成物を提供する。本発明のワクチンは E I A からウマ科の動物を感染防御し、ここでワクチン接種されたウマ科の動物は野生型の感染したウマ科の動物から区別でき、該ウマ科の動物はコギンズ試験で抗体陽転せず、インビボで複製しない。本発明により教示されるワクチンを H I V 、 F I V 、 B I V および S I V のワクチンなどのいずれかのレンチウイルスワクチンの製造に使用できることは十分に想定される。

40

【 0 0 1 2 】

(図面の簡単な説明)

図 1 は E I A V_{U K} と称する E I A V の概略図マップである。

【 0 0 1 3 】

図 2 は感染性クローン E I A V_{U K} の環状マップである。

【 0 0 1 4 】

図 3 a は分子クローン E I A V_{U K} の直線状概略図である。

【 0 0 1 5 】

50

図 3 b は C M V プロモーターを有する分子クローン E I A V_{U K} の直線状概略図である。

【 0 0 1 6 】

図 3 c は C A 遺伝子を欠失した分子クローン p C M V E I A V_{U K} の直線状概略図である。

【 0 0 1 7 】

図 3 d はカナマイシン抵抗性遺伝子 (K a n^r) で置換したアンピシリン抵抗性遺伝子 (A m p^r) を有する分子クローン p C M V E I A V_{U K} C A の直線状概略図である。

【 0 0 1 8 】

図 3 e は p 2 6 欠失プロウイルスクローン p C M V . C A . n e o の直線状概略図である。

10

【 0 0 1 9 】

図 4 は p 2 6 欠失プロウイルスクローン p C M V . C A . n e o の環状マップである。

【 0 0 2 0 】

図 5 a は E I A V_{U K} 分子クローンの直線状概略図である。

【 0 0 2 1 】

図 5 b は C M V プロモーターインサートを有する E I A V_{U K} クローン (C M V E I A V_{U K}) の概略図である。

【 0 0 2 2 】

図 5 c は p C M V E I A V_{U K} v i s 2 の概略図である。

【 0 0 2 3 】

図 5 d はカナマイシン抵抗性マーカ含有するプロウイルスクローンの直線状概略図である。

20

【 0 0 2 4 】

図 5 e は最終的な p C M V E I A V_{U K} V i s 2 . n e o プロウイルス構築物の直線状概略図である。

【 0 0 2 5 】

図 6 は最終的な p C M V E I A V_{U K} V i s 2 . n e o プロウイルス構築物の環状マップである。

【 0 0 2 6 】

図 7 は C A 遺伝子 / E I A V p 2 6 のヌクレオチドおよびアミノ酸マップである。

30

【 0 0 2 7 】

図 8 は C A 遺伝子 / ビスナ p 3 0 のヌクレオチドおよびアミノ酸マップである。

【 0 0 2 8 】

図 9 は E I A V の p 2 6 および ビスナウイルスの p 3 0 間の相同性の比較である。

【 0 0 2 9 】

図 1 0 a は g p 9 0 および p 2 6 モノクローナル抗体をディテクターとして用いる p 2 6 欠失クローン、ビスナキメラクローンおよび E I A V のサブクローンのウェスタンブロットである。

【 0 0 3 0 】

図 1 0 b は p 3 0 モノクローナル抗体をディテクターとして用いるいくつかの p 2 6 欠失クローン、ビスナキメラクローンおよび E I A V のサブクローンのウェスタンブロットである。

40

【 0 0 3 1 】

図 1 1 は p C M V E I A V_{U K} . V i s 2 n e o プロウイルス構築物でトランスフェクトされた E D 細胞の種々サブクローンの逆転写酵素活性を示すグラフである。

【 0 0 3 2 】

(発明の概要)

本発明はレンチウイルスにより惹起される疾患および / または感染からの免疫を哺乳動物に作製するワクチン組成物を提供し、該組成物はインビボでウイルスの複製を阻害する遺伝子の欠失を含む。より具体的には、本発明はレンチウイルスがインビボでの複製能が欠

50

如するが、レンチウイルス感染防御成分を保持したまま欠失を含むワクチンについて記載する。該ワクチンによりワクチン接種された、およびワクチン接種されていないが暴露されている哺乳動物の区別が可能になりワクチンとして哺乳動物に投与した場合に安全性および免疫を提供する。好ましくは該ワクチンは哺乳動物が安全にワクチン接種できるようにし、野生型レンチウイルスへの暴露からの感染防御を提供するレンチウイルスにおける少なくとも1つの欠失を包含する。本発明はさらにgag遺伝子における欠失、とりわけレンチウイルスがインビボまたはインビトロでカプシド抗原(CAタンパク質)を発現不能にする欠失を有するレンチウイルスをさらに包含する。レンチウイルスの実例はウマ伝染性貧血ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)またはサル免疫不全ウイルス(SIV)である。「安全」なる用語は本発明のワクチンでの哺乳動物のワクチン接種が、ワクチン接種された動物において感染、疾患またはいずれかその他の副作用を起こさないことを意味する。

10

【0033】

本発明はまた外来の遺伝子が遺伝子を欠失した領域に挿入され、該挿入遺伝子がワクチン接種された哺乳動物で使用するための診断手段および感染からの外来性疾患からの感染防御能を提供するマーカーワクチンをも包含する。

【0034】

好ましい実施形態では、本発明は哺乳動物をEIAから効果的および安全に免疫するためのワクチンを包含し、該組成物は、該遺伝子欠失構築物がインビボでウイルス複製を阻害し、EIAV感染防御成分を保持しているがインビボでp26の発現を阻害する遺伝子欠失したEIAV構築物を含む。このようにワクチン接種されたウマはEIAVにより惹起される疾患から感染防御され、コギンズ試験またはp26抗体を測定するいずれか別の試験で血清抗体陽転しない。本明細書で用いるEIAなる用語はウマ伝染性貧血を意味し、EIAVなる用語は疾患を引き起こすウマ伝染性貧血ウイルスを意味する。加えて該EIAVワクチンは哺乳動物において臨床疾患を惹起することができず、またはウマを含む別の哺乳動物に伝播もしくは拡散することができない。

20

【0035】

別の実施形態では、本明細書はEIAVにより惹起された疾患から安全および効果的に感染防御されるワクチン接種されたウマをワクチン接種されていないウマから該ワクチンにおける外来性遺伝子発現の検出により区別でき、ワクチン接種された動物において抗体を産生するマーカーワクチンを包含する。この外来性遺伝子または遺伝子産物を検出するための診断試験をも記載する。

30

【0036】

本発明のより具体的な実施形態はgag遺伝子内の1つもしくはそれ以上の遺伝子欠失、gagCA生成に及ぼす制御効果を有する遺伝子内での1つもしくはそれ以上の欠失、gagCA遺伝子もしくはCA生成を制御する遺伝子への1つもしくはそれ以上の停止コードの挿入、またはgagCA遺伝子もしくはCA生成を制御する遺伝子への外来性遺伝子の挿入によりp26抗原発現能が欠如しているワクチンである。外来性遺伝子の挿入とは挿入された遺伝子がEIAVに随伴される遺伝子ではないことを意味する。該外来性遺伝子はEIAV以外の生物から入手される。

40

【0037】

加えて、ワクチンのEIAVは非限定例としてはp26の発現に影響するgag遺伝子における欠失に限定されずに複数の欠失が含有されるような欠失を作製できると予測される。

【0038】

最後に、該遺伝子欠失(欠失領域)は複合感染防御ワクチンを製造するために外来遺伝子を挿入するという潜在的な効果を果たしうると予測される。これは外来性遺伝子(例えばインフルエンザヘマグルチン遺伝子)を担持するEIAワクチンでの1回ワクチン接種によりレンチウイルス疾患(例えばHIVまたはEIA)および挿入した外来性遺伝子に随伴される疾患(例えばヒトまたはウマインフルエンザ)の双方から哺乳動物が感染防御さ

50

れ得ることを意味する。

【0039】

(発明の詳細な説明)

本発明はE I A V、H I V、F I V、B I VおよびS I Vからなる群から選択されるレンチウイルスにより惹起される疾患に対して哺乳動物を有効におよび安全に免疫するためのワクチンを包含し、該組成物は遺伝子欠失レンチウイルス構築物を含む。本発明はインビボでレンチウイルスが複製する能力を欠如させ、レンチウイルス感染防御成分は保持している欠失を含むワクチンを包含する。レンチウイルス感染防御成分とはエンベロープに随伴される感染防御抗原を意味し、該抗原には非限定例としてg p 1 2 0、g p 9 0およびg p 4 5などがある。本発明はカプシド抗原(C Aタンパク質)をインビボで発現できないレンチウイルスを包含する。

10

【0040】

特異的制限エンドヌクレアーゼを用いて1つまたはそれ以上の遺伝子の全てまたは部分を除去することによりレンチウイルスゲノムに欠失を作ることができる。除去に好ましい遺伝子はカプシド抗原(C A)をコードする遺伝子である。P C R、ライゲーションおよびP C Rクローニング(選択された遺伝子配列を欠失するために)を用いてかかる遺伝子欠失を行いうる。レンチウイルスの遺伝子配列および切断すべき遺伝子の配列が分かれば制限エンドヌクレアーゼを用いて遺伝子の特定の部分を除去することもできる。特異的制限エンドヌクレアーゼを用いてg a g遺伝子全体または部分を除去できる。加えて、好ましくは5'末端で停止コドン遺伝子に挿入でき、そこで停止コドンが遺伝子にそのC Aタンパク質を発現させないようにする。さらに、別のレンチウイルスまたは非関連ウイルスからの外来性遺伝子を遺伝子欠失領域に挿入して複合感染防御ワクチンを作ることができる。後者の場合、本発明はE I A V以外の生物、好ましくはウイルスからの感染防御抗原を発現する遺伝子を挿入するのに十分な大きさのE I A Vゲノムの領域の欠失について記載している。従って、ウマインフルエンザA 2またはA 1からのヘماغルチニン(H A)遺伝子をg a g C A領域に挿入して、E I A Vのg p 9 0およびg p 4 5並びにA 1およびA 2ウマインフルエンザのH Aを発現させることができる。これによりE I A Vおよびウマインフルエンザウイルスにより惹起されるウマの疾患から感染防御できるワクチンが提供される。また、1、2および4型ウマヘルペスからの遺伝子をE I A V構築物に挿入してE I A Vおよびウマヘルペスウイルスにより惹起されるウマの疾患に対する感染防御を提供することができる。E I A Vに挿入される感染防御抗原をコードする遺伝子を有し得る別のウマウイルスには、非限定例としてはウマ動脈炎、脳脊髄炎ウイルス(イースタン、ウェスタン、ベネズエラおよびリフトバレー熱ウイルス)などがある。寄生虫(ウマ原虫脳脊髄炎すなわちE P Mを引き起こすサルコシスティス・ニューローナ(S a r c o c y s t i s n e u r o n a)、恐らくE P Mにも関連するネオスポラ・ヘヒューゲシ(N e o s p o r a h e u g e s i)、トキソプラズマ・ゴンディ(T o x o p l a s m a g o n d i i)等)からの感染防御抗原をコードする遺伝子をE I A V構築物に挿入してこれらの疾患に対して感染防御することもできる。最後に、ウマの細菌性疾患をコードする遺伝子には、非限定例としてはストレプトコッカス・エクイ(S t r e p t o c o c c u s e q u iおよびクロストリジウム・テタニ(C l o s t r i d i u m t e t a n i))などがあり、これをE I A V構築物に挿入して多重疾患感染防御を提供することができる。ウイルス構築物により提供される免疫を増強するために免疫刺激タンパク質(免疫変調遺伝子)または糖タンパク質をコードする遺伝子さえも遺伝子欠失領域に挿入することができる。最後にマーカーワクチンを製造するためにウマ以外の遺伝子、例えばビスナウイルスからの遺伝子を欠失遺伝子領域に挿入することができる。該マーカーワクチンはワクチン接種したウマをワクチン接種していないかまたは感染したウマから区別するのに有用である。

20

30

40

【0041】

広く報告されているように、レンチウイルスの遺伝子(例えばC A遺伝子)の欠失および該ライブラリー遺伝子の挿入の方法はP C R、ライゲーションの技術およびP C Rクロー

50

ニングの方法を利用する。

【0042】

CAオープン・リーディング・フレーム（ORF）の上流のプロモーター・レンチウイルスゲノムの領域を増幅するようにプライマーを設計する。さらなるプライマーを用いてCAの下流のプロモーター・レンチウイルスゲノムの領域を増幅する。増幅されたPCR産物をアガロースゲル電気泳動を用いて精製し、共にライゲーションする。上流フラグメントの5'プライマーおよび下流フラグメントの3'プライマーを用いてPCRの最終ラウンドを実施し、続いてゲル精製する。最終産物はCAオープン・リーディング・フレームの欠失を有する典型的な大きさのgag遺伝子を含む。PCR産物をゲル精製し、特異的制限エンドヌクレアーゼで消化し、同一の制限酵素または同一のプラント末端を作る酵素で消化したプラスミドとライゲーションできるようにする。好ましくはライゲーションされたインサートをプロモーターおよびクロンの選別を可能にする遺伝子（例えば抗生物質抵抗性遺伝子）を含むレンチウイルスクロンに付加し、このようにプロモーター・レンチウイルスクロンを作製する。次いでプロモーター・レンチウイルスクロンをコンピテント細菌細胞に形質転換し、細菌コロニーを遺伝子の挿入に関してスクリーニングする。クロンを遺伝子シーケンスにより、CA領域が欠失しており、インサートが作られていることを確認できる。

10

【0043】

感受性のある組織培養細胞をトランスフェクトし、液体を収穫し、液体をアジュバントと共に処方することにより、遺伝子欠失/遺伝子挿入構築物（本明細書ではキメラとも称する）を商業的に製造（大容量での製造）できる。該収穫された液体を技術分野で既知の失活剤、例えばホルマリン、バイナリー・エチレンイミン、ベータ・プロピオラクトン、チメロサルおよびプソラレンなどで場合によっては不活性化してもよい。遺伝子欠失/遺伝子挿入構築物とは、その欠失された遺伝子または部分が、非限定例としてはレンチウイルスまたはレンチウイルス以外の別のウイルスからの遺伝子により部分的にまたは全体的に置換されたレンチウイルスを意味する。該遺伝子欠失/遺伝子挿入構築物がインビトロで置換されない場合、トランスフェクション促進剤、例えばDEAEデキストラン、ジーンPORTER（商標）（ジーン・セラピー・システムズ）等を用いて組織培養細胞をトランスフェクトして細胞DNAに必要なゲノム物質を組み込み、細胞にレンチウイルス抗原を産生させることができる。

20

30

【0044】

トランスフェクション用に組織培養細胞を組織培養容器（例えばプレート）のウェルに播種し、トランスフェクション促進剤の存在下、遺伝子欠失構築物または遺伝子欠失/遺伝子挿入構築物に暴露し、インキュベートしてトランスフェクトさせ、次いで選択培地で積層する。選択培地ではトランスフェクトされていない細胞は生存できないが、トランスフェクトされた細胞の成長を阻止しない成分を含有するいずれかの栄養培地として定義される。このため、一般には該選択培地での成長を可能にするために遺伝子欠失構築物は抵抗性遺伝子のインサートを含有する。選択培地は抗生物質、抗微生物薬および選択的抗生物質を含有できる。一度トランスフェクトされた細胞が選択されて複製されると感染防御抗原の産生および欠失された遺伝子産物が発現しないことに関してこれらを試験する。次いでこれらの特性を示すこれらのクロンを最初の容器から細胞を除去することにより選択培地に広げて希釈し、さらに大きな容器に移し換える。例えば、最初のトランスフェクションを24ウェル培養プレートで実施できる。クロンの選択の後、生存しているトランスフェクトされた細胞を6ウェルプレート、25cm²フラスコ、75cm²フラスコ、次いでローラボトル（1700cm²またはそれ以上）に継代する。トランスフェクトされた細胞は持続的にウイルス構築物を産生するが、これは安定したトランスフェクションまたは産生細胞を示している。トランスフェクション細胞クロンが安定であることが示された後、安定してトランスフェクトされたマスター細胞（種々の制御作用により持続的感染した細胞とも称する）をワーキング細胞およびプロダクション細胞に拡張するために調製することができる。ワーキング細胞はプロダクション細胞を調製するために用いら

40

50

れる細胞として定義される。プロダクション細胞はワクチンを製造するために用いられる。マスター細胞、ワーキング細胞およびプロダクション細胞は全て一般にトランスフェクションクローンの生存性および安定性を保持するために液体室素中に保存される。

【0045】

本発明の実施において、遺伝子欠失構築物を含むワクチンはインビボで、および恐らくインビトロでの複製能が欠如している。前記により理解されるように、この型の欠失によりインビトロで複製または成長不能となる場合、前記したようなトランスフェクションおよびクロニングが必要となる。

【0046】

以下はインビボでカプシド抗原タンパク質（CAまたはp26）を発現できないレンチウイルスの説明であるが限定するものではない。p26が発現されないようなCAでの欠失はインビトロまたはインビボで複製できない遺伝子欠失構築物に至ることがEIAVで決定されている。この理由でかかるCA欠失レンチウイルスが安定したトランスフェクション細胞系において産生されなければならないことが予測される。これは安定したトランスフェクション細胞系を産生するために前記のようにトランスフェクトされなければならないことを意味する。

10

【0047】

本発明はさらに具体的にはp26抗原発現能の欠如がgag遺伝子内の1つもしくはそれ以上の遺伝子欠失またはgag CA産生に制御効果を有する遺伝子内の1つもしくはそれ以上の欠失、または1つまたはそれ以上の停止コドンの挿入または外来性遺伝子の挿入の結果である組成物を包含する。

20

【0048】

加えて、ワクチン組成物中のEIAVは非限定例としてはp26の発現に影響するgag遺伝子の欠失などの複数の欠失を含有するように別の欠失を作製できると予測される。最後に、該遺伝子欠失（欠失領域）は、外来性遺伝子を挿入する可能性のある点として提供され、複数の感染防御ワクチンおよび非常に重要なマーカー遺伝子であるEIAVの特徴を再現できると予測される。ワクチン接種を受ける哺乳動物において抗体を産生する外来性遺伝子を含有するワクチンがマーカーワクチンであり、該抗体は診断試験により検出され、ワクチン接種されたウマをワクチン接種されていないウマから区別する、およびワクチン接種されたウマを感染したウマから区別するのに用いられる。EIAVでは、コギンズ試験または同等の試験でp26と交差反応しない異なるレンチウイルスからのCA遺伝子を挿入するのが好ましい。従って、異なるレンチウイルス、例えばビスナウイルスからのp30遺伝子の挿入によりEIAVワクチンを哺乳動物、好ましくはウマのワクチン接種に使用することが可能になると予測される。該ウマはコギンズ試験またはp26に対する抗体の存在を測定するいずれかその他の試験でp26抗体を示さず、また酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫拡散試験、蛍光抗体試験（FA）または哺乳動物において抗体を検出するのに用いることができるいずれかその他の試験により検出できるp30に対する抗体を示す。

30

【0049】

前記したgag遺伝子欠失構築物はインビトロでは成長または複製しないと予測される。従って、製造目的で大量に産生するために、クローン化構築物を細菌細胞または哺乳動物細胞（組織培養）のいずれかにより発現できる。形質転換の方法は前記で簡単に記載したが実施例において詳細に記載する。安定してトランスフェクトされた組織培養細胞系（持続的感染したマスター細胞）の産生が好ましく、組織培養においてトランスフェクトされた哺乳動物細胞により達成される。EIAV構築のための好ましい技術は以下の実施例において記載する。

40

【0050】

得られたp26欠失構築物をワクチンに使用して効果的で安全にウマをEIAVから免疫することができ、該ワクチンは遺伝子欠失EIAV構築物を含み、ここで該遺伝子欠失はインビボでp26の発現を阻害する。

50

【 0 0 5 1 】

本発明のワクチンウイルスをさらに失活剤、例えばホルマリン、ベータ・プロピオラクトン、バイナリー・エチレンイミン、トリメラソールまたは効果的にウイルスを不活性化するいずれかその他のもので処理することができる。かかる作用物質を 0 . 0 0 0 0 1 % から 0 . 5 %、好ましくは 0 . 0 0 0 0 1 % から 0 . 1 %、さらに好ましくは 0 . 0 0 0 0 1 % から 0 . 0 1 % にわたる量で用いることができる。

【 0 0 5 2 】

加えて、アジュバントまたは免疫変調物質 / 免疫刺激物質をワクチンに加えてワクチンにより作られた免疫応答を増強することができる。アジュバントを重合体、例えばカルボボール（登録商標）基盤、ハプロゲン（登録商標）およびポリゲン（登録商標）、阻害共重合体、水中油例えばエマルシゲン（登録商標）またはエマルシゲン（登録商標）プラス、油中水、アルミニウム塩、脂質基盤、リポタンパク質、エンドトキシン基盤、およびその組み合わせからなる群に関して選択できる。免疫変調物質および免疫刺激物質には、非限定例としてはコリネバクテリア・ピオゲネスおよびその抽出物またはサブユニット、パラポックスウイルスおよびその抽出物またはサブユニット、インターフェロン産生を刺激する修飾生ウイルス、並びにサイトカインなどがある。本発明のワクチンをいずれかの経路で投与できる。例えば、これらを筋肉内、皮下、皮内、鼻腔内、経口、静脈内または腹腔内投与できる。ワクチンは筋肉内、皮下、経口、または鼻腔内で投与するのが好ましい。

