



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 14 146 T3** 2005.05.04

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 587 805 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 14 146.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL92/00097**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 914 642.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 92/21751**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.06.1992**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **10.12.1992**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.03.1994**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **25.09.1996**

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **22.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.05.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/00**

**C12N 15/38, A61K 39/265, C12P 21/08,  
A61K 39/395, C12Q 1/70, G01N 33/569,  
C12N 7/00**

(30) Unionspriorität:

**9100989 07.06.1991 NL**

(73) Patentinhaber:

**Stichting Centraal Diergeneeskundig Instituut,  
Lelystad, NL**

(74) Vertreter:

**Blumbach Zinngrebe, 65187 Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, MC,  
NL, SE**

(72) Erfinder:

**RIJSEWIJK, Franciscus, Antonius, Maria, NL-1017  
JP Amsterdam, NL; VAN OIRSCHOT, Johannes,  
Theodorus, NL-8212 AN Lelystad, NL; MAES,  
Roger, Kamiel, Okemos, MI 48864, US**

(54) Bezeichnung: **DELETIONSMUTANTEN VON BOVINEM HERPUVIRUS-1, AUF DIESE BASIERTE IMPFSTOFFE, DIAGNOSESÄTZE FÜR DEN NACHWEIS VON BOVINEM HERPESVIRUS-1**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Bereich der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereiche Impfung und Diagnostik im Zusammenhang mit Krankheiten, die durch Pathogene hervorgerufen werden, und schließt die Anwendung sowohl klassischer Methoden, um zu einer attenuierten Lebend-Vaccine zu kommen als auch die modernen Methoden ein, die auf rekombinanten DNA-Technologien beruhen.

**[0002]** Genauer gesagt betrifft die Erfindung attenuierte Lebend-Vaccinen zum Schutz von Tieren, insbesondere von Rindern, gegen den Rinder-Herpesvirus-Typ 1 (Bovine Herpesvirus Type 1; BHV-1), wobei diese Vaccinen so ausgelegt sind, daß sie nicht nur sicher und wirksam sind, sondern auch die Möglichkeit schaffen, infizierte von nicht-infizierten Tieren in einer geimpften Population zu unterscheiden.

**[0003]** Diagnose-Kits, die für einen derartigen Test zur Unterscheidung infizierter von nicht-infizierten Tieren in einer geimpften Population verwendet werden können, sind ebenfalls ein Aspekt der vorliegenden Erfindung.

## Hintergrund der Erfindung

**[0004]** Der Rinder-Herpesvirus-Typ 1 (BHV-1) einschließlich des infektiösen Rinder-Rhinotracheitis-Virus (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus; IBRV) und des infektiösen Pustel-Vulvovaginitis-Virus (Infectious Pustular Vulvovaginitis Virus; IPVV), spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Krankheiten des Atemtrakts und von Störungen der Fruchtbarkeit bei Rindern. Nach einer akuten Infektion bleibt der BHV-1 oft in latenter Form im Wirt. Ein latentes Virus kann reaktiviert werden unter dem Einfluß von u. a. Streßbelastung, die von klinischen Phänomenen begleitet sein kann oder nicht, und kann danach ausgeschieden werden. Folglich müssen infizierte Rinder Zeit ihres Lebens als potentielle Verbreiter von BHV-1 angesehen werden. BHV-1 tritt endemisch schätzungsweise in 75% aller holländischen Rinderfarmen auf. Speziell ältere Rinder sind serologisch positiv.

**[0005]** Es gibt eine Anzahl inaktivierter (toter) Vaccinen und eine Anzahl attenuierter (lebender) Vaccinen, die für eine Inokulation gegen BHV-1-Infektionen verfügbar sind. Inaktivierte Vaccinen werden hergestellt durch Abtöten des BHV-1-Virus, beispielsweise durch Hitzebehandlung, Bestrahlung oder Behandlung mit Ethanol oder Formalin. Derartige Vaccinen ergeben jedoch häufig unzureichenden Schutz. Attenuierte Vaccinen werden hergestellt durch eine große Anzahl von Passagen auf homologen (Rinder-)Zellen oder auf heterologen Zellen, wie beispielsweise Schweinezellen oder Hundezellen, und manchmal werden Viren auch im Anschluß daran physikalisch oder chemisch behandelt. Auf diesem Wege entwickeln sich in dem Virus-Genom unbekannte Mutationen/Streichungen, die oft die Krankheit hervorrufenden Eigenschaften des Virus abschwächen. Attenuierte Lebend-Vaccinen ergeben einen besseren Schutz als inaktivierte Vaccinen, unter anderem deswegen, weil sie dem Immunsystem des Wirts mehr virale Antigene präsentieren. Ein weiterer wichtiger Vorteil von Lebend-Vaccinen ist, daß sie intranasal verabreicht werden können, d. h. an der Stelle, wo die erste Vermehrung des Wild-Typs des Virus nach einer Infektion erfolgt. Jedoch lassen auch Lebend-Vaccinen Raum für Verbesserungen. Einige Lebend-Vaccinen scheinen noch ihr abortogenes Vermögen zu besitzen, was insbesondere nach intramuskulärer Verabreichung offenkundig wird. Darüber hinaus bleiben wahrscheinlich alle Lebend-Vaccinen latent in der geimpften Kuh. Auch besteht eine Chance, daß dann, wenn sich die Vaccine nur geringfügig vom Virus des Wild-Typs unterscheidet, ein Umschlagen der Virulenz erfolgt. Eines der Hauptprobleme ist jedoch, daß die BHV-1-Vaccinen eine Infektion durch Viren des Wild-Typs nicht verhindern können. Das Ergebnis ist, daß auch geimpfte Rinder BHV-1 des Wild-Typs verbreiten können.

**[0006]** Für ein geeignetes Programm zur Kontrolle von BHV-1 ist es nötig, daß man über eine wirksame und sichere Vaccine verfügen kann, die von Viren des Wild-Typs unterschieden werden kann, da die Anwendung einer wirksamen Vaccine zu einem erheblichen Rückgang des Kreislaufs von BHV-1 führen kann, und ein Test, der zwischen einer Vaccine und einem Virus des Wild-Typs unterscheiden kann, macht es möglich, infizierte Rinder in einer geimpften Population zu entdecken und anschließend zu entfernen.

**[0007]** Zwischenzeitlich wurden BHV-1-Vaccinen entwickelt, die sicherer zu sein scheinen als herkömmliche Vaccinen und die von einem Virus des Wild-Typs unterscheidbar sind. Eine durch Streichung im Thymidinkinase-Gen zustandegekommene Mutante wurde isoliert, die in geringerem Ausmaß abortogen ist, weniger häufig latent wird und nicht reaktiviert werden kann. Außerdem wurde unter Anwendung rekombinanter DNA-Techniken eine BHV-1-Vaccine konstruiert, die eine Streichung in dem Gen für Glykoprotein gIII aufweist, was diese

Vaccine vom BHV-1 des Wild-Typs mittels serologischer Techniken unterscheidbar macht. Gegenüber derartigen Vaccinen bestehen jedoch noch immer Bedenken. Einerseits ist das Thymidinkinase-Gen in die Virus-Replikation involviert, und weniger Replikation kann nur zu weniger Schutz führen. Andererseits ist das Glykoprotein gIII wichtig zur Erzeugung schützender Antikörper, was die durch Streichung im Bereich von gIII erhaltene Vaccine weniger wirksam macht. Ein praktisches Problem besteht darin, daß die intranasale Verabreichung rekombinanter Vaccinen, die allgemein den besten Schutz ergibt, in einigen Ländern nicht erlaubt ist. Dementsprechend besteht ein Bedarf für eine Vaccine, die sowohl sicher als auch wirksam ist und die noch von BHV-1 des Wild-Typs unterschieden werden kann, wobei es wünschenswert ist, daß wenigstens eine von solchen Vaccinen auf einem Virus beruht, der über einen herkömmlichen Weg attenuiert wurde, als auf einem Virus, der durch rekombinante DNA-Techniken konstruiert wurde.

**[0008]** Es wurde nun über Passagen in Zellkulturen ein BHV-1-Stamm erhalten, dem das Gen für Glykoprotein gE fehlt. Die ersten Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, daß dieses Gen sehr nützlich dafür ist, eine serologische Unterscheidung im Hinblick auf BHV-1 des Wild-Typs zu erbringen und daß es in die Expression von Virulenz involviert ist. Daher trägt dessen Streichung zur Sicherheit bei und kann die Anwendung von Thymidinkinase-Streichungen überflüssig machen. Das Glykoprotein gE scheint weniger wichtig für das Induzieren von Schutz zu sein als das Glykoprotein gIII. Ein herkömmlich attenuierter BHV-1-Stamm, der serologisch vom Virus des Wild-Typs unterschieden werden kann, ist einzigartig. Der Ort und die DNA-Sequenz des gE-Gens, das in der vorliegenden Anmeldung erstmalig beschrieben wird, waren bis dahin nicht bekannt, noch waren Oligonucleotide, Polypeptide und Oligopeptide bekannt, die davon abgeleitet werden können. Ein Test zur serologischen Unterscheidung auf der Basis des gE-Gens ist ebenfalls einzigartig.

**[0009]** Ein wichtiger Vorteil dieser herkömmlichen Mutante mit gE-Streichung ("herkömmlich bezieht sich auf die Anwendung eines herkömmlichen Verfahrens zum Isolieren des attenuierten Virus) besteht darin, daß es möglich sein wird, die Mutante intranasal in Ländern zu verabreichen, wo dies verboten ist, soweit es durch rekombinante Techniken erhaltene Vaccinen betrifft. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ansichten in Bezug auf die Sicherheit wurden jedoch zusätzlich zu dieser herkömmlichen, eine Streichung im gE-Gen des Virus aufweisenden Vaccine auch wohldefinierte rekombinante Versionen konstruiert. Diese rekombinanten Vaccinen weisen ebenfalls eine Streichung des gE-Gens auf und können oder können auch nicht zusätzlich eine Streichung im Thymidinkinase-Gen aufweisen. Sie können auch als Vektoren für die Expression heterologer Gene verwendet werden. Alle diese rekombinanten Vaccinen können von Viren des Wild-Typs mit demselben, auf gE spezifischen Test unterschieden werden. Die Verwendung von Standard-Tests für einen Satz verschiedener Vaccinen kann ein großer Vorteil bei der Bekämpfung von BHV-1 im Hinblick auf internationale Anstrengungen sein. Ein derartiger Lösungsweg wurde bisher im Bereich von Vaccinen gegen BHV-1 noch nicht beschrieben.

**[0010]** Eine serologische Analyse der Anti-BHV-1-Antwort in Rindern zeigte, daß eine wichtige Fraktion der Anti-gE-Antikörper gegen einen Komplex gerichtet ist, der aus Glykoprotein gE und einem anderen BHV-1-Glykoprotein gebildet wird, nämlich dem Glykoprotein gI. Serologische Tests, die (auch) das Vorhandensein derartiger Komplex-spezifischer Antikörper zeigen können, können daher empfindlicher sein als Tests, die nur Anti-gE-Antikörper nachweisen können. Rinder die mit einer einzelnen gE-Streichungs-Mutante geimpft wurden können Anti-gI-Antikörper erzeugen, die den Nachweis von Anti-gI-gE-Antikörpern stören. Folglich schließt die vorliegende Erfindung auch eine Vaccine mit einer gI/gE-Doppeldeletion ein.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0011]** An erster Stelle betrifft die vorliegende Erfindung eine Deletions- bzw. Streichungs-Mutante von BHV-1, welche gemäß Anspruch 1 eine Streichung in dem Glykoprotein gE-Gen aufweist. Die Worte "eine Streichung in" sollen eine Streichung des Gens als ganzes umfassen.

**[0012]** Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht in einer Streichungs-Mutante von BHV-1, die eine Streichung in dem Glykoprotein gE-Gen aufweist, die hervorgerufen wurde durch ein Attenuierungsverfahren, wie beispielsweise die Streichungs-Mutante Difivac-1, die nachfolgend zu beschreiben ist.

**[0013]** Andere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung bestehen in einer Streichungs-Mutante von BHV-1, die eine Streichung im Glykoprotein gE-Gen umfaßt, die durch rekombinante DNA-Techniken konstruiert wurde, wie beispielsweise die Streichungs-Mutanten 1B7 oder 1B8, die nachfolgend zu beschreiben sind.

**[0014]** Andere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung bestehen in einer Doppelstreichungs-Mutante von BHV-1, die eine Streichung im Glykoprotein gE-Gen und eine Streichung im Glykoprotein gI-Gen umfaßt,

wie beispielsweise die gl/gE-Doppelstreichungs-Mutante Difivac IE, die nachfolgend zu beschreiben ist.

**[0015]** Die Erfindung beinhaltet darüber hinaus eine Zusammensetzung die in Anspruch 8 beschrieben wird und einen Antikörper der in Anspruch 9 beansprucht wird. Alle Antikörper ist hierbei sowohl als polyklonaler Antikörper als auch als monoklonaler Antikörper der in den meisten Anwendungen verwendet wird, zu verstehen.

**[0016]** Darüber hinaus beinhaltet die Erfindung ein Diagnosekit zum Nachweis von Antikörpern, wie es von den Ansprüchen 12 oder 14 beansprucht wird.

**[0017]** Ferner bezieht sich die Erfindung auf ein Diagnosekit zum Nachweis von Proteinen wie aus Anspruch 15 hervorgeht.

**[0018]** Darüber hinaus liefert die Erfindung eine Methode zum Nachweis von BHV-1 Infektionen von Tieren, wie von den Ansprüchen 16 oder 17 beansprucht.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0019]** Die Erfindung betrifft einen Satz BHV-1-Lebend-Vaccinen, die gemeinsam haben, daß ihnen das Glykoprotein gE-Gen ganz oder teilweise fehlt. Dieser Satz umfaßt sowohl natürliche gE-Streichungs-Mutanten als auch konstruierte gE-Streichungs-Mutanten, die auch eine Streichung des Thymidinkinase-Gens und/oder des Glykoprotein gl-Gens umfassen können sowie konstruierte gE-Streichungs-Mutanten, die als Vektoren für heterologe Gene verwendet werden. Die Erfindung betrifft außerdem Nucleotid-Sequenzen, die für das BHV-1-Glykoprotein gE-Gen codieren, Oligonucleotide, die von diesen Sequenzen abgeleitet sind, das Glykoprotein gE selbst, Peptide, die davon abgeleitet sind, sowie (monoklonale oder polyklonale) Antikörper, die gerichtet sind gegen das gE-Glykoprotein und davon abgeleitete Peptide. Die Erfindung betrifft auch Komplexe der Glykoproteine gE und gl von BHV-1 und auch Antikörper, die gegen derartige Komplexe gerichtet sind.

**[0020]** Diese Materialien gemäß der Erfindung können verwendet werden für

- (1) die Impfung von Rindern gegen Krankheiten, die durch BHV-1 hervorgerufen werden, so daß eine Unterscheidung zwischen mit BHV-1 infizierten Tieren und geimpften Tieren gemacht werden kann, wobei die herkömmliche und die konstruierte Vaccine nebeneinander verwendet werden können;
- (2) die Impfung von Rindern sowohl gegen von BHV-1 hervorgerufene Krankheiten als auch gegen Krankheiten, die durch andere Pathogene hervorgerufen werden, deren codierende Sequenzen für Schutz-Antigene in die BHV-1-Streichungs-Mutanten eingearbeitet werden können;
- (3) das Testen von Blut, Serum, Milch oder anderen Körperflüssigkeiten von Rindern, um serologisch oder mittels Nucleinsäure-Nachweistechiken (z. B. PCR) zu bestimmen, ob sie mit einem BHV-1 des Wild-Typs infiziert wurden, oder ob sie mit einer gE-Streichungs-Mutante geimpft wurden.

Die Synthese von Oligopeptiden, Polypeptiden und Glykoproteinen, die von der codierenden Sequenz des Glykoprotein gE-Gens und des Glykoprotein gl-Gens von BHV-1 abgeleitet wurden

**[0021]** Die Ergebnisse der DNA-Sequenzanalyse, die in den Beispielen beschrieben ist, des Glykoprotein gE-Gens ([Fig. 3A](#)) und der isolierten DNA-Fragmente, die für dieses Gen codieren, machen es möglich, unter Anwendung von standardisierten molekularbiologischen Verfahrensweisen sowohl Peptide des gE-Proteins (Oligopeptide oder Polypeptide) zu synthetisieren, als auch das gE-Protein in seiner Gesamtheit oder in großen Teilen über einen Prokaryoten-Weg (in Bakterien) oder über einen Eukaryoten-Weg (beispielsweise in Mäusezellen) zu exprimieren. Über diese Wege kann ein gE-spezifisches Antigen erhalten werden, das beispielsweise dazu dienen kann, gE-spezifische monoklonale Antikörper (Mabs) zu erzeugen. Außerdem kann gE-spezifisches Antigen (und können gE-spezifische Mabs) in serologischen Tests verwendet werden, um eine Unterscheidung zwischen Tieren, die mit einer BHV-1-gE-Streichungs-Vaccine geimpft wurden, und Tieren, die mit dem BHV-1-Virus des Wild-Typs infiziert wurden, machen zu können.

**[0022]** Die Ergebnisse der partiellen DNA-Sequenzanalyse des Glykoprotein gl-Gens – beschrieben in den Beispielen – und der isolierten DNA-Fragmente, die für dieses Gen codieren, zusammen mit den Eukaryoten-Zellen, die Glykoprotein gE exprimieren, erlauben die Expression des gUgE-Komplexes in eukaryotischen Zellen (siehe [Fig. 13](#) und [Fig. 14](#)). Dieser Glykoprotein-Komplex kann verwendet werden zur Herstellung für gl/gE spezifischen monoklonalen Antikörpern. Der gl/gE-Komplex kann auch verwendet werden als Antigen in serologischen Tests zur Differenzierung zwischen Rindern, die mit einer gE BHV-1-Einzelstreichungs-Mutante oder mit einer gl/gE-BHV-1-Doppelstreichungs-Mutante geimpft wurden, und Rindern, die mit BHV-1-Virus des

Wild-Typs infiziert sind.

#### gE-spezifische Peptide

**[0023]** Auf der Basis einer bekannten Protein-Codierungssequenz können mittels einer automatischen Synthesevorrichtung Polypeptide von nicht weniger als 40 bis 50 Aminosäuren hergestellt werden. Da nun die Protein-Codierungssequenz des gE-Glykoproteins von BHV-1 Stammes Lam, aufgeklärt wurde ([Fig. 3A](#)), können Polypeptide dieses BHV-1-gE-Glykoproteins synthetisiert werden. Mit solchen Polypeptiden können nach Standard-Verfahren Versuchstiere wie beispielsweise Mäuse oder Kaninchen immunisiert werden, um gE-spezifische Antikörper zu erzeugen. Außerdem können unter Verwendung dieser gE-spezifischen Peptide die Stellen, an denen Anti-gE-Antikörper mit dem gE-Protein reagieren (die Epitope) weiter spezifiziert werden, beispielsweise mit dem PEPSCAN-Verfahren (Geysen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998–4002). gE-spezifische Oligopeptide können auch in serologischen Tests verwendet werden, die die Gegenwart von Anti-gE-Antikörpern zeigen.

#### Prokaryotische Expression von gE

**[0024]** Zur Synthese des gE-Proteins in Bakterien (d. h. für die prokaryotische Expression von gE) müssen DNA-Fragmente, die für das Glykoprotein gE oder für Teile davon codieren, in prokaryotische Expressions-Vektoren kloniert werden. Prokaryotische Expressions-Vektoren sind kreisförmige DNA-Moleküle, die sich in einem Bakterium selbst als getrennt replizierendes Molekül (Plasmid) erhalten können. Diese Expressions-Vektoren enthalten einen oder mehrere Marker-Gene, die für eine Antibiotikum-Resistenz codieren und so die Selektion von Bakterien mit dem Expressions-Vektor ermöglichen. Außerdem umfassen Expressions-Vektoren eine (oft steuerbare) Promoter-Region, hinter die DNA-Fragmente gebunden werden können, die dann unter dem Einfluß des Promoters exprimiert werden. In vielen derzeit gängigen prokaryotischen Expressions-Vektoren wird das gewünschte Protein exprimiert, wobei es an ein sogenannten Trägerprotein gebunden ist. Deswegen ist der Vektor dort hinter dem Promoter für die Codierungssequenz für das Trägerprotein angeordnet, an das unmittelbar benachbart das gewünschte DNA-Fragment gebunden sein kann. Fusionsproteine sind oft stabiler und leichter zu erkennen und/oder zu isolieren. Das steady-state-Niveau, das ein spezielles Fusionsprotein in einem bestimmten Bakterium erreichen kann, ist von Fusion zu Fusion und von Stamm zu Stamm unterschiedlich. Es ist üblich, verschiedene Kombinationen auszuprobieren.

#### Eukaryotische Expression des Glykoprotein RE-Gens

**[0025]** Obwohl eine prokaryotische Expression von Proteinen einige Vorteile bietet, fehlen den Proteinen die Modifikationen, wie beispielsweise eine Glykosylierung und dergleichen, die in eukaryotischen Zellen auftreten. Im Ergebnis ist daher ein eukaryotisch exprimiertes Protein oft ein besser geeignetes Antigen. Für die heterologe Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen wie beispielsweise in Mausezellen wird Gebrauch gemacht von eukaryotischen Expressions-Vektoren. Diese Vektoren sind Plasmide, die nicht nur in E. coli-Zellen vervielfältigt werden können, sondern auch in eukaryotischen Zellen stabil existieren. Zusätzlich zu einem prokaryotischen Selektions-Marker umfassen sie auch einen eukaryotischen Selektions-Marker. Analog zu den prokaryotischen Expressions-Vektoren enthalten eukaryotische Expressions-Vektoren eine Promoter-Region, hinter der gewünschte Gene gebunden werden können. Jedoch sind die Promoter-Sequenzen in eukaryotischen Vektoren spezifisch für eukaryotische Zellen. Darüberhinaus wird in eukaryotischen Vektoren eine Fusion an Trägerproteine nur selten angewendet. Diese Vektoren werden in die eukaryotischen Zellen mittels eines standardisierten Übertragungs- bzw. Transfektionsverfahrens eingeführt (F. L. Graham und A. J. van der Eb, 1973, Virology 52, 456–467). Zusätzlich zu den eukaryotischen Plasmid-Vektoren gibt es auch virale Vektoren, bei denen das heterologe Gen in das Genom eines Virus (z. B. Retroviren, Herpesviren und Vaccinia-Viren) eingeführt wird. Eukaryotische Zellen können dann mit rekombinanten Viren infiziert werden. Allgemein kann nicht vorausgesagt werden, welcher Vektor und welcher Zell-Typ am besten für ein spezielles Gen-Produkt geeignet sind. In den meisten Fällen werden einige Kombinationen ausprobiert.

