



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4866/84

(51) Int.Cl.6

C 12 N 15/00
A 61 K 39/245
C 12 N 7/00

(22) Indleveringsdag: 11 okt 1984

(41) Alm. tilgængelig: 13 apr 1985

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 23 feb 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 12 okt 1983 NL 8303501

(73) Patenthaver: *CENTRAAL DIERGENEESKUNDIG INSTITUUT; Edelhertweg 15; 8200 AB Lelystad, NL

(72) Opfinder: Antonius Jozef Maria *Berns; NL, Arnold Leonard Jozef *Gielkens; NL

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard, Lehmann & Ree A/S

(54) Deletionsmutant af et herpesvirus og vaccine indeholdende dette virus

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

4866-84

Levende deletionsmutanter af pseudorabies virus. Mutanternes genomer er forskellige fra den oprindelige stammes genomer ved at indeholde en eller flere deletioner valgt blandt en deletion i de spejlvendte gentagelser, en deletion i den særlige rækkefølge samt en deletion i thymidin-genasegenet.

Vaccine indeholdende ovennævnte mutante stammer.

Mutanterne er avirulente, inducerer ikke latente infektioner og udviser gode immunogene egenskaber.

Opfindelsen angår en levende deletionsmutant af et herpesvirus, specielt et virus, der stammer fra Pseudorabies-virus (PRV), også betegnet Aujeszky's syge-virus (ADV). Pseudorabies er en sygdom hos alle husdyr, bortset
5 fra hesten, og forårsager betydelige tab specielt blandt svin og kvæg. Svinet er den naturlige vært for herpesviruset fra Aujeszky's syge. Dyrene inficeres via den nasale vej og efter en primær virusopformering i slimhinderne i de øvre luftveje og fordøjelseskanalen, spreder viruset
10 sig til hjernen. Infektionen skrider fremad akut til subklinisk, hovedsagelig afhængigt af virusets virulens og svinenes alder. Pseudorabies-virus giver som andre herpesvira latente infektioner, specielt i nervevævene.

15 Man udfører vaccinationer for i nogen grad at begrænse de økonomiske tab på grund af dødsfald blandt dyrene og hæmning af væksten. Til dette formål forefindes vacciner, der er baseret henholdsvis på svækket levende virus og på inaktiveret virus. Vaccinerne baseret på svækket levende
20 virus er enklere at fremstille og derfor billigere end de vacciner, der er baseret på inaktiveret virus. Yderligere har de vacciner, der indeholder svækket levende virus den fordel, at de også kan anvendes intranasalt. Intranasal podning bevirker en bedre beskyttelse over for sygdommen
25 end parenteral vaccination med svækket levende virus eller med inaktiveret virus.

Svækkede levende virusvacciner, der for øjeblikket anvendes, udviser forskellige ulemper:

30

- 1) De fremstilles sædvanligvis ved rækkefortyndinger af virulente eller mildt virulente stammer i vævskultur (50-900 passager). Dette frembringer ukontrollerede mutationer i det virale genom.

35

- 2) De fleste præparater af kommercielle vacciner er ikke homogene. Vaccinerne indeholder nemlig et vist antal virusvarianter, hvis virulens eller vaccinationsevne ikke er veldefineret.

5

- 3) Der er fare for tilbagevenden til virulens.

- 4) Der er risiko for indførelse af latente infektioner.

10 Genomstrukturen af DNA'en hos Pseudorabies-virus (PRV) er beskrevet i litteraturen (Virology 97 (1979) side 151-163). På basis af arrangementet af de gentagne sekvenser hører PRV til gruppen af D-herpesvira. De indeholder et
15 te gentagelser og to unikke sekvenser, betegnet U_2 og U_1 . Viruset forekommer i to isomere former, der begge er infektiose. For at få et indblik i genomets struktur og i variabiliteten mellem de mange forekommende isolater blev
20 DNA'erne fra en række vaccinstammer og fra nogle af de omkring 100 uafhængige PRV-isolater, der er opnået i Holland og andre lande fra dyr, der led af sygdommen, sammenlignet ved hjælp af restriktionskortlægning. Denne analyse, der udførtes med et antal restriktionsenzymmer, viste følgende:

25

- a) De enkelte isolater udviser en høj grad af sekvenshomologi, dvs. en nick-translateret sonde fra viruset NIA-3 (Northern Ireland Aujeszky-3) anvendt som reference genkendte under strenge hybridiseringsbetingelser alle brudstykker af feltisolaterne.
30

- b) Strukturerne af de forskellige isolater viste en høj gensidig lighed. Almindeligvis er tilsvarende sekvenser lokaliseret i de samme områder.

35

- c) Visse regioner viser mere variabilitet end andre. F.eks. viste de overlappende fragmenter af omvendt gentagelse til unik sekvens en stærk heterogenitet.
- 5 d) Stammerne, der anvendtes i vaccinerne, indeholdt, selv om de mest var heterogene med hensyn til DNA'sammensætningen og dårligt definerbare, en deletion varierende fra 1000 til 4000 nucleotidpar i et tilsvarende restriktionsfragment.
- 10
- Opfindelsens formål er at modificere genomet af PRV på en sådan måde, at der opnås et virus, som er avirulent, ikke frembringer latent infektion, er genetisk stabilt og derfor ikke forøges i virulens efter dyrepassage, og har gode immunogene egenskaber.
- 15
- For at opnå dette blev genomet fragmenteret ved hjælp af restriktionsenzymmer, og fragmenterne blev adskilt under anvendelse af agarosegel-elektrophorese og glycerolha-
- 20 stighedsgradienter. Hefter blev de enkelte fraktioner undersøgt for biologisk aktivitet ved hjælp af transfektion i svinenyrecceller. Transfektion med intakt DNA gav anledning til virusproduktion fra 5-10 ng DNA pr. kulturflaske. Transfektion med kombinerede restriktionsfragmenter
- 25 gav i nogle tilfælde virus på ca. 50 ng pr. kulturflaske. Vira produceret af de inficerede celler blev karakteriseret. Det viste sig, at ved transfektion uden forudgående ligering skete der små deletioner omkring restriktionsstederne for det enzym, hvormed genomet var blevet fragmenteret. Som forventet tolereres en deletion kun ved et
- 30 begrænset antal steder.
- Ved hjælp af de ovenfor beskrevne analyser er der blevet defineret to områder af PRV-genomet, som tolererer deletioner. Vira, hvis genom udviser en eller flere af disse
- 35 deletioner, viser sig at være væsentlig mindre virulente

end udgangsviruset. De modificerede vira viser klart for-
andrede in-vitro vækstegenskaber. Infektionen skrider
langsommere frem, og den cytopatologiske virkning er
klart forskellig fra virkningen af de oprindelige stam-
5 mer. Også in-vivo viser deletionsmutanterne sig at opføre
sig helt anderledes. Efter intranasal inoculering viste
smågrise kun en lille temperaturforøgelse uden nogen som
helst yderligere kliniske fænomener. Under infektionen
kunne viruset atter isoleres fra spyttet.

10

Det viste sig yderligere, at tilstedeværelsen af et funk-
tionelt thymidinkinase-gen kan føre til uønsket latens af
viruset. Som følge heraf kan deletionsmutanterne ifølge
opfindelsen have en deletion i thymidinkinase-genet.