【 0 0 5 3 】

別の抗原をワクチンに付加して多成分ワクチンを産生できる。このために、別のウイルス、細菌または寄生虫からの抗原をアジュバントまたはその他の賦形剤と共に処方し、次いで本発明の E I A V 構築物と組み合わせる。従って、本発明はウマインフルエンザ（A 1 および A 2）、ウマヘルペスウイルス（サブタイプ 1、2、3 または 4）、ウマ動脈炎ウイルス、イースタンウマ脳脊髄炎、ウェスタンウマ脳脊髄炎、ベネズエラウマ脳脊髄炎、リフトバレー熱ウイルス、サルコシスティス・ニューローナ（*Sarcocystis neurona*）、ネオスポラ・フゲシ（*Neospora hughesi*）、トキシプラズマ・ゴンジ（*Toxoplasma gondii*）、ギアルディア・ラムビア（*Giardia lamblia*）、ストレプトコッカス・エクイ（*Streptococcus equi*）、ストレプトコッカス・ズーエピデミカス（*Streptococcus zooepidemicus*）、ロドコッカス・エクイ（*Rhodococcus equi*）、クロストリジウム・ボツリナム（*Clostridium botulinum*）、クロストリジウム・テタニ（*Clostridium tetani*）、クロストリジウム・ディフィシレ（*Clostridium difficile*）またはいずれかその他のウマ疾患産生物質から選択される抗原と組み合わせた E I A V 構築物を包含する。クロストリジウム・ボツリナムには A、B、C、D、E および / または F 型を含んでよい。

【 0 0 5 4 】

最後に、診断試験を用いて欠失した遺伝子タンパク質に対する、挿入した遺伝子タンパク質に対する、または双方のタンパク質に対する抗体の存在または不在を測定することによりワクチン接種したウマをワクチン接種していないおよび / または感染したウマから区別することができる。また、PCR 基盤の診断試験を用いてウマからの体液または組織中の遺伝子または遺伝子配列の存在または不在を検出できるため、ウマが E I A V に感染したかまたは本発明の組成物でワクチン接種したかどうかを検出できる。最適な診断はウマにおける p 2 6 抗体の存在または不在を測定する。加えて、挿入された遺伝子がウマ以外の生物、例えばビスナウイルスに由来する場合にマーカーワクチンのタンパク質産物を測定できる。本明細書に記載する実施例にはビスナウイルスからの p 3 0 遺伝子の挿入を含み、ここで p 3 0 はワクチン接種されたウマでは検出できるがワクチン接種していないか、または E I A V 感染したウマでは存在しない。

【 0 0 5 5 】

診断による区別を技術分野で既知のイムノアッセイ、抗体検出アッセイ（例えば間接的蛍

10

20

30

40

50

光抗体、免疫拡散、寒天拡散、電気泳動) またはPCR基盤のアッセイを發展させることにより測定できる。イムノアッセイの実例は、血清、血液または組織中の特異的タンパク質に対する抗体を検出および/または定量する酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)である。ELISA技術を用いて血液、血清または組織中のウイルス随伴抗原の存在または不在を検出することもできる。「ウイルス随伴抗原」とは遺伝子発現産物、例えばEIAVのp26タンパク質またはヒスナウイルスのp30タンパク質すなわちp26もしくはp30遺伝子の場合、各々の存在または不在を意味する。PCR基盤のアッセイを用いてウマの血液、血清または組織中の遺伝子または遺伝子配列の存在または不在を測定しており、従ってこれはウマが場合によって感染していたか、またはワクチン接種されていたことを示している。この特定の実施形態ではELISAによりp26またはp30タンパク質に対する抗体の存在が検出される。p26抗体が試験されたウマに存在した場合、ウマがEIAVに感染していたことを示す。非機能的p26遺伝子を含有する遺伝子変異EIAV構築物でワクチン接種されているウマは血清中のp26抗体を含有しない。p30遺伝子挿入を含む遺伝子変異EIAV構築物でワクチン接種されているウマは血清中のp30抗体を含有する。このようにワクチン接種されたウマを感染したウマから区別できる。PCR基盤アッセイを用いてウマの遺伝子配列の存在または不在を検出する。例えば、ウマが野生型EIAVで感染している場合、これは野生型p26の遺伝子配列を含有する。しかしながら、遺伝子変異EIAVを含むワクチンで免疫したウマ、とりわけここでp26遺伝子が欠失または特異的変異を含むウマは野生型p26の遺伝子配列を含有しない。また別にp30遺伝子挿入を含有する、遺伝子欠失EIAV構築物でワクチン接種しているウマはその血清中にp30遺伝子配列を含有する。

【0056】

本発明のこれらのおよびその他の実施形態を以下の非限定的な実施例によりさらに説明する。実施例および明細書全体で割合は特記しない場合重量である。

【0057】

実施例1

p26欠失変異プロウイルスクロンの構築物をpCMV. CA. neoと称した: CA遺伝子の全てまたは部分の欠失が可能であるかどうかを決定するためにEIAVからp26遺伝子全体を欠失することに決定した。Cookら、Journal of Virology 72(2): 1383-1393(1998)(これは出展明示により本明細書の一部とする)に記載されるEIAV_{UK}をプロウイルスの誘導に分子クローン用いた。図2はEIAV_{UK}分子クロンの環状マップを示す。図3aはこの実施例に記載される構築物に用いられる方法を示すための直線状概略図を示す。図6はCA遺伝子の特異的配列およびそれがコードするEIAVのp26のアミノ酸配列を示す。

【0058】

p26欠失変異プロウイルスクロン(pCMV. CA. neo)の構築手順は以下のとおりであった。最初にCMVプロモーターをPCR、ライゲーションおよびPCRクローニングの過程を経て5'LTR領域に挿入した。プライマーCMV3'プラント(配列番号1)および5'CMVBssH(配列番号2)を用いてプラスミドpRC/CMV(インビトロゲン)からCMVプロモーターを増幅した。PCR条件を薄壁0.5ml PCRチューブ(PGCサイエンティフィック)中以下のとおり設定した: dH₂O 40.6 μl、クローン化Pfu DNAポリメラーゼ10X反応バッファー 5 μl、25 mM デオキシ-A、C、G、T(ヌクレオチド)トリホスフェート(dNTP)混合物 0.8 μl、各プライマー(100 ng/μl) 2.5 μl、鋳型DNA(10 ng/μl) 1 l、クローン化Pfu DNAポリメラーゼ(2.5 U/μl、ストラッタジーン) 2.0 μl。増幅はハイバインドサーモサイクラー中で実施し、94 で20分間、60 で20秒間、72 で1分間の30サイクルから構成された。類似の反応条件でプライマーLTRプラント5'(配列番号3)およびMA3'Tth(配列番号4)を用いてMAオープン・リーディング・フレームを介する末端重複領域(R領域)の最後の31塩基対を含むゲノムの部分を包含するEIAV_{UK}クロンの領域を増幅した。ジーン・クリ

ーン (バイオ101) を含む 0.8% アガロースゲル上で2つのPCR産物 (50 μ l) をゲル精製した。2つの精製したPCR産物を個々のキナーゼ反応で以下のとおり設定した: DNA 5 μ l、ATP 2 μ l、10X タンパク質キナーゼバッファー (ニュー・イングランド・バイオラプズ) 2 μ l、 dH_2O 10 μ l、およびタンパク質キナーゼ 1 μ l。反応産物を37 で2時間インキュベートした。得られたキナーゼ処理産物をクロロホルム抽出により精製し、エタノール沈殿させた。以下の反応混合物中、T4リガーゼ (ニュー・イングランド・バイオラプズ) を用いて得られたエタノール産物 (3 μ l) を個々のプラント末端で共に一晚 (16) ライゲーションした: 10X T4リガーゼバッファー 1 μ l、 dH_2O 2 μ l、およびT4リガーゼ 1 μ l。プライマーCMV 5' BssH (配列番号2) およびMA3' Tth (配列番号4) を用いるPCRの第2ラウンドで最終産物を増幅し、EIAV_{UK} クローンにクローン化した。反応条件は前記したとおりでありライゲーション混合物 1 μ l を使用した。この最終PCR産物 (50 μ l) を再度0.8% アガロースゲルでゲル精製した。精製したPCR産物を制限酵素 BssHII およびTth111I を用いて以下の様式で消化した: PCR産物 17 μ l、BssHII 10X バッファー (NEB) 2 μ l、およびBssHII (NEB) 2 μ l、50 で2時間のインキュベーション、クロロホルム抽出およびエタノール沈殿。以下のように消化を完了させた: DNA (BssHII 消化) 16 μ l、10X 反応バッファー #4 (NEB) 2 μ l、Tth111I 2 μ l、65 で3時間のインキュベーション。EIAV_{UK} クローン (500 ng) をMluI (ニュー・イングランド・バイオラプズ) で部分消化した。これは以下の反応混合物中37 で5分間のインキュベーションにより行った: 10X # 反応バッファー 1 μ l、制限酵素 1 μ l、 dH_2O 2 μ l および即座に氷に沈め、続いてゲル精製した。次いで適当な大きさのバンドを10X # 4 反応バッファー (NEB) 1 μ l、制限酵素 1 μ l および dH_2O 2 μ l からなる反応混合物中Tth111I で完全に消化した。得られたフラグメントを0.8% アガロースゲルでゲル精製した。10X T4リガーゼバッファー 1 μ l、 dH_2O 2 μ l およびT4リガーゼ 1 μ l の混合物中T4リガーゼでプロモーターフラグメント (3 μ l) をEIAV_{UK} クローン (3 μ l) にライゲーションした。得られたライゲーション産物 (4 μ l) をコンピテントDH5 細菌細胞 (100 μ l) に形質転換した。形質転換手順は: 氷上30分間のインキュベーション、42 で45秒間の熱ショック、氷上2分間のインキュベーション、SOCブロス 900 μ l の添加 (20% バクト・トリプトン、5% バクト酵母、0.5% NaCl、2.5 mM KCl、10 mM 塩化マグネシウムおよび20 mM グルコースを含有する培地サプリメント)、37 で1時間のインキュベーション、およびLB Amp プレート上200 l のプレートからなる。クローンをシーケンスして図3bに概略を示すような正確なプロモーター整列を確認した。

10

20

30

40

50

【0059】

PCR、ライゲーション、クローニングのPCR法を用いてカプシド抗原 (CA) 配列を欠失させた。プライマー gag 441 (配列番号5) およびMAT (配列番号6) を用いてCAオープン・リーディング・フレームの上流のCMVEIAV_{UK} ゲノムと称する分子的に修飾されたEIAVの398 bp領域を増幅した。PGCサイエンティフィック薄壁0.5 ml PCRチューブ中以下のとおりPCR条件を設定した: dH_2O 40.6 μ l、クローン化Pfu DNAポリメラーゼ 10X 反応バッファー 5 μ l、25 mM dNTP 混合物 0.8 μ l、各プライマー (100 ng / μ l) 2.5 μ l、鋳型DNA (10 ng / μ l) 1 μ l、クローン化Pfu DNAポリメラーゼ (2.5 U / μ l、ストラッタジーン) 2.0 μ l。増幅はハイベイドサーモサイ클ー中で実施した。類似の反応混合物中CAコード化領域の下流のプライマー p9f5' (配列番号7) およびp9f3' (配列番号8) を用いてCMVEIAV_{UK} ゲノムの357 bp領域を増幅した。ジーン・クリーン (バイオ101) を含む0.8% アガロースゲル上でこれらの2つのPCR産物 (50 μ l) をゲル精製した。以下の反応混合物中、T4リガーゼ (ニュー・イングランド・バイオラプズ) を用いて2つの精製されたPCR産物 (3 μ l) を共に

一晚 (1 6) ライゲーションした： 1 0 X T 4 リガーゼバッファ－ 1 μ l、d H₂ O 2 μ l、および T 4 リガーゼ 1 μ l。g a g 4 4 1 プライマー (配列番号 5) および p 9 f 3 ' (配列番号 8) を用いて P C R の最終ラウンドを実施した。ライゲーションされた配列は正確な配向にある場合、およそ 7 5 5 b p の P C R 産物を生じる。これは塩基対 8 4 6 - 1 5 5 0 (E I A V 塩基対相関、プラスミドではない) からの C A オープン・リーディング・フレームを欠失している。ジーン・クリーンを含む 0 . 8 % アガロースゲル上で P C R 産物をゲル精製した。以下の様式で精製されたフラグメントを R t h 1 1 1 I および B s r G I で消化した： 1 5 I P C R 産物、2 1 B S A、1 0 X バッファ－ # 2 (N E B) 2 l および B s r G I (N E B)、3 7 で 3 時間のインキュベーション、クロロホルム抽出およびエタノール沈殿。以下のように消化を完了させた。D N A (B s r G I 消化) 1 6 μ l、1 0 X 反応バッファ－ # 4 (N E B) 2 μ l、T t h 1 1 1 I 2 μ l、6 5 で 3 時間のインキュベーションおよび前記したのと同じの様式でゲル精製。C M E I A V_UK クローンを同一の制限酵素で消化し、類似の形式でゲル精製した。1 0 X T 4 リガーゼバッファ－ 1 μ l、d H₂ O 2 μ l および T 4 リガーゼ 1 μ l の混合物中 T 4 リガーゼで 2 つのフラグメント (各 3 μ l) を共にライゲーションし、コンピテント D H 5 細菌細胞 (1 0 0 μ l) に形質転換した。形質転換手順は：氷上 3 0 分間のインキュベーション、4 2 で 4 5 秒間の熱ショック、氷上 2 分間のインキュベーション、S O C ブロス 9 0 0 μ l の添加、3 7 で 1 時間のインキュベーション、および L B A m p プレート上 2 0 0 μ l のプレートからなる。個々のクローンをインサートに関してスクリーニングした。クローンをシークエンスして図 3 c に概略図を示すように C A 領域が完全に欠失したことを確認した。は欠失を同一化した。

【 0 0 6 0 】

元来のプロウイルス D N A はアンピシリン抵抗性マーカー (A m p^r) を担持した。これは哺乳動物で用いられるワクチンの理想的なマーカーではなかったため、以下の手順を用いてこれをカナマイシン抵抗性マーカー (K a n^r) と置き換えた。プロウイルス D N A を p L G 3 3 9 / S P O R T (C u n n i n g h a m ら、G e n e 1 2 4 : 9 3 - 9 8 (1 9 9 3)) と称するカナマイシン抵抗性ベクターにサブクロニングした。ベクターを制限酵素 M I u I および E c o R I (ニュー・イングランド・バイオラプズ) で消化した。またプロウイルスクローンを E c o R I で十分に消化し、M I u I で部分的に消化した。プラスミド (5 0 0 n g) を以下の反応混合物中、別個に 3 7 で 5 分間のインキュベーションにより各々部分的に消化した： 1 0 X # 1 反応バッファ－ 2 μ l、制限酵素 (M I u I) 1 μ l、d H₂ O 1 2 μ l および即座に氷に沈め、続いてゲル精製した。次いで適当な大きさのバンドを 1 0 X # 2 反応バッファ－ 1 μ l、制限酵素 1 μ l および d H₂ O 2 μ l からなる反応混合物中 E c o R I で完全に消化した。望ましいフラグメントをジーン・クリーンを含む 0 . 8 % アガロースゲルでゲル精製した。以下の反応混合物中 T 4 リガーゼ (ニュー・イングランド・バイオラプズ) でプロウイルス D N A (4 μ l) およびベクター (2 μ l) を一晚 (1 6) 共にライゲーションした： 1 0 X T 4 リガーゼバッファ－ 1 μ l、d H₂ O 2 μ l および T 4 リガーゼ 1 μ l。ライゲーション産物 (4 μ l) をコンピテント D H 5 細菌細胞 (1 0 0 μ l) に形質転換した。形質転換手順は：氷上 3 0 分間のインキュベーション、4 2 で 4 5 秒間の熱ショック、氷上 2 分間のインキュベーション、S O C ブロス 9 0 0 μ l の添加、3 7 で 1 時間のインキュベーション、および L B K a n プレート上 2 0 0 μ l のプレートからなる。個々のクローンを適切な M I u I 部位へのインサートに関してスクリーニングした。図 3 d は A m p の抵抗性マーカーが K a n の抵抗性マーカーにより置換されていることを表すこの構築物の概略図を示す。

【 0 0 6 1 】

真核細胞のクローンの選別を可能にするためにネオマイシン抵抗性マーカーを付加した。制限酵素 E c o R I および X h o I (ニュー・イングランド・バイオラプズ) を用いてネオマイシン抵抗性マーカーを市販のベクター p R C / C M V (インビトロゲン) から切除した。p R C / C M V から切除した部分はネオマイシンオープン・リーディング・フレ

ム全体およびSV40プロモーター、複製起点およびSV40ポリA認識配列を包含した。pRC/CMVプラスミドDNA 500 ng、10X #2反応バッファー 2 μl、BSA 2 μl、dH₂O 2 μlおよび制限酵素各1 μlからなる反応混合物中37で消化を行った。得られたカナマイシン抵抗性プロウイルススクローンを制限酵素EcoRIおよびSalI（ギブコBRL）で消化した。SalI消化末端をXhoI消化末端にライゲーションできる。以下の反応混合物中で消化を実施した：プロウイルスDNA 1 μg、10X リアクト6バッファー、BSA 2 μl、H₂O 2 μl、および制限酵素各1 μl。消化したネオマイシンフラグメントおよびプロウイルススクローンをジーン・クリーンを含む0.8% アガロースゲルでゲル精製し、以下の反応混合物中T4リガーゼで16で一晩共にライゲーションした：精製したプロウイルスDNA 4 μl、精製したネオマイシンインサートDNA 3 μl、10X T4リガーゼバッファー 1.5 μl、dH₂O 5.5 μlおよびT4リガーゼ1 μl。ライゲーションしたDNA（6 μl）をコンピテントDH5細菌細胞（100 μl）に形質転換した。形質転換手順は：氷上30分間のインキュベーション、42で45秒間の熱ショック、氷上2分間のインキュベーション、SOCブロス 900 μlの添加、37で1時間のインキュベーション、およびLBKanプレート上200 μlのプレートからなる。個々のクローンをインサートに関してスクリーニングした。p26欠失プロウイルススクローンpCMV.CA.neoの概略図を図3eに示し、環状マップを図4に示す。

10

【0062】

実施例 2

20

ビスナキメラプロウイルススクロンの構築物をpCMV.Vis2.neoと称した：外来性遺伝子をgag遺伝子のカプシド抗原領域（CA）に置き換え、恐らくp26欠失を有する複製プロウイルススクローンを作製するために、ビスナウイルス、コギンズ試験で陽性の応答をしない別のレンチウイルスからのp30遺伝子を挿入することに決定した。EIAVのp26のメカニズムと置き換えるためにp30を適用できる場合、次いで複製プロウイルススクローンを産生できる。

【0063】

実施例1のように、欠失したp26領域に挿入したビスナのp30を有するプロウイルススクロンの構築物のバックボーンはEIAV_{UK}であった（Cookら、前出）。この出発構築物の該略図を図5aに示す。

30

【0064】

このEIAV構築物の調製手順は以下のとおりであった：前記で参照したとおり、PCR、ライゲーション、PCRクローニングの方法によりCMVプロモーターをEIAV_{UK}の5'LTR領域に挿入した。プライマーCMV3'プラント（配列番号1）および5'CMVBssH（配列番号2）を用いてプラスミドpRC/CMV（インビトロゲン）からCMVプロモーターを増幅した。PCR条件は薄壁0.5 ml PCRチューブ中以下のとおり設定した：dH₂O 40.6 μl、クローン化Pfu DNAポリメラーゼ10X反応バッファー 5 μl、25 mM dNTP混合物 0.8 μl、各プライマー（100 ng/μl）2.5 μl、鋳型DNA（10 ng/μl）1 μl、クローン化Pfu DNAポリメラーゼ（2.5 U/μl、ストラッタジーン）2.0 μl。増幅はハイベイドサーモサイクラー中で実施し、94で20分間、60で20秒間、72で1分間の30サイクルから構成された。類似の反応条件でプライマーLTRプラント5'（配列番号3）およびMA3'Tth（配列番号4）を用いてマトリックスオープン・リーディング・フレームを介する部分的R領域を含むゲノムの部分を包含するEIAV_{UK}クローンの領域を増幅した。ジーン・クリーン（バイオ101）を含む0.8%アガロースゲル上でPCR産物（50 μl）をゲル精製した。2つの精製されたPCR産物を個々のキナーゼ反応で以下のとおり設定した：DNA 5 μl、ATP 2 μl、10X タンパク質キナーゼバッファー（ニュー・イングランド・バイオラブズ）2 μl、dH₂O 10 μl、およびタンパク質キナーゼ1 μl。反応産物を37で2時間インキュベートした。キナーゼ処理産物をクロロホルム抽出により精製し、エタノール沈殿させた。以下の

40

50

反応混合物中、T4リガーゼ（ニュー・イングランド・バイオラブズ）を用いて得られた産物（3 μ l）を共に一晚（16）ライゲーションした：10X T4リガーゼバッファ1 μ l、dH₂O 2 μ l、およびT4リガーゼ 1 μ l。プライマーCMV5' BssH（配列番号2）およびMA3'Tth（配列番号4）を用いるPCRの第2ラウンドで最終産物を増幅し、EIAV_{UK} クローンにクローン化した。反応条件は前記したとおりであり、ライゲーション反応物1 μ lを使用した。

【0065】

この最終PCR産物（50 μ l）を再度0.8% アガロースゲルでゲル精製した。精製したPCR産物を制限酵素BssHIIおよびTth111Iを用いて以下の様式で消化した：PCR産物17 μ l、BssHII 10Xバッファ（NEB）2 μ l、およびBssHII（NEB）2 μ l、50 で2時間のインキュベーション、クロロホルム抽出およびエタノール沈殿。以下のように消化を完了させた：DNA（BssHII消化）16 μ l、10X反応バッファ#4（NEB）2 μ l、Tth111I 2 μ l、65 で3時間のインキュベーション。EIAV_{UK} クローン（500 ng）をMIUI（ニュー・イングランド・バイオラブズ）で部分消化した。これは以下の反応混合物中37 で5時間のインキュベーションにより行った：10X#反応バッファ 1 μ l、制限酵素 1 μ l、dH₂O 2 μ lおよび即座に氷に沈め、続いてゲル精製した。次いで適当な大きさのバンドを10X#反応バッファ 1 μ l、制限酵素 1 μ lおよびdH₂O 2 μ lからなる反応混合物中Tth111Iで完全に消化した。フラグメントを0.8% アガロースゲルでゲル精製した。10X T4リガーゼバッファ 1 μ l、dH₂O 2 μ lおよびT4リガーゼ1 μ lの混合物中T4リガーゼでプロモーター（3 μ l）をEIAV_{UK} クローン（3 μ l）にライゲーションした。ライゲーション産物（4 μ l）をコンピテントDH5 細菌細胞（100 μ l）に形質転換した。形質転換手順は：氷上30分間のインキュベーション、42 で45秒間の熱ショック、氷上2分間のインキュベーション、SOCブロス 900 μ lの添加、37 で1時間のインキュベーション、およびLB Ampプレート上200 μ lのプレートからなる。クローンをシーケンスして正確なプロモーター整列を確認した。図5bはCMVプロモーターインサートを有するEIAV_{UK} クローン（CMVEIAV_{UK}）の概略図である。