#### Eukaryotische Expression von beiden, dem Glykoprotein gE und dem Glykoprotein gI

**[0026]** Die End-Struktur, die ein Protein erhält, ist abhängig von seiner primären Aminosäure-Sequenz, seiner Faltung, seinen Modifikationen nach der Translation usw. Ein wichtiger Faktor, der zur Struktur eines Proteins beiträgt, ist seine Wechselwirkung mit einem oder mehreren anderen Proteinen. Es wurde gefunden, daß auch das BHV-1-Glykoprotein gE einen Komplex mit wenigstens einem anderen Glykoprotein bildet, nämlich mit BHV-1-Glykoprotein gI. Der erste Hinweis auf einen solchen Komplex kam von unseren Ergebnissen mit den in Versuchen verwendeten Anti-gE-Mabs 1, 51, 67, 75 und 78 (siehe Tabelle 2). Diese Mabs reagierten nicht

mit Difivac-1 und auch nicht mit Lam gE und erkannten darüberhinaus auch nicht Glykoprotein gE exprimierende 3T3-Zellen. Jedoch reagierten diese Mabs mit gE exprimierenden 3T3-Zellen nach Infektion mit Difivac-1, was zeigt, daß einander ergänzende Faktoren dafür erforderlich sind, dem Glykoprotein gE die richtige Antigen-Konfirmation für diese Mabs zu geben. In einigen unserer Radioimmuno-Präzipitations-Experimente mit Mab 81 wurde eine Copräzipitation eines Proteins mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 63 kD gefunden. Im Hinblick auf die Tatsache, daß das Herpes simplex-Virus-Glykoprotein gE einen Komplex mit einem Protein mit vergleichbarem Molekulargewicht bildet (HSV 1-Glykoprotein gl), wurde geschlossen, daß das BHV-1-Glykoprotein gE einen Komplex mit dem BHV-1-Homologen von Glykoprotein gl bildet. Um diesen BHV-1-gE/gl-Komplex zu untersuchen und um ein gE-Antigen mit der passenden Antigen-Struktur zu erzeugen, wurden beide Glykoproteine in einer eukaryotischen Zellen exprimiert. Dazu wurden dieselben Verfahrensweisen angewendet, wie sie für die eukaryotische Expression von Glykoprotein gE allein beschrieben sind. Die einzige zusätzliche Voraussetzung ist die Verwendung von Expressions-Vektoren mit verschiedenen eukaryotisch selektierbaren Markern.

### Serologische Tests

**[0027]** Serologische Verfahrensweisen zur Unterscheidung zwischen Rindern, die mit Difivac-1 geimpft waren und Rindern, die mit BHV-1 des Wild-Typs auf der Basis von Antikörpern gegen gE infiziert waren, beruhen vorzugsweise auf der Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen gE gerichtet sind. Diese können nach den folgenden Arten verwendet werden:

**[0028]** (a) Nach dem Prinzip, das beschrieben wurde von van Oirschot et al., Journal of Virological Methods 22, 191–206, 1988). In diesem ELISA für den Nachweis von gl-Antikörpern gegen den Virus der Aujeszky-Krankheit wird die Gegenwart von Antikörpern gezeigt durch ihren Blockierungseffekt auf die Reaktion von zwei Mabs mit zwei verschiedenen Epitopen auf gl.

**[0029]** Dieser Test wird wie folgt durchgeführt: Mikrotiterplatten werden mit Mab 1 beschichtet, über Nacht bei 37°C stehen gelassen und danach z. B. bei 4°C oder –20°C aufbewahrt. Das zu untersuchende Serum wird mit einem Antigen in separaten unbeschichteten Mikrotiterplatten z. B. für 2 h bei 37°C vorinkubiert. Die mit Mab 1 beschichteten Platten werden z. B. fünfmal gewaschen, wonach auf diese Platten Mab 2 gegeben wird, das an Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase; HRPO) gekoppelt ist. Danach werden die vorinkubierten Serum-Antigen-Mischungen auf die Platten übertragen, in denen sich die beiden Mabs befinden. Dem folgt eine Inkubation, z. B. für die Zeit von 1 h bei 37°C. Die Platten werden gewaschen, und Substrat wird jeder Vertiefung zugesetzt. Nach z. B. 2 h bei Raumtemperatur werden die Platten spektrophotometrisch ausgelesen. Vier negative Kontroll-Seren und vier Reihenverdünnungen eines positiven Serums werden auf jeder Platte angelegt. Das Serum, das einen Wert der optischen Dichte (OD) von weniger als 50% des mittleren OD-Wertes der vier negativen Kontroll-Seren aufweist, die auf derselben Platte untersucht wurden, wird als positiv angesehen.

**[0030]** (b) Nach dem Indirekt-Doppel-Antikörper-Sandwich-Prinzip (Indirect Double Antibody Sandwich Principle; IDAS Principle). In diesem Fall werden Mikrotiterplatten mit einem Mab oder einem polyklonalen Serum überzogen, das gegen das gE-Protein gerichtet ist. Eine Inkubation mit der gE-Antigen-Zubereitung führt zu einer Bindung von gE an den Überzug. Antikörper, die speziell gegen gE in dem zu untersuchenden Rinderserum gerichtet sind, binden sich danach an das gE. Diese gebundenen Antikörper werden von einem Anti-Rinderimmunoglobulin-Konjugat erkannt. Die Antikörper in diesem Konjugat sind kovalent an Peroxidase-Enzym gebunden. Zum Schluß wird das gebundene Konjugat durch Zusatz eines chromogenen Substrats sichtbar gemacht. Die Spezifität der Reaktion wird dadurch überprüft, daß man dieselbe Verfahrensweise mit einer auf gE negativen Kontroll-Zubereitung statt der gE-Antigen-Zubereitung durchführte. Auf jeder Mikrotiterplatte wurden auch positive und negative Kontroll-Seren angelegt. Der Test ist gültig, wenn sich das positive Serum in einer bestimmten Verdünnung positiv erweist. Ein Serum ist positiv, wenn es einen OD-Wert ergibt, der um 0,2 Punkte höher ist als der des negativen Standard-Kontroll-Serums.

**[0031]** (c) Nach dem unter (2) beschriebenen IDAS-Prinzip, jedoch wird nach Inkubieren des zu untersuchenden Serums ein Anti-gE-Mab/HRPO anstelle des Anti-Rinderimmunoglobulin-Konjugats verwendet. Ein Anti-gE-Peptid-Serum oder ein Anti-gE polyklonales Serum kann anstelle des Anti-gE-Mabs verwendet werden. Die Platten werden gewaschen und jeder Vertiefung wird ein chromogenes Substrat zugesetzt. Nach 2 h bei Raumtemperatur werden die Platten spektrophotometrisch abgelesen. Vier negative Kontroll-Seren und vier Reihenverdünnungen eines positiven Serums sind auf jeder Platte angelegt. Das Serum, das einen OD-Wert von weniger als 50% des mittleren OD-Wertes der negativen Kontroll-Seren aufweist, die auf derselben Platte untersucht wurden, wird als positiv angesehen.

**[0032]** (d) Nach dem Prinzip eines Blocking-ELISA, bei dem ein Virus-Antigen, das gereinigt sein kann (oder nicht gereinigt sein kann), über Nacht auf die Mikrotiterplatte beschichtungsmäßig aufgebracht wird. In diesen Platten wird das zu untersuchende Serum für die Zeit von z. B. 1 h oder länger bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschverfahren wird ein Anti-gE-Mab den Platten zugesetzt, worauf eine Inkubation für die Zeit von z. B. 1 h bei 37°C folgt. Ein Anti-gE-Peptid-Serum oder ein Anti-gE polyklonales Serum kann anstelle des Anti-gE-Mab verwendet werden. Die Platten werden gewaschen, und jeder Vertiefung wird ein chromogenes Substrat zugesetzt. Nach z. B. 2 h bei Raumtemperatur werden die Platten spektrophotometrisch abgelesen. Vier negative Kontroll-Seren und vier Reihenverdünnungen eines positiven Serums werden auf jeder Platte angelegt. Das Serum, das einen OD-Wert von weniger als 50% des mittleren OD-Wertes der vier negativen Kontroll-Seren aufweist, die auf derselben Platte untersucht wurden, wird als positiv angesehen.

**[0033]** In allen oben beschriebenen Anordnungen kann herkömmliches gezüchtetes Virus-Antigen, das gE enthält, verwendet werden, jedoch kann in gleicher Weise gE-Antigen verwendet werden, das über Prokaryoten oder Eukaryoten exprimiert wurde.

**[0034]** Alternativ dazu könnten Oligopeptide auf der Basis der BHV-1-gE-Sequenz in den oben beschriebenen diagnostischen Tests verwendet werden. Außerdem können solche Oligopeptide für die Entwicklung eines sogenannten "Kuhseitigen" Tests nach dem Prinzip verwendet werden, das beschrieben ist in einem Artikel von Kemp et al., Science 241, 1352–1354, 1988. Ein derartiger Test würde dann auf der Basis eines Bindens der Antigen-Sequenz des Oligopeptids an die gegen gE gerichteten Antikörper aufgebaut sein, die in den infizierten Tieren vorhanden sind. Für einen solchen Test müßte das Oligopeptid an einen Mab gekoppelt werden, der gegen Rindererythrozyten gerichtet ist.

#### Nucleinsäure-Analyse unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion

**[0035]** Oligonucleotide (Probensonden und Primer) können beispielsweise in der Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden, um zwischen geimpften und infizierten Tieren zu unterscheiden. Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) ist eine Technik, bei der Nucleinsäuren eines Pathogens milliardenfach in kurzer Zeit vervielfacht werden können (De Polymerase Kettingreactie, P. F. Hilderink, J. A. Wagenaar, J. W. B. van der Giessen und B. A. M. van der Zeijst, Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 115 (1990), 1111–1117). Die gE-Oligonucleotide können so gewählt werden, daß in einem auf gE positiven Genom ein anderes Produkt gebildet wird als in einem auf gE negativen Genom. Der Vorteil hiervon besteht darin, daß auch ein Tier, das mit der gE-Streichungs-Vaccine geimpft wurde, in einem PCR-Test ein positives Signal gibt. Jedoch hängt dieser Ansatz von dem Vorhandensein von Nucleinsäuren des Virus in einer Probe ab, beispielsweise in Blut, das von dem zu testenden Tier stammt.

**[0036]** Nach einer akuten Infektion mit BHV-1 besteht eine große Chance, daß das Vorhandensein von auf BHV-1 spezifischen Nucleinsäuren in dem Blut gezeigt werden kann. Es wurde jedoch noch nicht bestimmt, ob das Vorhandensein von BHV-1-Nucleinsäuren in dem Blut auch während der latenten Phase gezeigt werden kann.

#### Die Verwendung von BHV-1 als Vektor

**[0037]** Zur Expression heterologer Gene in dem BHV-1-Genom ist es nötig, exakte Informationen über den Bereich zur Verfügung zu haben, in den das heterologe Gen eingesetzt werden soll. Es sollte keine Störung essentieller Sequenzen auftreten, und Regulator-Sequenzen müssen für die Expression des heterologen Gens verfügbar sein. Grundsätzlich ist das Glykoprotein gE-Gen ein geeigneter Ort zum Exprimieren heterologer Gene. Das gE-Gen ist nicht essentiell. Folglich gibt es keinen Einwand gegen ein Ersetzen des gE-Gens durch das heterologe Gen. Infolge dessen kann das heterologe Gen so positioniert werden, daß es unter dem Einfluß der Regulator-Sequenzen des gE-Gens steht. Es ist jedoch nicht nötig, die Regulator-Sequenzen des gE-Gens zu verwenden. Die Expression heterologer Gene kann alternativ durch andere, z. B. stärkere Regulator-Sequenzen anderer Gene gesteuert werden. Es ist auch möglich, das heterologe Gen an das (Export-) Signalpeptid des gE-Gens zu koppeln, so daß die Sekretion des heterologen Produkts beeinflußt werden kann. Es ist klar, daß eine detaillierte Kenntnis des gE-Gens und des gE-Proteins die Möglichkeit liefert, BHV-1 als Vektor in einer sehr gemessenen Weise zu verwenden. Die entwickelten Vektoren können darüber hinaus serologisch von dem Wild-Typ unterschieden werden. Die Konstruktion von BHV-1-Mutanten, die heterologe Gene exprimieren, kann in derselben Weise wie die Konstruktion von gE-Streichungs-Mutanten erfolgen, die in den Beispielen gezeigt ist. Die Streichungs-Fragmente sollten dann jedoch durch ein Fragment ersetzt werden, an dem ein heterologes Gen an der Stelle der Streichung angeordnet ist.



## Beispiele

## (1) Isolierung und Identifizierung einer natürlichen gE-Streichungs-Mutante

## (a) Isolation einer natürlichen Mutante

**[0038]** Genom-DNA wurde aus einer Zahl herkömmlich attenuierter Vaccinen nach Standard-Verfahren isoliert und unter Verwendung von Restriktionsenzymen analysiert. Insbesondere wurde nach Genom-Abweichungen gesucht, die geeignet dafür sind, eine Unterscheidung vom BHV-1-Virus des Wild-Typs zu ermöglichen.

**[0039]** Aufmerksamkeit wurde insbesondere gerichtet auf den Us Bereich des BHV-1-Genoms, da in dem Bereich – in Analogie mit dem Herpes simplex-Virus – wahrscheinlich eine Anzahl von Genen, die für nicht essentielle Glykoproteine codieren, angeordnet ist (zur Identifizierung eines Herpes simplex-Virus 1-Glykoprotein-Gens innerhalb eines Gen-Clusters, der für ein Wachstum in einer Zellkultur entbehrlich ist: R. Longnecker, S. Chatterjee, R. J. Whitley und B. Roizman, Proc. Natl. Acad. Sci. 84 (1987), 4303–4307).

**[0040]** Es zeigte sich, daß eine Charge von BHV-1-Vaccine von der Universität Zagreb (Yugoslawien) (Lugovic et al., Veterinarski Arhiv 55 (1985), 241–245) nach einer großen Zahl von Passagen von Rinderembryonen-Nierenzellen und Rinderembryonen-Tracheazellen (Ebtr) eine abweichende Us-Region zusätzlich zu einer normalen Us-Region aufwies. Diese Vaccine schien darüberhinaus sowohl große als auch kleine Plaques auf Ebtr-Zellen zu bilden. Aus dieser Mischpopulation wurde ein Virus mit einer abweichenden Us-Region durch drei begrenzende Verdünnungsschritte isoliert, wobei jedes Mal die kleinen Plaques ausgewählt wurden. Der auf diesem Weg isolierte Virus wurde weiter untersucht und Difivac-1 genannt. Er wurde beim Institut Pasteur, Paris, Frankreich, am 27. Mai 1992 unter der Hinterlegungsnummer I-1213 hinterlegt.

## (b) Identifizierung der Streichung des gE-Gens in Difivac-1

**[0041]** Zur weiteren Analyse dieser Abweichung in der Us Region wurde Genom-DNA von Difivac-1 nach Standard-Verfahren isoliert und einer Southern-Blot-Analyse unterworfen ([Fig. 1A](#)). Eine Hybridisierung dieses Blots mit einem <sup>32</sup>P-markiertem Wild-Typ-HindIII-K-Fragment bestätigte, daß dieses Fragment, das im Zentrum der U<sub>s</sub> Region angeordnet ist, in Difivac-1 etwa 1,0 Kilobasen (kb) kürzer ist. Darüberhinaus konnte durch diese Analyse die Position des fehlenden Teils in etwa bestimmt werden ([Fig. 1B](#)). Zur weiteren Analyse dieser Streichung wurde der U<sub>s</sub> Bereich des Wild-Typ-BHV-1-Stamms Lam isoliert und in prokaryotische Vektoren kloniert. Dabei wurde in Übereinstimmung mit Standard-Verfahrensweisen Genom-DNA des Lam-Stamms ([Fig. 2A](#)) isoliert und in die Vektoren pUC18, pACYC und pBR322 kloniert ([Fig. 2B](#)). Eine physikalische Mappe des Bereichs um die angenommene Position der Streichung wurde erstellt ([Fig. 2C](#)). Ausgehend von dieser physikalischen Mappe wurden Subklone, die geeignet für die Bestimmung der Nucleotid-Sequenz dieses Bereichs, sind, in den Vektoren pKUN19 und pUC18 konstruiert ([Fig. 2D](#)). Unter Verwendung dieser Subklone wurde die Nucleotid-Sequenz der beiden Stränge des gesamten Bereichs (angegeben in [Fig. 2C](#)) unter Anwendung des Sanger-Verfahrens bestimmt.

**[0042]** Diese Nucleotid-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) wurde unter Verwendung des PC/Gene-Programms analysiert. Aus der Übersetzung gemäß Entwurf ergab sich, daß die Nucleotide (nt) 168 bis nt 1893 für einen offenen Leserahmen aus 575 Aminosäuren codieren ([Fig. 3A](#)). Eine weitere Analyse zeigte, daß diese Aminosäure-Sequenz die charakteristischen Eigenschaften eines Transmembran-Glykoproteins aufweist, wie es in [Fig. 3B](#) gezeigt ist. Tatsache ist, daß die ersten 26 Aminosäuren (amino acids; aa) als typisches eukaryotisches Export-Signal erkannt werden und daß der Bereich zwischen aa 423 und aa 450 als Transmembran-Region erkannt wird. Außerdem treten in dieser Sequenz drei potentielle N-gebundene Glykosylierungsstellen auf. Diese vorhergesagte Aminosäure-Sequenz zeigt klare Ähnlichkeiten zum Glykoprotein gE-Gen des Herpes simplex-Virus (HSV); siehe [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#)). Diese und andere Ähnlichkeiten rechtfertigen den Schluß, daß das gefundene Gen das gE-Homologe von BHV-1 ist. Aus diesem Grund wird das Gen gE genannt.

**[0043]** Um zu bestimmen, in welchem Umfang das BHV-1-gE-Gen in Difivac-1 fehlt, wurde das p318-Fragment isoliert. Das p318-Fragment beginnt an der AluI-Stelle 55 Nucleotide (nt) vor dem postulierten BHV-1-gE offenen Leserahmen und endet 133 Nucleotide (nt) danach. Genom-DNA von Difivac-1 wurde mit diesem p318-Fragment unter Einsatz einer Southern-Blot-Hybridisierung analysiert. Dies zeigte, daß Difivac-1 keine mit p318 nachweisbaren Sequenzen enthält ([Fig. 5](#)). Dieses Experiment bestätigte, daß Difivac-1 eine Streichung enthält, und zeigt klar, daß sich diese Streichung über das gesamte gE-Gen erstreckt.



**[0044]** Um die Größe und die Position des gestrichenen Bereichs zu bestimmen, wurden Genom-Sequenzen, die den U<sub>S</sub> Bereich von Difivac-1 abdeckten, in prokaryotische Vektoren inkloniert; siehe dazu [Fig. 11C](#). Das 14,5 kb große EcoR1-Fragment wurde in den pACYC-Vektor inkloniert und p775 genannt. Das 7,4 kb große HindIII-Fragment wurde unabhängig davon in den pUC18-Vektor inkloniert und p728 genannt. Von Klon p728 wurden zwei Subklone isoliert, und zwar das 1,4 kb große PstI-Fragment in Klon p737 und das 350 bp große AluI-PstI-Fragment in Klon p754.

**[0045]** Analyse mit Restriktionsenzymen und Southern-Blot-Analyse dieser Klone (Daten nicht gezeigt) zeigten, daß die gE-Streichung in Difivac-1 2,7 kb lang ist, genau am 5'-Ende des gE-Gens beginnt und am Rand des Ug Bereichs endet. Diese 2,7 kb wurden ersetzt durch eine Duplikation eines 1 kb großen Segments, das in dem U<sub>S</sub>-Bereich gegenüber dem gE-Gen angeordnet ist, und zwar als Aberrations-Ausweitung des Repeat-Bereichs; siehe [Fig. 11B](#). Um die Ergebnisse dieser Analyse zu bestätigen und den exakten Rekombinations-Punkt zu bestimmen, wurde die Nucleotid-Sequenz nahezu der gesamten Größe des Inserts von Klon p754 bestimmt und mit den Wild-Typ-Sequenzen verglichen; siehe [Fig. 12](#). Diese Analyse zeigte, daß der Rekombinations-Punkt 77 bp strangaufwärts vom Start-Codon des gE-Gens angeordnet ist.

#### (c) Bewertung der Sicherheit und Wirksamkeit von Difivac-1

**[0046]** Difivac-1 wurde in BHV-1-seronegativen, speziell pathogen-freien Kälbern eines Alters von 7 Wochen getestet. Acht Kälber wurden intranasal mit 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> in 2 ml geimpft, von denen jeweils 1 ml in jedes Nasenloch gesprüht wurde. Acht BHV-1-seronegativen, speziell pathogen-freien Kälbern eines Alters von 7 Wochen, die in einer getrennten Isolationseinheit untergebracht waren, wurden 2 ml Kulturmedium intranasal verabreicht. Diese dienten als nicht geimpfte Kontroll-Tiere. 5 Wochen nach der Impfung wurden den geimpften und den Kontroll-Kälbern intranasal 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> des hochvirulenten BHV-1-Stamms Iowa verabreicht. 6 Wochen nach der Verabreichung wurden alle Kälber intramuskulär 5 Tage lang mit Dexamethason behandelt, um vermeintliches latentes Virus zu reaktivieren. Es wurden klinische Symptome, die Rektaltemperaturen und das Körperwachstum überwacht. Die Isolation von Viren erfolgte aus Nasen-Abstrichen, und die Titer an neutralisierendem Antikörper wurden im Serum bestimmt.

**[0047]** Nach der Impfung blieben das Verhalten, der Appetit, die Rektaltemperaturen und die Wachstumsraten der Kälber normal; die geimpften Kälber zeigten jedoch in gewissem Umfang eine Abscheidung von Serum aus der Nase und eine überstarke Speichelbildung. Verletzungen der Nasalschleimhaut wurden nicht beobachtet. Difivac-1 wurde aus Nasal-Abstrichen nach der Impfung ausgeschieden ([Fig. 17](#)). Alle geimpften Kälber erzeugten neutralisierende Antikörper gegen BHV-1.