15

Opfindelsen angår en levende deletionsmutant af et her-
pesvirus opnået ved, at der ved hjælp af rekombinant-DNA-
teknikker i genomet af en virulent udgangsstamme, som be-
står af ca. 160 000 nucleotidpar og er karakteriseret ved
20 et restriktionskort, der er typisk for Pseudorabies-
virus-DNA, f.eks. ved restriktionskortet i fig. 1, hvori
rektanglerne repræsenterer omvendte gentagelser, og de
lodrette linier repræsenterer spaltningsstederne for re-
striktionsendonucleaseerne HindIII, KpnI, BamHI og BglII,
25 og som omfatter en lille unik sekvens U_s , som har et re-
striktionskort, der er typisk for den lille unikke se-
kvens af Pseudorabies-virus-DNA, f.eks. restriktionskor-
tet afbildet i fig. 2, hvori pilene repræsenterer spalt-
ningsstederne for restriktionsendonucleaseerne angivet i
30 fig. 2, er indført en eller flere af følgende deletioner:

(a) en deletion i de omvendte gentagelser beliggende mel-
lem spaltningsstederne for KpnI (mellem henholdsvis frag-
ment E eller fragment H og fragment K + M) og spaltnings-
35 stederne for BamHI (mellem BamHI fragmenter 5 og 8);

(b) en deletion i området, der er skraveret på restriktionskortet over den lille unikke sekvens (fig. 2);

(c) en deletion i thymidinkinase-genet.

5

Deletion (a) omfatter fortrinsvis ca. 100 nucleotider, og deletion (c) omfatter fortrinsvis ca. 100-500 nucleotider.

10 I den ovennævnte definition af deletionsmutanterne ifølge opfindelsen er mutanternes genomer defineret som genomer, der adskiller sig fra udgangsstammegenomerne ved tilstedeværelsen af 1, 2 eller 3 deletioner. I betragtning af den kendte variabilitet af udgangs-Pseudorabies-virus-

15 stammerne er opfindelsen ikke begrænset til mutanter afledt fra udgangsstammer, der har genomer nøjagtig svarende til restriktionskortet i fig. 1. Restriktionskortene for den lille unikke sekvens U_s i udgangsstammerne kan også være forskellige fra restriktionskortet i fig. 2,

20 skønt genomerne af alle udgangsstammerne indeholder en lignende unik sekvens. Imidlertid er alle udgangsstammer Pseudorabies-virus-stammer, der frembringer de kliniske symptomer på Pseudorabies.

25 Opfindelsen omfatter også vacciner indeholdende en levende virusmutant som defineret ovenfor. Vaccinerne fremstilles på sædvanlig måde.

Deletionsmutanter med de ovenfor beskrevne egenskaber opnås ved at indføre deletioner i det virale genom ved hjælp af molekylærbiologiske teknikker på en af følgende måder:

30

a) Nedbrydning af klonede eller uklonede subgenomfragmenter med restriktionsendonucleaser og efterfølgende religering af en del af de således frembragte frag-

35

5 menter med deletion af et eller flere fragmenter i
 det respektive subgenomfragment, indførsel af et så-
 ledes modificeret fragment, evt. efter ligering med
 resten af den overlappende eller ikke-overlappende
 genetiske information fra det virale genom, i følsom-
 me celler til produktion af det modificerede virus.

10 b) Nedbrydning af klonede eller uklonede subgenomfrag-
 menter med restriktionsendonucleaser og frembringelse
 af en deletion ved spaltningsstedet ved behandling af
 fragmenterne med en exonuclease og, evt. efter re-
 ligering med resten af den overlappende eller ikke-
 overlappende genetiske information fra det virale
 genom, indførsel af de modificerede fragmenter i føl-
15 somme celler til produktion af det modificerede vi-
 rus.

20 c) Nedbrydning af klonede eller uklonede subgenom-
 fragmenter med restriktionsendonucleaser og frembrin-
 gelse af en deletion ved spaltningsstedet ved trans-
 fektion af de dannede fragmenter (uden forudgående
 ligering) sammen med resten af den overlappende eller
 ikke-overlappende genetiske information fra det vira-
 le genom i følsomme celler. Disse celler vil produce-
25 re det modificerede virus. Deletionen vil blive frem-
 bragt spontant under transfektionsproceduren.