【0066】

ビスナp30カプシド配列の供給源はpビスナクローンpuc9-4.9V2（Braun, MJら、Journal of Virology 61(12):4046-4054(1987))であった。以下の反応で制限酵素ApaIおよびTth111Iを用いてビスナp30（1 μ gを含有する7 μ l）をクローンから切除した：dH₂O 4 μ l、10X #4反応バッファ（NEB）1.5 μ l、ApaIおよびTth111I（NEB）5 μ l、65 で2時間のインキュベーション；ApaIをさらに0.5 μ l反応混合物に添加し、室温で一晩（25）インキュベートした。望ましいフラグメントをジーン・クリーンを含む0.8% アガロースゲルでゲル精製した。以下の反応混合物中CMVEIAV_{UK} クローン（1 μ gを含有する5 μ l）をBipI（Bpu1102IのNEB酵素）およびTth111I（NEB）で消化した：10X #4バッファ（NEB）1.5 μ l、およびBsrGI（NEB）1 μ l、dH₂O 7.5 μ l、37 で3時間のインキュベーション、クロロホルム抽出、およびエタノール沈殿。以下のとおり消化を完了した：（BipI消化）15 μ l、10X反応バッファ#4（NEB）2 μ l、Tth111I 2 μ l、dH₂O 2 μ l、65 で3時間のインキュベーション。消化したフラグメントをジーン・クリーンを含む0.8% アガロースゲルでゲル精製した。以下の混合物中T4リガーゼで2つのフラグメントをライゲーションした：10X T4リガーゼバッファ 1 μ l、dH₂O 2 μ lおよびT4リガーゼ1 μ lの混合物中DNAフラグメント（各3 μ l）をT4リガーゼで共にライゲーションした。ライゲーション産物（4 μ l）をコンピテントDH5 細菌細胞（100 μ l）に形質転換した。形質転換手順は：氷上30分間のインキュベーション、42 で45秒間の熱ショック、氷上2分間のインキュベーション、SOCブロス 900 μ lの添加、37

10

20

30

40

50

で1時間のインキュベーション、およびLB A m p プレート上200 μ lのプレートからなる。個々のクローンをインサートに関してスクリーニングし、ジデオキシシーケンスおよびABI自動シーケンサーを用いてシーケンスし、ピスナp30オープン・リーディング・フレーム全体がプロウイルスクローンに正確におよびフレーム内に挿入されたことを確認した。図5cはCMVEIAV_{UK}.vis2の概略図を示す。

【0067】

プロウイルスDNAをpLG339/SPORT(Cunninghamら、Gene 124:93-98(1993))(出展明示により本明細書の一部とする)と称するカナマイシン抵抗性ベクターにサブクロニングした。ベクターをMluIで部分的に、およびEcoRI(ニュー・イングランド・バイオラプズ)で十分に消化した。またプロウイルスクローンをEcoRIで十分に、およびMluIで部分的に消化した。プラスミド(500 ng)を以下の反応混合物中、別個に37で5分間のインキュベーションにより各々部分的に消化した: 10X #2反応バッファー 2 μ l、制限酵素 1 μ l、dH₂O 12 μ lおよび即座に氷に沈め、続いてゲル精製した。次いで適当な大きさのバンドを10X #2反応バッファー 1 μ l、制限酵素 1 μ lおよびdH₂O 2 μ lからなる反応混合物中EcoRIで完全に消化した。望ましいフラグメントをジーン・クリーンを含む0.8% アガロースゲルでゲル精製した。以下の反応混合物中T4リガーゼ(ニュー・イングランド・バイオラプズ)でプロウイルスDNA(4 μ l)およびベクター(2 μ l)を一晩(16)共にライゲーションした: 10X T4リガーゼバッファー 1 μ l、dH₂O 2 μ lおよびT4リガーゼ1 μ l。ライゲーション産物(4 μ l)をコンピテントDH5 細菌細胞(100 μ l)に形質転換した。形質転換手順は: 氷上30分間のインキュベーション、42で45秒間の熱ショック、氷上2分間のインキュベーション、SOCブロス 900 μ lの添加、37で1時間のインキュベーション、およびLB Kan プレート上200 μ lのプレートからなる。個々のクローンを適切なMluI部位へのインサートに関してスクリーニングした。図5dはKanの抵抗性マーカ含有するプロウイルスクローンの概略図を示す。

【0068】

EIAVプロウイルス構築物をさらに市販により入手しやすくするために、カナマイシン抵抗性マーカをネオマイシン抵抗性マーカと置き換えた。制限酵素EcoRIおよびXhoIを用いて市販のベクターpRC/CMV(インビトロゲン)からネオマイシン抵抗性マーカを切除した。これははネオマイシンオープン・リーディング・フレーム全体およびSV40プロモーター(配列番号9)、複製起点(配列番号10)およびSV40ポリA認識配列(配列番号11)を包含した。pRC/CMVプラスミドDNA 500 ng、10X #2反応バッファー 2 μ l、BSA 2 μ l、dH₂O 2 μ lおよび制限酵素各1 μ lからなる反応混合物中37で消化を行った。新規のカナマイシン抵抗性プロウイルスクローンを制限酵素EcoRIおよびSmaI(ギブコBRL)で消化した。SmaI消化末端をXhoI消化末端にライゲーションできる。以下の反応混合物中で消化を実施した: プロウイルスDNA 1 μ g、10X リアクト6バッファー、BSA 2 μ l、H₂O 2 μ l、および制限酵素各1 μ l。消化したネオマイシンフラグメントおよびプロウイルスクローンをジーン・クリーンを含む0.8% アガロースゲルでゲル精製し、以下の反応混合物中T4リガーゼで16で一晩共にライゲーションした: 精製したプロウイルスDNA 4 μ l、精製したネオマイシンインサートDNA 3 μ l、10X T4リガーゼバッファー 1.5 μ l、dH₂O 5.5 μ lおよびT4リガーゼ1 μ l。ライゲーションしたDNA(6 μ l)をコンピテントDH5 細菌細胞(100 μ l)に形質転換した。形質転換手順は: 氷上30分間のインキュベーション、42で45秒間の熱ショック、氷上2分間のインキュベーション、SOCブロス 900 μ lの添加、37で1時間のインキュベーション、およびLB Kan プレート上200 μ lのプレートからなる。個々のクローンをインサートに関してスクリーニングした。図5eはpCMVEIAV_{UK}.Vis2.neoプロウイルス構築物(本明細書後記ではpCMV.Vis2.neoと称する)の概略図を示し、図6はこの構築物の最終環状マッ

10

20

30

40

50

ブを示す。

【0069】

実施例1に記載する標準的な複製アッセイを用いてpCMV.Vis2.neoプロウイルス構築物をそのインビトロ複製能力に関して試験した。プロウイルスクローンpCMV.CA.neoと同様、このpCMV.Vis2.neoプロウイルス構築物はインビトロで複製せず、インビボで複製しないと予測された。従って、トランスフェクション細胞系（持続的感染細胞系）を開発することに決定した。

【0070】

実施例3

細胞系のトランスフェクションおよび選別：ウマ皮膚細胞系のトランスフェクション
p26欠失プロウイルスクローンpCMV.CA.neoおよびプロウイルス構築物pCMV.Vis2.neoを用いて野生型EIAV_{UK}に類似の様式で細胞をトランスフェクトする能力を評価した。手順は以下のとおりであった。

【0071】

プロウイルスクローンまたはプロウイルス構築物DNA1μgを用いてウマ皮膚（ED）細胞系（ATCC CRL6288）をトランスフェクトした。10%ウシ胎児血清、ペニシリン100単位/ml、100μg/mlストレプトマイシン（ギブコBRL 15140-122）および2mmL-グルタミン（ギブコBRL 25030-081）を加えたアール塩を含む完全成長最小必須培地（EMEM）2ml中ウェルあたり2から4×10⁵ED細胞を播種した6ウェル組織培養プレート中でED細胞系を成長させた。プレートはCO₂インキュベーター中37°Cでおよそ16から24時間、細胞が全面成長の50から80%になるまでインキュベートした。各々のトランスフェクションに関してDNA1μgをOPTI-MEM I還元血清培地（ギブコBRL 18324-012）100μlに希釈し、リポフェクタミン試薬（ギブコBRL 18324-012）10μlをOPTI-MEM I還元血清培地（OPTI-MEM RSM）100μlに添加した。2つの溶液を穏やかに混合し、室温で30分間インキュベートしてDNAリボソーム複合体を形成させた。この間にED細胞培養物をOPTI-MEM RSM（ギブコBRL）2mlで1回すすいだ。各々のトランスフェクションに関して、OPTI-MEM RSM 0.8mlをDNAリボソーム複合体が入ったチューブに加え、チューブを穏やかに混合し、内容物をすすいだ細胞に積層した。トランスフェクションの間に抗生物質は加えなかった。DNAリボソーム/組織培養物をCO₂インキュベーター中37°Cで5時間インキュベートした。インキュベーションの後、トランスフェクション混合物を除去せずに、通常の2倍濃度の血清を含有する完全成長培地MEM 1mlを細胞培養に加えた。トランスフェクションの開始後24時間に培地を新鮮な完全成長培地（EMEM）で置換した。トランスフェクション後48時に開始し、72時まで定期的な間隔で組織培養上澄のアリコートを採取し、標準的な逆転写酵素（RT）アッセイを用いてウイルス産生の測定として分析した。Lichtensteinら（1995）に記載されるように、RT活性に至る上澄を細胞ELISAの読みに基づく感染性アッセイで力価測定した。pCMV.CA.neoおよびプロウイルス構築物pCMV.Vis2.neoは共に組織培養で複製しなかった。RTレベルは、トランスフェクトされた細胞からの培養培地に暴露したEIAVで正常に感染できる組織培養細胞の陰性対照のレベルに満たないかまたは同等であった。従って、p26欠失がインビトロまたはインビボで複製できない欠損ウイルス粒子を製造することが決定された。大容量ワクチン製造のための粒子を得るために、プロウイルスクローンpCMV.CA.neoおよびプロウイルス構築物pCMV.Vis2.neoを有する持続的感染した細胞系を製造することを決定した。

【0072】

COS細胞のトランスフェクション

サル細胞系COS-1（ATCC CRL1650）においてトランスフェクトされたプロウイルスクローンpCMV.CA.neoおよびプロウイルス構築物pCMV.Vis2.neoを用いてウイルス粒子を製造した。トランスフェクションの24時間前に6

0 mm プレート (ファルコン) に全面成長のおよそ 50 % で細胞をプレートした。デキストラン法を用いてプロウイルスクロン DNA (pCMV . CA . neo または pCMV . Vis2 . neo) およそ 1 μ g を細胞にトランスフェクトした。簡単には、DEA デキストランの 50 mg / ml 溶液を DNA と共にトリス緩衝生理食塩水 (TBS) 中 1 : 50 (最終濃度 1 mg / ml) で希釈し、血清不含培地 (DMEM) 中で細胞に添加した。5 % CO₂ の存在下、15 分毎に振盪しながら 37 °C で 1 時間、DNA 溶液を細胞上でインキュベートした。通常の成長培地をこの時点で置換した。トランスフェクションの 48 時間後に上澄を RT 活性に関して検定した。マイクロ逆転写酵素アッセイ (Lichtens tein ら、前出) を用いて細胞不含上澄サンプルにおいて RT 活性を検出した。ウェスタンブロット分析手順を用いてタンパク質含量を検出した。この手順に関しては、超遠心 (ベックマン SW41 Ti ローター) で 50000 \times g で 45 分間、20 % グリセロールクッション上の細胞不含上澄 10 ml からウイルス粒子をペレット化した。10 mM NaCl、1 % デオキシコリン酸 (DOC)、0.1 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、25 mM トリス HCl および 1 % トリトン X-100 を含有する溶解溶液 100 μ l 中でペレットを溶解し、1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。溶解後、6X SDS ゲル負荷バッファー 20 μ l 中でサンプルを煮沸し、12 % SDS ポリアクリルアミドゲルに負荷した。グラジエント精製した EIAV_{p_v} (1 μ g) をもゲルに負荷してウイルスタンパク質のマーカーとして提供した。およそ 10 mA で一晩冷却しながら電気泳動を実施した。25 mM トリス、192 mM グリシン、20 % メタノールおよび 0.05 % SDS を含有するバッファー中バイオラッドタンパク質移動細胞系を用いてタンパク質をミリポア膜に移した。冷却しながら 400 mA で 3 時間の後、移動を完了した。モノクローナル抗体を用いて EIAV タンパク質を検出した。抗体インキュベーションの前に 5 % ブロト (1X PBS 中 5 % 粉乳、5 % FBS および 0.25 % トウイーン 20) 中室温で 1 時間ブロットを阻害した。5 % ブロト中室温で 1 時間マウスモノクローナル - gp90 および - p26 を共に使用した。西洋ワサビペルオキシダーゼで抱合した 2 次抗体 - マウス IgG (シグマ・ロット # 115H8995) を室温で 1 時間インキュベートした。1 次および 2 次抗体インキュベーションの間に 1X PBS / 0.025 % トウイーン 20 中 3 から 5 分間ブロットを洗浄した。化学ルミネサンス基質スーパーシグナル (ピヤース・ロット # AE40027) を室温で 1 分間インキュベートした後、2 次抗体インキュベーションの後に最終洗浄を行った。ブロットのフィルムへの暴露により gp90 および p26 の双方が EIAV_{p_v} 陽性対照で検出できることが示された ; しかし gp90 のみがプロウイルスクロン pCMV . CA . neo およびプロウイルス構築物 pCMV . Vis2 . neo で検出できた。双方の RT 活性からおよびウェスタンブロット分析によりウイルス粒子の産生が観察された。

10

20

30

40

50

【0073】

CHO、C-33A および ED-MCS 細胞系における安定したトランスフェクション 3 つの細胞系においてウイルス粒子の安定した産生が試みられた ; ヒト細胞系 C-33A (ATCC HTB-31)、チャニーズ・ハムスター卵巣細胞、CHO (ATCC CRL-9618)、およびウマ細胞系 ED-MCS。トランスフェクションは全て 2 検定ずつで実施した。細胞を持続的にインキュベーター中 5 % CO₂ を伴って 37 °C で維持した。トランスフェクションの 24 時間前にサルステットおよびファルコンにより製造された 10 mm プレートに以下の密度で細胞系を播種した : CHO および C-33A 1 \times 10⁶ セル / プレート、ED-MCS 3.5 \times 10⁵ セル / プレート。血清不含 DMEM (ギブコ) 中ジーン・ポーター (商標) (ジーン・セラピー・システムズ) 試薬 55 μ l を用いてプロウイルスクロン pCMV . Vis2 . neo および pCMV . CA . neo (20 μ g / プレート) を細胞にトランスフェクトした。製造者の指示書は以下のとおりであった。トランスフェクションの後 24 時間に培地をトランスフェクション培地から 800 g / ml G-418 (ゲネチシン、ギブコ BRL) および 10 % FBS (ハイクローン) を含有する選択培地 (DMEM) に交換した。トランスフェクトしなか

ったプレートを同一培地中で選択するための対照として担持した。一度対照プレートに生存細胞が存在せず、選択されたプレートがコロニー形成を示すと、細胞をバルク培養としてT75フラスコ(ファルコン)に移した。ED-MCS細胞のG-418のレベルは急速な成長のために1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで増加した。選択期間中RT活性に関して上澄を分析し、個々の時点でウェスタンブロット分析によりタンパク質含量を検定した。ヒトおよびマウス細胞系においてRT活性は最初最も高い産生を示した。ウマ皮膚細胞系が長期間の産生の間に最も安定した構築物を発達させ、選択後150日には最も高レベルを連続的に産生することが判明した。この実験により、組織培養細胞をp26欠失クローンによりおよびビスナウイルス(p30)からの外来性遺伝子がp26領域に挿入されたキメラによりトランスフェクトすることができることが判明した。これらのトランスフェクトされた細胞からの逆転写酵素活性は組織培養液10 μl あたり10000 CPMほどの高レベルに到達した。これは組織培養物にトランスフェクトされた場合、野生型EIAVにより生み出されたRT活性と等価である。第2のウェスタンブロットを以前と同一の様式で実施した以外は、前記したようにウェスタンブロット分析を行い、膜をやギ - ビスナp30で再ブローピングしてビスナキメラタンパク質を検出した。2次抗体は - ヤギIgG HRP分子全体(シグマ・ロット#117H4831)であった。ビスナp30タンパク質をビスナキメラプロウイルス構築物pCMV.Vis2.neoで検出した(図10b参照)。

10

【0074】

ウェスタンブロット分析

20

超遠心SW41Tiローター(ベックマン)中の20%グリセロールクッション上で細胞不含上澄10mlからウイルス粒子をペレット化した。10mM塩化ナトリウム、1%DOC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、25mMトリスHClおよび1%トリトンX-100を含有する溶解溶液100 μl 中でペレットを溶解し、1.5mlエッペンドルフチューブに移した。溶解後、6X SDSバッファージェル負荷バッファ20 μl 中でサンプルを煮沸し、12%SDSポリアクリルアミドゲルに負荷した。グラジエント精製したポニーウイルス1 μg をもゲルに負荷してウイルスタンパク質のマーカーとして提供した。およそ10mAで一晩冷却しながら電気泳動を実施した。25mMトリス、192mMグリシン、20%メタノールおよび0.05%SDSを含有するバッファ中バイオラッドタンパク質移動細胞系を用いてタンパク質をミリポア膜に移した。冷却しながら400mAで3時間の後、移動を完了した。モノクローナル抗体を用いてEIAVタンパク質を検出した。抗体インキュベーションの前に5%ブロー(1X PBS中5%粉乳、5%FBSおよび0.25%トウイーン20)中室温で1時間ブロットを阻害した。5%ブロー中室温で1時間マウスモノクローナル - gp90および - p26を共に使用した。西洋ワサビペルオキシダーゼで抱合した2次抗体マウスIgG(シグマ・ロット#115H8995)を室温で1時間インキュベートした。1次および2次抗体インキュベーションの間に1X PBS/0.025%トウイーン20中3から5分間ブロットを洗浄した。化学ルミネサンス基質スーパーシグナル(ピヤース・ロット#AE40027)を室温で1分間インキュベートした後、2次抗体インキュベーションの後に最終洗浄を行った。ブロットのフィルムへの暴露によりgp90およびp26の双方がPV陽性対照で検出できることが示された;しかし図10aで示すように、gp90のみがプロウイルスクローン(pCMV.Vis2.neoおよびpCMV.CA.neo)で検出できた。グリシン-HCl(pH2.3)バッファ(0.05Mグリシン、0.15M NaCl)中45分間インキュベートすることにより膜を取り除いた。膜を同一の洗浄バッファ中7から5分間洗浄し、5%ブロー中2時間阻害した。第2のウェスタンブロットは以前と同一の様式で行い、膜をやギ - ビスナp30で再ブローピングしてビスナキメラタンパク質を検出した。2次抗体は - ヤギIgG HRP分子全体(シグマ・ロット#117H4831)であった。ビスナp30タンパク質をビスナキメラプロウイルス構築物(pCMV.Vis2.neo)で検出した(図10b参照)。

30

40

50

【0075】

g p 9 0 の存在は、これらの p 2 6 欠失構築物が感染防御抗原を産生することを示している。キメラ (p C M V . V i s 2 . n e o) もまたピスナ p 3 0 抗原を産生することから、後者から調製されたワクチンをマーカーワクチンとして定義できるということを意味する。これらは動物において p 2 6 抗体産生能を欠如させるだけではなく、これらでワクチン接種された動物に p 3 0 に対する抗体を産生させる。ウマにおける p 3 0 の存在はウマがワクチン接種されていることを示す。この p 3 0 抗体の存在を検出するアッセイを発展させて、本発明のワクチンでワクチン接種されたウマをワクチン接種されていないウマ、または野生型 E I A V に感染したウマから区別することができる。加えて、p 3 0 遺伝子配列または p 3 0 タンパク質の全てまたは部分を検出する診断を診断手段として同様に用いることができる。

10

【0076】

実施例 4

サブクロニング - 安定したトランスフェクションの単一細胞クローニング

選別の 40 日に再凍結された安定して選別されるピスナ (p C M V . V i s 2 . n e o) トランスフェクト E D - M C S 細胞を 37 で溶融し、T 7 5 フラスコの通常の成長培地 (G - 4 1 8 不含) 中に播種した。クローニングのためにプレートする前に、細胞を 5 % C O ₂ を伴って、G - 4 1 8 陰性培地中 37 で 48 時間成長させた。T 7 5 フラスコから細胞をトリプソン処理し、計数し、プレートあたりおよそ 100 セルの密度で 100 mm フアルコンプレートにプレートした。800 μ g / ml G - 4 1 8 を含有する培地中で細胞を選別した。およそ 4 日毎に培地を交換し、可視的なクローンが形成されるまで細胞をプレートで成長させた。クローニングシリンドラーの使用により個々のコロニーをプレートから別個にトリプソン処理し、ファルコン 24 ウェルプレートの別個の細胞に播種した。これらはまた 800 μ g / ml G - 4 1 8 を含有する培地中でも選別した。移動後およそ 7 日間、細胞上澄を R T 活性に関して検定した。以下のとおり実施した：

20

検定すべき細胞不含上澄のサンプル各 10 μ l に以下のものを加える：

3 H - T T P (40 C i / ミリモル) 1 . 5 μ l

スピードバックで乾燥し、以下の容量の水で容量を補う

100 mM E G T A 5 . 0 μ l

10 X 塩 5 . 0 μ l

30

(2 M トリス - H C l (p H 8 . 0)、2 M K C l、1 M M g C l ₂、1 M D T T、20 % N P - 40、脱イオン水)