**[0048]** Nach der Beimpfung zeigten alle ungeimpften Kontroll-Kälber Apathie, einen Appetitverlust, Abscheidungen aus den Augen und aus der Nase, eine Rötung des Zahnfleisches des Unterkiefers, starke Verletzungen der Nasalschleimhäute bis 14 Tage nach der Verabreichung und ein Anhalten des Wachstums von 4 Tagen. Die geimpften Kälber hatten kleine, schnell heilende Verletzungen der Nasenschleimhäute und zeigten kein Anhalten des Wachstums. Die klinischen Bewertungen, die Rektaltemperatur und die Wachstumsentwicklung nach der Verabreichung sind in den [Fig. 18](#), [Fig. 19](#) und [Fig. 20](#) angegeben. Nach der Verabreichung verbreiteten alle Kälber Viren aus ihrer Nase, jedoch war die Menge und die Zeitdauer der Virus-Abscheidung bei den geimpften Kälbern merklich reduziert ([Fig. 21](#)). Eine Sekundär-Antikörper-Antwort entwickelte sich in den geimpften Kälbern, und die ungeimpften Kälber erzeugten nach der Verabreichung ausnahmslos Antikörper.

**[0049]** Nach einer Reaktivierung wurde das verabreichte Virus aus einem geimpften Kalb und aus fünf ungeimpften Kälbern isoliert. Difivac-1 konnte nicht reaktiviert werden.

**[0050]** Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß Difivac-1 kaum ein Anzeichen einer Krankheit in jungen Kälbern induzierte und nicht reaktivierbar war. Difivac-1 reduzierte deutlich die Schwere der Krankheit und die Menge an Virus-Ausscheidung nach der Verabreichung.

**[0051]** Daraus wird geschlossen, daß Difivac-1 eine sichere und wirksame Vaccine zur Verwendung bei Rindern gegen BHV-1-Infektionen ist.

#### (2) Konstruktion rekombinanter gE-Streichungs-Mutanten von BHV-1

**[0052]** Um in der Lage zu sein, differenzierbare BHV-1-Vaccinen zur Verfügung zu haben, die molekular besser definiert sind als Difivac-1 und die – sofern dies erwünscht ist – eine Streichung in z. B. in dem Thymidin-kinase-Gen zusätzlich zu einer Streichung in dem gE-Gen enthalten, wurden rekombinante gE-Strei-

chungs-Mutanten zusätzlich zu Difivac-1 konstruiert. Ausgehend von der bestimmten Position des Glykoprotein gE-Gens und unter Verwendung der geklonten DNA-Fragmente, die das gE-Gen flankieren, konnte ein gE-Streichungs-Fragment konstruiert werden. Unter Verwendung einer Standard-Technik (F. L. Graham und A. J. van der Eb, 1973, *Virology* 52, 456–467) konnte dieses Streichungs-Fragment in dem Genom eines Wild-Typ-BHV-1-Stamms rekombiniert werden, was zu einer gE-Streichungs-Mutante führte.

#### (a) Konstruktion des gE-Streichungs-Fragments

**[0053]** Zur Konstruktion des gE-Streichungs-Fragments wurde nach einem Fragment gesucht, dem einerseits die gE-Sequenz fehlt und das andererseits eine ausreichende flankierende Sequenz enthält, um eine Rekombination mit dem Wild-Typ-Genom zu ermöglichen. Am 5'-Ende (strangaufwärtige Seite) wurde das 1,2 kb große PstI-AsuII-Fragment gewählt, das 18 nt vor dem Start-Codon des gE-Gens endet. Als 3'-endiges (strangabwärtiges) Fragment wurde das 1,2 kb große EcoNI-DraI-Fragment gewählt, das 2 nt vor dem Stop-Codon des gE-Gens beginnt ([Fig. 6](#)).

**[0054]** Zur Konstruktion des gE-Streichungs-Fragments wurde das 1,4 kb große PstI-SmaI-Fragment, das von dem 8,4 kb großen HindIII K-Fragment des BHV-1-Stamms Lam stammte, das auf der 5'-Seite des gE-Gens angeordnet ist, in die SmaI- und PstI-Stelle des Plasmids pUC18 subkloniert. Dieser Klon wurde p515 genannt. Das EcoNI-SmaI-Fragment, das auf der 3'-Seite von gE angeordnet war und von dem 4,1 kb großen HindIII-EcoRI-Klon kam, wurde in die einzige AsuII-Stelle von p515 kloniert. So wurde die Konstruktion des gE-Streichungs-Fragments vervollständigt, und der so konstruierte Klon wurde p519 genannt.

**[0055]** Obwohl prinzipiell das gesamte PstI-SmaI-Insert von p519 als gE-Streichungs-Fragment verwendet werden konnte, ist dies nicht ratsam. Tatsache ist, daß sich das PstI-SmaI etwa 100 bis 150 Basenpaare (bp) in die Repeat-Sequenz hinein erstreckt, die den U<sub>s</sub> Bereich flankiert. Dieses 100 bis 150 bp große Stück könnte mit der Repeat-Sequenz auf der anderen Seite des U<sub>s</sub>-Bereichs rekombinieren, wo das gE-Gen nicht angeordnet ist, und könnte so unerwünschte Rekombinations-Produkte ergeben. Aus diesem Grund wurde das PstI-DraI-Fragment für das Rekombinations-Experiment ausgewählt, so daß 100 bp der Repeat-Einheit entfernt werden.

#### (b) Rekombination des gE-Streichungs-Fragments mit dem Genom des Wild-Typ BHV-1

**[0056]** Um die Rekombination zwischen dem konstruierten gE-Streichungs-Fragment und dem Genom des Wild-Typs BHV-1 zu bewirken, wurden Mikrogramm-Mengen der beiden DNA-Moleküle gemeinsam in Rinderembryonen-Tracheazellen (Embryonal Bovine Trachea Cells; Ebtr Cells) in Übereinstimmung mit dem Standard-Verfahren von F. L. Graham und A. J. van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456–467) co-transfiziert. Celluläre Rekombinations-Mechanismen führen zur Rekombination einer geringen Prozentmenge der DNA-Moleküle (2 bis 4%), die in die Zellen inkorporiert wurden. Zur Selektion der rekombinierten gE-Streichungs-Mutante wurde die Virusmischung, die sich nach der Transfektion gebildet hatte, in eine frische Ebtr-Zellkultur disseminiert. In den meisten Fällen stammen die getrennten Virus-Populationen, die sich dabei entwickeln (Plaques) von einem Virus. Zur Isolierung der gE-Streichungs-Mutanten von BHV-1-Stamm Lam wurden 230 dieser Plaques isoliert und nach standardisierten immunologischen Verfahren mit BHV-1 spezifischen monoklonalen Antikörpern (Mabs) untersucht, die nicht mit mit Difivac-1 infizierten Zellen reagieren. Diese Mabs waren gerichtet gegen das Glykoprotein gE. 5 der 230 Plaques reagierten nicht mit diesen Mabs. Die DNA dieser 5 Plaques wurde weiter untersucht.

#### (c) DNA-Analyse der konstruierten gE-Streichungs-Mutanten des BHV-1-Stamms Lam

**[0057]** DNA-Zubereitungen von 3 (1B7, 1B8 und 2H10) der oben genannten gE-Streichungs-Mutanten wurden weiter untersucht unter Anwendung der Standard-Southern-Blot-Analyse-Technik (Sambrook et al. (1989)). Doppelumsetzungen dieser DNA-Zubereitungen mit PstI und DraI und anschließende Gel-Elektrophorese und Southern-Blot-Hybridisierung mit dem 2,3 kb großen PstI-DraI-Streichungs-Fragment als Probensonde zeigen, daß das gE-Gen des Genoms der Virus-Populationen 1B7 und 1B8 exakt in der gewünschten Weise entfernt wurde; siehe [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#). Population 2H10 hat ein abweichendes PstI-DraI-Fragment. Southern-Blot-Hybridisierungen mit einer gE spezifischen Probensonde zeigen, daß keine gE-Sequenzen in einer der drei DNA-Zubereitungen angeordnet waren (Ergebnisse sind nicht gezeigt). Die BHV-1-Virus-Populationen 1B7 und 1B8 sind die gewünschten rekombinanten gE-Streichungs-Mutanten. Die BHV-1-Virus-Population 1B7 wurde auf ihre Vaccine-Eigenschaften getestet.

## (d) Konstruktion von Thymidinkinase/gE-Doppelstreichung-Mutanten

**[0058]** Da rekombinante BHV-1-Streichungs-Mutanten mit einer Streichung in nur einem Gen in Bezug auf ihre Virulenz nicht ausreichend reduziert sein können, wurden Streichungen auch in dem Thymidinkinase-Gen (TK-Gen) der BHV-1-Stämme Lam und Harberink vorgenommen. Diese Mutanten wurden in einer Weise konstruiert, die analog zu der ist, die für die oben beschriebenen gE-Streichungs-Mutanten angewendet wurde (Ergebnisse sind nicht gezeigt). Diese TK-Streichungs-Mutanten wurden dazu verwendet, TK/gE-Doppelstreichungs-Mutanten zu konstruieren.

## (e) Konstruktion von Glykoprotein gl/Glykoprotein gE-Doppelstreichungs-Mutanten

**[0059]** Da Rinder, die mit einer einzelnen gE-Streichungs-Mutante geimpft werden, anti-gl-Antikörper produzieren können, die den Nachweis von Anti-gl/gE-Antikörpern stören können (siehe nachfolgende Beschreibung) wurde auch eine Vaccine mit einer gl/gE-Doppelstreichung erfunden. Eine derartige gl/gE-Doppelstreichungs-Mutante kann unter Anwendung derselben Verfahrensweisen konstruiert werden, die für die Konstruktion der gE-Einzelstreichungs-Mutanten angewendet wurden. Eine partielle Nucleotid-Sequenzanalyse des strangaufwärts gelegenen Endes des 1,8 kb großen PstI-Fragments, das das 5'-Ende des gE-Gens abdeckt, offenbarte einen offenen Leserahmen mit signifikanter Homologie zu gl-Homologen, die in anderen Herpesviren gefunden wurden (siehe [Fig. 13](#) und [Fig. 14](#)). Unter Verwendung des 350 bp großen SmaI-PstI-Fragments, das das vermeintliche 5'-Ende des gl-Gens und das EcoNI-SmaI-Fragment umfaßt, die strangabwärts vom gE-Gen gelegen sind, kann ein gl/gE-Streichungs-Fragment konstruiert werden. Dieses Fragment kann mit dem Wild-Typ-Genom rekombiniert werden und führt zu einer BHV-1-gl/gE-Streichungs-Mutante; siehe [Fig. 16](#). Die 80 bis 90 Aminosäuren, die – theoretisch – noch erzeugt werden können, sind nicht in der Lage, Antikörper herauszubringen, die den Nachweis von Anti-gl/gE-Antikörpern stören können. Eine weitere Sequenzanalyse des gl-Gens erlaubt die Konstruktion einer gl-Streichung, die den kompletten für gl codierenden Bereich abdeckt. Diese gl/gE-Doppelstreichungs-Mutante wurde Difivac-IE genannt.

(f) Bewertung von Sicherheit und Wirksamkeit der Lam gE<sup>-</sup>- und der Lam gE<sup>-</sup> TK<sup>-</sup> Mutanten

**[0060]** Die Vaccine-Eigenschaften der Lam gE-Mutante und der Lam gE, TK<sup>-</sup>-BHV-1-Mutantenstämme wurden in 7 Wochen alten, BHV-1 seronegativen, von spezifischen pathogenfreien Kälbern getestet. Jeder Mutantenstamm wurde intranasal in 6 Kälber gesprüht. Jedem Kalb wurde eine Totaldosis von 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> in 2 ml Kulturmedium verabreicht, wovon jeweils 1 ml in jedes Nasenloch gesprüht wurde. Weiteren 6 Kälbern wurde intranasal virusfreies Kulturmedium eingesprüht. Diese dienten als ungeimpfte Kontroll-Tiere. 5 Wochen nach der Impfung wurde allen Kälbern, und zwar sowohl den geimpften als auch den Kontroll-Tieren, intranasal 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> des hochvirulenten BHV-1-Stamms Iowa verabreicht. Nach Impfung und Verabreichung wurden klinische Symptome, Rektaltemperaturen und Körpergewicht aufgezeichnet. Nasal-Abstriche wurden zur Bestimmung der Zahl der Tage einer nasalen Verbreitung des Virus herangezogen.

**[0061]** Nach der Impfung blieben Verhalten, Appetit, Rektaltemperatur und Wachstumsraten der Kälber normal. Seröse Abscheidungen aus der Nase und kleine Verletzungen der Nasenschleimhaut wurden bei allen geimpften Kälbern beobachtet. Der Virus konnte aus den Nasen der geimpften Kälber etwa 7 Tage isoliert werden (Tabelle 1).

**[0062]** Nach der Verabreichung zeigten alle ungeimpften Kontroll-Kälber Apathie, Appetitverlust, Abscheidungen aus Augen und Nase, Rötung des Zahnfleisches des Unterkiefers, starke Verletzungen der Nasenschleimhäute, und das Wachstum war reduziert. Die mit Lam gE<sup>-</sup>, TK<sup>-</sup> geimpften Kälber erbrachten in gewissem Umfang Abscheidungen aus der Nase und zeigten einige geringere Verletzungen der Nasenschleimhäute. Nicht alle mit Lam gE<sup>-</sup> geimpften Kälber hatten Abscheidungen aus der Nase oder Verletzungen der Nasenschleimhäute. Apathie, Appetitverlust oder andere klinische Symptome einer Krankheit wurden bei den geimpften Kälbern nicht beobachtet. Die Rektaltemperatur, das Wachstum und die klinische Bewertung nach der Verabreichung sind in den [Fig. 22](#), [Fig. 23](#) und [Fig. 24](#) gezeigt. Ungeimpfte Kälber scheiden Viren aus der Nase zweimal länger ab als geimpfte Kälber (Tabelle 1).

**[0063]** Die obigen Ergebnisse zeigen, daß die BHV-1-Mutantenstämme Lam gE<sup>-</sup> und Lam gE<sup>-</sup>, TK<sup>-</sup> kaum irgendwelche klinischen Anzeichen einer Krankheit in jungen Kälber induzierten. Beide Mutantenstämme verhinderten eine Krankheit nach der Verabreichung von Viren und reduzierten die Zeitdauer der Virus-Verbreitung über die Nase um 50%.

**[0064]** BHV-1-Mutantenstämme Lam gE<sup>-</sup> und Lam gE<sup>-</sup>, TK<sup>-</sup> sind sicher und wirksam bei der Verwendung als

Vaccine in Rindern gegen BHV-1-Infektionen.

### (3) Prokaryotische Expression von gE

**[0065]** Zur prokaryotischen Expression des BHV-1-Glykoprotein gE-Gens kamen bisher PGEX-Expressions-Vektoren zum Einsatz (D. B. Smith und K. S. Johnson, Gene 67 (1988), 31–40). pGEX-Vektoren codieren für das Trägerprotein Glutathion S-Transferase (GST) von *Schistosoma japonicum*, das unter dem Einfluß des tac-Promoters steht, der durch Expression durch Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert werden kann. Ein Beispiel eines GST-gE-Fusionsproteins ist das Produkt des Konstrukts pGEX-2T600s3 ([Fig. 8A](#)). In diesem Konstrukt wurde unter Verwendung von standardisierten molekularbiologischen Techniken (Sambrook et al., 1989) ein 600 bp großes *Sma*I-Fragment, das für den N-terminalen Bereich von 200 Aminosäuren des gE-Proteins codiert, hinter das GST-Gen gebunden. Dieses Konstrukt wurde in drei Exemplaren entworfen, wobei jedes Mal ein unterschiedlicher Leserahmen des 600 bp-Fragments an die GST gebunden wurde. Alle drei Konstrukte wurden in *Escherichia coli*-Stämme DH5a eingesetzt, und mit IPTG induziert. Die gebildeten Proteine wurden mittels Western-Blotting nach Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Nitrocellulose übertragen. Ein immunologischer Nachweis mit Anti-GST-Antikörpern zeigte, daß nur der richtige Leserahmen (Nr. 3), der für den gE-Protein-Bereich codiert, zur Expression eines hervorragenden Fusionsproteins der vorausgesagten Größe von 27 k (GST) + 20 k (gE) = 47 k führte. Drei der Mabs, die im Rahmen der Erfindung isoliert wurden und nicht mit Difivac-1 reagieren, erkennen das 47 kD GST-gE-Fusionsprotein in einem Western-Blot (siehe [Fig. 8B](#)).

### (4) Eukaryotische Expression des Glykoprotein gE-Gens

**[0066]** Für die eukaryotische Expression des Glykoprotein gE-Gens wurde bisher unter anderem der Vektor pEVHis gewählt. Der pEVHis-Vektor hat als eukaryotischen Marker das HisD-Gen, das für die Histidinol-Dehydrogenase [EC 1.1.1.23] codiert (C. Hartmann und R. Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8047–8051). Dies ermöglicht es Zellen, die toxische Konzentration von 2,5 mM Histidinol zu überleben. Darüberhinaus umfaßt der Vektor den Promotor-Bereich des unmittelbaren frühen Gens des menschlichen Cytomegalovirus (Human Cytomegalovirus; HCMV), wobei einzigartige Restriktionsenzym-Stellen danach angeordnet sind.

**[0067]** Zur Konstruktion eines pEVHis/gE-Expressions-Vektors wurde Gebrauch gemacht von einem Fragment, das den gesamten codierenden Bereich des Glykoprotein gE-Gens umfaßt. Er beginnt an der *Alu*I-Stelle 55 bp vor dem postulierten offenen Leserahmen von gE und endet 133 bp danach. Dieser Bereich wurde hinter den HCMV-Promotor des pEVHis-Vektors kloniert, wodurch das Konstrukt pEVHis/gE gebildet wurde ([Fig. 9](#)). Das pEVHis/gE-Konstrukt wurde in *E. coli* DH5a-Zellen amplifiziert und mittels eines Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigt (Sambrook et al., 1989). Diese gereinigte DNA wurde nach dem Verfahren von Graham und van der Eb in Balb/C-3T3-Zellen transfektiert. Transformierte Zellen wurden mit Histidinol selektiert, wonach 20 gegen Histidinol resistente Kolonien isoliert werden konnten. Diese Kolonien wurden mit Mab 81 mittels eines Immuno-Peroxidase-Monolayer-Assays (IPMA) untersucht. Es zeigte sich, daß 4 Kolonien das gE-Protein exprimieren. Von diesen 4 Kolonien wurde der 3T3-gE-Klon 9 zur Isolation eines Subklons verwendet, der eine hohe gE-Expression hatte. Der nach diesem Verfahren isolierte Klon (genannt 3T3gE9,5) wurde zur Charakterisierung der entsprechenden anti-gE monoklonalen Antikörper verwendet.

### (5) Eukaryotische Expression sowohl des BHV-1-Glykoproteins gE als auch des BHV-1-Glykoproteins gI in derselben Zelle

**[0068]** Um das BHV-1-Glykoprotein gI in derselben Zellen wie das BHV-1-Glykoprotein gE zu exprimieren, wurde zuerst die vermeintliche Position des BHV-1-gI-Gens bestimmt. Da das Herpes simplex-Virus-Glykoprotein gI-Gen unmittelbar strangaufwärts von dem Glykoprotein gE-Gen angeordnet ist, wurde geschlossen, daß das BHV-1-gI-Gen an einer entsprechenden Position angeordnet ist. Um dies zu testen, wurde die Sequenz eines Bereichs von 283 Nucleotiden bestimmt, die etwa 1 kb strangaufwärts vom Beginn des BHV-1-gE-Gens angeordnet sind. Eine im Entwurf vorliegende Translation dieses Bereichs zeigte, daß der zweite Leserahmen für eine aus 94 Aminosäuren bestehende Sequenz codiert, die homolog zu der Sequenz des Herpes simplex-Virus-Glykoproteins gI ist ([Fig. 13](#) und [Fig. 14](#)). Da das homologe Segment etwa 80 Aminosäuren vom Start-Codon entfernt liegt, wurde geschätzt, daß der vermeintliche Beginn des offenen Leserahmens des BHV-1-gI-Gens etwa 250 nt strangaufwärts vom sequenzierten Bereich ist. Daraus wurde geschlossen, daß das 1,7 kb große *Sma*I-Fragment, das 400 nt strangaufwärts von dem sequenzierten Bereich beginnt und innerhalb des gE-Gens endet, den kompletten codierenden Bereich des BHV-1-gI-Gens enthält. Dieses 1,7 kb große *Sma*I-Fragment wurde in den eukaryotischen Vektor MSV-neo kloniert (siehe [Fig. 15](#)). Dieser Vektor enthält den starken Mause-Sarcoma-Virus-Promoter (Murine Sarcoma Virus Promoter; MSV-Promoter) und



das Selektor-Gen neo, das für die Resistenz gegen das Antibiotikum G-418-Sulphat Geneticin codiert. Das resultierende Konstrukt MSVneoGI wurde E. coli DH5a-Zellen amplifiziert und in 3T3gE-9,5-Zellen transfektiert, wofür man das Verfahren von Graham und van der Eb anwendete. Die transfektierten Zellen wurden mit 400 µg Geneticin/ml Kulturmedium selektiert, und die resistenten Kolonien wurden isoliert und mit den Anti-gE-Mabs getestet, die nicht mit 3T3gE-9,5-Zellen reagierten. Daraus wurde der 3T3gE/gI-R20-Klon selektiert, der mit z. B. Mab 66 reagierte, wie dies auch der Wild-Typ BHV-1 tut.

#### (6) Charakterisierung der jeweiligen Anti-gE-Mabs

**[0069]** Mabs wurden gegen Wild-Typ BHV-1 produziert und im Hinblick auf ihr Unvermögen zur Reaktion mit mit Difivac-1 infizierten Rinderembryonen-Tracheazellen (Ebtr-Zellen) selektiert. Diese Mabs wurden untersucht auf ihre Reaktivität mit

- (a) der Lam gE<sup>-</sup>-Streichungs-Mutante;
- (b) dem oben beschriebenen prokaryotischen Expressionsprodukt in einem Western-Blot;
- (c) dem oben beschriebenen, gE exprimierenden Balb/c-3T3-Zellen;
- (d) unter (c) genannten Zellen, die mit Difivac-1 infiziert waren; und
- (e) Balb/c-3T3-Zellen, die den gE/gI-Komplex exprimieren.

**[0070]** Zum Reaktivitäts-Test bei (a), (c), (d) und (e) wurde ein Immunoperoxidase-Monolayer-Assay (IPMA) verwendet. Die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, daß Mabs produziert wurden, die gerichtet sind gegen gE (Nr. 2, 3, 4, 52, 66, 68, 72 und 81) und Mabs, die gerichtet sein können gegen konformationelle Antigen-Domänen auf dem gE/gI-Komplex (Nr. 1, 51, 53, 67, 75 und 78). Ein Konkurrenz-IPMA zum Kartieren der Antigen-Domänen, die durch die verschiedenen Mabs erkannt wurden, zeigte, daß wenigstens vier Antigen-Domänen auf dem Glykoprotein gE vorhanden sind und daß eine Domäne wahrscheinlich durch den gE/gI-Komplex gebildet wird (Tabelle 2).