30 Følgende eksempler belyser konstruktionen af deletionsmu-
 tanterne ifølge opfindelsen samt deres biologiske egen-
 skaber. De hidtil ukendte mutantstammer 2.4N3A og 2.8N3A
 er deponeret i Phabagen Collection ved Rijksuniversiteit
 i Utrecht, Vakgroep Moleculaire Celbiologie, Transitorium
 3, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, Holland. Deponeringsnum-
 rene er henholdsvis PCPV2 og PCPV3. Yderligere er disse
35 stammer deponeret i Collection Nationale de Cultures de
 Micro-organismes (C.N.C.M.), Institut Pasteur, Paris,

Frankrig. I denne samling er deponeringsnummeret for stamme 2.4N3A I 351 og deponeringsnummeret for stamme 2.8N3A I 352.

5 EKSEMPEL

Konstruktion af mutanter

Konstruktionen af de forskellige deletionsmutanter af Pseudorabies-virus (PRV) stamme NIA-3 er skitseret i fig. 3. NIA-3 virion-DNA blev nedbrudt fuldstændigt med restriktionsendonucleaserne BamHI og HindIII. Produkterne af nedbrydningerne blev fraktioneret på præparative agarosegeler, og fragmenterne blev isoleret ved elektroeluering. HindIII B og BamHI 7 fragmenterne blev indsat i plasmidvektoren pBR322 og klonet ifølge etablerede procedurer. Plasmidet pN3B7 (11,1 kbp), der bar BamHI fragmentet, blev anvendt til at indføre deletioner i NIA-3 genomet. For at udføre dette blev pN3B7 lineariseret ved delvis BalI-nedbrydning (45 min, 37 °C, 0,3 enheder BalI pr. µg DNA). Fuld-længde DNA-molekyler blev isoleret ved agarosegelelektrophorese og elektroeluering. Disse molekyler blev nedbrudt med exonucleasen Bal31. Optimale betingelser for nedbrydning (0,18 kbp DNA/min) var 57 nM DNA og 20 enheder pr. ml Bal31 exonuclease ved 37 °C. Aliquoter blev udtaget 7, 12,5 og 18,5 minutter efter tilsætning af exonucleasen, og nedbrydningsprodukterne adskiltes efter størrelse på et lavt smeltende agarosegel. DNA-fragmenter af den ønskede længde (8,3 til 9,0 kbp) udvalgte. DNA-molekylerne blev behandlet med T4 polymerase, religeret med T4 DNA ligase og indført i Escherichia coli stamme HB101 ved hjælp af standardmetoder. Fra de Amp-resistente/Tet-følsomme kolonier isoleredes plasmid-DNA. Størrelsen og positionen af deletionerne bestemtes ved nedbrydning med restriktionsendonucleaserne MluI, BglII, SphI og PvuI. Tre rekombinante plasmider med forskellige deletio-

ner (2,1, 2,4 og 2,8 kbp) udvalgte til yderligere manipulation. De havde bibeholdt MluI-stedet ved kortposition 0,886 og BglII-stedet ved position 0,856, men havde tabt MluI-stedet ved position 0,876 (fig. 3). MluI-BglII fragmenterne (stiplede linier) af pN3B7-derivaterne med dele-
5 tioner på 2,1, 2,4 og 2,8 kbp blev isoleret og ligeret til 30 kbp MluI-BglII fragmentet af plasmid pN3HB. De resulterende plasmider pHB 2.1, pHB 2.4 og pHB 2.8 blev karakteriseret ved restriktionsendonuclease-analyse.

10

Til transfektion blev HindIII A fragmentet af NIA-3 virion-DNA og de virale insertioner af plasmiderne pHB 2.1, pHB 2.4 og pHB 2.8, spaltet med HindIII, renset ved to på hinanden følgende 5-40% glycerolgradienter (20 mM Tris-
15 hydrochlorid pH 8,0, 1 M NaCl, 10 mM EDTA). Renheden af HindIII A fragmentet og af de virale insertioner blev verificeret ved restriktionsendonuclease-spaltning og Southern-aftryksanalyse. Herefter blev et firefolds molært overskud af hver af de virale plasmidinsertioner
20 blandet med HindIII A fragmentet fra NIA-3 virion-DNA. DNA-blandingerne (500 ng) blev transficeret ind i sekundære svinenyreceller (PK-2) ved hjælp af calciumphosphat-copræcipitationsteknikken (Virology 52 (1973), 456-467).