ポリ (r A) . p (d T) _{1 2 - 1 3} 2 . 0 μ l

(5 単位 / ml から . 25 mg / ml)

ミリボア水 38 . 0 μ l

50 . 0 μ l

【0077】

上澄の混合物 (サンプル) および反応混合物を共に混合し、37 で 1 . 5 から 2 . 0 時間インキュベートする。全容量 (~ 60 μ l) を D E A E コーティングした濾紙にピペティングし、完全に乾燥させる。次いで濾紙を各々 1 X S S C 中 3 X 15 分間洗浄し、再度完全に乾燥させる。次いで濾紙をシンチレーション液に浸漬し、組み込まれた活性を測定する。この R T アッセイの使用の結果として、最高の R T 活性を有する 12 個の「サブクローン」をトリプソン処理し、6 ウェルプレート (ファルコン) に継代し、なお 800 μ g / ml G - 4 1 8 中選別した。6 ウェルプレート中の 4 日間の選別の後、上澄を R T 活性に関して分析した。最高の R T 活性を有する 8 個のサブクローンをトリプソン処理し、T 7 5 フラスコ (ファルコン) に継代し、なお 800 μ g / ml G - 4 1 8 中選別した。フラスコ中の 7 日間の選別の後、上澄を R T 活性に関して分析した。G - 4 1 8 量はこの継代点で 600 μ g / ml に減少した。さらに 4 日間選別を実施し、R T 活性を分析し、G - 4 1 8 のレベルは再度 400 μ g / ml に低下した。7 日間の選別の後、別の R T アッセイを 8 個のサブクローンで実施し、選別をモニター観察した。さらに 7 日

40

50

間の選別に続いて別のRTアッセイを実施した。4個の最高の産生細胞系を再度継代し、G-418のレベルを200 μ g/mlまで低下させた(別の4個は再凍結させた)。最高の産生サブクローン、F-1V2.23(V2.23とも称する)は高レベルのRT活性を生み出した(図11に示すように、組織培養液10 μ lあたり4000から50000 CPMの間)。図12はウイルス様粒子を産生するpCMV.vi.s2.neoプロウイルス構築物で形質転換したED-MCS細胞のこのサブクロンの電子顕微鏡写真を示す。電子顕微鏡写真の上図は放出されたウイルス様粒子を表し、一方電子顕微鏡写真の下図は細胞から出芽するウイルス様粒子を示す。この結果は、本発明の構築物が細胞から出芽し、典型的なレンチウイルスの見えるウイルス様粒子を産生することを示している。これは、ウイルス様粒子がRT活性を有し、gp90を発現し、gp30を発現し、p26を発現しないという事実と組み合わせて、市販により入手可能なEIAVワクチンを製造でき、ウマを疾患および/または感染から感染防御すると予測されることを示している。

10

【0078】

本発明の構築物がEIAV gp90感染防御成分の存在を示すことができ、著明なEIAV RT活性を示し、電子顕微鏡写真(出芽および物理学的外観)により典型的なレンチウイルスに見えるという事実は、本発明に従って調製されたワクチンが動物をレンチウイルスに由来する疾患および/または感染から、とりわけEIAVにより惹起される疾患および感染から動物を感染防御するのに有用であるということを保証する。加えて、該ワクチンがp26に対する抗体を刺激する能力を欠如し、p30に対する抗体を産生し、それによりワクチン接種された動物を感染したまたは暴露されていない動物から区別することができることが示されている。最も重要なことに、EIAVゲノムへの外来性遺伝子の、該外来性遺伝子が発現されるような挿入は、複数の遺伝子を挿入できるベクターとしてまたはウイルス構築物としてのこのレンチウイルスの有用性を示している。かかる複数の遺伝子挿入により複数の疾患から感染防御するEIAワクチンが提供される。

20

【0079】

本発明を説明の目的で前記で詳細に記載したが、かかる詳細な記載は単にその目的であり、請求の範囲により限定され得る以外は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく当業者によりそこに変更を加えることができる。

【図面の簡単な説明】

30

【図1】

EIAV_{UK}と称するEIAVの概略図マップである。

【図2】

感染性クローンEIAV_{UK}の環状マップである。

【図3a】

分子クローンEIAV_{UK}の直線状概略図である。

【図3b】

CMVプロモーターを有する分子クローンEIAV_{UK}の直線状概略図である。

【図3c】

CA遺伝子を欠失した分子クローンpCMVEIAV_{UK}の直線状概略図である。

40

【図3d】

カナマイシン抵抗性遺伝子(Kan^r)で置換したアンピシリン抵抗性遺伝子(Amp^r)を有する分子クローンpCMVEIAV_{UK} CAの直線状概略図である。

【図3e】

p26欠失プロウイルスクローンpCMV. CA. neoの直線状概略図である。

【図4】

p26欠失プロウイルスクローンpCMV. CA. neoの環状マップである。

【図5a】

EIAV_{UK}分子クローンの直線状概略図である。

【図5b】

50

C M V プロモーターインサートを有する E I A V_{U K} クローン (C M V E I A V_{U K}) の概略図である。

【図 5 c】

p C M V E I A V_{U K} v i s 2 の概略図である。

【図 5 d】

カナマイシン抵抗性マーカーを含有するプロウイルスクロンの直線状概略図である。

【図 5 e】

最終的な p C M V E I A V_{U K} V i s 2 . n e o プロウイルス構築物の直線状概略図である。

【図 6】

最終的な p C M V E I A V_{U K} V i s 2 . n e o プロウイルス構築物の環状マップである。

【図 7】

C A 遺伝子 / E I A V p 2 6 のヌクレオチドおよびアミノ酸マップである。

【図 8】

C A 遺伝子 / ビスナ p 3 0 のヌクレオチドおよびアミノ酸マップである。

【図 9】

E I A V の p 2 6 およびビスナウイルスの p 3 0 間の相同性の比較である。

【図 10 a】

g p 9 0 および p 2 6 モノクローナル抗体をディテクターとして用いる p 2 6 欠失クロン、ビスナキメラクロンおよび E I A V のサブクロンのウェスタンブロットである。

【図 10 b】

p 3 0 モノクローナル抗体をディテクターとして用いるいくつかの p 2 6 欠失クロン、ビスナキメラクロンおよび E I A V のサブクロンのウェスタンブロットである。

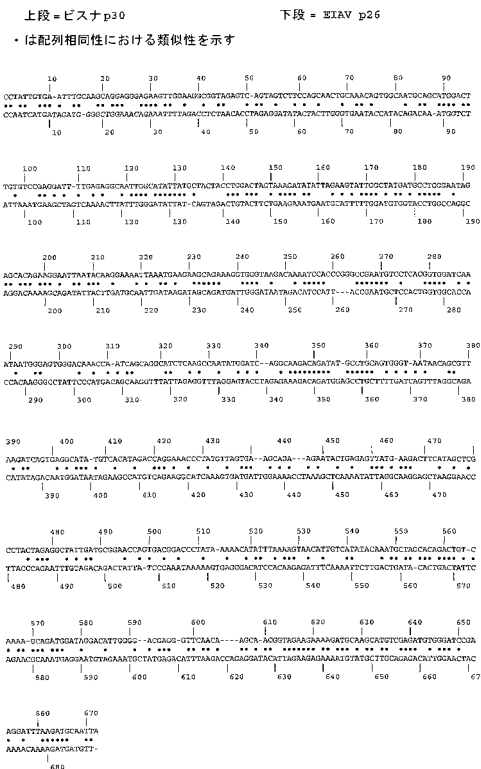
【図 11】

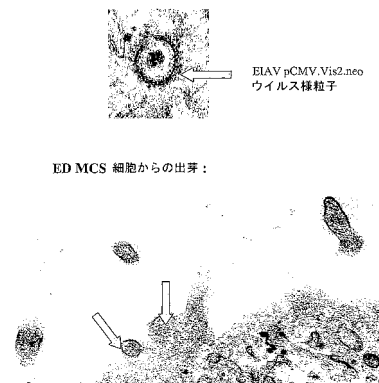
p C M V E I A V_{U K} . V i s 2 n e o プロウイルス構築物でトランスフェクトされた E D 細胞の種々サブクロンの逆転写酵素活性を示すグラフである。

10

20







【国際公開パンフレット】

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

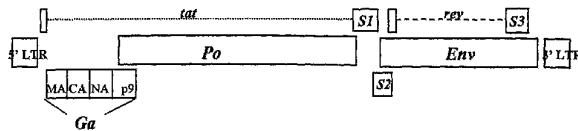
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/20049 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 39/12 Karen, K. [US/US]; 5501 N.W. Foxhill Road, Parkville, MO 64152 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/27599
- (22) International Filing Date: 6 September 2001 (06.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/659,029 9 September 2000 (09.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AKZO NOBEL N.V. [NL/NL]; Velperweg 76, P.O. Box 186, NL-6800 LS Arnhem (NL).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MONTELARO, Ronald, C. [US/US]; 127 Greenbriar Drive, Westford, PA 15090 (US); CRAIGO, Jodi [US/US]; 12 Hillcrest Drive, Pittsburgh, PA 15202 (US); ISSEL, Charles [US/US]; 725 Edgewater Drive, Lexington, KY 40502 (US); PUFFER, Bridget [US/US]; 219 Strathmore Place, Corning, NY 14830 (US); HENNESSEY, Kristina, J. [US/US]; 5215 N.W. Bluff Drive, Parkville, MO 64152 (US); BROWN,
- (74) Agent: BLACKSTONE, William, M.; 1300 Piccard Drive, Suite 206, Rockville, MD 20850 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that 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.

(54) Title: EIAV CHIMERIC VACCINE AND DIAGNOSTIC

Schematic representation of EIA virus EIAV_{UK}

(57) Abstract: Disclosed herein is a lentivirus chimera vaccine and diagnostic and methods of making and using the same, which can be used safely and effectively to provide immunity to mammals from infection and/or disease caused by a lentivirus, such as equine infectious anemia virus (EIAV) and which vaccine allows differentiation between vaccinated and non-vaccinated, but exposed mammals particularly horses.

WO 02/20049 A2

WO 02/20049

PCT/US01/27599

EIAV CHIMERIC VACCINE AND DIAGNOSTICBACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention:

This invention pertains to a vaccine composition which provides immunity from clinical disease signs and/or infections caused by lentivirus.

More specifically, the invention relates to an Equine Infectious Anemia

- 5 Virus (EIAV) vaccine composition which provides immunity from clinical disease signs and/or infection with EIAV, and which composition allows diagnostic differentiation between vaccinated and non-vaccinated but exposed or diseased mammals, and which allows the vaccinated animal to test negative using a Coggins test or other similar test that detects p26-specific antibodies.

10

Brief Description of the Prior Art:

Lentiviruses are a subfamily of retroviruses that cause persistent infection and chronic disease in numerous types of mammals including humans (HIV), equines (EIA), felines (FIV), bovines (BIV) and monkeys

- 15 (SIV). All of the diseases are spread by blood transmission. EIAV causes persistent infection and chronic disease in horses, worldwide. With EIAV, the blood transmission occurs by biting flies and other insects carrying virus particles from one horse to another. The first cycle of disease (clinical episode) in an infected horse usually occurs within 42 days after exposure to the virus. This first cycle is usually referred to as the acute stage of EIA and is characterized by pyrexia, thrombocytopenia, anorexia, depression and high plasma viremia levels. Anemia is not usually detected at this stage. Resolution of this first febrile episode is normally observed after 1 to 5 days and occurs concomitantly with a dramatic drop in the amount of plasma-associated virus. Following the acute stage, some animals may remain clinically normal while others go on to experience multiple bouts of illness in which severe anemia may accompany pyrexia, thrombocytopenia, edema, and dramatic weight loss,
- 20
- 25

and death. In instances of persistent infection by a lentivirus, as illustrated by EIAV, nucleotide sequence data has revealed a high mutation rate of the lentivirus genome as reported by Payne et al, Virology, 1987: 161, p 321-331, which is incorporated herein by reference. With EIAV infections, it is generally thought that neutralizing antibodies aid in the selection of new antigenic virus variants during persistent infections. Also, with EIAV infections, serologically distinct variants of EIAV emerge possibly through immune selection pressure operating on random viral genome mutations. Without being bound to any particular theory, it is believed that horses that show no further clinical signs of disease have developed a mature immune response that can protect against the virus and its known mutations.

As a member of the lentivirus subfamily of retroviruses, EIAV is useful as a model for the pathogenicity, immunology, vaccinology, treatment and prevention of HIV. The disease is significant in its own right because horses that demonstrate exposure to EIAV as measured by testing for antibodies in the blood (Coggins Test or similar p26 detecting test) are either required to be destroyed or strictly quarantined. The Coggins Test is used broadly throughout the world, especially in testing performance horses that are transferred into and out of the United States. Therefore, it is critical that an effective EIAV vaccine not seroconvert horses to a positive Coggins Test or to any other test that detects p26. Therefore, for vaccines useful in protecting against EIA, it is important to either delete all or part of the gene expressing p26 or block its expression by deleting regulator genes or inserting stop codons or foreign genes. It is expected that use of the methods described herein can provide vaccines for the other lentiviruses (HIV, FIV, BIV and SIV) that can elicit immune responses that are effective and that can be distinguished from viral infections.

As with other lentiviruses such as HIV, BIV, FIV and SIV, the genetic organization of EIAV classifies it as a complex retrovirus. The EIAV genome contains the canonical *gag*, *pol*, and *env* genes common to

- all retroviruses, and three accessory genes (*S1*, *S2* and *S3*). The *gag* gene encodes the core proteins of the virus designated as Matrix Antigen (MA), Capsid Antigen (CA), Nucleocapsid (NC) and a protein identified as p9. The *env* gene encodes the viral envelope proteins (gp90 and gp45).
- 5 The *pol* gene encodes the enzymes that replicate the viral genome, designated as Deoxy UTPase (DU), Reverse Transcriptase (RT) and Integrase (IN). The *S1* open reading frame (ORF) encodes the viral Tat protein, a transcription *trans* activator that acts on the viral long-terminal-repeat (LTR) promoter element to stimulate expression of all viral genes.
- 10 The *S3* ORF encodes the Rev protein, a post-transcriptional activator that acts by interacting with its target RNA sequence, named the Rev-responsive element (RRE), to regulate viral structural gene expression. The *S2* gene is located in the *pol-env* intergenic region immediately following the second exon of Tat and overlapping the amino
- 15 terminus of the Env protein (see Figure 1). It encodes a 65 amino acid protein with a calculated molecular mass of 7.2 kDa. *S2* appears to be synthesized in the late phase of the viral replication cycle by ribosomal leaky scanning of a tricistronic mRNA encoding Tat, *S2* protein, and Env protein, respectively.
- 20 The *gag*-encoded Capsid Antigen (CA) or p26 protein comprises the capsid shell of the virion that is enclosed in the viral envelope and that contains the viral RNA genome. Homologous CA proteins are present in HIV, FIV, BIV and SIV and are also encoded by the respective *gag* genes. As noted above, detection of antibodies to the p26 antigen is the basis for
- 25 the Coggins Test and certain other commercial tests used to diagnose EIA in horses. To be compatible with current regulatory guidelines, it is critical that an EIAV vaccine should not cause seroconversion in these diagnostic assays based on detection of serum antibodies to EIAV p26. The p26 antigen is highly antigenic in that extremely small amounts of its presence
- 30 in a vaccine can stimulate antibody responses and seroconversion in diagnostic assays. Attempts to extract or delete p26 antigen from a pool of EIAV have not been practical for vaccine production. Therefore, it

would seem that one could eliminate it by deletion of the *gag* gene, a segment of the *gag* gene that interferes with the expression of p26 or deletion or inactivation of a control gene that regulates the expression of p26. However, it has been determined by the inventors that deletion of the *gag* gene or segments thereof produces an EIAV particle that is unable to replicate *in vitro* (tissue culture) or *in vivo*. Therefore, simply deleting or blocking expression of p26 makes growth of EIAV for vaccine production impractical if not impossible.

To provide protection from disease and protection from infection, envelope proteins (Env) are considered the proteins of choice, as these proteins are the predominant immune targets during infection. By protection from disease is meant that a mammal exposed to the virus does not demonstrate clinical signs (fever, lethargy, anemia, death, etc.), but does carry virus particles in its blood, which particles are detectable by a reverse transcriptase polymerase chain reaction test (RT-PCR). By protection from infection is meant that a mammal exposed to the virus does not demonstrate clinical signs of EIA and does not contain RT-PCR-detectable virus particles in blood. The major envelope proteins of EIAV are gp90 and gp45. These are considered the protective antigens or protective components of EIAV. By the term protective components is meant antigens that produce either protection from disease or protection from infection as indicated above. It is therefore important that any effective lentivirus vaccine contain amounts of the lentiviral Env proteins (such as, gp 120, gp90 or gp45) effective to protect mammals from disease caused by the lentivirus. The protective components from EIAV include but are not limited to gp90 and gp45.

It would seem obvious to prepare a vaccine by purifying out the Env proteins, especially gp90 and gp45 for EIAV. Indeed, vaccines comprising preparations from which gp90 and gp45 have been purified out of the EIAV have been attempted with limited success. Issel et al (J. Virol. June 1992, p 3398-3408) reports that a gp90/gp45 vaccine protected ponies from infection caused by homologous EIAV (the subunits were derived

from the same EIAV strain as was used for challenge). However, these subunit-containing vaccines did not protect horses from either disease or infection when challenged with a heterologous EIAV strain. In fact, the latter produced enhanced disease signs. The enhancement of disease by the subunit EIAV vaccine corroborates findings with SIV and FIV subunit vaccines that appear to enhance disease post challenge. Issel et al (ibid) concludes that perfecting a subunit vaccine for lentiviruses (e.g., HIV, FIV, EIA, BIV and SIV) poses a significant challenge because of the subunit enhancement effect.

Issel, et al (ibid) also reports the prevention of infection by a whole-virus EIAV vaccine. However, vaccination of horses with this vaccine produces horses that are Coggins Test positive (p26 positive). As mentioned previously, due to the eradication program in effect in the U.S., horses testing positive for p26 are either euthanized or strictly quarantined. Additionally, the amount of virus included in said vaccine was 1 milligram, an amount not commercially feasible. Therefore, this whole-virus vaccine is not compatible with regulatory requirements or commercialization.

A donkey virus vaccine has been in use by the Chinese for more than 20 years. This vaccine was developed by using total EIAV genetic material from donkey leukocyte attenuated EIAV infected cells and ribonucleic acid from virus in peripheral blood of donkey-adapted EIAV from infected donkeys (see Xinhua News Agency, May 6, 1999). As would be expected, this vaccine produces a p26 positive response (Coggins's Test positive) in vaccinated horses or other vaccinated equids. Such a vaccine is not acceptable in those countries where equids are tested by Coggins assays or other p26-specific antibody tests. In addition, numerous countries will not accept live vaccines for veterinary applications.

Since there has been no effective and safe method for immunizing mammals against disease or infection caused by lentiviruses, particularly equines against EIA, and since lentivirus diseases, especially HIV, FIV

WO 02/20049

- 6 -

PCT/US01/27599

and EIA are such a wide-spread and significant diseases world-wide, there remains a long-felt need to prepare such a vaccine.

The vaccine of this invention provides a successful vaccine composition that effectively and safely immunizes mammals from diseases caused by lentiviruses. The vaccine of the present invention protects equines from EIA wherein vaccinated equines can be differentiated from wild-type infected equines, which does not convert said equines to Coggins Test positive and which does not replicate *in vivo*. It is fully envisioned that the vaccines taught by the present invention can be used for production of any lentivirus vaccines, including vaccines for HIV, FIV, BIV and SIV.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a schematic representation of EIAV designated EIAV_{UK}.
 Figure 2 is a circular map of infectious clone EIAV_{UK}.
 Figure 3a is a linear schematic of the molecular clone EIAV_{UK}.
 Figure 3b is a linear schematic of molecular clone EIAV_{UK} with the CMV promoter.
 Figure 3c is a linear schematic of molecular clone pCMVEIAV_{UK} with the CA gene deleted.
 Figure 3d is a linear schematic of molecular clone pCMVEIAV_{UK}ΔCA with the Amp Resistance gene (Amp^r) replaced by the Kanamycin Resistance gene (Kan^r).
 Figure 3e is a linear schematic of the p26-deleted Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo.
 Figure 4 is a circular map of the p26-deleted Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo.
 Figure 5a is a linear schematic of the EIAV_{UK} molecular clone.
 Figure 5b is a linear schematic representation of the EIAV_{UK} clone with the CMV promoter insert (CMVEIAV_{UK}).
 Figure 5c is a linear schematic representation of the pCMVEIAV_{UK}-vis2.

WO 02/20049

- 7 -

PCT/US01/27599

Figure 5d is a linear schematic representation of the Proviral Clone containing the Kanamycin Resistance Marker.

Figure 5e is a linear schematic representation of the final pCMVEIAV_{UK}.Vis2.neo Proviral Construct.

5 Figure 6 is a Circular map of the final pCMVEIAV_{UK}.Vis2.neo Proviral Construct.

Figure 7 is the nucleotide and amino acid map of the CA gene/EIAV p26.

10 Figure 8 is the nucleotide and amino acid map of the CA gene/Visna p30.

Figure 9 is a comparison of the homology between p26 of EIAV and p30 of Visna virus.

Figure 10a is a Western Blot of p26-deleted clones, Visna chimeric clones & subclones of EIAV using gp90 & p26 monoclonal antibodies as the detector.

Figure 10b is a Western Blot of several p26-deleted clones, Visna chimeric clones & subclones of EIAV using p30 monoclonal antibody as the detector.