#### Nachweis von Anti-gE-Antikörpern in Rindern, die durch BHV-1 infiziert sind

**[0071]** Um zu untersuchen, ob im Serum infizierter Rinder Antikörper gegen gE vorhanden sind, wurde ein indirekter Blocking-IPMA mit den 16 gE-Mabs und den folgenden ausgewählten 8 Seren durchgeführt:

- 2 Seren von Rindern, die mit Difivac-1 geimpft waren und denen der virulente Iowa-Stamm verabreicht worden war, wobei die Seren 14 Tage nach der Verabreichung abgenommen worden waren;
- 2 Seren von Rindern, die experimentell mit BHV-1-Subtyp 1-Virus infiziert worden waren, wobei die Seren 20 Monate nach der Infektion abgenommen worden waren; eines der Rinder war durch Kontakt infiziert worden; 29
- 2 Seren von Rindern, die experimentell mit BHV-1-Subtyp 2B-Virus infiziert worden waren, wobei die Seren 20 Monate nach der Infektion abgenommen worden waren; eines der Rinder war durch Kontakt infiziert worden;
- 1 Serum eines von speziellen Pathogenen freien Kalbs, das mit einer ts-Mutanten-Vaccine geimpft worden war und dem 3 Wochen später BHV-1-Subtyp 2B-Virus verabreicht worden war, wobei das Serum 7 Wochen nach der Verabreichung abgenommen worden war;
- Serum eines gnotobiotischen Kalbs, das mit einer ts-Mutanten-Vaccine geimpft worden war und dem 3 Wochen später BHV-1-Subtyp 2B-Virus verabreicht worden war, wobei das Serum 7 Wochen nach der Verabreichung abgenommen worden war.

**[0072]** Tabelle 2 zeigt, daß alle diese Seren Antikörper gegen die Antigen-Domänen III und IV auf gE und gegen die Antigen-Domäne I, die wahrscheinlich auf dem gE/gI-Komplex angeordnet ist, enthielten. Es kann daraus geschlossen werden, daß gE ein geeigneter serologischer Marker zur Unterscheidung zwischen mit BHV-1 infizierten und geimpften Rindern zu sein scheint.

#### (7) Nachweis von BHV-1-Nucleinsäuren mittels der PCR-Verfahrensweise unter Verwendung von auf BHV-1-gE spezifischen Primern

**[0073]** Ausgehend von der bestimmten Nucleotid-Sequenz des BHV-1-gE-Gens wurde ein Primer-Paar unter Verwendung des Primer-Selektionsprogramms von Lowe et al. ausgewählt, das für die PCR geeignet ist (T. Lowe, J. Sharefkin, S. Qi Yang und C. W. Dieffenbach, Nucleic Acids Res. 18, 1990, 1757–1761). Diese Primer wurden P<sub>3</sub> und P<sub>4</sub> genannt und sind in [Fig. 10](#) gezeigt. Die Primer sind 159 nt entfernt angeordnet und führen zur Amplifikation eines Fragments von 200 nt. Unter Verwendung der Primer P<sub>3</sub> und P<sub>4</sub> und von isolierter BHV-1-DNA wurden die Bedingungen für die PCR-Verfahrensweise optimiert. Dies schloß insbesondere die Variation der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, der Glycerin-Konzentration und der Zyklisierungsbedingungen ein. Der op-

timale Puffer, der für die Verwendung  $P_3$  und  $P_4$  bei der Amplifikation von BHV-1-DNA gefunden wurde, ist 10 mM Tris (pH-Wert: 8,0), 50 mM KCl, 0,01% Gelatine, 2,6 mM  $MgCl_2$  und 20% Glycerin. Die gefundenen optimalen Zyklusbedingungen (Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler) wurden gefunden für die Zyklen 1 bis 5 zu 1 min bei 98°C, 30 s bei 55°C und 45 s bei 72°C, und für die Zyklen 6 bis 35 zu 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 45 s bei 72°C. Nach der PCR-Amplifikation wurde das erhaltene 200 nt große DNA-Fragment auf einem 2%igen Agarosegel einer Elektrophorese unterzogen, auf Nitrocellulose aufgetüpfelt und danach einer Southern-Blot-Analyse unterworfen. Die mit  $^{32}P$ -dCTP markierte Probensonde, die für die Southern-Blot-Analyse verwendet wurde, war das 137 bp große TaqI-Fragment, das zwischen den Primer-Bindungsstellen ([Fig. 10](#)) angeordnet ist. Nach Autoradiographie der hybridisierten Filter kann eine 200 bp-Bande beobachtet werden. Auf diesem Wege führt eine Amplifikation von nur 10 BHV-1-Genomen (etwa  $1,5 \times 10^{-15}$  µg DNA) noch zu einem brauchbar nachweisbaren Signal (Ergebnis nicht gezeigt). In einer vergleichbaren Weise wurde eine PCR-Verfahrensweise unter Verwendung von Primern entwickelt, die auf der codierenden Sequenz des BHV-1-Glykoproteins gIII basieren (D. R. Fitzpatrick, L. A. Babiuk und T. Zamb, *Virology* 173 (1989), 46–57). Um zu ermöglichen, daß eine Unterscheidung zwischen einer Wild-Typ-BHV-1-DNA und einer gE-Streichungs-Mutanten-Vaccine getroffen werden kann, wurden DNA-Proben sowohl einer gE-spezifischen PCRA-nalyse als auch einer gIII-spezifischen PCR-Analyse unterzogen. In einem solchen Test wurde gefunden, daß eine Difivac-1-DNA-Zubereitung gegenüber gIII positiv und gegenüber gE negativ war.

**[0074]** Da der Nachweis von BHV-1-DNA in Rindersamen ein wichtiges Anwendungsfeld der BHV-1-spezifischen PCR-Verfahrensweise sein wird, wurde versucht, die gE-spezifische PCR an Rindersamen durchzuführen, der mit BHV-1 infiziert war. Jedoch haben unbekannte Komponenten in dem Samen eine starke inhibitorische Wirkung auf die Polymerase-Kettenreaktion. Daher wurde eine Verfahrensweise zum Isolieren der BHV-1-DNA aus Rindersamen entwickelt. Um die DNA aus Rindersamen zu isolieren, wurden 30 µl Samen mit 1 mg/ml Proteinase K (pK) in einem Gesamtvolumen von 300 µl 0,15 M NaCl, 0,5% Na-Sarkosyl und 40 mM DTT bei 60°C inkubiert. Nach 1 h ließ man die Probe auf Raumtemperatur abkühlen, und es wurden 300 µl 6 M NaI zugesetzt. Die Mischung wurde 5 min lang inkubiert. Aus dieser Mischung wurde die DNA mit einer Standard-Chloroform-Isoamylethanol-Extraktion isoliert und mit 1 Volumenteil Isopropanol ausgefällt. Das Präzipitat wurde mit 2,5 M  $NH_4Ac$ /70% Ethanol gewaschen und in 10 mM Tris (pH-Wert: 7,4), 1 mM EDTA, 0,5% Tween® 80 und 0,1 mg/ml pK für eine zweite Inkubation für die Zeit von 1 h bei 60°C resuspendiert. Diese DNA-Zubereitung kann direkt der Polymerase-Kettenreaktion unterzogen werden.

#### Beschreibung der Figuren

**Fig. 1:** Southern-Blot-Analyse der BHV-1-Stämme Difivac-1 und Iowa

**[0075]** (A) Zeichnung eines Autoradiogramms eines Southern-Blot von Difivac-1-Genom-DNA und Iowa-Genom-DNA. In den Spuren 1 und 3 wurde Difivac-1-DNA aufgebracht nach Restriktionsenzym-Verdauung mit HindIII bzw. PstI. In den Spuren 2 und 4 wurde Iowa-DNA aufgebracht nach Restriktionsenzym-Verdauung mit HindIII bzw. PstI. Die Größe der Fragmente ist in Kilobasen (kb) angegeben.

**[0076]** Virus-DNA wurde isoliert durch Zentrifugieren des Kulturmediums (70 ml/Walzenflasche von ca. 450 cm<sup>2</sup>) mit mit Virus infizierten Ebtr-Zellen für die Zeit von 2 h durch einen 25% (w/w) Sucrose-Puffer in 10 mM Tris (pH-Wert: 7,4), 150 mM NaCl und 1 mM EDTA bei 20 kUpm im SW27-Rotor der Beckman-L5-65-Ultrazentrifuge. Aus dem so erhaltenen Virus-Pellet wurde DNA nach Standard-Verfahren isoliert (J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)). An dieser DNA wurden Restriktionsenzym-Verdauungen durchgeführt mit Enzymen von Boehringer (Mannheim) in den SuRE/Cut-Puffern, die vom Hersteller geliefert werden.

**[0077]** Nach Trennung auf einem 0,7%-Agarosegel für eine horizontale Elektrophorese und Blotten auf einem Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schüll, Inc.) wurde das Filter 6 h lang bei 42°C in 50% Formamid, 3 × SSC (1 × SSC = 0,15 mM NaCl und 0,015 M Na-Citrat; pH-Wert: 7,4), 50 µl denaturiertem Lachssperma-DNA (Sigma)/ml und 0,02% Rinderserumalbumin, 0,02% Polyvinylpyrrolidon und 0,02% Ficoll® und 0,1% Na-Dodecylsulfat (SDS) prähybridisiert. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung durch Zusatz des mit  $^{32}P$  dCTP (Amersham) markierten HindIII-K-Fragments zu derselben Lösung. (Die Wahl des HindIII-K-Fragments basiert auf Klonieren und Spaltstellen-Kartieren der DNA von Rinder-Herpesvirus 1 (Cooper-Stamm); siehe John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOort, Alphonso R. Campbell und David A. Reed, *Journal of Virology* (1983), 259–264). Nach 12 bis 14 h Hybridisieren wurde das Filter 2 h lang in 0,1% SDS und 0,1 × SSC bei 60°C gewaschen. Das HindIII-K-Fragment wurde in den pUC18-Vektor kloniert, und zwar in Übereinstimmung mit Standard-Klonierungs-Verfahren (J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)). Nach HindIII-Verdauen des

pUC/8,4 HindIII-Klons wurde der pUC18-Vektor von dem 8,4 kb HindIII-K-Fragment durch Elektrophorese auf einem 0,7%-Agarosegel mit niedrigem Schmelzpunkt (BRL; Life Technologies, Inc.) wieder getrennt und wurde von der Agarose durch Standard-Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation isoliert. Das isolierte HindIII-K-Fragment wurde mit dem Random-Primed-DNA-Labeling-Kit 1004.760 der Firma Boehringer (Mannheim) markiert. Eine Autoradiographie der hybridisierten Filter erfolgte durch 36-stündige Belichtung eines Kodak-XARFilms bei  $-70^{\circ}\text{C}$  unter Verwendung eines reflektierenden Schirms.

**[0078]** (B) Physikalische Kartierungen des 8,4 kb-HindIII-K-Fragments des Iowa-Stamms und des 7,4 kb HindIII K-Fragments von Difivac-1. Im Hinblick auf die gemeinsame Wanderung der 6 kb PstI-Fragmente und das Fehlen des 1,8 kb PstI-Fragments in Difivac-1 wird die Streichung in dem schraffierten Bereich postuliert.

**Fig. 2:** Subklonieren von Wild-Typ-BHV-1-Fragmenten um den in Difivac-1 fehlenden Bereich herum

**[0079]** In **Abb. 2A** sind die Komponenten des BHV-1-Genoms gezeigt: Der Unique Long ( $U_L$ )-Bereich, der Unique Short ( $U_S$ ) Bereich und die beiden Repeat-Sequenzen (Ir und Tr). Diese Kartierung basiert auf der publizierten Analyse des Cooper-Stamms (John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOort, Alphonso R. Campbell und David A. Reed, Journal of Virology (1983), 259–264).

**[0080]** In B sind die Fragmente vom  $U_S$  Bereich gezeigt, die in prokaryotische Vektoren kloniert wurden: ein 15,2 kb EcoRI-Fragment in pACYC, ein 8,4 kb HindIII-Fragment in pUC18 und ein 2,7 kb großes und ein 4,1 kb großes EcoRI-HindIII-Fragment in pBR322. Die Isolierung der Virus-DNA-Fragmente wurde durchgeführt in Übereinstimmung mit den Verfahrensweisen, die genannt sind in den Erklärungen von **Fig. 1A**. Die Klonierung dieser Fragmente in die verschiedenen Vektoren erfolgte in Übereinstimmung mit Standard-Verfahrensweisen (J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, Molecular cloning: a laboratory manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)).

**[0081]** In **Abb. 2C** ist eine physikalische Kartierung des Bereichs gezeigt, in dem die postulierte Streichung in Difivac-1 lokalisiert ist.

**[0082]** In **Abb. 2D** sind einige Subklone dieses Bereichs angegeben, die für eine weitere Analyse verwendet wurden. Die beiden PstI-Fragmente wurden in pKUN19 kloniert, und die verbleibenden Fragmente wurden in pUC18 kloniert.

### **Fig. 3**

**[0083]** (A) Nucleotid-Sequenz aus 2027 Nucleotiden von  $U_S$  Bereich des BHV-1-Stamms Lam, um den postulierten Bereich, der in Difivac-1 gestrichen war, wie dies in **Fig. 2C** angegeben ist [von der AluI-Erkennungsstelle auf der extrem linken zur HincII-Erkennungsstelle auf der extrem rechten Seite]. Die Nucleotid-Sequenz in den Inserts der Subklone, die in **Fig. 2D** gezeigt sind, wurde bestimmt durch Analyse an den beiden Strängen unter Verwendung der Dideoxy-Sequenz-Methode von Sanger et al. (F. Sanger, S. Nicklen und A. R. Coulson, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467). Hierfür wurde das T7-Sequenz-Kit der Firma Pharmacia in Übereinstimmung mit der Verfahrensweise verwendet, die durch den Hersteller speziell beschrieben wurde. Für die radioaktive Markierung wurde [ $^{35}\text{S}$ ] dATP (Firma Amersham) verwendet. Die Sequenzanalyse der GC-reichen Bereiche mit Kompressions-Artefakten wurde mit der 7-Deaza-dGTP-Variante des Pharmacia-Kits wiederholt. Unter der Nucleotid-Sequenz ist im 3-Buchstaben-Code die Aminosäure-Sequenz (aa) des offenen Leserahmens aus 575 aa-Resten angegeben, die nach erster Translation der Nucleotid-Sequenz gefunden wurde. Diese Translation beruht auf dem universellen Code und wurde bestimmt unter Verwendung des PC/Gene-Computerprogramms (PC/gene, Version 1.03; November 1987). Dieser offene Leserahmen mit 575 aa beginnt mit dem Methionin in Position nt 168 und endet mit dem Stop-Codon am Nucleotid 1893.

**[0084]** Eine Strukturanalyse des offenen Leserahmens aus 575 aa-Resten wurde ebenfalls mit dem PC/Gene-Computerprogramm durchgeführt. Die ersten 26 aa bilden ein eukaryotisches Export-Signal, das in der Figur die Bezeichnung "Signalpeptid" erhalten hat. Mit einer Bewertung von 6,2 ist die Spaltung dieser Signal-Sequenz zwischen aa 26 und aa 27 vorausgesagt. Die Sequenz von 575 aa hat drei mögliche N-gebundene Glykosylierungsstellen (NXT/S), die durch eine Linie unter den Aminosäure-Resten angegeben ist. Entsprechend der Verfahrensweise von Rao und Argos gibt es einen Transmembran-Bereich zwischen aa 423 und aa 450, der durch die Bezeichnung "Transmembran-Helix" in der Figur bezeichnet ist. Erkennungssequenzen (Stellen) für die Restriktionsenzyme AsuI, SmaI, HindIII und EcoNI sind unterstrichen. Das berechnete Molekulargewicht dieses Polypeptids beträgt 61.212.



**[0085]** (B) Schematische Wiedergabe der charakteristischen Struktureigenschaften des oben genannten 575 aa langen, offenen Leserahmens.

**Fig. 4:** Aminosäure-Vergleich der Aminosäure-Sequenz des BHV-1-gE-Gens mit der Aminosäure-Sequenz des Herpes simplex-Virus-(HSV-)gE-Gens und anderen homologen gE-Genen [Pseudo-Tollwut-Virus-(pseudorabies virus: PRV-)gI und Varicella-Zoster-(VZV-)gpl]

**[0086]** Die für diesen Vergleich verwendeten Sequenzen ergaben sich aus den folgenden Publikationen: HSV: Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1; D. J. McGeoch, A. Dolan, S. Donald und F. J. Rixon, Journal Mol. Biol. 181 (1985), 1–13. VZV: DNA sequence of the U<sub>S</sub> component of the varicella-zoster virus genome; A. J. Davidson, EMBO Journal 2 (1983), 2203–2209. PRV: Use of Igt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simplex virus and varicella-zoster virus glycoproteins; E. A. Petrovskis, J. G. Timmins und L. E. Post, Journal of Virology 60 (1986), 185–193. Diese Sequenzen wurden verglichen unter Verwendung des Sequenzanalyse-Programms Multalin (F. Corpet, Nucl. Acids Res. 16 (1988), 10881–10890).

**[0087]** In A ist ein Diagramm gezeigt, in dem alle vier Aminosäure-Sequenzen schematisch gezeigt sind. Darin sind die vorausgesagten Transmembranbereiche (TM) jeweils untereinander gezeigt. Zusätzlich zu den vorhergesagten Export-Signal-Sequenzen (SP) und den möglichen N-gebundenen Glykosylierungsstellen (I) sind zwei konservierte Bereiche gezeigt, in denen die relative Position der Cystein-Reste oft unverändert ist (C C).

**[0088]** In B sind die Ergebnisse des Multalin-Vergleichs des zentral angeordneten Cystein-reichen Bereichs der vier gE-Versionen gezeigt. Sternchen zeigen identische Aminosäuren an, und Doppelpunkte zeigen analoge Aminosäuren an.

**Fig. 5:** Zeichnungen von Photographien, die bei einer Southern-Blot-Analyse von Difivac-1 und Iowa erhalten wurden

**[0089]** Platte A: Genom-DNA von Difivac-I- und Iowa-Restriktionsenzym-Verdauungen mit BstI (1, 2), EcoRI (3, 4) und HindIII (5, 6), getrennt auf einem 0,7%-Agarosegel, geblottet auf Nitrocellulose und hybridisiert mit einem <sup>32</sup>P-markierten HindIII-K-Fragment von BHV-1-Stamm Lam, gemäß den in der Erläuterung von **Fig. 1A** spezifizierten Verfahrensweisen.

**[0090]** Platte B: Nitrocellulose-Blot desselben Gels wie in A nach Hybridisierung mit der für BHV-1-gE spezifischen Probensonde p318. Diese Probensonde umfaßt den gesamten AluI-HincII-Bereich, wie er in **Fig. 2C** angegeben ist.

**Fig. 6:** Konstruktion des gE-Streichungs-Fragments BHV-1

**[0091]** In A ist die Position des gE-Gens und der verwendeten Klone gezeigt. Die Komponenten des BHV-1-Genoms sind: der Unique Long-(U<sub>L</sub>-)Bereich, der Unique Short-(U<sub>S</sub>-)Bereich und die beiden Repeat-Bereiche (Ir und Tr). Um den auf der 5'-Seite des gE-Gens angeordneten Bereich zu erhalten, wurde das 1,4 kb große PstI-SmaI-Fragment des 8,4 kb großen HindIII-K-Fragments des BHV-1-Stamms Lam in die SmaI- und PstI-Stelle des Plasmids pUC18 subkloniert. Dieser Klon wurde p515 genannt und ist in B gezeigt. Das EcoNI-SmaI-Fragment, das auf der 3'-Seite von gE angeordnet ist, und von dem 4,1 kb großen HindIII-EcoRI-Klon stammt, wurde in die einzige AsuII-Stelle von p515 kloniert. Um die Bindung des EcoNI-Restes an den AsuII-Rest zu ermöglichen, wurde Klon p515 mit AsuII verdaut, anschließend mit Klenow-Enzym (Firma Boehringer Mannheim) und dCTP nach Standard-Verfahrensweisen (Sambrook et al. (1989)) behandelt und so ein Cytosin-Rest in dem AsuII-Rest geschaffen. Dieser zusätzliche Cytosin-Rest ist in D durch ein Sternchen angegeben. Danach wurde p515 auch mit dem SmaI-Enzym verdaut, wonach das EcoNI-Fragment in diesen Vektor eingebunden werden konnte. Der so aufgebaute Klon wurde p519 genannt.

**Fig. 7**

**[0092]** (A) Zeichnung einer Photographie, die bei einer Southern-Blot-Analyse der DNA-Zubereitungen von 1B7, 1B8 und 2H10 erhalten wurde. Die DNA-Isolierung, die Restriktionsenzym-Behandlungen, das Blotten und die Hybridisierung wurden in Übereinstimmung mit den Verfahrensweisen durchgeführt, die in den Anmerkungen zu **Fig. 1A** beschrieben sind. Nach doppelter Verdauung der DNA-Zubereitungen 1B7, 1B8 und 2H10 mit PstI-DraI wurden die Fragmente auf einem 0,7%-Agarosegel getrennt und danach auf einem Nitrocellulo-

se-Filter geblottet. Dieses Filter wurde mit dem mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP markierten, 2,3 kb großen PstI-DraI-Streichungs-Fragment als Probensonde hybridisiert. In den Spuren 1 bis 3 wurden die Proben 1B7, 1B8 und 2H10 jeweils getrennt voneinander getrennt. In Spur 4 wurde Wild-Typ-BHV-1-DNA des Stammes Lam aufgetragen, und in Spur 5 wurde das 2,3 kb-Streichungs-Fragment aufgetragen.

**[0093]** (B) Physikalische Kartierung des 15,2 kb-EcoRI-Fragments des BHV-1-Stammes Lam. Die Kartierung zeigt die Position der Erkennungsstellen für PstI, DraI und HindIII sowie die Position der Hybridisierungs-Probensonde, wie sie in Punkt 7A erwähnt wurde.