25 De rekonstituerede vira opnået ud fra positive transfektioner blev renset ved tre omganges plak-udtagning, og deres genomer blev karakteriseret ved Southern-aftryksanalyse.

30 Biologisk karakterisering af deletionsmutanter

Udgangsstammen NIA-3, den avirulente stamme NIA-4 og deletionsmutanterne 2.4N3A og 2.8N3A blev undersøgt med hensyn til deres biologiske egenskaber hos mus og svin.

35

Gennemsnitstiden til dødsfald (MID) hos mus efter inoculering med stammer af PRV anvendtes som en parameter til at gruppere stammer efter virulens (Archives of Virology 63 (1080), 107-114). Sædvanligvis dræber virulent PRV mus hurtigere end svækkede stammer af PRV, skønt man har set undtagelser. Som det fremgår af tabel 1 varierede MID-værdierne for de forskellige stammer betydeligt. Deletionsmutanterne 2.4N3A og 2.8N3A udviste signifikant (Wilcoxon rank test, $p < 0,05$) længere MTD-værdier end NIA-3-stammen, hvilket angav, at en markør for virulens hos mus forefindes i U_s - og/eller gentagelsesregionen. Også forskellen i MTD mellem mutanterne 2.4N3A og 2.8N3A er signifikant ($p < 0,05$), hvilket tyder på at virulensen for mus er påvirket af positionen og/eller størrelsen af deletionen i U_s -området.

Svin af den hollandske landrace "minimal-sygdoms"-besætning fra Central Veterinary Institute, der er frie for Pseudorabies, blev anvendt til at bestemme virulensen af deletionsmutanterne i den naturlige vært. Som vist i tabel 1 havde deletionsmutanterne afledt fra NIA3-stammen en udpræget reduceret virulens for svin. Udgangs-NIA-3-stammen dræbte 2 ud af 5 svin. Hos de overlevende dyr observeredes kraftig depression, anorexi og feber ($> 40^\circ\text{C}$), der begyndte på postinoculationsdag (PID) 2. Fra PID 5 til 7 udviste de fleste svin udflåd fra næsen og åndenød. Yderligere udviklede de milde til kraftige neurologiske tegn. Rekonstitueret NIA-3 uden en deletion i U_s -området, men med en lille deletion i gentagelsesenheden ved positionen af HindIII stedet, opførte sig på samme måde som NIA-3, hvilket angav, at deletionen i gentagelsen ikke er af betydning for virulensen hos svin. I modsætning hertil blev svin, som var inoculeret med mutant 2.4N3A, kun svagt nedtrykt og havde en noget reduceret appetit mellem PID 2 og 5. Gennemsnitskropstemperaturerne forblev under 40°C . Det eneste tegn på sygdom hos svin, der var inocu-

leret med mutant 2.8N3A, var en stigning i kropstemperaturen: gennemsnittemperaturerne på PID 3, 4 og 5 var henholdsvis 40,3, 40,4 og 40,1. Disse resultater viser klart, at forekomsten af deletioner i U_s-regionen af PRV er forbundet med en reduceret virulens hos både mus og svin. Svin inoculeret med NIA-4 stammen viste også en noget reduceret appetit på PID 4. Denne stammes virulens for svin forandrede sig ikke, når dens HindIII B fragment blev erstattet med det deleterede HindIII B fragment (Δ 2,4) af den virulente NIA-3 stamme. Dette viser, at deletionen, der findes i U_s-regionen af NIA-4, er den afgørende faktor, der bestemmer den reducerede virulens af NIA-4 stammen. Gruppens gennemsnitlige vækststandsperioder er en vigtig parameter med hensyn til sygdommens sværhedsgrad. Tabel 1 viser, at der hos svin inoculeret med NIA-3-virus sås en gennemsnitlig vækststandsperiode på 9 dage, medens der hos svin inoculeret med en vilkårlig af de andre mutanter ikke blev bemærket nogen vækststandsning.