20 Figure 11 is a graph demonstrating the Reverse Transcriptase Activity of various subclones of ED cells transfected with pCMVEIAV_{UK}.Vis2neo Proviral Construct.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides a vaccine composition that produces immunity to mammals from disease and/or infection caused by a lentivirus, said composition comprising a deletion in a gene that blocks replication of the virus *in vivo*. More specifically, this invention describes a vaccine comprising a deletion that produces a lack of ability of the lentivirus to replicate *in vivo* but retains the lentivirus protective components. Said vaccine allows differentiation between vaccinated and non-vaccinated, but exposed, mammals and provides safety and immunity when administered as a vaccine to mammals. Preferably said vaccine encompasses at least one deletion in a lentivirus which allows mammals to be safely vaccinated

and provides protection from exposure to wild-type lentiviruses. The invention further encompasses a lentivirus with a deletion in the *gag* gene, specifically a deletion that results in an inability of the lentivirus to express the Capsid Antigen (CA protein) *in vivo* or *in vitro*. Examples of the

5 lentivirus are equine infectious anemia virus, human immunodeficiency virus (HIV), feline immunodeficiency virus (FIV), bovine immunodeficiency virus (BIV) or simian immunodeficiency virus (SIV). By the term "safe" is meant that vaccination with of mammals with vaccines of the present invention does not produce infection, disease or any other adverse

10 reaction in the vaccinated mammals.

The invention also encompasses a marker vaccine in which a foreign gene is inserted into the gene-deleted region, said inserted gene providing a diagnostic tool for use in vaccinated mammals and, potentially, protection from infection from a foreign disease.

15 In a preferred embodiment, the invention encompasses a vaccine for effectively and safely immunizing mammals from EIA, said composition comprising a gene-deleted EIAV construct wherein said gene-deleted construct interrupts virus replication *in vivo* and blocks the expression of p26 *in vivo* while retaining the EIAV protective components. As such,

20 vaccinated equines would be protected from disease caused by EIAV and not convert to a seropositive status on the Coggin's Test or any other test that measures p26 antibodies. As used herein, the term EIA refers to the disease Equine Infectious Anemia and the term EIAV refers to the Equine Infectious Anemia Virus that causes the disease. Additionally, said EIAV

25 vaccine cannot cause clinical disease in mammals or spread or shed to other mammals including equines.

In another embodiment, this invention encompasses a marker vaccine in which vaccinated equines that are safely and effectively protected from disease caused by EIAV can be distinguished from non-

30 vaccinated equines by detection of a foreign gene expressed in said vaccine and which produces antibodies in the vaccinated animals. A

WO 02/20049

- 9 -

PCT/US01/27599

diagnostic test to detect this foreign gene or gene product is also described.

A more specific embodiment of the invention is a vaccine wherein the lack of ability to express p26 antigen results from one or more gene deletions within the *gag* gene, one or more deletions within a gene having a regulatory effect on *gag* CA production, an insertion of one or more stop codons into the *gag* CA gene or a gene regulating CA production, or insertion of a foreign gene into the *gag* CA gene or a gene regulating CA production. By insertion of a foreign gene is meant that the gene being inserted is not a gene associated with EIAV. Said foreign gene is obtained from a non-EIAV organism.

Additionally, it is expected that further deletions could be made such that the EIAV in the vaccine contained multiple deletions including but not limited to a deletion in the *gag* gene affecting the expression of p26.

Finally, it is expected that said gene deletions (deleted regions) could serve as potential points for insertion of foreign genes to produce a multiple protective vaccine. This means that a single vaccination with the EIA vaccine carrying a foreign gene (e.g., influenza hemagglutinin gene) could protect the mammal from both the lentivirus disease (e.g., HIV or EIA) and the disease associated with the foreign gene insert (e.g., human or equine influenza).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

This invention encompasses a vaccine for effectively and safely immunizing mammals against diseases caused by lentiviruses selected from the group consisting of EIAV, HIV, FIV, BIV and SIV, said composition comprising a gene-deleted lentivirus construct. This invention encompasses a vaccine comprising a deletion that produces a lack of ability of the lentivirus to replicate *in vivo* and retains the lentivirus protective components. By lentivirus protective components is meant the protective antigens associated with the envelope, said antigens including but not limited to gp120, gp90 and gp45. The invention encompasses a

lentivirus that is unable to express the Capsid Antigen (CA protein) *in vivo*.

A deletion can be produced in the lentivirus genome by using specific restriction endonucleases to remove all or part of one or more genes. A preferred gene for removal is the gene encoding the Capsid Antigen (CA). Such gene deletion can be accomplished by using PCR, ligation and PCR cloning; to delete the selected gene sequence. Restriction endonucleases can also be used to remove specific portions of genes once the gene sequence of the lentivirus and the gene sequence of the gene to be excised are known. Using specific restriction endonucleases, the *gag* gene can be removed in whole or part. Additionally, a stop codon can be inserted into the gene, preferably at the 5' end wherein the stop codon causes the gene not to express its CA protein. Additionally, a foreign gene from another lentivirus or an unrelated virus can be inserted into the gene-deleted region producing a multiply protective vaccine. In the latter case, the invention describes the deletion of a region of the EIAV genome large enough to insert a gene expressing a protective antigen from a non-EIAV organism, preferably a virus. Therefore, the hemagglutinin (HA) gene from equine influenza A2 or A1 can be inserted into the *gag* CA region allowing expression of gp90 and gp45 of EIAV as well as HA of A1 and A2 equine influenza. This will provide a vaccine that can protect from disease in equines caused by EIAV and equine influenza viruses. Also, genes from equine herpes viruses types 1, 2, and 4 can be inserted into the EIAV construct to provide protection against disease of equines caused by EIAV and equine herpes viruses. Other equine viruses which could have genes encoding for protective antigens inserted in the EIAV include but are not limited to equine arteritis, encephalomyelitis viruses (Eastern, Western, Venezuelan and Rift Valley Fever virus). Genes encoding protective antigens from parasites (*Sarcocystis neurona* that causes Equine Protozoal Encephalitis or EPM, *Neospora heugesi* that is also possibly related to EPM, *Toxoplasma gondii*, etc.) can also be inserted into an EIAV construct to protect against these diseases. Finally, genes encoding for bacterial

WO 02/20049

- 11 -

PCT/US01/27599

diseases of horses, including but not limited to *Streptococcus equi* and *Clostridium tetani*, can be inserted into an EIAV construct to provide multiple disease protection. It is expected that even a gene encoding for an immunostimulatory protein (immunomodulator gene) or glycoprotein can be inserted into the gene-deleted region in order to enhance the immunity provided by the virus construct. Finally, a non-equine gene, such as a gene from a Visna virus, can be inserted into the deleted gene region in order to produce a marker vaccine. Said marker vaccine is useful in differentiating vaccinated equines from non-vaccinated or infected equines.

Broadly described, a method for deleting a gene of a lentivirus (e.g., the CA gene) and insertion of a foreign gene utilizes the techniques of PCR, ligation, and a method of PCR cloning.

Primers are designed to amplify a region of a promoter-lentivirus genome upstream of the CA open reading frame (ORF). Additional primers are used to amplify the region of the promoter-lentivirus genome downstream of the CA. The amplified PCR products are purified using agarose gel electrophoresis and ligated together. A final round of PCR is performed using the 5' primer of the upstream fragment, and the 3' primer of the downstream fragment, followed by gel purification. The final product would comprise a representative size of the *gag* gene with a deletion of the CA open reading frame. The PCR product is gel purified and digested with specified restriction endonucleases such that it can be ligated with a plasmid that had been digested with the same restriction enzymes or enzymes producing the same blunt ends. The ligated insert is preferably added to a lentivirus clone comprising a promoter and genes allowing for selection of clones (e.g., antibiotic resistance genes) thus producing a promoter-lentivirus clone. Then the promoter-lentivirus clone is transformed into competent bacterial cells and colonies of the bacteria are screened for insertion of the genes. Clones may be genetically sequenced to verify that the CA region had been deleted and an insert had been made.

A gene-deleted/gene-inserted construct (also herein designated as a chimera) could be commercially produced (produced in large scale) by transfecting susceptible tissue culture cells, harvesting the fluids and formulating the fluids with an adjuvant. Optionally, said harvest fluids may be inactivated with art-known inactivating agents such as formalin, binary ethyleneimine, beta-propiolactone, thimerasol and psoralen. By gene-deleted/gene-inserted construct is meant a lentivirus in which a deleted gene or portion thereof replaced in part or in whole by a gene from another virus, including but not limited to a lentivirus or a non-lentivirus. If said gene-deleted/gene-inserted construct cannot replicate *in vitro*, tissue culture cells may be transfected with the construct using transfecting agents such as DEAE dextran, GenePORTER™ (Gene Therapy Systems), etc. to incorporate the necessary genomic material into the cell DNA such that the cells produce lentivirus antigens.

For transfection, tissue culture cells are seeded into wells of tissue culture vessels (e.g., plates), exposed to the gene-deleted construct or the gene-deleted/gene-inserted construct in the presence of a transfecting agent, incubated to allow transfection and then overlayed with a selection medium. Selection media is defined as any nutrient medium that contains components to kill non-transfected cells but does not inhibit growth of transfected cells. To accomplish this, generally, gene-deleted constructs contain inserts of a resistance gene in order to allow the construct to grow in said selection media. Selection media can contain antibiotics, antimicrobials and selective antibiotics. Once transfected cells have been selected and are replicating they are tested for production of protective antigens as well as for the absence of expression of the deleted gene product. Those clones demonstrating these characteristics are then expanded in selection media by removing the cells from their initial container, diluting them and replanting them into larger containers. For instance, initial transfection may be carried out in 24 well tissue culture plates. After selection of clones, the surviving transfected cells are passaged to 6 well plates, 25 cm² flasks, 75 cm² flasks and then to roller

bottles (1700cm² or larger). Transfected cells should consistently produce the virus construct, indicating a stable transfected or producer cell. After the transfected cell clones have been demonstrated to be stable, stable-transfected Master Cells (also referred to as persistently infected cells by various regulatory agencies) can be prepared for expansion into Working Cells and Production Cells. Working Cells are defined as those cells that are used to prepare Production Cells. Production Cells are the cells used to manufacture vaccines. Master Cells, Working Cells and Production Cells are all generally stored in liquid nitrogen for retaining viability and stability of the transfecting clone.

In the practice of this invention, a vaccine comprising a gene-deleted construct lacks the ability to replicate *in vivo* and, possibly, *in vitro*. As should be realized by the foregoing, this type of deletion, if producing an inability to replicate or grow *in vitro*, requires transfection and cloning as described above.

The following is an illustrative but non-limiting description of a lentivirus that is unable to express the Capsid Antigen protein (CA or p26) *in vivo*. It has been determined that with ELAV, a deletion in the CA such that the p26 is not expressed results in a gene-deleted construct that cannot replicate *in vitro* or *in vivo*. For this reason, it is expected that such a CA deleted lentivirus would have to be produced in a stable transfected cell line. This means that it would have to be transfected as described above in order to produce the stable transfected cell line.

This invention more specifically encompasses a composition wherein the lack of ability to express p26 antigen results from one or more gene deletions within the *gag* gene or one or more deletions within a gene having a regulatory effect on *gag* CA production, or an insertion of one or more stop codons or insertion of a foreign gene.

Additionally, it is expected that further deletions could be made such that the ELAV in the vaccine composition contained multiple deletions including but not limited to a deletion in the *gag* gene affecting the expression of p26. Finally, it is expected that said gene deletions (deleted

WO 02/20049

- 14 -

PCT/US01/27599

regions) could serve as potential points for insertion of foreign genes to produce a multiple protective vaccine and a very important feature for EIAV, a marker vaccine. A marker vaccine is a vaccine that contains a foreign gene that produces antibody in the mammal receiving a vaccination, said antibody being detected by a diagnostic test and being used to distinguish a vaccinated equid from a non-vaccinated equid and a vaccinated equid from an infected equid. With EIAV, it is preferred to insert a CA gene from a different lentivirus that does not cross-react with p26 in the Coggins Test or equivalent tests. Therefore, insertion of the p30 gene from a different lentivirus such as a Visna virus would be expected to allow an EIAV vaccine to be used for vaccination of mammals, preferably equids. Said equids would demonstrate no p26 antibody in the Coggins Test or any other test measuring the presence of antibody to p26, and would also demonstrate antibody to p30 which could be detected by an enzyme linked immunosorbant assay (ELISA), immunodiffusion test, fluorescent antibody test (FA), or any other test that can be used to detect antibodies in mammals.

It is expected that the gag gene-deleted constructs discussed above will not grow or replicate *in vitro*. Therefore, in order to produce large quantities for manufacturing purposes, the cloned constructs can either be expressed by bacterial cells or by mammalian cells (tissue culture). The process of transformation has been described briefly above and is described in detail in the EXAMPLES. Production of a stable transfected tissue culture cell line (persistently infected Master Cell) is preferable and is accomplished by transfecting mammalian cells in tissue culture. A preferred technique for EIAV constructs is described in the EXAMPLES to follow.

The resulting p26 deleted construct can be employed in a vaccine for effectively and safely immunizing equines from EIAV, said vaccine comprising a gene-deleted EIAV construct wherein said gene deletion blocks the expression of p26 *in vivo*.

Vaccine viruses of this invention can be further treated with inactivating agents such as formalin, beta propiolactone, binary ethyleneimine, thimerasol or any other that effectively inactivates viruses. Such agents can be used in amounts varying from 0.00001% to 0.5%,
5 preferably from 0.00001% to 0.1% and more preferably from 0.00001% to 0.01%.

Additionally, adjuvants or immunomodulators/immunostimulators may be added to the vaccine to enhance the immune response produced by the vaccine. Adjuvants can be selected for the group consisting of
10 polymers such as Carbopol®-based, HAVLOGEN® and POLYGEN®, block co-polymers, oil-in-water such as EMULSIGEN® or EMULSIGEN® PLUS, water-in-oil, aluminum salts, lipid-based, lipoprotein, endotoxin-based and combinations thereof. Immunomodulators and immuno-
stimulators include but are not limited to *Corynebacteria pyogenes* and
15 extracts or subunits thereof, parapox viruses and extracts or subunits thereof, modified live viruses that stimulate interferon production, as well as cytokines. The vaccines of the present invention can be administered by any route. For instance, they can be administered intramuscularly, subcutaneously, intradermally, intranasally, orally, intravenously or
20 intraperitoneally. It is preferable to administer the vaccines either intramuscularly, subcutaneously, orally or intranasally.

Other antigens may be added to the vaccines such that a multi-component vaccine can be produced. In order to accomplish this, antigens from other viruses, bacteria or parasites are formulated with
25 adjuvants or other excipients and then combined with the EIAV construct of this invention. Therefore, this invention encompasses an EIAV construct combined with antigens from the group selected from equine influenza (A1 and A2), equine herpes virus (subtypes 1, 2, 3 or 4), equine arteritis virus, eastern equine encephalomyelitis, western equine
30 encephalomyelitis, Venezuelan equine encephalitis, Rift Valley Fever Virus, *Sarcocystis neurona*, *Neospora hughesi*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Rhodococcus*

equi, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile* or any other equine disease-producing agent. The *Clostridium botulinum* can include types A, B, C, D, E, and/or F.

Finally, it is within the scope of this invention that a diagnostic test
 5 can be used to differentiate vaccinated equines from non-vaccinated
 and/or infected equines by measuring the presence or absence of
 antibodies to the deleted gene protein, to the inserted gene protein or to
 both proteins. Also, a PCR-based diagnostic test could be used to detect
 the presence or absence of the genes or gene sequences in body fluids or
 10 tissues from the equine and, thus, detect whether an equine had been
 infected with EIAV or vaccinated with the composition of this invention.
 The diagnostics of choice measure the presence or absence of p26
 antibodies in an equine. Additionally, if an inserted gene from a non-
 equine organism such as a Visna virus, the protein product of the marker
 15 vaccine can be measured. An example described herein includes the
 insertion of the p30 gene from Visna virus wherein the p30 can be
 detected in vaccinated equines but is not present in non-vaccinated or
 EIAV infected equines.

Diagnostic differentiation can be measured by developing an
 20 immunoassay, an antibody-detecting assay (e.g. indirect fluorescent
 antibody, immunodiffusion, agar diffusion, electrophoresis) or a PCR-
 based assay known to the art. An example of an immunoassay is an
 enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) that detects and/or
 quantitates antibodies to specific proteins in serum, blood or tissues.
 25 ELISA technology could also be used to detect the presence or absence
 of virus-associated antigens in the blood, serum or tissues. By the term
 "virus-associated antigens" is meant the presence or absence of a gene
 expression product such as the p26 protein of EIAV or p30 protein of
 Visna virus or in the case of the p26 or p30 genes, respectively. PCR-
 30 based assays have been used to measure the presence or absence of
 genes or gene sequences in the blood, serum or tissues of an equine,
 thus indicating that a horse had been infected or vaccinated, as the case

may be. For this particular embodiment, an ELISA would detect the presence of antibodies to the p26 or p30 proteins. If p26 antibodies were present in horses that were tested it would indicate that the horse had been infected with EIAV. Horses that had been vaccinated with a gene-mutated EIAV construct containing a non-functional p26 gene would not contain p26 antibodies in their serum. Horses that had been vaccinated with a gene-mutated EIAV construct containing a p30 gene insertion would contain p30 antibodies in their serum. Thus, vaccinated horses could be differentiated from infected horses. The PCR-based assays would be used to detect the presence or absence of gene sequences within the horse. For instance, if a horse had been infected with a wild-type EIAV, it would contain the gene sequence for wild-type p26. However, equines immunized with vaccines comprising a gene-mutated EIAV, particularly one wherein the p26 gene comprised deletions or specific mutations would not contain the gene sequence for wild-type p26. Alternatively, horses that had been vaccinated with a gene deleted EIAV construct containing a p30 gene insertion would contain the p30 gene sequence in their serum.

These and other aspects of the invention are further illustrated by the following non-limiting examples. In the examples and throughout the specification, parts are by weight unless otherwise indicated.

EXAMPLE 1

Construction of the p26 Deletion Mutant Proviral Clone designated as pCMV.ΔCA.neo: In order to determine whether deletion of all or part of the CA gene was possible, it was decided to delete the entire p26 gene from EIAV. The molecular clone EIAV_{UK} as described by Cook et al. Journal of Virology 72(2): 1383-1393, 1998 which is incorporated herein by reference, was used for derivation of the proviral clone. Figure 2 displays a circular map of the EIAV_{UK} molecular clone. Figure 3a displays a linear schematic in order to demonstrate the methods used for the constructs described in this example. Figure 6 shows the specific

WO 02/20049

- 18 -

PCT/US01/27599

sequence of the CA gene and the amino acid sequence of p26 of the EIAV that it encodes.

The procedure for the construction of the p26 deletion mutant proviral clone (pCMV. Δ CA.neo) was as follows. First, the CMV promoter
 5 was inserted into the 5' LTR region through a process of PCR, ligation, and PCR cloning. Primers CMV3'Blunt (SEQ ID No. 1) and 5'CMVBssH (SEQ ID No. 2) were used to amplify the CMV promoter from the plasmid pRC/CMV (Invitrogen). PCR conditions were set up as follows in thin-walled 0.5ml PCR tubes (PGC Scientific): 40.6 μ l dH₂O, 5 μ l cloned Pfu
 10 DNA Polymerase 10X reaction buffer, 0.8 μ l 25mM Deoxy- A,C,G,T (nucleotide) tri-phosphate (dNTP) mixture, 2.5 μ l each primer (100ng/ μ l), 1l template DNA (10ng/ μ l) 2.0 μ l cloned Pfu DNA Polymerase (2.5U/ μ l-Stratagene). Amplification was performed in a Hybaid thermocycler and consisted of 30 cycles of: 94°C-20seconds, 60°C-20 seconds, 72°C-1
 15 minute. Primers LTRBlunt5' (SEQ ID No. 3) and MA3'Tth (SEQ ID No. 4) were used to amplify a region of the EIAV_{UK} clone encompassing the portion of the genome including the final 31 base pairs of the terminal redundancy region (R region) through the MA open reading frame in similar reaction conditions. The two PCR products (50 μ l) were gel purified
 20 on a 0.8% agarose gel with GeneClean (Bio101). The two purified PCR products were set up in individual kinase reactions as follows: 5 μ l DNA, 2 μ l ATP, 2 μ l 10X Protein Kinase buffer (New England Biolabs), 10 μ l dH₂O, and 1 μ l Protein Kinase. The reaction product was incubated at 37°C 2 hours. The resulting kinased products were purified through chloroform
 25 extraction and ethanol precipitated. The resultant products (3 μ l) were ligated together overnight (16°C) at their individual blunt ends with T4 ligase (New England Biolabs) in the following reaction mixture: 1 μ l 10X T4 ligase buffer, 2 μ l dH₂O, and 1 μ l T4 ligase. A second round of PCR using the primers CMV5'BssH (SEQ ID 2) and MA3'Tth (SEQ ID 4) amplified the
 30 final product to be cloned into the EIAV_{UK} clone. The reaction conditions were as stated above using 1 μ l of the ligation reaction. This final PCR

WO 02/20049

- 19 -

PCT/US01/27599

product (50 μ l) was gel purified again on a 0.8% agarose gel. The purified PCR product was digested with the restriction enzymes BssHII and Tth111I in the following manner: 17 μ l PCR product, 2 μ l BssHII 10X buffer(NEB), and 2 μ l BssHII (NEB), incubated at 50°C for 2 hours,

5 chloroform extracted and ethanol precipitated. The digestion was completed as follows: 16 μ l DNA (BssHII digested), 2 μ l 10X reaction buffer #4 (NEB), 2 μ l Tth111I, incubated at 65°C for 3 hours. The EI_{AV} clone (500ng) was partially digested with MluI (New England Biolabs). This was conducted through incubation at 37°C for 5 minutes in the following

10 reaction mixture: 1 μ l 10X # reaction buffer, 1 μ l of restriction enzyme, 2 μ l of dH₂O and immediate submersion on ice followed by gel purification. The appropriate size band was then completely digested with Tth111I in a reaction mixture consisting of 1 μ l 10X # 4 reaction buffer (NEB), 1 μ l of restriction enzyme and 2 μ l of dH₂O. The resulting fragment was gel

15 purified on a 0.8% agarose gel. The promoter fragment (3 μ l) was ligated into the EI_{AV} clone (3 μ l) with T4 ligase in a mixture of 1 μ l 10X T4 ligase buffer, 2 μ l dH₂O, and 1 μ l T4 ligase. The resulting ligation product (4 μ l) was transformed into competent DH5 α bacterial cells (100 μ l). The transformation procedure consisted of: incubation on ice for 30 minutes,