**Fig. 8:** Prokaryotische Expression von BHV-1-gE

**[0094]** Für die prokaryotische Expression von BHV-1-gE wurde das 600 bp große SmaI-Fragment des gE-Gens in drei Leserahmen an den codierenden Bereich des Glutathion-S-Transferase-Gens von *Schistosoma japonicum* in dem Vektor pGEX-2T gebunden (D. B. Smith und K. S. Johnson, Gene 67 (1988), 31–40). Rekombinante Moleküle mit der richtigen (syn) Orientierung des SmaI-Fragments wurden mittels Restriktionsenzym-Analyse unter Verwendung von Standard-Verfahren identifiziert. *E. coli*-DH5a-Klone mit diesem Fusionskonstrukt wurden pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2, und pGEX-2T600s3 genannt.

**[0095]** (A) Diagramm eines pGEX-2T600s-Konstrukts. Angeordnet auf der  $\text{NH}_2$ -Seite des Bereichs, der für das GST-gE-Fusionsprodukt codiert, ist der mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) induzierbare tac-Promoter-Bereich.

**[0096]** (B) Zeichnungen von Photographien, die bei einer Western-Blot-Analyse der Gesamtprotein-Zubereitungen von DH5a-Zellen erhalten wurden, die mit pGEX-2T600s trans-formiert waren. Über-Nacht-Kulturen von DH5a-Zellen, die mit den Konstrukten pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 und pGEX-2T600s3 transfektiert worden waren, wurden weiter 1/10 in Luria-Bertani (LB) Medium mit 50 µg/ml Ampicillin behandelt, und nach 1 h wurde ein Wachstum mit IPTG 5 h lang induziert. Diese induzierten Kulturen wurden 5 min bei  $6.000 \times g$  zentrifugiert und in  $1 \times$  Layermix (2% SDS, 10% Glycerin, 5% Mercaptoethanol und 0,01% Bromphenolblau) eingearbeitet. [1,5 ml Kultur wurde in 500 µl Layermix eingearbeitet]. Das Produkt wurde bei  $95^\circ\text{C}$  5 min lang erhitzt. Anschließend wurden 50 µl pro Spur auf einem vertikalen 12,5%-Polyacrylamidgel nach Standard-Verfahrensweisen abgetrennt und danach halbtrocken (semi-dry) auf ein Nitrocellulose-Filter unter Verwendung des LKB-Multiphor II Nova Blot-Systems unter den vom Hersteller speziell angegebenen Bedingungen geblottet.

**[0097]** In den Spuren M wurde vorgefärbtes Markerprotein aufgebracht (BRL life Technologies, Inc. 236k, 112k, 71k, 44k, 28k, 18k und 15k), und in den Spuren 1, 2 und 3 wurden die Gesamtprotein-Zubereitungen der DH5a-Zellen aufgetragen, die mit den drei jeweiligen Rahmen pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 und pGEX-2T600s3 transfektiert waren.

**[0098]** In Platte A kann das Ergebnis der Western-Blot-Analyse mit Anti-GST-Serum abgelesen werden. Dazu wurde das Filter nach Standard-Verfahrensweisen inkubiert (E. Harlow und D. Lane, Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)). Dies geschah in Blocking-Puffern (PBS + 2% Milchpulver und 0,05% Tween 20) und danach mit polyklonalem Anti-GST-Kaninchen-Serum. Anschließend wurde das Filter gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase (HRPO) inkubiert, die mit Ziegen-Anti-Kaninchen-Immuno-globulin-Serum konjugiert war. Anschließend wurden die gebundenen Ziegen-Antikörper immunochemisch mit einem Chromogen nachgewiesen (Diaminobenzidin, Chlornaphthol und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Das GST-Fusionsprodukt, das durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, hat die vorhergesagte Größe von etwa 47 k nur im Rahmen 3.

**[0099]** Auf Platte B ist das Resultat der Western-Blot-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper Mab 4 zu sehen, der das gE-Protein erkennt. Dazu wurde ein Duplo-Filter wie in Platte A geblockt, mit Mab inkubiert, gewaschen und mit an HRPO konjugiertem Kaninchen-Anti-Maus-Serum inkubiert. Anschließend wurden die gebundenen Kaninchen-Antikörper immunochemisch mit einem Chromogen nachgewiesen. Die Bande, die in Spur 3 zu sehen ist (Rahmen 3), hat eine Größe von 47 k und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

**Fig. 9:** Konstruktion des pEVHisEE-Plasmids für die eukaryotische Expression des BHV-1-gE-Gens

**[0100]** Für die eukaryotische Expression des gE-Gens wurde der gesamte gE codierende Bereich in passender Orientierung hinter den HCMV-Promoter-Bereich des Expressions-Vektors pEVHis unter Anwendung von Standard-Verfahrensweisen (Sambrook et al., 1989) kloniert. Dazu wurde das 394 bp große AluI-Fragment, das 55 bp vor dem offenen Leserahmen des gE beginnt, in pUC18 kloniert und p201 genannt. Danach wurde

nach Verdauung von p201 mit HindI das 1.740 bp große HincII-Fragment, das den größeren Teil des gE-Gens umfaßt, in p201 kloniert. Dies führte zu dem Plasmid p318, das in dem Polylinker von pUC18 den gesamten gE codierenden Bereich von der AluI-Stelle 55 bp vor dem Start-Codon von gE bis zu der HincII-Stelle 133 bp nach dem Stop-Codon von gE umfaßt. Unter Verwendung der Restriktionsenzym-Stellen in dem Polylinker des Vektors wurde dieses Fragment von p318 mit den Enzymen BamHI und SphI abgespalten. Zuerst wurde p318 mit SphI verdaut, und anschließend wurde die SphI-Stelle unter Verwendung von Klenow-Polymerase und dNTPs aufgefüllt. Nach dem Verdauen mit BamHI wurde das 1,9 kb große Insert von dem pUC18-Vektor getrennt in Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt und in den pEVH-Vektor eingebunden, der mit BamHI und EcoRV verdaut worden waren. Das so gebildete Plasmid wurde pEVHis/gE genannt.

**Fig. 10:** Position der gE spezifischen Primer und Probensonde für PCR-Verfahrensweise zum Nachweis von BHV-I-DNA

**[0101]** In der Figur gezeigt ist die Nucleinsäure-Sequenz des BHV-1-Glykoprotein gE-Gens von dem Nucleotid 1272 bis zum Nucleotid 2027 [die Sequenz wurde aus [Fig. 3](#) übernommen]. Die Primer, die für die gE spezifische PCR-Verfahrensweise verwendet wurden, wurden P<sub>3</sub> und P<sub>4</sub> genannt. Die Primer-Bindungsstellen für P<sub>3</sub> und P<sub>4</sub> sind unterstrichen. Die Nucleotid-Sequenz von P<sub>3</sub> ist 5'-ACG-TGG-TGG-TGC-CAG-TTA-GC-3' (SEQ ID Nr. 2). Die Nucleotid-Sequenz von P<sub>4</sub> ist (komplementär zu der oben angegebenen Primer-Bindungssequenz) 5'-ACC-AAA-CTT-TGA-ACC-CAG-AGC-G-3' (SEQ ID Nr. 3). Die Probensonde, die für die Southern-Blot-Hybridisierung für den Nachweis der durch PCR amplifizierten DNA verwendet wurde, ist das 137 bp große TaqI-Fragment, das zwischen den Primer-Bindungsstellen angeordnet ist, wobei die Enden dieses Fragments angegeben sind. Zum Vergleich mit [Fig. 3](#) sind die HindIII- und EcoNI-Stellen ebenfalls angegeben.

**Fig. 11:** Kartierung der gE-Streichung von Difivac-1

**[0102]** A zeigt die physikalische Mappe des 15,5 kb großen EcoRI-Fragments des Wild-Typ-BHV-1-Stamms Lam. B zeigt die physikalische Kartierung des 14,5 kb großen EcoRI-Fragments von Difivac-1. Beide EcoRI-Fragmente decken die kompletten Unique Short-Bereiche der Genome der jeweiligen Viren ab. Die Position des gE-Gens und die vermeintliche Position des gl-Gens wurden durch offene Boxen angegeben. Die Kartierungen A und B sind in der Weise angeordnet, daß die sechs kb großen PstI-Fragmente innerhalb jeder Kartierung in Reihe angeordnet sind. In beiden Kartierungen sind die internen Repeat-Sequenzen und die terminalen Repeat-Sequenzen durch schraffierte Boxen angegeben. Die Pfeile unter den Repeat-Einheiten zeigen die Orientierung dieser Sequenzen an.

**[0103]** In A ist der Teil der U<sub>S</sub>-Region, welche in dem Difivac-1 Stamm fehlt, angezeigt.

**[0104]** C zeigt die Position der geklonten Difivac-1-Fragmente, die zum Kartieren der gE-Streichung und zum Erhalt der in B gezeigten physikalischen Mappe verwendet wurden. Die Pfeile unter den Inserts der Klone p728, p737 und p754 zeigen die Regionen an, die sequenziert wurden, um den Rekombinationspunkt zu bestimmen.

**[0105]** Abkürzungen: A = AluI, E = EcoRI, P = PstI, H = HindIII, r = Rekombinationspunkt, IR = innere Repeat-Sequenz, TR = terminale Repeat-Sequenz.

**Fig. 12:** Bestimmung des exakten Rekombinationspunktes im U<sub>S</sub>-Bereich von Vifivac-1

**[0106]** Zur Bestimmung der exakten Grenzen der gE-Streichung, wie sie in dem Difivac-1-Stamm gefunden wird, wurden der Klon p754 und die Enden der Klone p728 und p737 sequenziert. Die Inserts dieser Klone wurden in [Fig. 11](#) angegeben. Die verwendeten Sequenzierungs-Verfahren wurden beschrieben in den Anmerkungen zu [Fig. 3](#).

**[0107]** In A ist die Sequenz des größten Teils des AluI-PstI-Fragments gezeigt. Diese Sequenz beginnt im Promoter-Bereich des gE-Gens. Eine vermeintliche TATA-Box wurde unterstrichen. Am Punkt r (= Rekombinationspunkt) ist dieser Promoter-Bereich an eine Sequenz gebunden, die auch auf der gegenüberliegenden Seite der U<sub>S</sub>-Region gefunden wird und "inverted repeat" genannt wird.

**[0108]** Der exakte Rekombinationspunkt wurde bestimmt durch Vergleichen der Repeat-Sequenz, die in der gE-Promoter-Region gefunden wurde, mit der Kopie der Repeat-Sequenz, die auf der gegenüberliegenden Seite der U<sub>S</sub>-Region gefunden wurde. Der Punkt, an dem diese Sequenzen abweichen, wurde in B (unter I) mit

r bezeichnet. Ein ähnlicher Vergleich wurde mit der gE-Promoter-Sequenz, die in Difivac-1 gefunden wird, und dem gE-Promoter gemacht, der im Wild-Typ-Stamm Lam gefunden wird. Der Punkt, an dem diese Sequenzen voneinander abweichen, wurde in B (unter II) gezeigt und ist auch mit "r" bezeichnet. Die gefundenen Rekombinationspunkte waren dieselben.

**Fig. 13:** Partielle Sequenzanalyse des BHV-1-gI-Gens

**[0109]** Unter Verwendung des 1,8 kb großen PstI-Klons des BHV-1-Stamms Lam, der sowohl in das BHV-1-gI-Gen als auch in das BHV-1-gE-Gen hineinreicht (siehe [Fig. 11](#)), wurde die Sequenz der 284 Nucleotide innerhalb des Kodierungsbereichs von BHV-1-gI bestimmt. Die angewendeten Sequenzierungs-Verfahrensweisen wurden beschrieben in den Anmerkungen von [Fig. 3](#). Die Sequenz wurde auf der Basis des universellen Codes mit den PC/Gene Computerprogramm, Version 1.03 (November 1987) translatiert. Die Aminosäuresequenz, codiert durch den zweiten Leserahmen, ist im Ein-Buchstaben-Code unter der Nucleotid-Sequenz angegeben. Diese Aminosäure-Sequenz ist homolog zu dem codierenden Bereich anderer Herpesvirus-gI-Homologe (siehe [Fig. 14](#)).

**Fig. 14:** Aminosäure-Vergleich der partiellen Aminosäure-Sequenz des vermeintlichen BHV-1-gI-Gens mit den entsprechenden Teilen der codierenden Bereiche des Herpes-Simplex-Virus-(HSV1-) gI-Gens, des Pseudo-Tollwut-Virus(PRV)-sp63-Gens und des Varicella-Zoster-Virus-(VZV-)gplV-Gens

**[0110]** Die PRV-Sequenz beginnt bei Aminosäure 82, und die HSV 1-Sequenz beginnt bei aa 80 und die VZV-Sequenz beginnt bei aa 76 der jeweiligen codierenden Bereiche. Die verwendeten Sequenzen wurden publiziert in den Veröffentlichungen, die in den Anmerkungen zu [Fig. 4](#) genannt sind. Der Vergleich wurde unter Verwendung des Mutalin-Computerprogramms durchgeführt. Sternchen zeigen identische Aminosäuren an, und Doppelpunkte zeigen analoge Aminosäuren an.

**Fig. 15:** Konstruktion des MSVneoGI-Plasmids für die eukaryotische Expression des BHV-1-gI-Gens

**[0111]** Auf der Basis des Aminosäure-Vergleichs der partiellen Sequenz des BHV-1-gI-Gens wurde die vermeintliche Position des BHV-1-gI-Gens abgeschätzt. Basierend auf dieser Abschätzung wurde gefolgert, daß das 1,7 kb große SmaI-Fragment den vollständigen codierenden Bereich des BHV-1-gE-Gens enthalten sollte. Die Position dieses 1,7 kb großen SmaI-Fragments wurde in A angegeben. An die stumpfen Enden dieses 1,7 kb großen SmaI-Fragments wurden BamHI-Linker unter Anwendung von Standard-Verfahrensweisen gebunden. Das resultierende Produkt wurde mit BamHI verdaut und in den eukaryotischen Expressions-Vektor MSV-neo gebunden. Der Vektor MSV-neo hat eine einzige BamHI-Stelle hinter dem MSV-LTR, die starke Promoter-Aktivität aufweist. Dieser Vektor wurde beschrieben von Rijsewijk et al., 1987, EMBO J. 6, 127–131.

**Fig. 16:** Konstruktion eines BHV-1-gI/gE-Doppelstreichungs-Fragments

**[0112]** Die Position des Glykoprotein-gE-Gens und die vermeintliche Position des Glykoprotein-gI-Gens im U<sub>S</sub> Bereich von BHV-1 sind in Diagramm A abgebildet. Die schraffierten Blocks zeigen die Wiederholungseinheiten an, die am Rand des U<sub>S</sub> Bereichs liegen. B zeigt die physikalische Kartierung einiger essentieller Restriktionsenzym-Erkennungsstellen im Hinblick auf die Position beider Gene. Um das gI/gE-Streichungs-Fragment zu konstruieren, wird Klon p1,7-SmaI/o, der das 1,7 kb große SmaI-Fragment enthält, das das gI-Gen umfaßt, mit PstI verdaut. Die PstI-Stelle des verbleibenden, 350 bp großen SmaI-PstI-Inserts wird unter Anwendung standardisierter molekularbiologischer Verfahrensweisen mit stumpfen Enden versehen. Das EcoNI-SmaI-Fragment (siehe [Fig. 6B](#)), das aus dem 4,1 kb großen HindIII-EcoRI-Fragment isoliert wird, das in [Fig. 6A](#) beschrieben ist, wird ebenfalls mit stumpfen Enden versehen und an die modifizierte PstI-Stelle gebunden. Dies ist diagrammartig in C und D angegeben. Von dem resultierenden Klon pAIE kann das 1,4 kb große SmaI-DraI-Fragment isoliert werden und kann dann mit der Wild-Typ-BHV-1-DNA rekombinieren.

**[0113]** Abkürzungen: E = EcoRI, H = HindIII, S = SmaI, P = PstI, ENI = EcoNI, D = DraI, kb = Kilobase und U<sub>S</sub> = Unique short.

**Fig. 17**

**[0114]** Mittlere nasale Virenverbreitung bei Kälbern nach Impfung • = geimpft mit Difivac-1; 0 = ungeimpfte Kontroll-Gruppe

[Fig. 18](#)

[0115] Mittlere tägliche klinische Bewertung von Kälbern nach Verabreichung eines virulenten BHV-1-Stamms; Schlüssel wie in [Fig. 17](#).

[Fig. 19](#)

[0116] Mittlere Rektaltemperatur von Kälbern nach Verabreichung eines virulenten BHV-1-Stamms; Schlüssel wie in [Fig. 17](#).

[Fig. 20](#)

[0117] Mittleres Wachstum von Kälbern nach Verabreichung eines virulenten BHV-1-Stamms; Schlüssel wie in [Fig. 17](#).

[Fig. 21](#)

[0118] Mittlere Virus-Verbreitung, über die Nase bei Kälbern nach Verabreichung eines virulenten BHV-1-Stamms; Schlüssel wie in [Fig. 17](#).

[Fig. 22](#)

[0119] Mittlere Rektaltemperatur von Kälbern nach Verabreichung eines virulenten BHV-1-Stamms; • = geimpft mit Lam gE; 0 = geimpft mit Lam gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>; x = ungeimpfte Kontroll-Gruppe.

[Fig. 23](#)

[0120] Mittleres Wachstum von Kälbern nach Verabreichung eines virulenten BHV-1-Stamms; Schlüssel wie in [Fig. 22](#).

[Fig. 24](#)

[0121] Mittlere tägliche klinische Bewertung von Kälbern nach Verabreichung eines virulenten BHV-1-Stamms; Schlüssel wie in [Fig. 22](#).

Tabelle 1

Nasale Verbreitung des Virus bei Kälbern nach Impfung mit Lam gE<sup>-</sup> oder Lam gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> und nach Verabreichung eines virulenten BHV-1-Stammes an diese geimpften sowie an Kontroll-Kälber

Gruppe	Durchschnittliche Zahl von Tagen der nasalen Verbreitung des Virus	
	Nach Impfung	Nach Virusverabreichung
Kontroll-Gruppe	0	10,33 ± 1,51
Mit Lam gE geimpfte Gruppe	7,00 ± 0,89	4,83 ± 1,17
Mit Lam gE <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> geimpfte Gruppe	7,17 ± 1,33	5,17. ± 0,98

Tabelle 2  
Charakterisierung von gE-Mabs

Reaktivität der jeweiligen gE-Mabs mit							
Mab	Difivac-1 3T3/EBTR	Lam gE <sup>-</sup>	Prok.	3T3 gE	3T3 gE/gI	Ag- Gruppe	Ab- Rind
1	-	-	nd	-	?	I	+
2	-	-	-	+	+	II	-
3	-	-	+	+	+	?	-
4	-	-	+	+	+	?	-
42	-	-	nd	-	?	V?	±
51	-	-	nd	+	+	III	+
52	-	-	+	+	+	?	-
53	-	-	nd	+	+	III	+
59	-	-	nd	-	++	III	+

66	-	-	nd	+	+	III	+
67	-	-	nd	+	+	III	+
68	-	-	-	+	+	IV	+
72	-	-	-	+	+	V	±
75	-	-	nd	+	?	I	+
78	-	-	nd	+	?	nd	-
81	-	-	-	+	+	II?	-

## Anmerkungen

## [0122]

- + alle acht getesteten Seren erreichen einen Blocking-Prozentsatz von > 50% in einem indirekten Blocking-IPMA
- ± Seren erreichen einen Blocking-Prozentsatz von ±50%.
- Seren erreichen einen Blocking-Prozentsatz von < 50%.

## Sequenz-Listing

SEQ ID Nr. 1:

Länge: 2027 Nucleotide, 575 Aminosäuren

Typ: Nucleotid und

Aminosäure Strängigkeit:

einsträngig

AGGGCGGAGC GTTGAGCGGC CCGACCGCCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGCGGCTC 60

I----&gt; gestrichen in Difivac-1

GTGGTTCCAC ACCGCCGGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG 120

AsuII

TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGGTTC GAAAAGGGCA TTTGGCA 167

ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CGG CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG 215

Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu

1

5

10

15

=====Signalpeptid=====

CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC 263

Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr

20

25

30





CGC ACG ACG ACA CGC GCG CCC CCG CGG CGG CAC GGC GCG CGC TTC CGC	839
Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg	
210 215 220	
SmaI	
GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC CCG GGC GAT TCC TTT CTG	887
Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu	
225 230 235 240	
CTA TCG GTG CGT CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GCT CCC TTC TCG	935
Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser	
245 250 255	
GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CGG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC	983
Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Lou	
260 265 270	
ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC	1031
Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys	
275 280 285	
CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CCC TCC	1079
Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser	
290 295 300	
GAG ACC GTG TAC AGC CGG CTG TAC GAG CAG TGC CGC CCC GAC CCT GCC	1127
Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala	
305 310 315 320	
GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT	1175
Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Val	
325 330 335	
GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC	1223
Ala His Leu Arg Pro Ala Asn Asn Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp	
340 345 350	
GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC	1271
Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn	
355 360 365	
HindIII	
GGC CAC GTG GAA GCT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT	1319
Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg	
370 375 380	
TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CGC CCC GAG GCC GCA GCC GCC	1367
Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala Ala	

385		390		395		400	
GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GCC GCG							1415
Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala							
	405		410			415	
CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG CTG GTG GGC GCG CTT GGA							1463
Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly							
	420		425			430	
=====Transmembrane Helix=====							
CTC GCG GGA CTG GTG GCC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG							1511
Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala							
	435		440			445	
=====							
CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG							1559
Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly							
	450		455			460	
CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG							1607
Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val							
	465		470			475	480
CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT							1655
Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Lau Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp							
	485		490			495	
GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC							1703
Asp Asp Ser Asp Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala							
	500		505			510	
TAC GAC CTC-GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC							1751
Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala							
	515		520			525	
CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT							1799
Pro Ala <u>Asp Gly Thr</u> Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe							
	530		535			540	
AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA							1847
Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala							
	545		550			555	560
CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC CGC TAG							1895
Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *							
	565		570			575	

GCGCCCCCCC	CCCCCGCGC	GCTGTGCCGT	CTGACGGAAA	GCACCCGCGT	GTAGGGCTGC	1955
ATATAAATGG	AGCGCTCACA	CAAAGCCTCG	TGCGGCTGCT	TCGAAGGCAT	GGAGAGTCCA	2015
CGCAGCGTCG	TC					2027

SEQ ID Nr. 2:

Länge: 20 Nucleotide

Typ: Nucleotid Strängigkeit: einsträngig

**ACGTGGTGGT GCCAGTTAGC 20**

SEQ ID Nr. 3:

Länge: 22 Nucleotide

Typ: Nucleotid

Strängigkeit:

einsträngig

**ACCAAAC TTT GAACCCAGAG 22**

### Patentansprüche

1. Impfstoff-Zubereitung für eine Impfung von Tieren, insbesondere von Säugern, noch mehr von Rindern, zum Schutz gegen BHV-1, worin die Impfstoff-Zubereitung eine Lebendvakzine ist die eine BHV-1 Mutante sowie einen Schutz gegen BHV-1-Mutante sowie einen geeigneten Träger oder Hilfsstoff enthält, wobei die BHV-1-Mutante eine Streichung in dem BHV-1 Glykoprotein gE-Gen aufweist und keine Streichung in dem Thymidinkinasegen aufweist, wobei gE ein Protein ist, das in einem speziellen BHV-1 Stamm die Aminosäuresequenz aufweist, wie sie in [Fig. 3A](#) gezeigt ist, und serologisch von BHV-1 des Wild-Types unterschieden werden kann.