TABEL 1 Biologiske egenskaber af deletionsmutanter af PRV

Virus	Mus	Svin					
		Dødsfald	Vækststandsning	Feber	Virus-udskillelse		Antistoftiter
	MTD				pos %	gennemsnit	
NIA-3	50 $\pm$ 4	2	9	4	90	3,64	2,85
NIA-4	170 $\pm$ 29,0	0	0	0	ND	ND	1,13
2.4N3A	73 $\pm$ 7,0	0	0	0	80	2,65	1,65
2.8N3A	60 $\pm$ 8,5	0	0	3	50	2,20	1,62

For at bestemme virulensen over for mus inoculeredes grupper på otte 6-7 uger gamle BALB/c mus med 10^6 plakdannende enheder (PFU) af PRV. Musene kontrolleredes med 6 timers mellemrum i 10 dage. Gennemsnitstiden til musene døde (MID) er angivet med standardafvigelse.

For at bestemme virulensen hos svin inoculeredes grupper på fem 10 uger gamle svin intranasalt med en dosis på 10^5 PFU af PRV ved inddrypning af 0,5 ml i hvert næsebor.

Vækststandsperioden defineredes som det antal dage, der var nødvendige for at genvinde gruppens gennemsnitsvægt på postinoculationsdag (PID) 3. Svin, der døde, var ikke indbefattet i denne beregning.

Dages feber: gennemsnitsantallet af dage, hvor krops-temperaturerne var over 40 °C.

Virusudskillelse: Prøver af oropharyngealvæske (OPF) blev opsamlet dagligt 10 dage efter vaccination. Udtagningsmetoden og virusprøvningen blev foretaget som beskrevet i Veterinary Quarterly 4 (1982), 49-56.

Pos, %: procent positive OPF-prøver.

Gennemsnitstiter: Gennemsnitlige virustitere er udtrykt som $\log_{10}$ PFU/ml OPF.

Antistoftiter: den neutraliserende antistoftiter på PID 21 er udtrykt som $\log_{10}$ af den reciproke værdi af den slutserumfortynding, der inhiberede cytopatisk virkning i 50% af kulturerne.

Niveauerne af virusudskillelse efter inoculation, der giver en indikation på virusets evne til at formere sig i de øvre luftveje og/eller fordøjelseskanalen, blev også kontrolleret. Svin inficeret med virulent PRV udskilte betydelig større mængder virus gennem længere tid end

svin, der var inoculeret med svækket PRV. Som vist i tabel 1 indeholdt bogstavelig talt alle prøver af oropharyngealvæske (OPF) fra svin indgivet NIA-3 stamme virus. Desuden var den gennemsnitlige virustiter i OPF-prøverne den højeste i disse dyr. Virusudskillelsen hos svin indgivet mutanterne 2.4N3A eller 2.8N3A var væsentligt reduceret. De svin, der overlevede infektionen med den virulente NIA-3 stamme, viste mere end tifold højere gennemsnitlige neutraliserende antistoftiters 3 uger efter inoculation, end de fra NIA-3 afledte deletionsmutanter. NIA-4 stammen inducerede den laveste antistoftiter. Imidlertid var svin inoculeret med deletionsmutanterne udmærket beskyttet over for en udfordring med virulent PRV: Intranasal vaccination med deletionsmutanterne forhindrede forekomsten af kliniske tegn efter udfordring med den virulente NIA-3 stamme (tabel 2). Der blev ikke observeret nogen vækststandsning, og den gennemsnitlige kropstemperatur hos svin inoculeret med 2.4N3A og 2.8N3A forblev under 40 °C. Selv om de var beskyttet mod klinisk sygdom, udskilte svinene virulent virus via OPF. Sammenlignet med kontrolsvin var procenten af virusholdige prøver opsamlet i 10 dage efter udfordringen reduceret i udpræget grad. Desuden var gennemsnitstiterne af PRV i OPF 3-5 log lavere end hos kontrolsvinene (tabel 2).