20 heat shock at 42°C for 45 seconds, incubation on ice for 2 minutes, addition of 900 μ l SOC borth (a media supplement containing 20% bacto-tryptone, 5% bacto-yeast, 0.5% NaCl, 2.5mM KCl, 10 mM magnesium chloride and 20 mM glucose), incubation at 37°C for 1 hour, and 200l plated on LBamp plates. Clones were sequenced to verify correct

25 promoter arrangement as schematically represented in Figure 3b

The PCR, ligation, PCR method of cloning was used to delete the Capsid Antigen (CA) sequence. Primers gag441 (SEQ ID No. 5) and MAT (SEQ ID No. 6) were used to amplify a 398bp region of the molecularly-modified EI_{AV} designated as CMVEI_{AV} genome upstream of the CA

30 open reading frame. PCR conditions were set up as follows in PGC Scientific thin-walled 0.5ml PCR tubes: 40.6 μ l dH₂O, 5 μ l cloned Pfu DNA

WO 02/20049

- 20 -

PCT/US01/27599

Polymerase 10X reaction buffer, 0.8µl 25mM dNTP mixture, 2.5µl each primer (100ng/µl), 1µl template DNA (10ng/µl) 2.0µl cloned Pfu DNA Polymerase (2.5U/µl-Stratagene). Amplification was performed in a Hybaid thermocycler. Primers p9f5' (SEQ ID No. 7) and p9f3' (SEQ ID No. 8) were used to amplify a 357bp region of the CMVEIAV_{UK} genome downstream of the CA encoding region in a similar reaction mixture. These two PCR products (50µl) were gel purified on a 0.8% agarose gel with GeneClean (Bio 101). The two purified PCR products (3µl) were ligated together overnight (16°C) with T4 ligase (New England Biolabs) in the following reaction mixture: 1µl 10X T4 ligase buffer, 2µl dH₂O, and 1µl T4 ligase. A final round of PCR was performed using the gag441 primer (SEQ ID 5) and p9f3' primer (SEQ ID 8). The ligated sequence when in the correct orientation would yield a PCR product of approximately 755bp. This deletes the CA open reading frame from base pairs 846-1550 (EIAV base pair correlation, not plasmid). The PCR product was gel purified on a 0.8% agarose gel with GeneClean. The purified fragment was digested with Tth111I and BsrGI in the following manner: 15l PCR product, 2l BSA, 2l 10X buffer #2 (NEB), and 2µl BsrGI (NEB), incubated at 37°C for 3 hours, chloroform extracted and ethanol precipitated. The digestion was completed as follows: 16µl DNA(BsrGI digested), 2µl 10X reaction buffer #4 (NEB), 2µl Tth111I, incubated at 65°C for 3 hours, and gel purified in the same manner previously mentioned. The CMVEIAV_{UK} clone was digested with the same restriction enzymes and gel purified in a similar format. The two fragments (3µl each) were ligated together with T4 ligase in a mixture of 1µl 10X T4 ligase buffer, 2µl dH₂O, and 1µl T4 ligase, and transformed into competent DH5α bacterial cells (100µl). The transformation procedure consisted of: incubation on ice for 30 minutes, heat shock at 42°C for 45 seconds, incubation on ice for 2 minutes, addition of 900µl SOC broth, incubation at 37°C for 1 hour, and 200µl plated on LBamp plates. Individual clones were screened for insert. Clones were sequenced to verify that the CA region had indeed been

deleted as schematically diagrammed in Figure 3c. The Δ identifies the deletion.

The original proviral DNA carried an ampicillin resistance marker (Amp^r). Because this would not be the ideal marker for a vaccine used in mammals, it was replaced with a Kanamycin resistant marker (Kan^r) using the following procedure. The proviral DNA was subcloned into a kanamycin-resistant vector designated as pLG339/SPORT (Cunningham et al. Gene, 124: 93-98, 1993). The vector was digested with the restriction enzymes MluI and EcoRI (New England Biolabs). The proviral clones were also digested fully with EcoRI and partially digested with MluI. The plasmids (500ng) were each partially digested individually through incubation at 37°C for 5 minutes in the following reaction mixture: 2 μ l 10X #1 reaction buffer, 1 μ l of restriction enzyme (MluI), 12 μ l of dH₂O and immediate submersion on ice followed by gel purification. The appropriate size band was then completely digested with EcoRI in a reaction mixture consisting of 1 μ l 10X #2 reaction buffer, 1 μ l of restriction enzyme and 2 μ l of dH₂O. The desired fragments were gel purified on a 0.8% agarose gel with GeneClean. The proviral DNA (4 μ l) and vector (2 μ l) were ligated together overnight (16°C) with T4 ligase (New England Biolabs) in the following reaction mixture: 1 μ l 10X T4 ligase buffer, 2 μ l dH₂O, and 1 μ l T4 ligase. The ligation product (4 μ l) was transformed into competent DH5 α bacterial cells (100 μ l). The transformation procedure consisted of: incubation on ice for 30 minutes, heat shock at 42°C for 45 seconds, incubation on ice for 2 minutes, addition of 900 μ l SOC broth, incubation at 37°C for 1 hour, and 200 μ l plated on LBKan plates. Individual clones were screened for insert into the proper MluI site. Figure 3d shows a schematic representation of this construct demonstrating the Amp^r resistance marker being replaced by the Kan^r resistance marker.

A neomycin resistance marker was added in order to allow selection of clones in eukaryotic cells. The neomycin resistance marker was excised from the commercial vector pRC/CMV (Invitrogen) using the

WO 02/20049

- 22 -

PCT/US01/27599

restriction enzymes EcoRI and XhoI (New England Biolabs). The area excised from the pRC/CMV encompassed the entire neomycin open reading frame as well as the SV40 promoter, origin of replication, and SV40 poly A recognition sequence. The digestion was executed at 37°C in a reaction mixture which consisted of 500ng pRC/CMV plasmid DNA, 2µl 10X #2 reaction buffer, 2µl BSA, 2µl dH₂O, and 1µl each of the restriction enzymes. The resulting kanamycin-resistant proviral clone was digested with the restriction enzymes EcoRI and SalI (GIBCO BRL). SalI digested ends can ligate into XhoI digested ends. The digestion was carried out in the following reaction mixture: 1µg proviral DNA, 2µl 10X REACT 6 buffer, 2µl BSA, 2µl H₂O and 1µl each restriction enzyme. The digested neomycin fragment and proviral clone were gel purified on a 0.8% agarose gel with GeneClean, and ligated together at 16°C overnight with T4 ligase in the following reaction mixture: 4µl purified proviral DNA, 3µl purified neomycin insert DNA, 1.5µl 10X T4 ligase buffer, 5.5µl dH₂O and 1µl T4 ligase. The ligated DNA (6µl) was transformed into competent DH5 bacterial cells (100µl). The transformation procedure consisted of: incubation on ice for 30 minutes, heat shock at 42°C for 45 seconds, incubation on ice for 2 minutes, addition of 900µl SOC broth, incubation at 37°C for 1 hour, and 200µl plated on LBKan plates. Individual clones were screened for insert. A schematic representation of the p26 deleted Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo is shown in Figure 3e with a circular map shown in Figure 4.

25 EXAMPLE 2

Construction of Visna Chimera Proviral Clone designated as pCMV.Vis2.neo: In order to substitute a foreign gene into the Capsid Antigen region (CA) of the gag gene and perhaps, to produce a replicating Proviral Clone with a p26 deletion, it was decided to insert the p30 gene from a Visna virus, another lentivirus which does not produce a positive response on the Coggin's Test. If the p30 could be adapted to replace the

WO 02/20049

- 23 -

PCT/US01/27599

mechanism for p26 of the EIAV, then a replicating proviral clone could be produced.

As in Example 1, the backbone for the construction of the Proviral Clone with the p30 of Visna inserted into the deleted p26 region was EIAV_{UK} (Cook et al., *ibid*). A schematic diagram of this starting construct is shown in Figure 5a.

The procedure for preparation of this EIAV construct was as follows: The CMV promoter was inserted into the 5' LTR region of EIAV_{UK} through a process of PCR, ligation, PCR cloning as referenced previously. Primers CMV3'Blunt (SEQ ID No.1) and 5'CMVBssH (SEQ ID No.2) were used to amplify the CMV promoter from the plasmid pRC/CMV (Invitrogen). PCR conditions were set up as follows in PGC thin-walled 0.5ml PCR tubes: 40.6µl dH₂O, 5µl cloned Pfu DNA Polymerase 10X reaction buffer, 0.8µl 25mM dNTP mixture, 2.5µl each primer (100ng/µl), 1µl template DNA (10ng/µl) 2.0µl cloned Pfu DNA Polymerase (2.5U/µl-Stratagene). Amplification was performed in a Hybaid thermocycler and consisted of 30 cycles of: 94°C-20seconds, 60°C-20 seconds, 72°C-1 minute. Primers LTRBlunt5' (SEQ ID No. 3) and MA3'Tth (SEQ ID NO. 4) were used to amplify a region of the EIAV_{UK} clone encompassing the portion of the genome including partial R region through the matrix open reading frame in similar reaction conditions. The PCR products (50µl) were gel purified on a 0.8% agarose gel with GeneClean (Bio 101). The two purified PCR products were set up in individual kinase reactions as follows: 5µl DNA, 2µl ATP, 2µl 10X Protein Kinase buffer (New England Biolabs), 10µl dH₂O, and 1µl Protein Kinase. The reaction was incubated at 37°C 2 hours. The kinased products were purified through chloroform extraction and ethanol precipitated. The resultant products (3µl) were ligated together overnight (16°C) at their individual blunt ends with T4 ligase (New England Biolabs) in the following reaction mixture: 1µl 10X T4 ligase buffer, 2µl dH₂O, and 1µl T4 ligase. A second round of PCR using the primers CMV5'BssH (SEQ ID No. 2) and MA3'Tth (SEQ ID No. 4)

WO 02/20049

- 24 -

PCT/US01/27599

amplified the final product to be cloned into the EIAV_{UK} clone. The reaction conditions were as stated above using 1 µl of the ligation reaction.

- This final PCR product (50 µl) was gel purified again on a 0.8% agarose gel. The purified PCR product was digested with the restriction enzymes
- 5 BssHII and Tth111I in the following manner: 17 µl PCR product, 2 µl BssHII 10X buffer(NEB), and 2 µl BssHII (NEB), incubated at 50°C for 2 hours, chloroform extracted and ethanol precipitated. The digestion was completed as follows: 16 µl DNA (BssHII digested), 2 µl 10X reaction buffer #4 (NEB), 2 µl Tth111I, incubated at 65°C for 3 hours. The EIAV_{UK} clone
- 10 (500ng) was partially digested with MluI (New England Biolabs). This was conducted through incubation at 37°C for 5 minutes in the following reaction mixture: 1 µl 10X # reaction buffer, 1 µl of restriction enzyme, 2 µl of dH₂O and immediate submersion on ice followed by gel purification. The appropriate size band was then completely digested with Tth111I in a
- 15 reaction mixture consisting of 1 µl 10X # reaction buffer, 1 µl of restriction enzyme and 2 µl of dH₂O. The fragment was gel purified on a 0.8% agarose gel. The promoter (3 µl) was ligated into the EIAV_{UK} clone (3 µl) with T4 ligase in a mixture of 1 µl 10X T4 ligase buffer, 2 µl dH₂O, and 1 µl T4 ligase. The ligation product (4 µl) was transformed into competent DH5α
- 20 bacterial cells (100 µl). The transformation procedure consisted of: incubation on ice for 30 minutes, heat shock at 42°C for 45 seconds, incubation on ice for 2 minutes, addition of 900 µl SOC broth, incubation at 37°C for 1 hour, and 200 µl plated on LBamp plates. Clones were sequenced to verify correct promoter arrangement. Figure 5b is a
- 25 schematic representation of the EIAV_{UK} clone with the CMV promoter insert (CMVEIAV_{UK}).

- The source of the Visna p30 capsid sequence was the pVisna clone puc9-4.9V2 (Braun, MJ et al, Journal of Virology, 61(12): 4046-4054, 1987). The Visna p30 (7 µl containing 1 µg) was excised out of the
- 30 clone using the restriction enzymes ApaI and Tth111I in the following reaction: 4 µl dH₂O, 1.5 µl BSA, 1.5 µl 10X #4 reaction buffer (NEB), .5 µl

WO 02/20049

- 25 -

PCT/US01/27599

Apal and Tth111I (NEB), incubated at 65°C for 2 hours; 0.5µl more of
 Apal added to the reaction mixture and incubated at room temperature
 (25°C) overnight. The desired fragment was gel purified in a 0.8%
 agarose gel with GeneClean. The CMVEIAV_{UK} clone (5µl containing 1µg)
 5 was digested with BlnI (NEB enzyme for Bpu1102I) and Tth111I (NEB) in
 the following reaction mixture: 1.5µl 10X buffer #4 (NEB), and 1µl BlnI
 (NEB), 7.5µl dH₂O, incubated at 37°C for 3 hours, chloroform extracted
 and ethanol precipitated. The digestion was completed as follows: 15µl
 DNA(BlnI digested), 2µl 10X reaction buffer #4 (NEB), 1µl Tth111I, 2µl
 10 dH₂O, incubated at 65°C for 3 hours. The digested proviral DNA was gel
 purified on a 0.8% agarose gel with GeneClean. The two fragments were
 ligated with T4 ligase in the following mixture: DNA fragments (3µl each)
 were ligated together with T4 ligase in a mixture of 1µl 10X T4 ligase
 buffer, 2µl dH₂O, and 1µl T4 ligase. The ligation product (4µl) was
 15 transformed into competent DH5α bacterial cells (100µl). The
 transformation procedure consisted of: incubation on ice for 30 minutes,
 heat shock at 42°C for 45 seconds, incubation on ice for 2 minutes,
 addition of 900µl SOC broth, incubation at 37°C for 1 hour, and 200µl
 plated on LBamp plates. Individual clones were screened for insert and
 20 sequenced using dideoxy sequencing and an ABI automatic sequencer to
 verify the entire visna p30 open reading frame was inserted in the proviral
 clone correctly and in frame. Figure 5c shows a schematic of the
 CMVEIAV_{UK}-vis2.

The proviral DNA was subcloned into a kanamycin-resistant vector
 25 designated as pLG339/SPORT (Cunningham et al. Gene, 124: 93-98,
 1993), incorporated herein by reference. The vector was digested partially
 with MluI and fully with EcoRI (New England Biolabs). The proviral clones
 were also digested fully with EcoRI and partially digested with MluI. The
 plasmids (500ng) were each partially digested individually through
 30 incubation at 37°C for 5 minutes in the following reaction mixture: 2µl 10X
 #2 reaction buffer, 1µl of restriction enzyme, 12µl of dH₂O and immediate

WO 02/20049

- 26 -

PCT/US01/27599

submersion on ice followed by gel purification. The appropriate size band was then completely digested with EcoRI in a reaction mixture consisting of 1 μ l 10X #2 reaction buffer, 1 μ l of restriction enzyme and 2 μ l of dH₂O. The desired fragments were gel purified on a 0.8% agarose gel with

5 GeneClean. The proviral DNA (4 μ l) and vector (2 μ l) were ligated together overnight (16°C) with T4 ligase (New England Biolabs) in the following reaction mixture: 1 μ l 10X T4 ligase buffer, 2 μ l dH₂O, and 1 μ l T4 ligase. The ligation product (4 μ l) was transformed into competent DH5 α bacterial cells (100 μ l). The transformation procedure consisted of: incubation on

10 ice for 30 minutes, heat shock at 42°C for 45 seconds, incubation on ice for 2 minutes, addition of 900 μ l SOC broth, incubation at 37°C for 1 hour, and 200 μ l plated on LBKan plates. Individual clones were screened for insert into the proper MluI site. Figure 5d shows a schematic of the proviral clone containing the kanamycin resistance marker.

15 In order to make the EIAV proviral construct more commercially-acceptable, the kanamycin resistance marker was replaced with a neomycin resistance marker. The neomycin resistance marker was excised from the commercial vector pRC/CMV (Invitrogen) using the restriction enzymes EcoRI and XhoI. This encompassed the entire

20 neomycin open reading frame as well as the SV40 promoter (SEQ ID No. 9), origin of replication (SEQ ID. No. 10), and SV40 poly A recognition sequence (SEQ ID. No. 11). The digestion was executed at 37°C in a reaction mixture that consisted of 500ng pRC/CMV plasmid DNA, 2 μ l 10X

25 #2 reaction buffer, 2 μ l BSA, 2 μ l dH₂O, and 1 μ l each of the restriction enzymes. The new kanamycin-resistant proviral clone was digested with the restriction enzymes EcoRI and Sall (GIBCO BRL). Sall digested ends can ligate into XhoI digested ends. The digestion was carried out in the following reaction mixture: 1 μ g proviral DNA, 2 μ l 10X REACT 6 buffer, 2 μ l

30 BSA, 2 μ l H₂O and 1 μ l each restriction enzyme. The digested neomycin fragment and proviral clone were gel purified on a 0.8% agarose gel with GeneClean, and ligated together at 16°C overnight with T4 ligase in the

WO 02/20049

- 27 -

PCT/US01/27599

following reaction mixture: 4µl purified proviral DNA, 3µl purified neomycin insert DNA, 1.5µl 10X T4 ligase buffer, 5.5µl dH₂O and 1µl T4 ligase. The ligated DNA (6µl) was transformed into competent DH5α bacterial cells (100µl). The transformation procedure consisted of: incubation on ice for 5 30 minutes, heat shock at 42°C for 45 seconds, incubation on ice for 2 minutes, addition of 900µl SOC broth, incubation at 37°C for 1 hour, and 200µl plated on LBKan plates. Individual clones were screened for insert. Figure 5e shows a schematic drawing of the final pCMVEIAV_{UK}.Vis2.neo proviral construct (hereinafter designated pCMV.Vis2.neo) and Figure 6 10 shows the final circular map of this construct.

The pCMV.Vis2.neo proviral construct was tested for its ability to replicate *in vitro* by using the standard replication assay as described in EXAMPLE 1. As with the Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo, this pCMV.Vis2.neo proviral construct did not replicate *in vitro* and would not 15 be expected to replicate *in vivo*. It was therefore decided to develop a transfected cell line (persistently-infected cell line).

EXAMPLE 3

Transfection & Selection of Cell Lines: Transfection of an Equine Dermal 20 Cell Line.

The p26-deleted Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo and proviral construct pCMV.Vis2.neo were used to evaluate their ability to transfect cells in a manner similar to the wild-type EIAV_{UK}. The procedure used was as follows.

25 One microgram of proviral clone or proviral construct DNA was used to transfect an Equine Dermal (ED) cell line (ATCC CRL 6288). The ED cell line was grown in 6 well tissue culture plates seeded with between 2 and 4 x 10⁵ ED cells per well in 2 mL of the complete growth Minimum Essential Media with Earles salts (EMEM) plus 10% fetal calf serum, 100 30 units/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin (Gibco BRL 15140-122) and 2 mm L-glutamine (Gibco BRL 25030-081). The plates were

incubated at 37° C in a CO₂ incubator approximately 16 to 24 hours until the cells are between 50 and 80% confluent. For each transfection, 1µg of DNA was diluted into 100 µL of OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco BRL 18324-012) and 10 µL of Lipofectamine reagent (Gibco BRL 18324-012) was added to 100 µL of OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (OPTI-MEM RSM). The two solutions were mixed gently and incubated at room temperature for 30 minutes to allow the DNA-liposome complexes to form. During this time, the ED cell cultures were rinsed once with 2 mL of OPTIMEM I RSM (GIBCO-BRL). For each transfection, 0.8 mL of OPTI-MEM I RSM was added to the tube containing the DNA-liposome complexes, the tube was mixed gently and the contents were overlaid onto the rinsed cells. No antibiotics were added during transfection. The DNA-liposome/tissue cultures were incubated for 5 hours at 37°C in a CO₂ incubator. Following incubation, 1 mL of complete growth MEM containing twice the normal concentration of serum was added to the cell culture without removing the transfection mixture. Twenty four hours following the start of transfection the medium was replaced with fresh complete growth medium (EMEM). Starting at 48 to 72 hours post transfection, aliquots of the tissue culture supernatants were taken at periodic intervals and analyzed by using a standard reverse transcriptase (RT) assay as a measure of virus production. Supernatants resulting in RT activity were titrated in an infectivity assay based on cell-ELISA readings as described by Lichtenstein et al, 1995. Neither the Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo nor the proviral construct pCMV.Vis2.neo replicated in tissue culture. The RT levels were less than or equal to those of the negative control in tissue culture cells normally capable of being infected with EIAV, that were exposed to the culture medium from the transfected cells. Therefore, it was determined that the deletion of p28 produced a defective virus particle, unable to replicate *in vitro* or *in vivo*. In order to obtain particles for large-scale vaccine production, it was decided to produce a

persistently-infected cell line with the Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo and proviral construct pCMV.Vis2.neo.