2. Impfstoff-Zubereitung nach Anspruch 1, worin die Streichung in dem gE-Gen durch eine Attenuierungs-Behandlung, eher als durch rekombinante DNA-Techniken, hervorgerufen wurde.

3. Impfstoff-Zubereitung nach Anspruch 2, worin die erhaltene Mutante Difivac-1 (Institut Pasteur, Frankreich; Hinterlegungsnummer I-1213) ist.

4. Impfstoffzubereitung nach Anspruch 1, worin die Streichung in dem gE-Gen erzeugt wurde durch rekombinante DNA-Techniken.

5. Impfstoff-Zubereitung nach Anspruch 1, worin die Mutante zusätzlich zu der Streichung in dem gE-Gen eine Streichung in dem Glykoprotein gI-Gen aufweist.

6. Impfstoff-Zubereitung nach Anspruch 1, worin die Mutante selektiert ist nach einem Verfahren unter Diskriminierung zwischen BHV-1-Viren, die ein intaktes gE-Gen aufweisen, und BHV-Viren, die eine Streichung in dem gE-Gen aufweisen, wobei das Verfahren den Schritt der Prüfung umfaßt, ob Nucleinsäuren des Virus mit für gE spezifischen Sonden oder Primern reagiert, die von der für gE codierenden Nucleotidsequenz abgeleitet sind.

7. Impfstoff-Zubereitung nach Anspruch 1, worin die Mutante selektiert ist nach einem Verfahren unter Diskriminierung zwischen BHV-Viren, die gE exprimieren, und BHV-Viren, die eine Streichung in dem gE-Gen aufweisen, wobei das Verfahren den Schritt der Prüfung umfaßt, ob das Virus mit für gE spezifischen Antikörpern reagiert, die gegen Peptide, die von der Aminosäuresequenz von gE abgeleitet sind, entstanden sind.

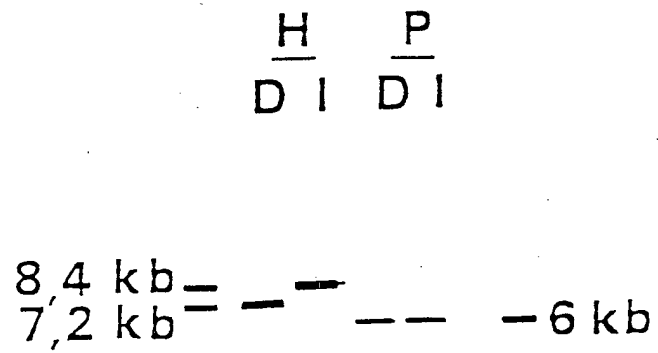
8. Zubereitung bestehend aus einem Komplex der BHV-Glykoproteine gE und gI, wobei gE ein Protein ist, das in einem speziellen BHV-Stamm die Aminosäuresequenz aufweist, wie sie in [Fig. 3A](#) gezeigt ist.

9. Zubereitung umfassend einen Antikörper, der spezifisch ist für einen Komplex der BHV-1-Glykoproteine gE und gI, wobei gE ein Protein ist, das in einem speziellen GHV-1-Stamm die Aminosäuresequenz aufweist, wie sie in [Fig. 3A](#) gezeigt ist.

10. Zubereitung nach Anspruch 9, umfassend einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch ist für einen Komplex der BHV-Glykoproteine gE und gI.
11. Zubereitung nach Anspruch 9, umfassend einen polyklonalen Antikörper, der spezifisch ist für einen Komplex der BHV-Glykoproteine gE und gI.
12. Diagnose-Kit zum Nachweis von Antikörpern, die für BHV-1 spezifisch sind, in einer Probe, insbesondere in einer biologischen Probe wie beispielsweise Blut oder Blutserum, Speichel, Sputum, Körperflüssigkeiten wie z. B. Tränen, Lungenwasch-Flüssigkeit, Nasal-Flüssigkeit, Milch oder Gewebe, das von einem Tier stammt, insbesondere von einem Säuger, noch mehr besonders von einem Rind, umfassend einen Komplex der BHV-Glykoproteine gE und gI, wobei gE ein Protein ist, das in einem speziellen BHV-1-Stamm die Aminosäuresequenz aufweist, wie sie in [Fig. 3A](#) gezeigt ist, sowie ein Nachweismittel, das für ein Antikörper-Nachweis-Assay geeignet ist.
13. Diagnose-Kit nach Anspruch 12, welches außerdem einen oder mehrere Antikörper umfaßt, der/die spezifisch ist/sind für einen Komplex der BHV-1-Glykoproteine gE und gI.
14. Diagnose-Kit zum Nachweis von Antikörpern, die spezifisch sind für BHV-1, in einer Probe, insbesondere in einer biologischen Probe wie beispielsweise Blut oder Blutserum, Speichel, Sputum, Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Tränen, Lungenwasch-Flüssigkeit, Nasal-Flüssigkeit, Milch oder Gewebe, das von einem Tier stammt, insbesondere von einem Säuger, noch mehr besonders von einem Rind, und einen Antikörper umfaßt, der spezifisch ist für gE von BHV-1 oder einen Komplex der BHV-1-Glykoproteine gE und gI, wobei gE ein Protein ist, das in einem speziellen BHV-1-Stamm die Aminosäuresequenz aufweist, wie sie in [Fig. 3A](#) gezeigt ist, und ein Nachweismittel, das geeignet ist für ein Antikörper-Nachweis-Assay.
15. Diagnose-Kit zum Nachweis von Protein von BHV-1 in einer Probe, insbesondere in einer biologischen Probe wie beispielsweise Blut oder Blutserum, Blutzellen, Milch, Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Tränen, Lungenwasch-Flüssigkeit, Nasal-Flüssigkeit, Sperma, insbesondere Samenflüssigkeit, Speichel, Sputum oder Gewebe, insbesondere Nervengewebe, das von einem Tier stammt, insbesondere von einem Säuger, noch mehr besonders von einem Rind, umfassend einen Antikörper, der spezifisch ist für gE von BHV-1 oder einen Komplex der BHV-1-Glykoproteine gE und gI, wobei gE ein Protein ist, das in einem speziellen BHV-1-Stamm die Aminosäuresequenz aufweist, wie sie in [Fig. 3A](#) gezeigt ist, und ein Nachweismittel, das geeignet ist für ein Protein-Nachweis-Assay.
16. Verfahren zur Bestimmung einer BHV-1-Infektion in einem Tier, insbesondere in einem Säuger, noch mehr besonders in einem Rind, umfassend das Untersuchen einer Probe, die von einem Tier stammt, insbesondere einer biologischen Probe wie z. B. Blut oder Blutserum, Blutzellen, Sperma, insbesondere Samenflüssigkeit, Speichel, Sputum, Körperflüssigkeiten wie z. B. Tränen, Lungenwasch-Flüssigkeit, Nasal-Flüssigkeit, Milch oder Gewebe, insbesondere Nervengewebe, auf das Vorhandensein einer Nucleinsäure, die das gE-Gen von BHV-1 umfaßt, oder auf das Vorhandensein von gE von BHV-1 oder eines Komplexes der BHV-1-Glykoproteine gE und gI oder auf das Vorhandensein von Antikörpern, die spezifisch sind für gE von BHV-1 oder einen Komplex der BHV-1-Glykoproteine gE und gI, wobei gE ein Protein ist, das in einem speziellen BHV-1-Stamm die Aminosäuresequenz aufweist, die in [Fig. 3A](#) gezeigt ist.
17. Verfahren zur Bestimmung einer BHV-1-Infektion eines Tiers, insbesondere eines Säugers, noch mehr besonders eines Rinds, umfassend das Untersuchen einer Probe, die von einem Tier stammt, insbesondere einer biologischen Probe wie beispielsweise Blut oder Blutserum, Blutzellen, Sperma, insbesondere Samenflüssigkeit, Speichel, Sputum, Körperflüssigkeit wie beispielsweise Tränen, Lungenwasch-Flüssigkeit, Nasal-Flüssigkeit, Milch oder Gewebe, insbesondere Nervengewebe, auf das Vorhandensein eines Komplexes der BHV-Glykoproteine gE und gI oder auf das Vorhandensein von Antikörpern, die spezifisch sind für einen Komplex der BHV-1-Glykoproteine gE und gI, wobei gE ein Protein ist, das in einem speziellen BHV-1-Stamm die Aminosäuresequenz aufweist, wie sie in [Fig. 3A](#) gezeigt ist, wobei die zu untersuchende Probe von einem Tier stammt, das mit einer Impfstoffzubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 geimpft wurde.

Es folgen 30 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



1 2 3 4

FIG.1A

HindIII - K - Fragment

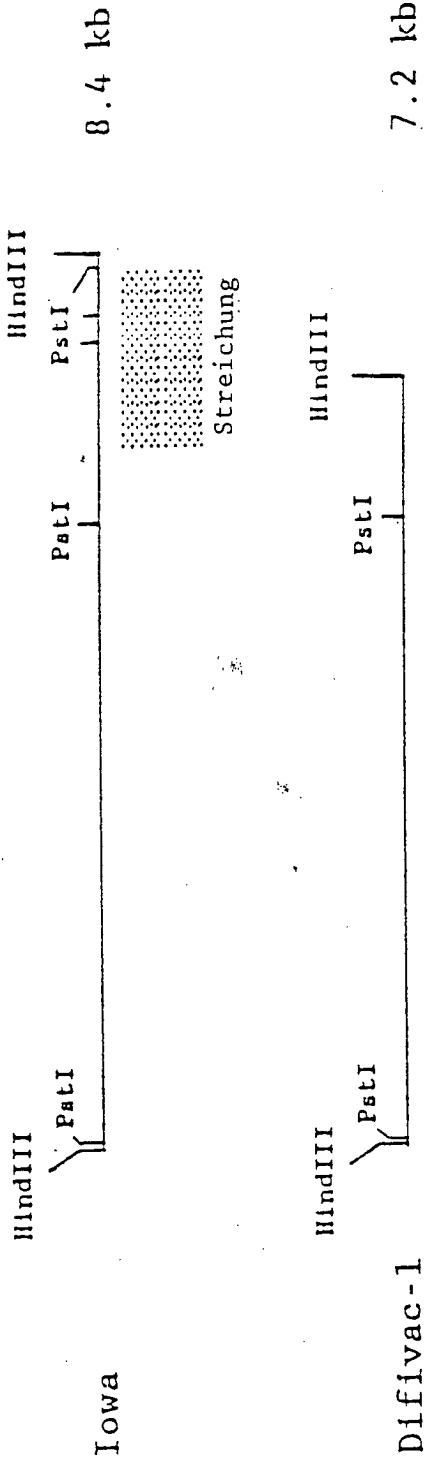


FIG.1B



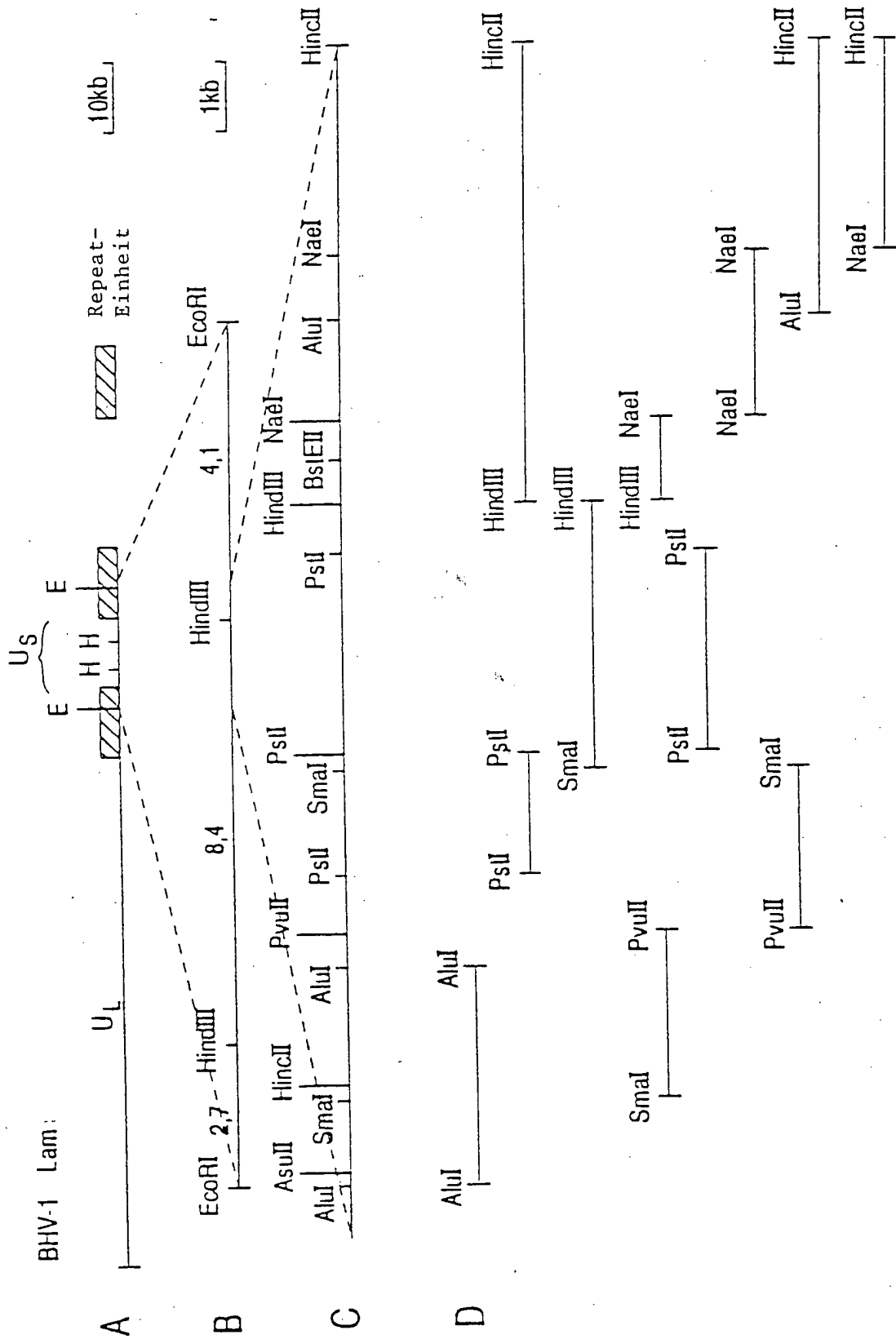


FIG. 2

```

AGGGCGGAGC GTTGAGCGGC CCGACCGCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGGGGCTC 60
      |-----> gestrichen in Difivac1
GTGGTTCCAC ACCGCCGGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG 120

      AsuII
TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGTTTCAAAGGGCA TTGGGCA 167

ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CCG CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG 215
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu
1      5      10      15
===== Signalpeptid =====
CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC 263
Pro Gln Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr
20      25      30
=====
      SmaI
GAA ACC CCG GGC TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG GCG GCT 311
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala
35      40      45

GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG GCG GAC GTG CGC 359
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg
50      55      60

GCC GTT CGC GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG 407
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val
65      70      75      80

```

FIG. 3A

CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC	455
Pro Glu Pro Val Cys Leu Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala	95
	85
CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CTG GCC ATC	503
Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile	110
	100
GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT	551
Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val	125
	115
CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG	599
Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asn Ala Thr Gly	140
	135
	130
	PvuII
GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GGC GTG TAC TTC CTG	647
Val Leu Ile Ala Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Val Tyr Phe Leu	160
	155
	150
TAC GAC CCG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAC GAG GAG ACG CAG TTG GCG	695
Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Glu Glu Thr Gln Leu Ala	175
	170
	165
CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GGC GCG CAG GGC GCC GCG CGG GAC	743
Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp	190
	185
	180

FIG. 3A

GAG GAG AGG GAA CCA GCG ACC GGG CCC ACC CCC GGC CCG CCG CCC CAC	791
Glu Glu Arg Glu Thr Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro His	195 200 205
CGC ACG ACG ACA CGC GCG CCC CCG CGG CAC GGC GCG CGC TTC CGC	839
Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg	210 215 220
GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC <del>CCG</del> GGC GAT TCC TTT CTG	887
Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu	225 230 235 240
SmaI	
CTA TCG GTG CGT CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GCT CCC TTC TCG	935
Leu Ser Val Arg Leu Ser Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser	245 250 255
GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CCG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC	983
Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu	260 265 270
ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC	1031
Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys	275 280 285
CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CGC TCC	1079
Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser	290 295 300

FIG. 3A

GAG ACC GTG TAC AGC CGG CTG TAC GAG CAG TGC CGC CCG GAC CCT GCC	1127
Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala	320
305	
GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT	1175
Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Val	335
325	
GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC	1223
Ala His Leu Arg Pro Ala Asn Asn Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp	350
340	
345	
GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC	1271
Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn	365
355	
360	
HindIII	
GGC CAC GTG GAA GCT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT	1319
Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg	380
370	
375	
TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CGC CGC GAG GCC GCA GCC GCC	1367
Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala Ala	400
385	
390	
395	
GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GCG GCG	1415
Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala	415
405	
410	

FIG. 3A

```

CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG GGC GCG CTT GGA      1463
Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Gly Ala Leu Gly
420 425 430
===== Transmembran-Helix =====
CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG      1511
Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala
435 440 445
=====
CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG      1559
Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly
450 455 460
CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG      1607
Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val
465 470 475 480
CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT      1655
Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp
485 490 495
GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC      1703
Asp Asp Ser Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala
500 505 510

```

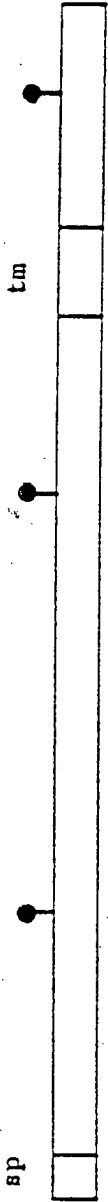
FIG. 3A

TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC	1751
Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala	
515	525
CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT	1799
Pro Ala Asn Gly Thr Arg Ser Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe	
530	540
AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG ACC CCG GCC GCA	1847
Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala	
545	555
CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC CGC TAG	1895
Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *	
565	570
ECONI	
GCGCCCCCCC CCCCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGGAAA GCACCCGCGT GTAGGGCTGC	1955
ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TCGGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA	2015
CGCAGCGTGC TC	2027

FIG. 3A



BIV-1 gE



575 Aminosäuren

sp = Signalpeptid 26 Reste

• = vermeintliche N-Glykosylierungsstelle

tm = Transmembran-Helix Reste 423 - 450

FIG.3B

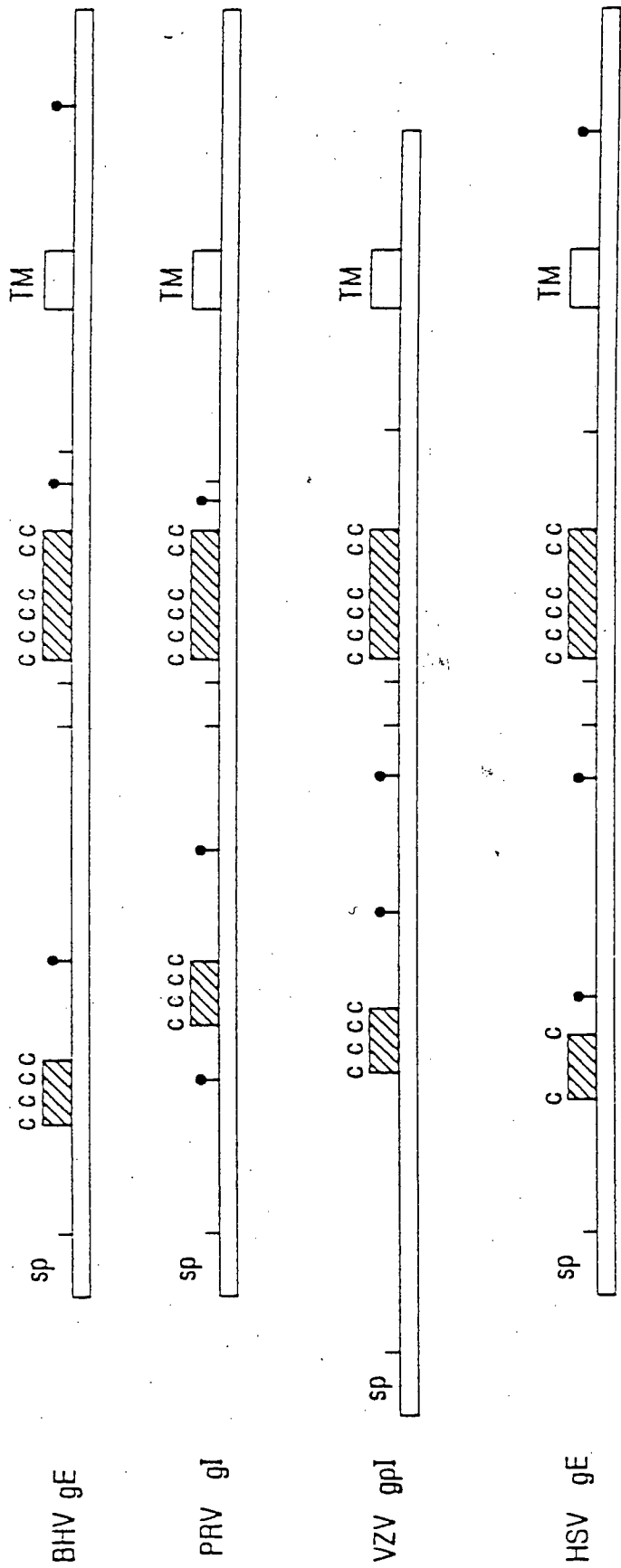


FIG.4A

Symbol-Vergleichs-Tabelle: DAYHOFF.DAT; Lückenabzug: 8

1	10	20	30	40	50	60
PRV	HSQLESPGDTEDLMPRVVSDMGDSRENTETATLDWYARAPPRCLLYVYEPYCIYHPRAP					
	**::** ** ** :	** ** *	** ** *	** *	** *	** *
VZV	HSVFSVGDTEFSLAMHLQYKI.H..EAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAP					
	***: ** * * : ** *	*** :	** :	** :	** :	** :
BHV	HSVYTPGDSFLLSVRLQSEFFD..EAPFSASIDWYFLRTAGDCALIRIYETCIFIHPEAP					
	:: ** : * * :	** :	** :	** :	** :	** :
HSV	EALFSPGETFTSNVSIHAIAND..DQYSDMDVVWLREDDVPTSCAEMRIYESCLYHPQLP					
1	10	20	30	40	50	
PRV	ECLRPVDPACSFETSPARAALVARRAYASCSPLLGDRWLTACPFDAFGEEVH.....					
	:: ** * ** * * ** *	** *	** *	** *	** *	** *
VZV	QCLSHMNSGCTETSPHILAQRVASTVYQNC..EHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGT					
	** : ** * ** :	** :	** :	** :	** :	** :
BHV	ACLHPADAQCTEASPYRSETVYSRLYEQCRRPDPAWRPHECEGAAAYAAPVAHLRPANNSV					
	** * ** * * * :	** *	** *	** *	** *	** *
HSV	ECLSPADAPC..AASTWTSRLAVRSYAGCSRTNP...PPRCSAEAHMEPVPGLAWQAASV					
60	70	80	90	100	110	
PRV	....TNATADESGLYVLVMTNHNGHVATWDYTLVAT					
	:	***: ; ** *	***	**:	** *	
VZV	TLKFVDTPESLSGLYVFVYFNGHVEAVAYTVVST					
	* * * * *	***: ; ** *	***	**:	** *	
BHV	DLVFDDAPAAASGLYVFLQYNGHVEAWDYSLVVT					
	: * * * *	***: * ; ** *	** :	** :	** :	
HSV	NLEERDASPOHSGLYLCVVYVNDHIHAWGHITIST					
120	130	140	148			