TABEL 2 Bedømmelse af beskyttelse induceret af deletionsmutanter

Virus	Antistoftiter	Dødsfald	Vækststandsning	Feber	Virusudskillelse	
					pos %	gennemsnit
2.4N3A	2,25	0	0	0	20	0,51
2.8N3A	2,04	0	0	0	52	2,00
Kontroller	-	0	20	8	100	5,27

En gruppe bestående af fem sero-negative svin og to grupper svin vaccineret med PRV-deletionsmutanterne 2.4N3A og 2.8N3A (se tabel 1) blev intranasalt udfordret med 10^5 PFU virulent NIA-3 virus ved en alder på 16 uger. Anti-stoftiterne blev kontrolleret på selve udfordringsdagen, 6 uger efter vaccination.

P a t e n t k r a v

Levende deletionsmutant af et herpesvirus opnået ved, at der ved hjælp af rekombinant-DNA-teknikker i genomet af
5 en virulent udgangsstamme, som består af ca. 160 000 nucleotidpar og er karakteriseret ved et restriktionskort, der er typisk for Pseudorabies-virus-DNA, f.eks. ved restriktionskortet i fig. 1, hvori rektanglerne repræsenterer omvendte gentagelser, og de lodrette linier repræsenterer
10 spaltningsstederne for restriktionsendonucleaseerne HindIII, KpnI, BamHI og BglII, og som omfatter en lille unik sekvens U_s , som har et restriktionskort, der er typisk for den lille unikke sekvens af Pseudorabies-virus-DNA, f.eks. restriktionskortet afbildet i fig. 2, hvori
15 pilene repræsenterer spaltningsstederne for restriktionsendonucleaseerne angivet i fig. 2, er indført en eller flere af følgende deletioner:

(a) en deletion i de omvendte gentagelser beliggende mellem spaltningsstederne for KpnI (mellem henholdsvis fragment E eller fragment H og fragment K + M) og spaltningsstederne for BamHI (mellem BamHI fragmenter 5 og 8);
20

(b) en deletion i området, der er skraveret på restriktionskortet over den lille unikke sekvens (fig. 2);
25

(c) en deletion i thymidinkinase-genet.

2. Virus ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
30 deletion (a) omfatter ca. 100 nucleotider.

3. Virus ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at deletion (c) omfatter ca. 100-500 nucleotider.

4. Levende Pseudorabies-virus-deletionsmutanter ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at de er afledt fra NIA-3 stammen af PRV.
- 5 5. Deletionsmutant 2.4N3A ifølge krav 4, som beskrevet i beskrivelsen og deponeret i Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.), Institut Pasteur, Paris, Frankrig, under deponeringsnummeret I 351.
- 10 6. Deletionsmutant 2.8N3A ifølge krav 4, som beskrevet i beskrivelsen og deponeret i Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.), Institut Pasteur, Paris, Frankrig, under deponeringsnummeret I 352.
- 15 7. Vaccine indeholdende en levende virusmutant ifølge et eller flere af de forudgående krav.