Transfection of COS cells

- 5 Virus particles were produced using Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo and the proviral construct pCMV.Vis2.neo transfected in the monkey cell line COS-1 (ATCC_CRL 1650). Cells were plated at approximately 50% confluency into 60mm plates (Falcon) 24 hours prior to transfection. Approximately 1μg of proviral clone DNA (pCMV.ΔCA.neo or
- 10 pCMV.Vis2.neo) was transfected into the cells using DEAE Dextran methodology. Briefly, a 50mg/ml solution of DEAE dextran was diluted 1:50 (1mg/ml final concentration) in Tris-buffered saline (TBS) with DNA and added to the cells in serum-free media (DMEM). The DNA solution was incubated on the cells for 1 hour at 37°C in the presence of 5% CO₂
- 15 with rocking every 15 minutes. Regular growth medium was replaced at this point. Forty-eight hours post-transfection the supernatants were assayed for RT activity. The RT activity was detected in cell-free supernatant samples using the micro reverse transcriptase assay (Lichtenstein et al., *ibid*). Protein content was detected using a Western
- 20 Blot Analysis procedure. For this procedure, virus particles were pelleted from 10mls of cell-free supernatant over a 20% glycerol cushion in an ultracentrifuge (Beckman SW41Ti rotor) at 50,000 x g for 45 min. Pellets were lysed in 100μl of lysis solution containing 10mM NaCl, 1% Deoxycholic acid (DOC), 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 25mM
- 25 Tris-HCl and 1% TritonX-100 and transferred to 1.5ml eppendorf tubes. After lysis, the samples were boiled in 20μl of 6X SDS gel loading buffer and loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. Gradient purified EIAP_{py} (1μg) was also loaded onto the gel to serve as a marker for viral proteins. Electrophoresis was carried out at approximately 10mA overnight with
- 30 cooling. Proteins were transferred onto Millipore membranes using BioRad's protein transfer cell system in a buffer containing 25mM Tris,

WO 02/20049

- 30 -

PCT/US01/27599

192mM glycine, 20% methanol and 0.05% SDS. Transfer was completed after 3 hours at 400mA with cooling. EIAV proteins were detected using monoclonal antibodies. Prior to antibody incubation the blot was blocked in 5% blotto (5% drymilk, 5% FBS and 0.25% Tween-20 in 1X PBS) for 1 hour at room temperature. Mouse monoclonal α -gp90 and α -p26 were used together in 5% blotto for 1 hour at room temperature. Secondary antibody α -mouse IgG conjugated with horse-radish-peroxidase (Sigma lot # 115H8995) was incubated at room temperature for one hour. The blot was washed for 3-5 minute periods in 1XPBS/0.025% Tween-20 between primary and secondary antibody incubations. A one minute incubation at room temperature of the chemi-illuminiscent substrate SuperSignal (Pierce lot #AE40027) followed the final wash after the secondary antibody incubation. Exposure of the blot to film demonstrated that both gp90 and p26 were detectable in the EIAV_{pv} positive control; but only gp90 was detectable in the proviral clone pCMV. Δ CA.neo and the proviral construct pCMV.Vis2.neo. Production of the virus particles was observed through both RT activity and by Western Blot analysis.

Stable Transfections in CHO, C-33A & ED-MCS Cell Lines

Stable production of virus particles was attempted in three cell lines; a human cell line C-33A (ATCC HTB-31), a chinese hamster ovary cell, CHO (ATCC CRL-9618), and an equine cell line ED-MCS. Transfections were all done in duplicate. Cells were consistently maintained in an incubator at 37°C with 5%CO₂. Cell lines were seeded onto 10mm plates manufactured by Sarstedt and Falcon 24 hours prior to transfection at the following densities: CHO & C-33A 1X 10⁶ cells/plate, ED-MCS 3.5 X 10⁵ cells/plate. Proviral clones, pCMV.Vis2.neo and pCMV. Δ CA.neo (20 μ g/plate) were transfected into the cells using 55 μ l of the reagent GenePORTER™ (Gene Therapy Systems) in serum-free DMEM (Gibco). Manufacturers' instructions were followed. Twenty-four hours post-transfection media was changed from transfection media to

WO 02/20049

- 31 -

PCT/US01/27599

selection media (DMEM) which contained 800g/ml G-418 (Geneticin, Gibco BRL) and 10% FBS (Hyclone). A plate that was not transfected was carried as a control for selection in the same media. Once the control plate had no viable cells present and the selected plates displayed colony formation, cells were passed into T75 flasks (Falcon) as bulk cultures. The level of G-418 in the ED-MCS cells was increased to 1000µg/ml due to rapid growth. Supernatants were analyzed throughout the selection period for RT activity and at individual points assayed for protein content through Western blot analysis. RT activity initially indicated highest production in the human and mouse cell lines. The equine dermal cell line proved to develop the most stable construct during long-term production, producing continuously the highest levels out to post-selection day 150. This experiment proved that tissue culture cells can be transfected by the p26-deleted clone as well as by the chimera wherein a foreign gene from a Visna virus (p30) was inserted into the p26 region. Reverse transcriptase activity from these transfected cells reached levels as high as 10,000 CPM/10µl of tissue culture fluid. This is equivalent to RT activity produced by wild-type EIAV when transfected into tissue culture. Western Blot analysis was conducted as described previously except that a second western blot was done in the same format as before, re-probing the membrane with goat α-Visna p30 to detect the Visna chimera proteins. Secondary antibody was α-goat IgG whole molecule-HRP (Sigma lot# 117H4831). The Visna p30 protein was detected in the Visna chimeric proviral construct pCMV.Vis2.neo (See Figure 10b).

Western Blot Analysis

Virus particles were pelleted from 10mls of cell-free supernatant over a 20% glycerol cushion in the ultracentrifuge SW41Ti rotor (Beckman). Pellets were lysed in 100µl of lysis solution containing 10mM sodium chloride (NaCl), 1% DOC, 0.1% Sodium Dodecyl Sulafte (SDS), 25mM Tris-HCl and 1% TritonX-100 and transferred to 1.5ml eppendorf

WO 02/20049

- 32 -

PCT/US01/27599

tubes. After lysis, the samples were boiled in 20 μ l of 6X SDS buffer gel loading buffer and loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. One microgram of gradient purified pony virus EIAV_{PV} was also loaded onto the gel to serve as a marker for viral proteins. Electrophoresis was carried out at approximately 10mA overnight with cooling. Proteins were transferred onto Millipore membranes using BioRad's protein transfer cell system in a buffer containing 25mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol and 0.05% SDS. Transfer was completed after 3 hours at 400mA with cooling. EIAV proteins were detected using monoclonal antibodies. Prior to antibody incubation the blot was blocked in 5% blotto (5% drymilk, 5% FBS and 0.25% Tween-20 in 1X PBS) for 1 hour at room temperature. Mouse monoclonal α -gp90 and α -p26 were used together in 5% blotto for 1 hour at room temperature. Secondary antibody -mouse IgG conjugated with horse-radish-peroxidase (Sigma lot # 115H8995) was incubated at room temperature for one hour. The blot was washed for 3-5 minute periods in 1XPBS/0.025% Tween-20 between primary and secondary antibody incubations. A one minute incubation at room temperature of the chemiluminescent substrate SuperSignal (Pierce lot #AE40027) followed the final wash after the secondary antibody incubation. Exposure of the blot to film demonstrated that both gp90 and p26 were detectable in the PV positive control; but only gp90 was detectable in the proviral clones (pCMV.Vis2.neo and pCMV. Δ CA.neo) as noted in FIGURE 10a. The membranes were stripped through incubation in Glycine-Cl pH 2.3 buffer (0.05M glycine 0.15M NaCl) for 45 minutes. The membranes were washed in the same wash buffer for 7-5 minute periods and blocked in 5% blotto for 2 hours. The second western was done in the same format as before, re-probing the membrane with goat α -Visna p30 to detect the Visna chimera proteins. Secondary antibody was α -goat IgG whole molecule-HRP (Sigma lot# 117H4831). The Visna p30 protein was detected in the Visna chimeric proviral constructs (pCMV.Vis2.neo) see Figure 10b.

The presence of gp90 indicates that these p26-deleted constructs produce the protective antigen. The fact that the chimera (pCMV.Vis2.neo) also produces the Visna p30 antigen confirms that vaccines prepared from the latter can be defined as Marker vaccines.

- 5 Not only do they lack the ability to produce p26 antibodies in animals but they also cause the animals vaccinated with them to produce antibodies to p30. The presence of p30 in an equine will indicate that the horse has been vaccinated. An assay to detect the presence of this p30 antibody can be developed in order to differentiate horses that are vaccinated with
- 10 the vaccines of this invention from horses that have not been vaccinated or horses that have been infected with wild-type EIAV. Additionally, a diagnostic that detects all or part of the p30 gene sequence or the p30 protein can be used similarly as a diagnostic tool.

15 EXAMPLE 4

Subcloning - Single Cell Cloning of the Stable Transfection:

- Stably-selected Visna (pCMV.Vis2.neo) transfected ED-MCS cells which had been frozen back at day 40 of selection were thawed at 37°C and seeded into a T75 flask in normal growth medium (no G-418). Cells
- 20 were grown at 37°C with 5% CO₂ in G-418-negative medium for 48-hours prior to plating for cloning. Cells were trypsonized from the T75 flasks, counted, and plated onto 100mm Falcon plates at densities of approximately 100 cells per plate. The cells were selected in medium containing 800µg/ml G-418. Media was changed approximately every four
- 25 days and cells were grown in the plates until visible colonies had formed. Independent colonies were trypsonized from the plates separately through the use of cloning cylinders and seeded into separate cells of Falcon 24-well plates. These were also selected in media containing 800µg/ml G-418. Approximately 7 days post-transfer the cell supernatants were
- 30 assayed for RT activity. The was conducted as follows:

WO 02/20049

- 34 -

PCT/US01/27599

For each 10 μ l sample of cell-free supernatant to be assayed the following is added:

- | | | |
|----|---|------------------------------|
| | 3 H-TTP (40Ci/mmol) | 1.5 μ l |
| 5 | -dried in speedvac and volume made up with the volume of water below | |
| | 100mM EGTA | 5.0 μ l |
| | 10X Salts | 5.0 μ l |
| | (2M Tris-Cl pH 8.0, 2M KCl, 1M MgCl ₂ , 1M DTT, 20% NP-40, DI Water) | |
| 10 | poly(rA).p(dT) ₁₂₋₁₃ | 2.0 μ l |
| | (5 units/ml ~ .25mg/ml) | |
| | millipore water | <u>38.0μl</u> |
| | | 50.0 μ l |
| 15 | The mixture of supernatant (sample) and reaction mixture are mixed together and incubated at 37°C for 1.5hr-2.0hr. The total volume is (~60 μ l) pipetted onto DEAE coated filter paper and allowed to dry completely. The filters are then washed 3X for 15 minute each in 1X SSC and again | |
| 20 | allowed to dry completely. The filters are then immersed in scintillation fluid and the incorporated activity measured. As a result of using this RT assay, the 12 "subclones" with the highest RT activity were trypsonized and passaged into 6-well plates (Falcon), still selecting in 800 μ g/ml G-418. Supernatants were analyzed for RT activity after 4 days of selection in the | |
| 25 | 6-well plates. The 8 subclones with the highest RT activity were trypsonized and passaged into T75 flasks (Falcon) still selecting in 800 μ g/ml G-418. Supernatants were analyzed for RT activity after 7 days of selection in the flasks. The amount of G-418 was reduced at this passage point to 600 μ g/ml. Selection was carried out for 4 more days, RT | |
| 30 | activity analyzed, and the level of G-418 lowered again to 400 μ g/ml. After 7 days of selection another RT assay was performed on the 8 subclones | |

to monitor selection. Following 7 more days of selection, another RT assay was performed. The 4 highest producing cell lines were passaged again, lowering the level of G-418 to 200µg/ml (the other 4 were frozen back). The highest-producing subclone, F-1V2.23 (also designated 5 V2.23), was producing a high level of RT activity (between 4000 and 50,000 CPM per 10µl of tissues culture fluid as shown in Figure 11. Figure 12 shows an electron micrograph of this subclone of ED MCS cells transfected with the pCMV.vis2.neo Proviral Construct producing virus-like particles. The top EM demonstrates a released virus-like particle whereas 10 the bottom EM shows the virus-like particle budding from the cells. This result indicates that the constructs of this invention produce virus-like particles that bud from a cell and appear like a typical lentivirus. This coupled with the fact that the virus-like particles have RT activity, express gp90, express gp30 and do not express p26 indicates that a commercially- 15 viable EIAV vaccine can be produced and is expected to protect equids from disease and/or infection.

The fact that the constructs of this invention were able to demonstrate the presence of the EIAV gp90 protective component, displayed significant EIAV RT activity and appeared typical of lentiviruses 20 via electron microscopy (budding and physical appearance) provides assurance that a vaccine prepared according to this invention would be useful in protecting animals from disease and/or infection from lentiviruses, particularly from disease and infection caused by EIAV. Additionally, it has been demonstrated that said vaccine lacks the ability to 25 stimulate antibodies to p26 and that it would produce antibodies to p30 so that vaccinated animals can be differentiated from infected or nonexposed animals. Most importantly, the insertion of a foreign gene into the EIAV genome such that said foreign gene is expressed indicates the usefulness of this lentivirus as a vector or as a virus construct into which multiple 30 genes could be inserted. Such a multiple gene insertion could provide for an EIA vaccine that protects from multiple diseases.

Although the invention has been described in detail in the foregoing, for the purpose of illustration it is to be understood that such detail is solely for that purpose and that variations can be made therein by those skilled in the art without departing from the spirit and scope of the
5 invention except as it may be limited by the claim.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A vaccine that produces protection from disease and/or infection caused by a lentivirus comprising a lentivirus chimera which lacks the ability to replicate *in vivo*.
- 5 2. The vaccine of Claim 1 wherein the lack of ability to replicate *in vivo* results from a gene deletion in the lentivirus.
3. The vaccine according to Claim 1 wherein said lentivirus is selected from the group consisting of equine infectious anemia virus (EIAV), human immunodeficiency virus (HIV), feline immunodeficiency virus (FIV), bovine immunodeficiency virus (BIV) or simian
10 immunodeficiency virus (SIV).
4. The vaccine according to Claim 2, wherein said gene-deletion is within one or more genes blocking expression of a Capsid Antigen.
- 15 5. The vaccine according to Claim 4 wherein the gene-deletion is of a member selected from the group consisting of a portion of the *gag* gene, all of the *gag* gene and a gene regulating expression of the *gag* gene.
6. The vaccine according to Claim 1 wherein said lentivirus
20 chimera further lacks the ability to replicate *in vitro*.
7. The vaccine according to Claim 1 wherein said the lentivirus chimera is produced in large quantities by transfecting a cell line.
8. The vaccine according to Claim 1, wherein the lentivirus chimera safely immunizes mammals against disease and/or infection
25 caused by the lentivirus and further allows differentiation between vaccinated, non-vaccinated and wild-type exposed mammals.
9. The vaccine according to Claim 1 wherein lentivirus chimera is derived from EIAV, which safely immunizes an equid against disease and/or infection caused EIAV and wherein the vaccine allows
30 differentiation between vaccinated, non-vaccinated and wild-type exposed equids.

WO 02/20049

- 38 -

PCT/US01/27599

10. The vaccine according to Claim 9 wherein the chimera is derived from EIAV that lacks the ability to express the p26 antigen.
11. The vaccine of Claim 10 wherein the lack of ability to express the p26 results from a deletion in the gag gene.
- 5 12. The vaccine according to Claim 11 wherein the gene-deletion is of a member selected from the group consisting of a portion of the gag gene, all of the gag gene and a gene regulating expression of the gag gene.
13. The vaccine of Claim 9 further comprising an adjuvant.
- 10 14. The vaccine according to Claim 9 wherein the EIAV is inactivated.
15. The vaccine according to Claim 9 comprising an inactivated EIAV and an adjuvant.
16. The vaccine according to Claim 9 wherein the EIAV lentivirus chimera comprises a deletion in the gag gene of EIAV and further comprises an insertion of another lentivirus gag gene in the deleted region.
- 15 17. The vaccine according to Claim 16 wherein the inserted gene is derived from a Visna virus which expresses p30.
- 20 18. A vaccine for protecting horses from disease and/or infection caused by EIAV comprising a gene-deleted EIAV marker vaccine in which a foreign gene is inserted into the gene-deleted region, said inserted gene providing a diagnostic tool for use in vaccinated mammals and wherein antibodies to the deleted gene are found in horses exposed to wild-type EIAV.
- 25 19. A diagnostic test to detect the foreign gene inserted into the gene-deleted region of Claim 18.
20. A diagnostic test to detect antibodies to a product produced by the foreign gene inserted into the gene-deleted region of Claim 16.
- 30 21. An EIAV vaccine that allows equines to be safely vaccinated and protected from disease and/or infection without converting to a seropositive status on the Coggins Test or any other test which measures

p26 antibodies.

22. A vaccine for effectively and safely immunizing equines from EIAV, said vaccine comprising a gene-deleted EIAV wherein said gene-deleted EIAV lacks the ability to express p26 and can be used to differentiate vaccinated from non-vaccinated or infected equines and protects against a disease caused by a non-EIAV organism.
23. A vaccine for protecting horses from a disease and/or infection caused by an organism comprising EIAV said vaccine containing a gene-deleted EIAV in which a foreign gene is inserted in a region for the gene-deletion wherein the inserted gene provides a marker and/or protection from a disease caused by a non-EIAV organism
24. A method of immunizing mammals against disease produced by an EIAV comprising, administering to said mammals the vaccine of Claim 1 further comprising an adjuvant.
25. A method of preparing a lentivirus vaccine comprising:
- 1) deleting all or a portion of the gag gene from the lentivirus to provide a deleted region,
 - 2) inserting all or portion of a gag gene from a different lentivirus into the resulting deleted region to produce a chimera,
 - 3) transfecting a tissue culture with the resulting chimera to produce a transfected cell culture,
 - 4) growing the transfected cell culture,
 - 5) harvesting the transfected cell culture,
 - 6) optionally inactivating the harvested cell culture, and
 - 7) optionally adjuvanting the harvested cell culture.
26. The method of Claim 25 wherein lentivirus from which all or a portion of the gag gene is deleted is EIAV.
27. The method of Claim 25 wherein the different lentivirus is a Visna virus.

Figure 1 Schematic representation of EIA virus EIAV_{UK}

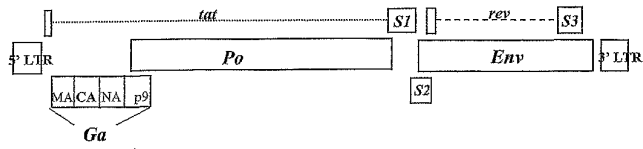


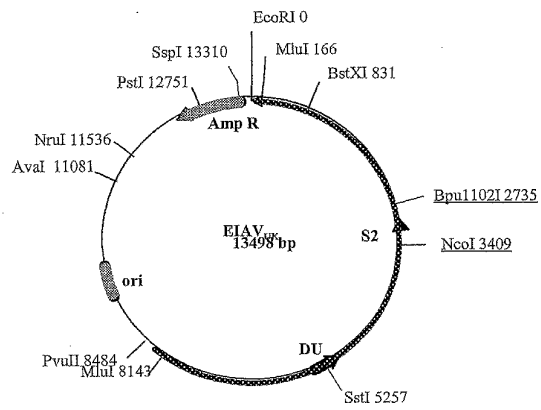
Figure 2 Circular Map of Infectious Clone EIAV_{UK}

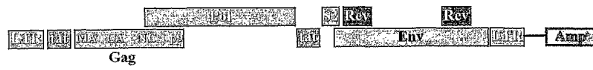
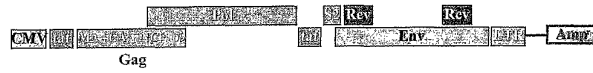
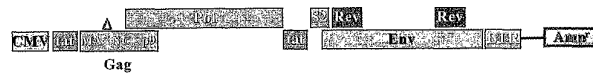
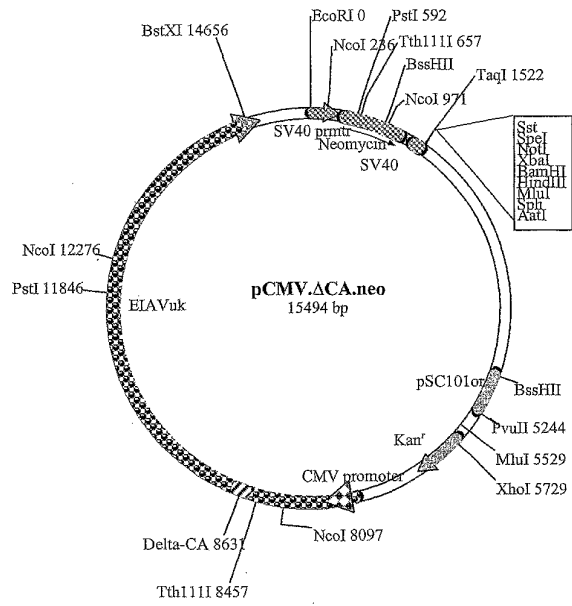
Figure 3a Linear Schematic of the Molecular Clone EIAV_{UK}Figure 3b Linear Schematic of Molecular Clone EIAV_{UK} with the CMV PromoterFigure 3c Linear Schematic of Molecular Clone EIAV_{UK} with the CA gene deletedFigure 3d Linear Schematic of Molecular Clone EIAV_{UK} with the Amp Resistance Gene Replaced by the Kanamycin Resistance Gene

Figure 3e Linear Schematic of the p26 Deleted Proviral Clone pCMV.ΔCA.neo



Figure 4 pCMV.ΔCA.neo -- 15494 bp

WO 02/20049

5/14

PCT/US01/27599

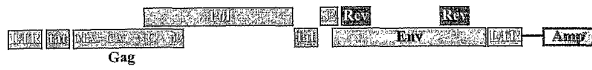
Figure 5a Linear Schematic Representation of ELAV_{UK}Figure 5b Linear Schematic Representation of the ELAV_{UK} clone with the CMV promoter insert (CMVELAV_{UK})Figure 5c Linear Schematic Representation of the CMVELAV_{UK}.vis2.

Figure 5d Linear Schematic Representation of the Proviral Clone containing the Kanamycin Resistance Marker.

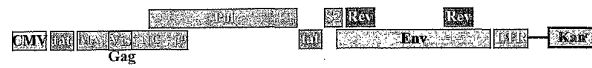


Figure 5e Linear Schematic Representation of the final pCMV.Vis2.neo Proviral Construct

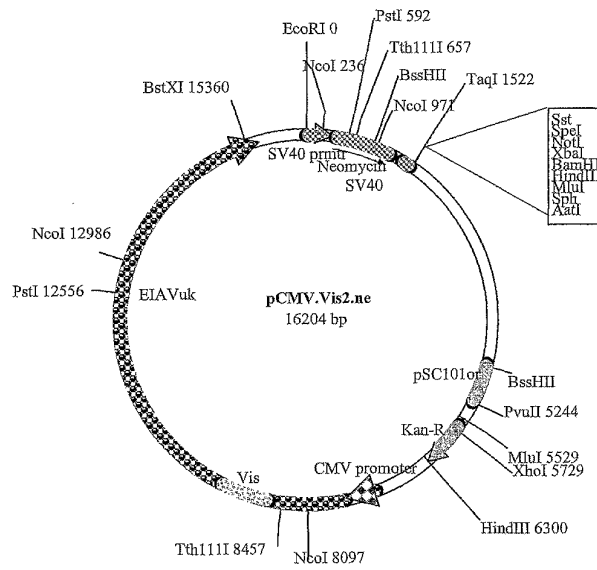


WO 02/20049

6/14

PCT/US01/27599

Figure 6 Circular map of the final pCMV.Vis2.neo Proviral Construct.