FIG.4B

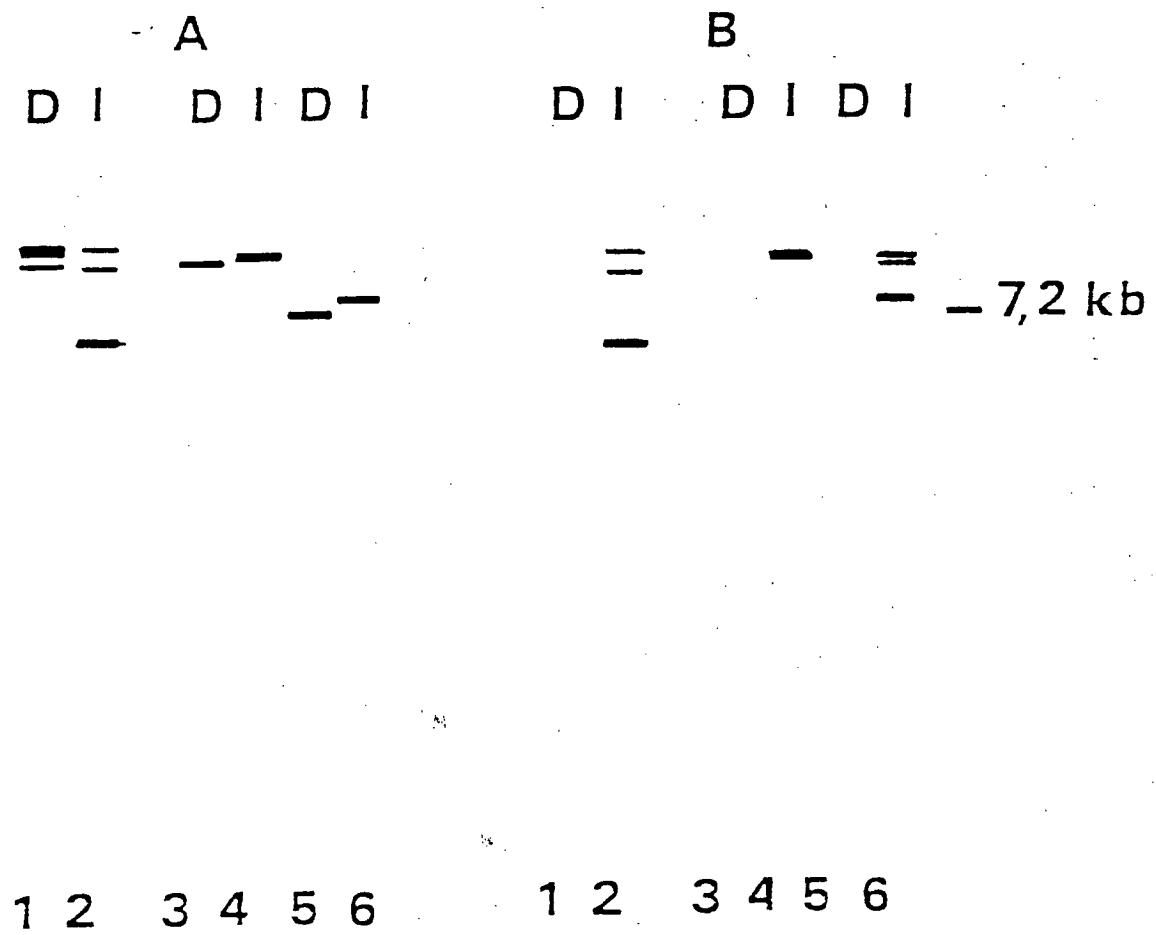


FIG. 5

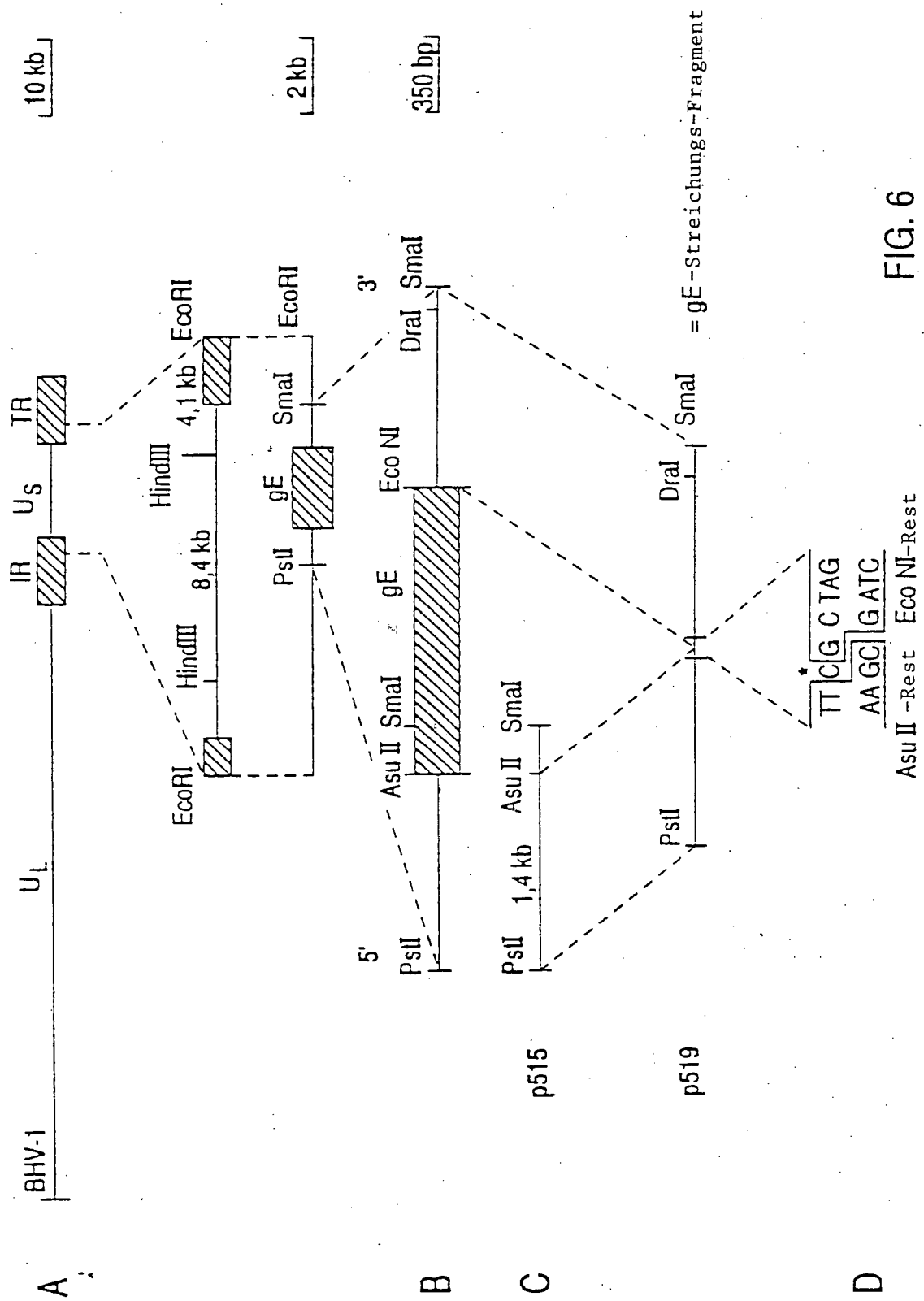


FIG. 6

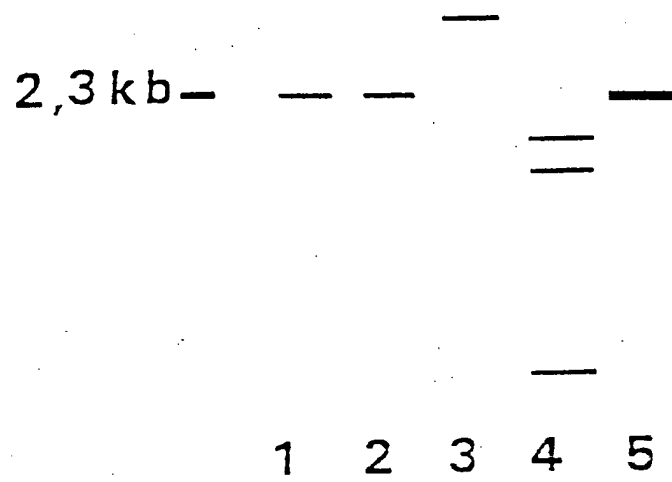


FIG.7A

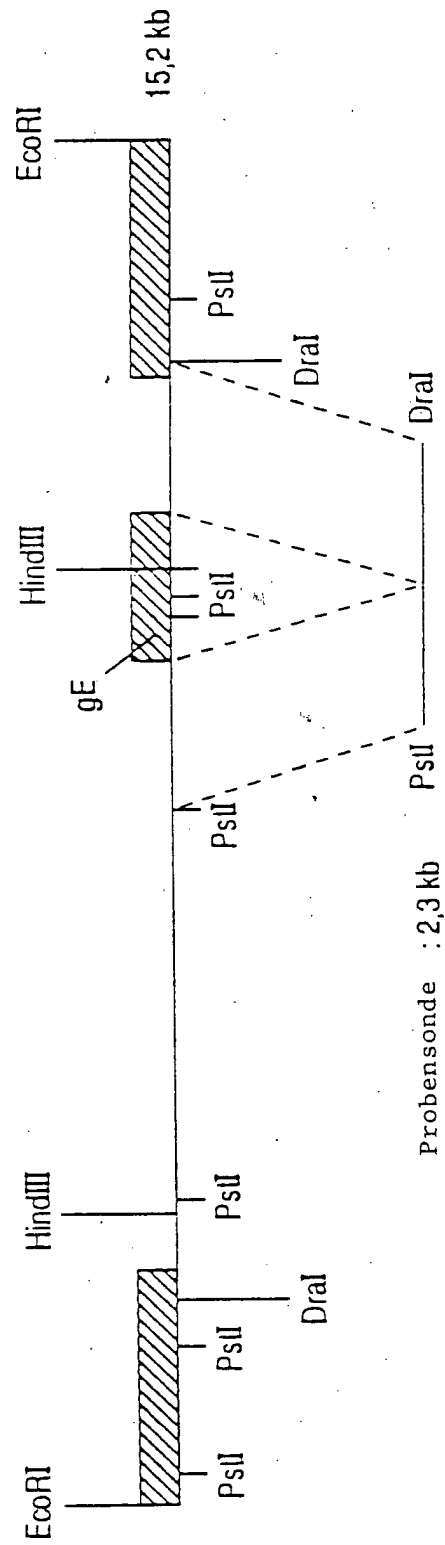


FIG. 7B



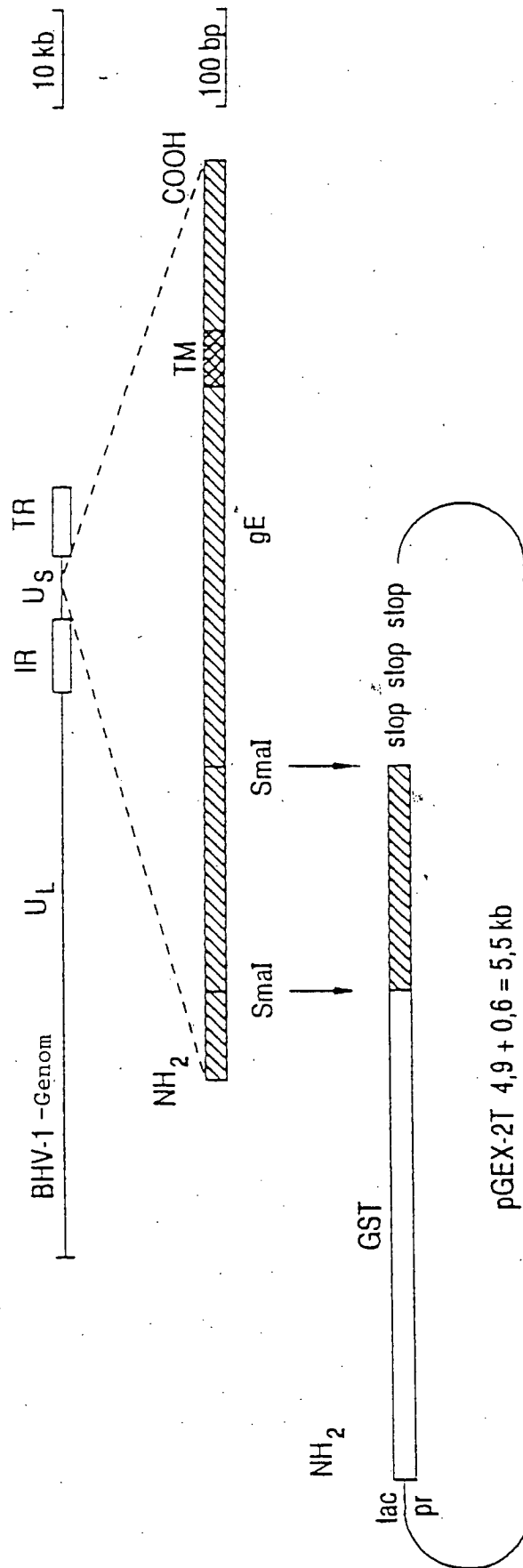


FIG. 8A

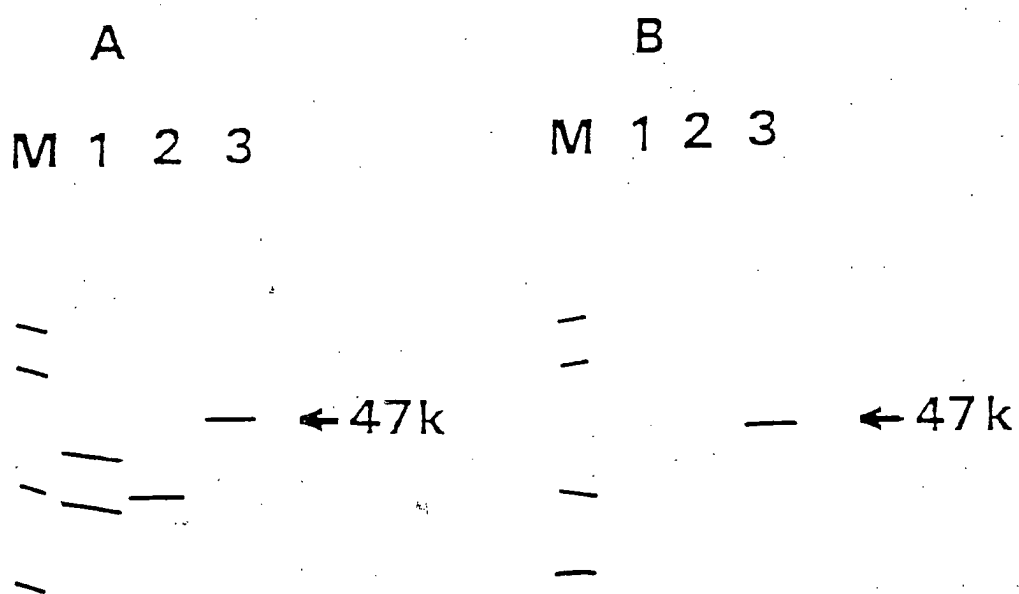


FIG.8B

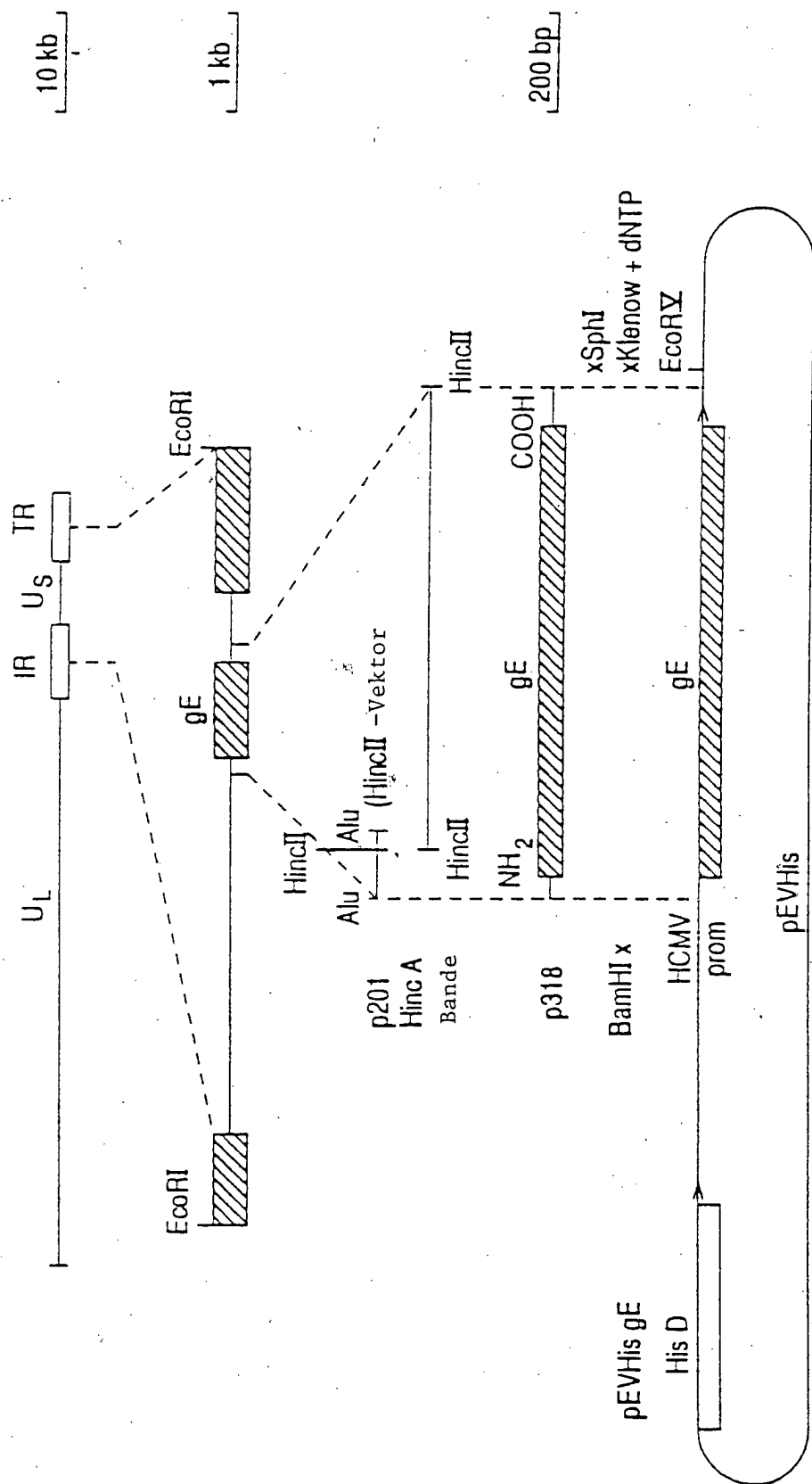


FIG. 9

```

1272      GGCCACGTGGAAGCTTGGGACTACAGCCTAGTCGTTACTTCGGACCGTTTGGTGCGCGGTCACC
      HindIII
GACCACACGCGCCCGAGGCGCGACGCCCGGAGCCAGCCACCGCTCACCAGCGAGCCGGGGGCGG
CCACCGGCGCCCGCTGGCTTGTGGTGGTGGCGCGCTTGGACTCGCGGGACTGGTGGGCATCGCAGCCCTC
GCCGTTCCGGGTGTGCGCGCGCGCAAGCCAGAAAGCGCACCTACGACATCCCTCAACCCCTTCGGGCCCCGTATACACC
AGCTTGCCGACCAACGAGCCGCTCGACGTTGGTGGTGGCCAGTTAGCGACGACGAATTTCCCTCGGACGAACTCTTTT
      P3
      TaqI
GCGGATGACGACGACGATGACGGGGCCCGCTAGCAACCCCTGCGGATGCCCTACGACCTCGCCGGCGCCCGCAGAG
CCAACTAGCGGTTTGCGCGAGCCCCCGCCCAACGGCACGCGCTCGAGTGCTCTGGGTTCAAAGTTTGGTTAGGGAC
      P4
      TaqI
CCGCTTGAAGACGATGCCCGCGCCAGCGCGGACCCCGCGCACCAAGATTACACCGTGGTAGCAGCGGACTCAAGTCC
ATCCTCCGCTAGGCGCCCCCCCCCGCGCGCTGTGCCGTCTGACGGAAGCACCCGCGTGTAGGGCTGCATATAA
      EcoNI
ATGGAGCGCTCACACAAGCCTCGTGCGGCTGCTTCGAAGGCATGGAGAGTCCACGCGCGTCGTC      2027