Fig-1

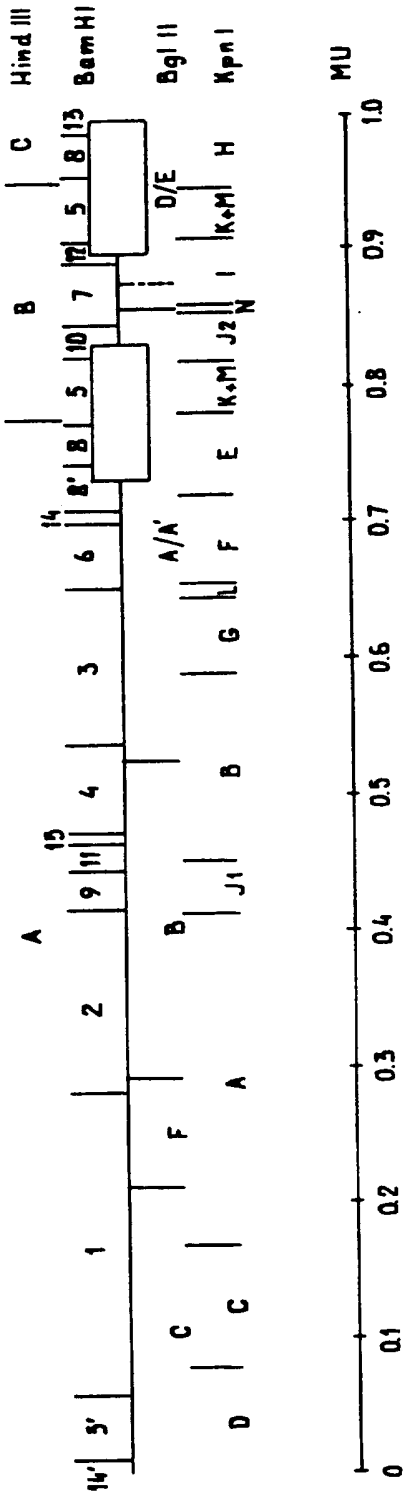


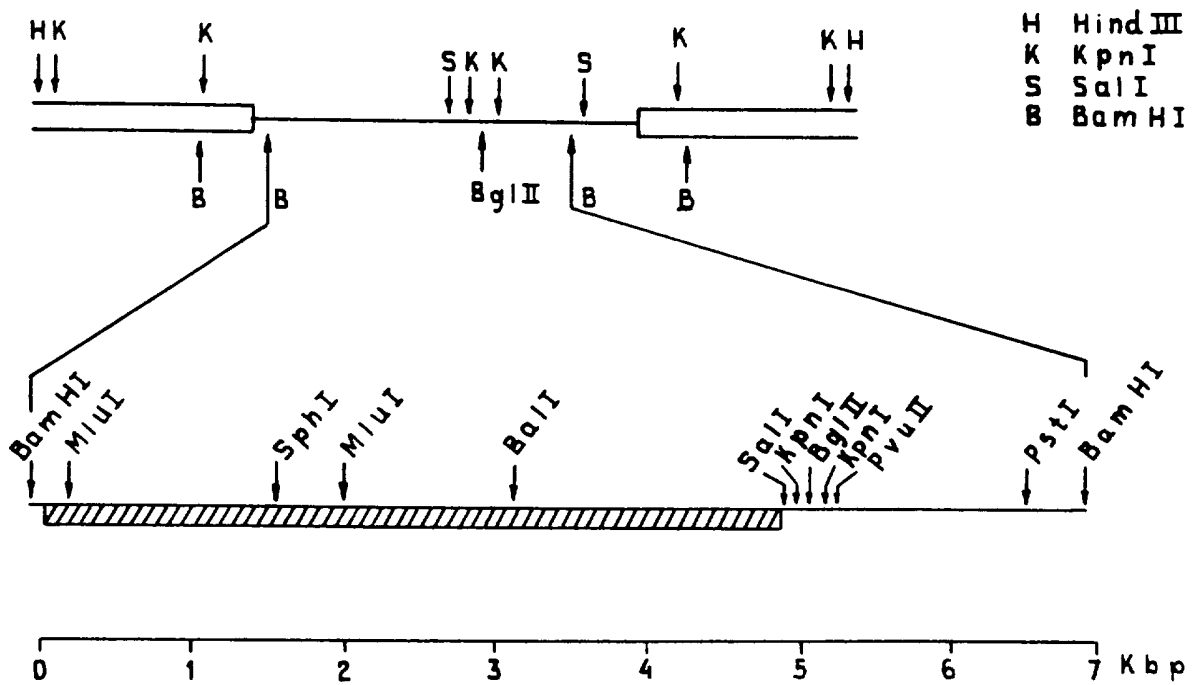
Fig-2

Fig-3