WO 02/20049

7/14

PCT/US01/27599

Figure 7 Nucleotide and Amino Acid Map of the Capsid Antigen Gene/EIA Virus p26 Protein

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
CCAAATCATGATAGATGGGGCTGGAACAGAAATTTAGACCTCTAACACCTAGAGGATATACTACTTGGGTGAATACC
P I M I D G A G N R N F R P L T F R G Y T T W V N T

      80      90      100     110     120     130     140     150
      |      |      |      |      |      |      |      |
ATACAGACAAATGGTCTATTAAATGAAGCTAGTCAAAACTTATTGGGATATTATCAGTAGACTGTACTTCTGAAGAA
I Q T N G L L N E A S Q N L F G I L S V D C T S E E

      160     170     180     190     200     210     220     230
      |      |      |      |      |      |      |      |
ATGAATGCATTTTGGATGTGGTACCTGGCCAGGCAGGACAAAAGCAGATATTACTTGATGCAATTGATAAGATAGCA
M N A F L D V V P G Q A G Q K Q I L L D A I D K I A

      240     250     260     270     280     290     300     310
      |      |      |      |      |      |      |      |
GATGATTGGGATATAGACATCCATTACCGAATGCTCCACTGGTGGCACCACCACAAGGCGCTATTCCCATGACAGCA
D D W D N R H P L P N A P L V A P P Q G P I P M T A

      320     330     340     350     360     370     380     390
      |      |      |      |      |      |      |      |
AGGTTTATTAGAGGTTTAGGAGTACCTAGAGAAAGACAGATGGAGCCTGCTTTTGATCAGTTTAGGCAGACATATAGA
R F I R G L G V P R E R Q M E P A F D Q F R Q T Y R

      400     410     420     430     440     450     460
      |      |      |      |      |      |      |
CAATGGGATATAGAGCCATGTGAGAAGGCATCAAAGTGATGATTGGAAACCTAAAGCTCAAAATATTAGGCAAGGA
Q W I I E A M S E G I K V M I G K P K A Q N I R Q G

      470     480     490     500     510     520     530     540
      |      |      |      |      |      |      |      |
GCTAAGGAACCTTACCAGAAATTTGTAGACAGACTATTATCCAAATAAAAGTGAGGACATCCACAAGGATTTCA
A K E P Y P E F V D R L L S Q I K S E G H P Q E I S

      550     560     570     580     590     600     610     620
      |      |      |      |      |      |      |      |
AAATTTCTGACTGATACACTGACTATTCAGAACCCAAATGAGGAAATGTAGAAATGCTATGAGACATTTAAGACCAGAG
K F L T D T L T I Q N A N H E C R N A M R H L R P E

      630     640     650     660     670     680
      |      |      |      |      |      |
GATACATTAGAAGAGAAAATGTATGCTTGCAGAGACATGGAACTACAAAACAAAAGATGATGTT
D T L E E K M Y A C R D I G T T K Q K M M L

```

WO 02/20049

8/14

PCT/US01/27599

Figure 8 Nucleotide and Amino Acid Map of the CA gene/Visna Virus p30

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
CCTATTGTGAATTTGCAAGCAGGAGGGAGAAGTTGGAAGCGGTAGAGTCAGTAGTCTTCCAGCAACTGCAAAACAGTG
P I V N L Q A G G R S W K A V E S V V F Q Q L Q T V

      80      90      100     110     120     130     140     150
      |      |      |      |      |      |      |      |
GCAATGCAGCATGGACTTGTGTCGAGGATTTGAGAGGCAATTGGCATATTATGCTACTACCTGGAAGTAGTAAGAT
A M Q H G L V S E D F E R Q L A Y Y A T T W T S K D

      160     170     180     190     200     210     220     230
      |      |      |      |      |      |      |      |
ATATTAGAAGTATTGCTATGATGCTGGGAATGAGACACAGAAGGAATTAATCAAGGAAATTAATGAAGAAGCA
I L E V L A M M P G N R A Q K E L I Q G K L N E E A

      240     250     260     270     280     290     300     310
      |      |      |      |      |      |      |      |
GAAAGGTGGGTAAGACAAAATCCACCGGGCCGAATGTCCTCACGGTGGATCAAATAATGGGAGTGGGACAAACCAAT
B R W V R Q N P P G P N V L T V D Q I M G V G Q T N

      320     330     340     350     360     370     380     390
      |      |      |      |      |      |      |      |
CAGCAGGCATCTCAAGCCAATATGGATCAGGCAAGACAGATATGCCTGCAGTGGGTAATAACAGCGTTAAGATCAGTG
Q Q A S Q A N M D Q A R Q I C L Q W V I T A L R S V

      400     410     420     430     440     450     460
      |      |      |      |      |      |      |
AGGCATATGTCACATAGACCAGGAAACCTATGTTAGTGAAGCAGAAGAATACTGAGAGTTATGAAGACTTCATAGCT
R H M S H R F G N P M L V K Q K N T E S Y E D F I A

      470     480     490     500     510     520     530     540
      |      |      |      |      |      |      |      |
CGCCTACTAGAGGCTATTGATGCGGAACCAAGTACCGACCTATAAAACATATTAAAGTAACATTGTATATACA
R L L E A I D A E P V T D P I K T Y L K V T L S Y T

      550     560     570     580     590     600     610     620
      |      |      |      |      |      |      |      |
AATGCTAGCACAGACTGTCAAAGCAGATGGATAGGACATTGGGACGAGGGTTCAACAAGCAACGGTAGAAGAAAAG
N A S T D C Q K Q M D R T L G T R V Q Q A T V E E K

      630     640     650     660     670
      |      |      |      |      |
ATGCAAGCATGTCGAGATGTGGGATCCGAAGGATTTAAGATGCAATTA
M Q A C R D V G S E G F K M Q L

```

WO 02/20049

9/14

PCT/US01/27599

Figure 9 Comparison of the Homology Between p26 of EIAV and p30 of Visna

TOP=Visna p30

BOTTOM= EIAV p26

. Denotes similarities in sequence homology

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
OCTATGTGA-ATTTCACAGCAGGAGGGAGAGTGGAGGCGGTAGATC-ACATAGTCTTCCAGCACTGCRAACAGTGGCAATGCGAGATGACT
.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
CCAATCATGATAGTG-GGCTGGAACAGAAATTTAGACCTCTAACACCTAGAGGATATACACTTGGGTGANTACCAATACAGACAA-ATGGTCTC
      10      20      30      40      50      60      70      80      90

      100     110     120     130     140     150     160     170     180     190
TGTGTCCGAGGATT-TTGAGAGGCAATTGGCATATTAATGCTACTACTGGGACTAGTAAGATATATTAGAAGTATTGGCTATGATGCCCTGGGAATAG
.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
ATTAAATGAAGCTAGTCAAACTTATTTGGGATATTAT-CAGTAGACTGTACTTCTGAAGAAATGAATGCATTTTGGATGTGGTACCTGGCCAGGC
      100     110     120     130     140     150     160     170     180     190

      200     210     220     230     240     250     260     270     280
AGCACAGAGGAATTAAATCAAGGAAATTAATGAGAGCAGAAAGGTGGTAAAGACAAATCCACCGGGCCGAAATGCTCAGCGTGGATCAA
.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
AGGACAAAGCAGATATTACTTGAATGCAATTTGATAGATAGCAGATGATTGGGATATAGACATCCATT---ACCGAATGCTCCACTGGTGGCAGCA
      200     210     220     230     240     250     260     270     280

      290     300     310     320     330     340     350     360     370     380
ATAATGGGAGTGGGACAAACCA-ATCAGCAGGCATCTCAGCCATATAGGATC--AGGCAGACAGATAT-GCCTGCAGTGGGT-AATAACAGCCYT
.. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..
CCACAAAGGSCCTATTCCCATGACAGCAGGTTTATAGAGGTTTAGGAGTACCTAGAGAAAGCAGATGGAGCCCTGCTTTGATCAGTTTAGGCAGGA
      290     300     310     320     330     340     350     360     370     380
```

WO 02/20049

10/14

PCT/US01/27599

Figure 9 Cont'd

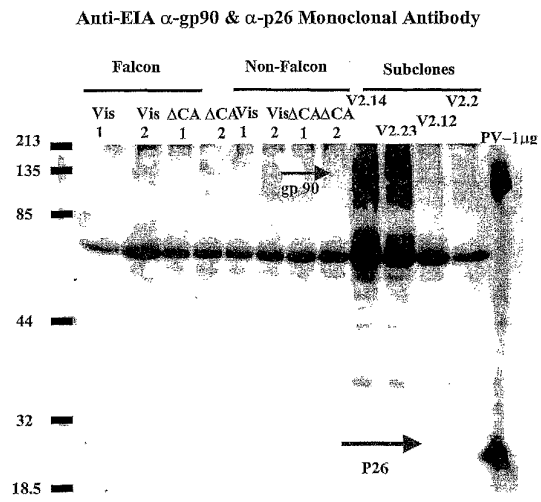
390 400 410 420 430 440 450 460 470
AAGATCAGTGGGCGATA-TGTACATAGACGAGGAAACCTATGTTAGTGA--AGCAGA---AGAATACTGAGAGTTATG-AAGACTTCATAGCTCG
* * * * *
CATATAGCAATGATATATAGAGCCATGTCAGAGGCGTCAAGTGATGATTGGAAACCTAAGCTCAAAATATTAGGCAAGAGCTAAGGAACC
390 400 410 420 430 440 450 460 470

480 490 500 510 520 530 540 550 560
CCTACTAGAGGCTATTGATCGGAAACCACTGACCGGACCTATA-AAAACATATTAAAGTAACTTGTCAATACAAATGCTAGCACAGACTGT-C
* * * * *
TACCCAGAAATTGTAGACAGACTATTA-TCCCAATAAAGTGAAGGACCTCCACAGAGATTTCAGAAATCTTACTGTGA-CACTGACTATTC
480 490 500 510 520 530 540 550 560 570

570 580 590 600 610 620 630 640 650
AATA-GCAGATGATAGGACATTGGGG--ACGAGG-GTTCACCA---AGCA-ACGATAGAGAAAGATGCAATGTCAGATGTTGGATCGA
* * * * *
AGAACCCATATGAGGAATGTAGAAAGCTATGAGACATTAAAGCCAGAGGATACATTAGAGAGAGAAATGTATGCTTGCAGAGACATTGGAACCTAC
570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670

660 670
AGGATTAGAGATGCAATTA
* * * * *
AATAAAGATGATGTT-
680

Figure 10a Western Blot of EIA Virus Constructs

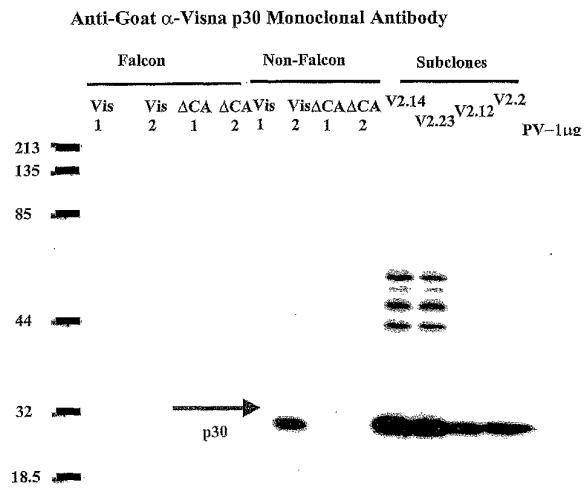


WO 02/20049

12/14

PCT/US01/27599

Figure 10b Western Blot of EIA Virus Constructs



WO 02/20049

13/14

PCT/US01/27599

Figure 11 Reverse Transcriptase Activity of Subclones of Tissue Culture Cells Transfected with pCMV.Vis2.neo Proviral Construct

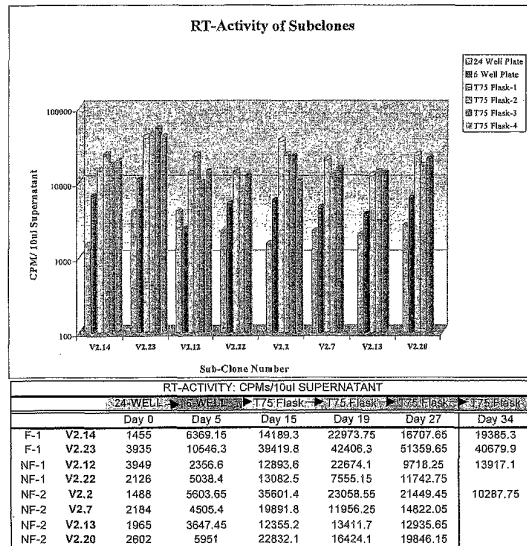
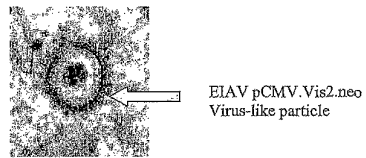


Figure 12 Chimeric Virus-Like Particles from V2.23 Cell Line**Budding from the ED MCS cells:**

WO 02/20049

PCT/US01/27599

SEQUENCE LISTING

<110> MONTELARO, Ronald C.
CRAIGO, Jodi
ISSEL, Charles
PUFFER, Bridget
HENNESSEY, Kristina J.
BROWN, Karen K.

<120> EIAV CHIMERIC VACCINE AND DIAGNOSTIC

<130> MONTELARO'029

<140> PCT/US01/TO BE ASSIG
<141> 2001-09-06

<150> USSN 09/659,029
<151> 2000-09-09

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> GIBCO

<400> 1
aatttcgata agccagttta gca

<210> 2
<211> 26
<212> DNA
<213> GIBCO

<400> 2
ctggcgcgcg atgtacgggc cagata

<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> GIBCO

<400> 3
ggcctttcta ataaatataa ttctctac

23

26

28

WO 02/20049

PCT/US01/27599

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> GIBCO

<400> 4
aggcctctct tccttgcct gacagcg

27

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> GIBCO

<400> 5
tggccagaac acaggaggac aggtaag

27

<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> GIBCO

<400> 6
gatattcttc agagggtca gactgcttt

29

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> GIBCO

<400> 7
cagactggtc ttgogggcc attta

25

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> GIBCO

<400> 8
gatcctctac ttgatccttc tcc

23

<210> 9

WO 02/20049

PCT/US01/27599

<211> 226

<212> DNA

<213> IN VITROGEN

<400> 9

```
ccaggcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa 60
gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaaagcatg catctcaatt agtcagcaac 120
catagtcccg cccctaactc cgcctatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc 180
tcgcccctat ggtgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgag 226
```

<210> 10

<211> 86

<212> DNA

<213> IN VITROGEN

<400> 10

```
gactaatttt tttttttat gcagaggccg aggcgcctc tgcctctgag ctattccaga 60
agtagtgagg aggccttttt ggaggc 86
```

<210> 11

<211> 131

<212> DNA

<213> IN VITROGEN

<400> 11

```
acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 60
ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggttgtc caaactcatc aatgtatott 120
atcatgtctg t 131
```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/020049 A3(51) International Patent Classification: **A61K 39/21**,
C12N 7/04, 15/49, C12Q 1/70, G01N 33/569 (74) Agent: **BLACKSTONE, William, M.**, Patent Depart-
ment, 405 State Street, Millsboro, DE 19986 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/27599

(22) International Filing Date:
6 September 2001 (06.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/659,029 9 September 2000 (09.09.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): **AKZO
NOBEL N.V.** [NL/NL], Velperweg 76, P.O. Box 186,
NL-6800 LS Arnhem (NL).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MONTELARO,
Ronald, C.** [US/US]; 127 Greenbriar Drive, Wexford, PA
15090 (US). **CRAIGO, Jodi** [US/US]; 12 Hillcrest Drive,
Pittsburgh, PA 15202 (US). **ISSEL, Charles** [US/US]; 725
Edgewater Drive, Lexington, KY 40502 (US). **PUFFER,
Bridget** [US/US]; 219 Strathmore Place, Corning, NY
14830 (US). **HENNESSEY, Kristina, J.** [US/US]; 5215
N.W. Bluff Drive, Parkville, MO 64152 (US). **BROWN,
Karen, K.** [US/US]; 5501 N.W. Foxhill Road, Parkville,
MO 64152 (US).**Published:**
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
3 July 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/020049 A3

(54) Title: **EAIV CHIMERIC VACCINE AND DIAGNOSTIC**

(57) Abstract: Disclosed herein is a lentivirus chimera vaccine and diagnostic and methods of making and using the same, which can be used safely and effectively to provide immunity to mammals from infection and/or disease caused by a lentivirus, such as equine infectious anemia virus (EIAV) and which vaccine allows differentiation between vaccinated and non-vaccinated, but exposed mammals particularly horses.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Initial Application No. PCT/US 01/27599
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/21 C12N7/04 C12N15/49 C12Q1/70 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 05292 A (ROVINSKI BENJAMIN ;CONNAUGHT LAB (CA); PERSSON ROY (CA); CAO SHI X) 22 February 1996 (1996-02-22)	1-3,6-8
Y	examples 1-5	9,13,24
X	VIGNE R ET AL: "PRECURSOR POLY PEPTIDES TO STRUCTURAL PROTEINS OF VISNA VIRUS" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 42, no. 3, 1982, pages 1046-1056, XP008014040 ISSN: 0022-538X abstract; figures 3,4	19,20
	-/--	
<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 claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 2003		Date of mailing of the international search report 18/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brouns, G

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/27599
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LU J ET AL: "DIFFERENTIAL TEST ON SERUM ANTIBODY FROM EIA HORSES WITH THAT FROM ATTENUATED EIA VACCINE IMMUNIZED HORSES" SCIENTIA AGRICULTURA SINICA, vol. 22, no. 6, 1989, pages 69-75, XP001148407 ISSN: 0578-1752 abstract	9,13,24
A	WO 99 32646 A (CARROLL MILES WILLIAM ;MITROPHANOUS KYRIACOS (GB); ROHLL JONATHAN) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document	1-27
A	WO 98 39463 A (UEBERLA KLAUS) 11 September 1998 (1998-09-11) page 6-7; claim 19; figure 1	1-3,6-8
P,A	WO 00 63387 A (CHEN GANG ;FAN XIUJUAN (CN); FENG YI (CN); JIA BIN (CN); SHAO YIMI) 26 October 2000 (2000-10-26) example 2	1-27
L	& EP 1 174 507 A (HARBIN VETERINARY RES INST CHI ;NAT CT FOR AIDS PREVENTION AND (CN) 23 January 2002 (2002-01-23) cited for language reasons	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No.

PCT/US 01/27599

107/00 02/27/99

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9605292	A	22-02-1996	US 5955342 A	21-09-1999
			AU 704309 B2	22-04-1999
			AU 3159995 A	07-03-1996
			CA 2197446 A1	22-02-1996
			WO 9605292 A1	22-02-1996
			EP 0778888 A1	18-06-1997
			JP 10503933 T	14-04-1998
			US 5866320 A	02-02-1999
			US 6518030 B1	11-02-2003
			US 6342228 B1	29-01-2002
			US 5889176 A	30-03-1999
			US 5879925 A	09-03-1999
			US 6025125 A	15-02-2000
WO 9932646	A	01-07-1999	AU 1773299 A	12-07-1999
			CA 2315269 A1	01-07-1999
			CN 1285000 T	21-02-2001
			EP 1042493 A1	11-10-2000
			GB 2356200 A ,B	16-05-2001
			WO 9932646 A1	01-07-1999
			GB 2334257 A ,B	18-08-1999
			GB 2345062 A ,B	28-06-2000
			JP 2002516065 T	04-06-2002
			US 6312683 B1	06-11-2001
WO 9839463	A	11-09-1998	AU 7332198 A	22-09-1998
			WO 9839463 A2	11-09-1998
			EP 0991771 A2	12-04-2000
			JP 2001513643 T	04-09-2001
			US 2002123471 A1	05-09-2002
WO 0063387	A	26-10-2000	CN 1271015 A	25-10-2000
			AU 3955400 A	02-11-2000
			WO 0063387 A1	26-10-2000
			EP 1174507 A1	23-01-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/53	M
// C 1 2 N 7/02	G 0 1 N 33/569	L
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 7/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,S I,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 モンテラーロ,ロナルド・シー
アメリカ合衆国、ペンシルバニア・15090、ウエクスフォード、グリーンブライアー・ドライブ・127

(72)発明者 クライゴー,ジヨディ
アメリカ合衆国、ペンシルバニア・15202、ピッツバーグ、ヒルクレスト・ドライブ・12

(72)発明者 イセル,チャールズ
アメリカ合衆国、ケンタッキー・40502、レキシントン、エツジウオーター・ドライブ・725

(72)発明者 パフアー,ブリジット
アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・14830、コーニング、ストラスモア・プレイス・219

(72)発明者 ヘネシー,クリスティーナ・ジェイ
アメリカ合衆国、ミズーリ・64152、パークビル、ノース・ウエスト・ブラフ・ドライブ・5215

(72)発明者 ブラウン,カレン・ケイ
アメリカ合衆国、ミズーリ・64152、パークビル、ノース・ウエスト・フォックスヒル・ロード・5501

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA02 DA02 EA02 FA20 GA11 HA20
4B065 AA97X AB01 AC20 BA01 BD13 CA45
4C085 AA03 AA04 BA65 BA69 CC01 CC03 CC04 CC05 CC08 DD01
DD02 DD03 DD23 DD33 DD35 DD42 DD43 DD62 EE06 GG02
GG03 GG04 GG06 GG08