```

FIG.10

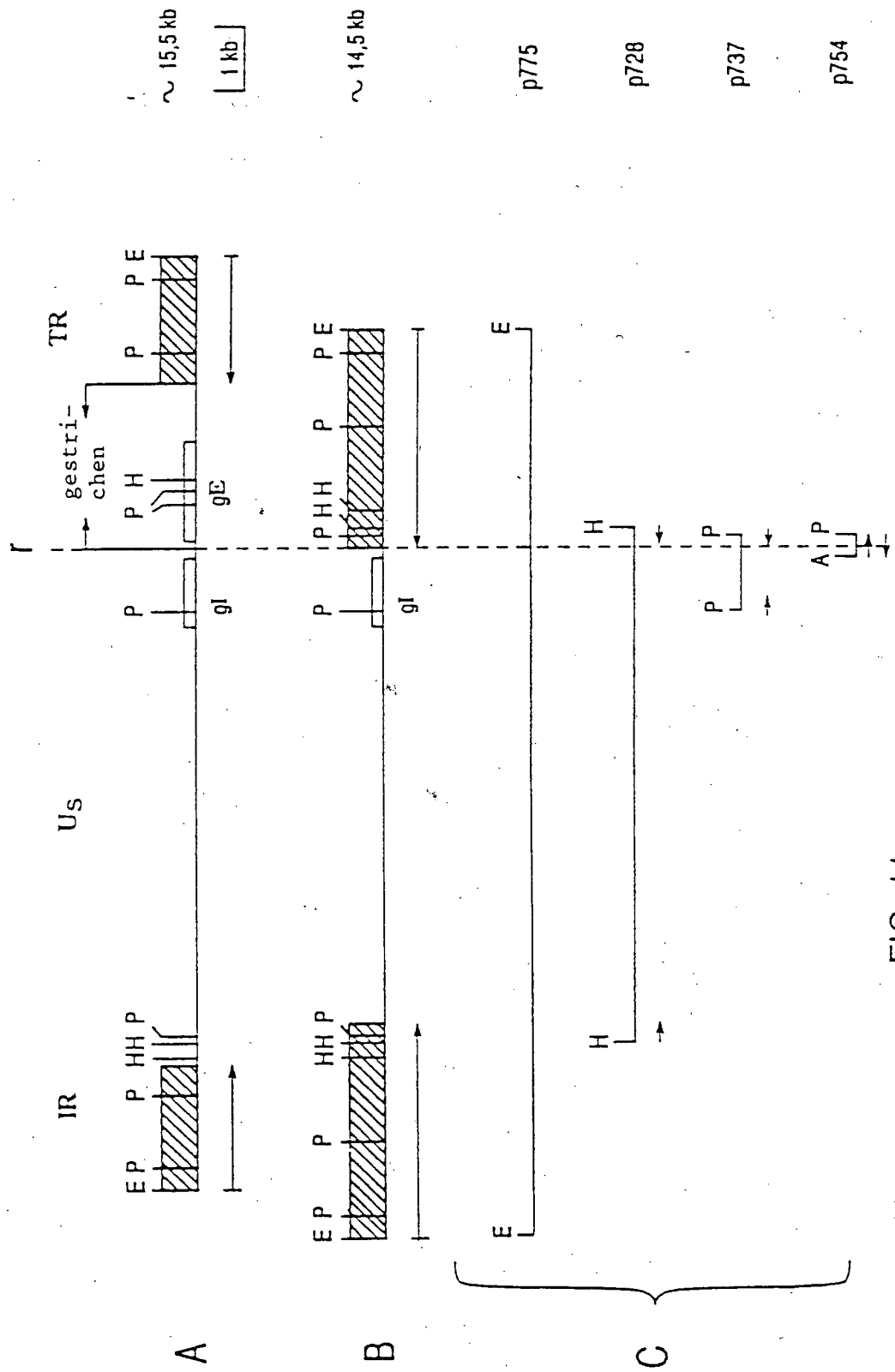


FIG. 11

A

```

-----> gE-Promoter-Bereich ----->
5' GAGCGGCCCCGACCGCCGCGGGTTGTTAAATGGGTCTCGCGCGGCTCGTGGTTCACACCGCCGGAGAA
      r
----->|<----- umgekehrte Repeat-Sequenz -----
CCAGCGC|TCCGAGGGGGGGCTTGGTGGCTGGCGACTCTTTAAGGCGTGCCGCCACGAGCAAGAAGACGGC
      |
-----<----- umgekehrte Repeat-Sequenz -----
CTGTATGCTATGCTCCCGCCGGACTATTTTCCGGTGGTGCCCTCGTCCAAGCCCCTGCTGGTGAAAGTT 3'

```

B(I)

```

      Unique short | umgekehrte Repeat-Sequenz
Gegenüber der Repeat- : GGCACCGGTCCCGGA|TCCGAGGGGGGGCTTGG
Grenzsequenz (inverse Sequenz) * * |*****
Rekombinierter Bereich : CCGGAGAACCAGCGC|TCCGAGGGGGGGCTTGG

```

B(II)

```

      r
Rekombinierter Bereich : CCGGAGAACCAGCGC|TCCGAGGGGGGGCTTGG
      *****|* * * *
Wild-Typ-gE-Bereich : CCGGAGAACCAGCGC|GAGCTTCGCTGCGTGTG
      | gE-Leader ---->

```

FIG.12

10 20 30 40 50 60  
CTACCACGCCGCGGGCGACTGCTTCGTTATGCTGCAGACGACCGCGTTTCGCCTCCTGCCC  
Y H A A G A C F V M L Q T T A F A S C P  
70 80 90 100 110 120  
GCGCGTCGCGAACGACGCCTTTCGCTCCTGCCTGCACGCCGACACGCGCCCCGCTCGCAG  
R V A N D A F R S C L H A D T R P A R S  
130 140 150 160 170 180  
CGAGCGGCGCGCGAGCGCCGCGGTGCGAAAACCACGTGCTCTTCTCCATCGCCCATCCGCG  
E R R A S A A V E N H V L F S I A H P R  
190 200 210 220 230 240  
CCCAATAGACTCAGGGCTCTACTTTCTGCGCGTCGGCATCTACGGCGGCACCGCGGGCAG  
P I D S G L Y F L R V G I Y G G T A G S  
250 260 270 280  
CGAGCGCCGCGCGAGACGTCTTTCCTTGGCCGCGTTTGTACACA  
E R R R D V F P L A A F V H

FIG. 13



Symbol-Vergleichs-Tabelle : DAYHOFF.DAT; Lückenabzug: 8

	1	10	20	30	40	50
BHV1	YHAAGD	CFVMLQTTAFAS	CPRVAN	AFRSLHADTRP	ARSERRASAAVENH	VLFSLA
	*	:	****	: *** **:	:	***** : *:
PRV	RLDPKRA	CYTREYAAEYDLC	PRVHHEAFRGCLR	...KR	EPLARRASAAVEARRLLFVS	
	:	*	***	** *	:	*
HSV1	YPMGHK	CPRVVHVVTAC	PRRPAVAFALCRATD	STH	SPAYPTLELNLAQQPLL	RVQ
	*	*	***	** **	*	*
VZV	YADTVAFCFRSVQV	IRYDGCPRIRTS	AFISCRYKHSWHYGN	STDRISTEPDAGV	MLKIT	
	1	10	20	30	40	50

	60	70	80	90	93
BHV1	HPRPIDSGLYFLRV	GIYGG	TAGSERRRDVF	PLAAFVH	
	: * * * * *	***	* *	:	*
PRV	RPAPPDAGSYVLRVR	..NG	TIDLFVLTALVPPRGRPHG		
	*	** *****:	:	****	:
HSV1	RATRDYAGVYVLRV	VWGDAPNASL	FVLGMAIAAEG		
	:	:	*****	*:	*
VZV	KPGINDAGVYVLLV	RLDHSRSTDG	FILGVNVYTAG		
		70	80	90	94

FIG.14

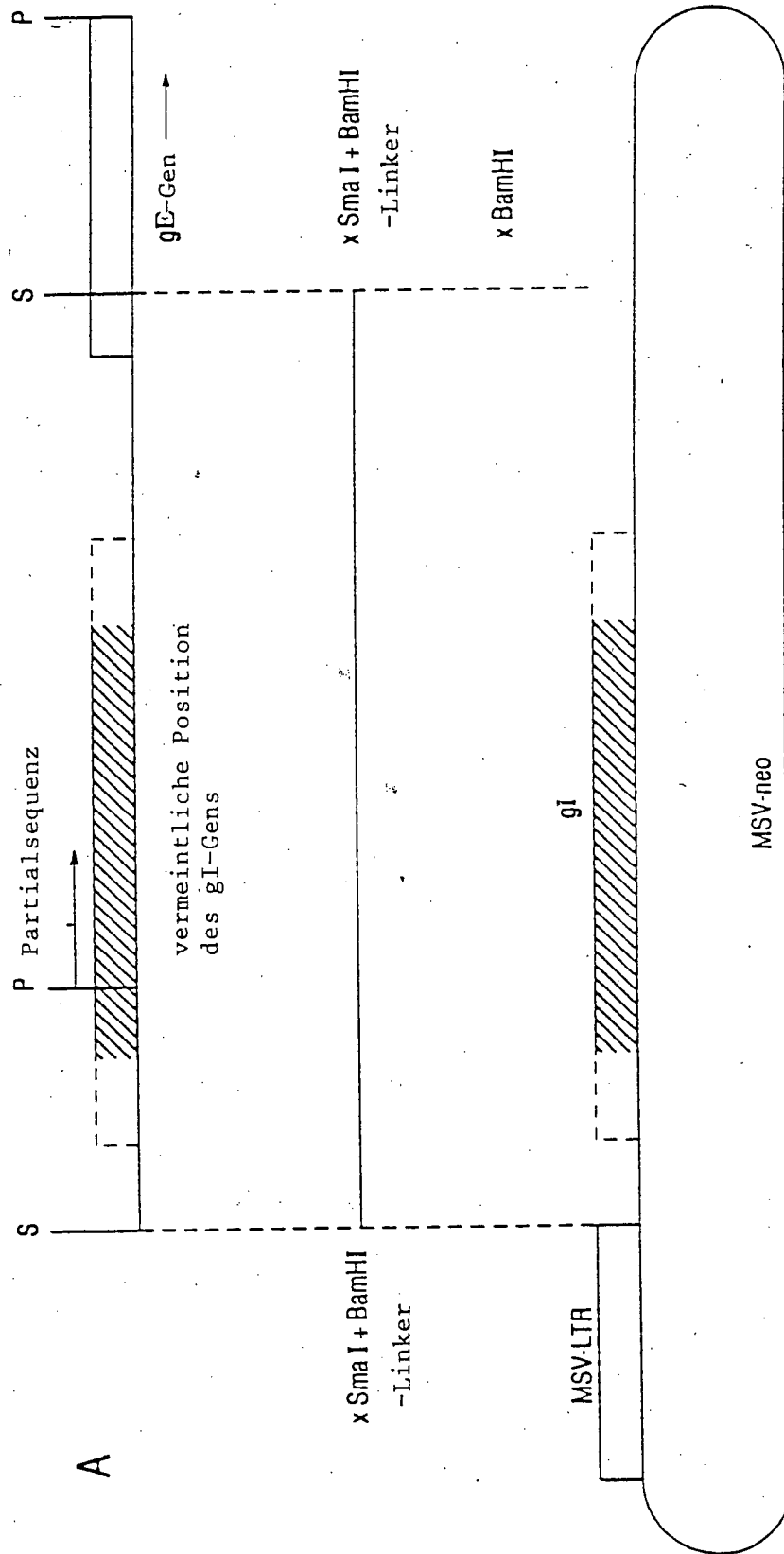


FIG. 15

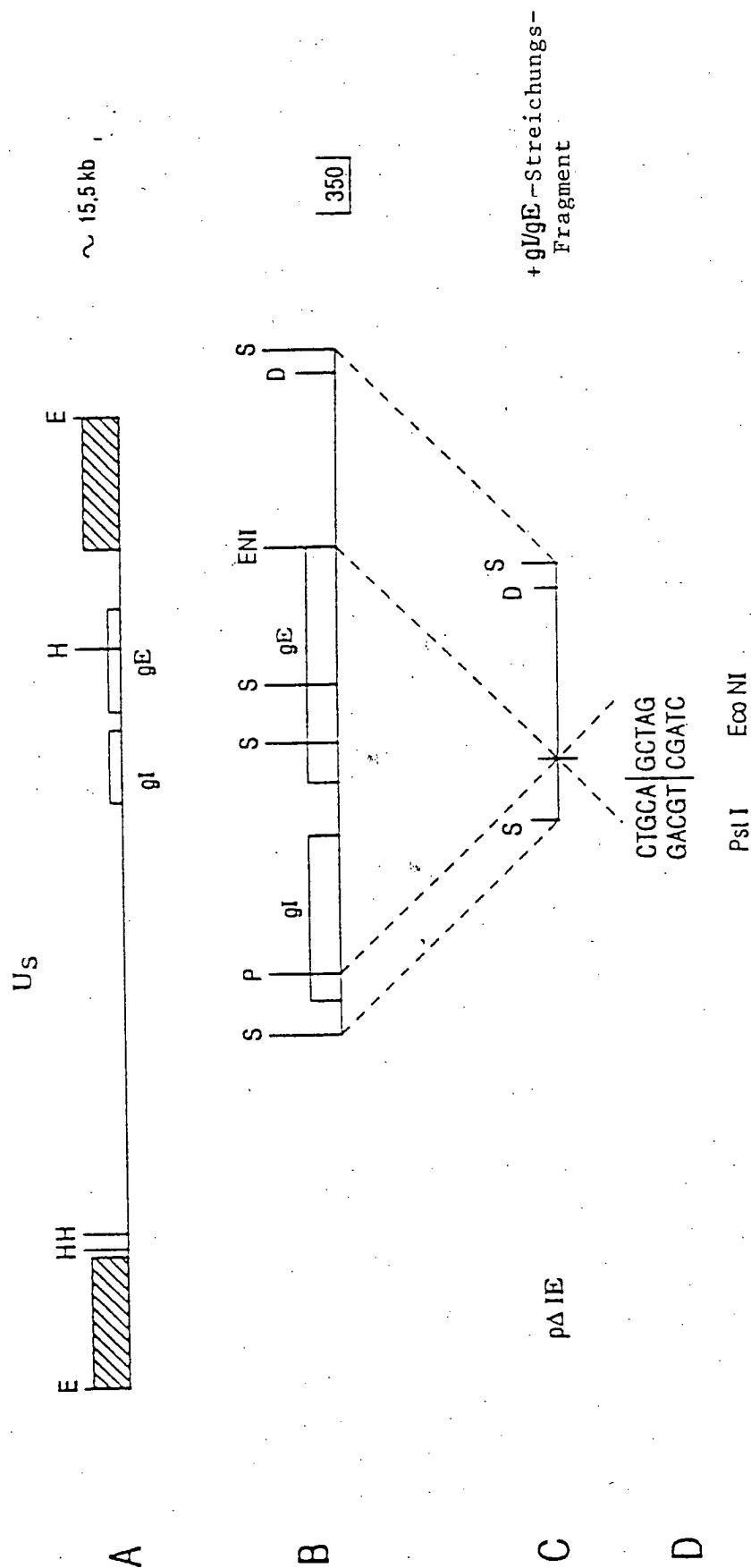


FIG. 16

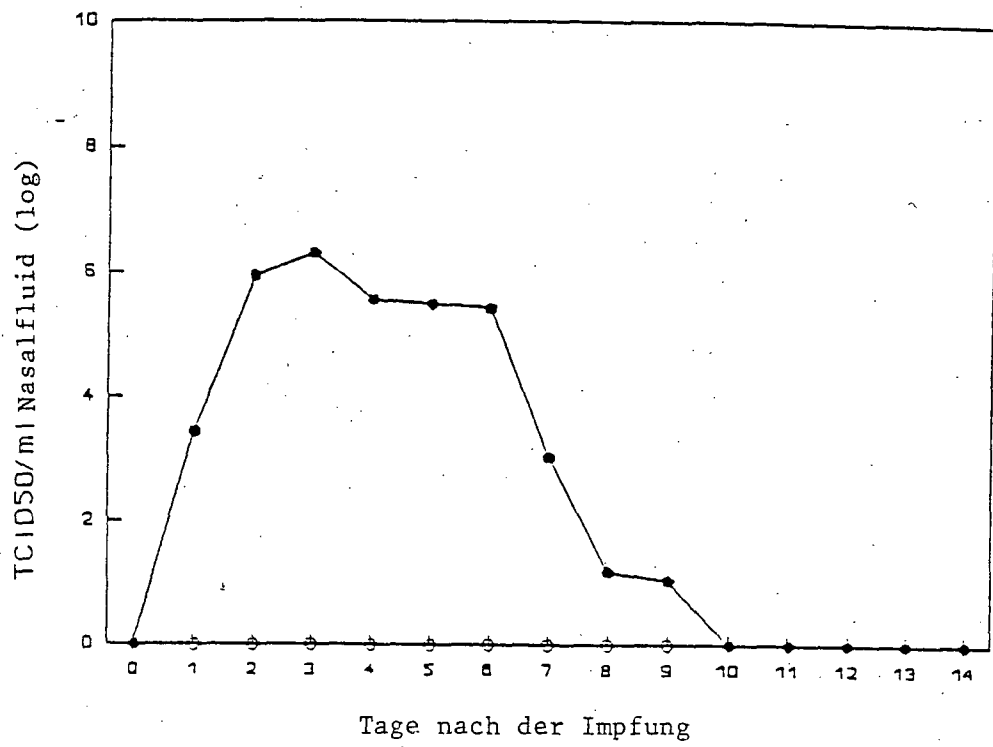


FIG.17

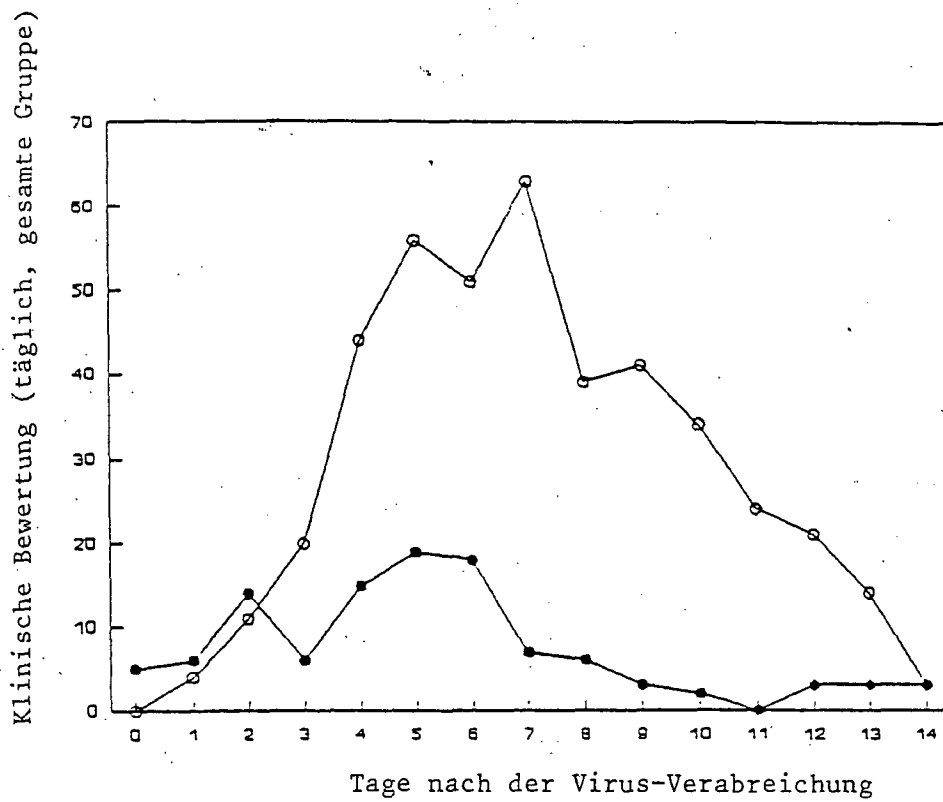


FIG.18

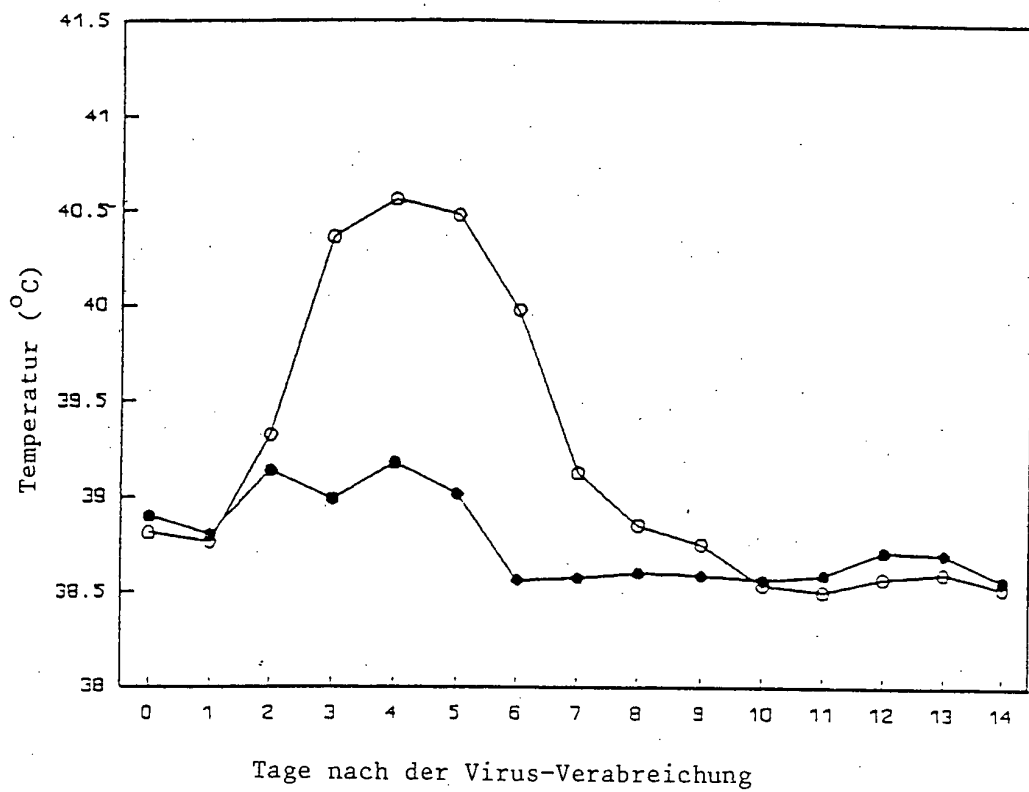


FIG.19

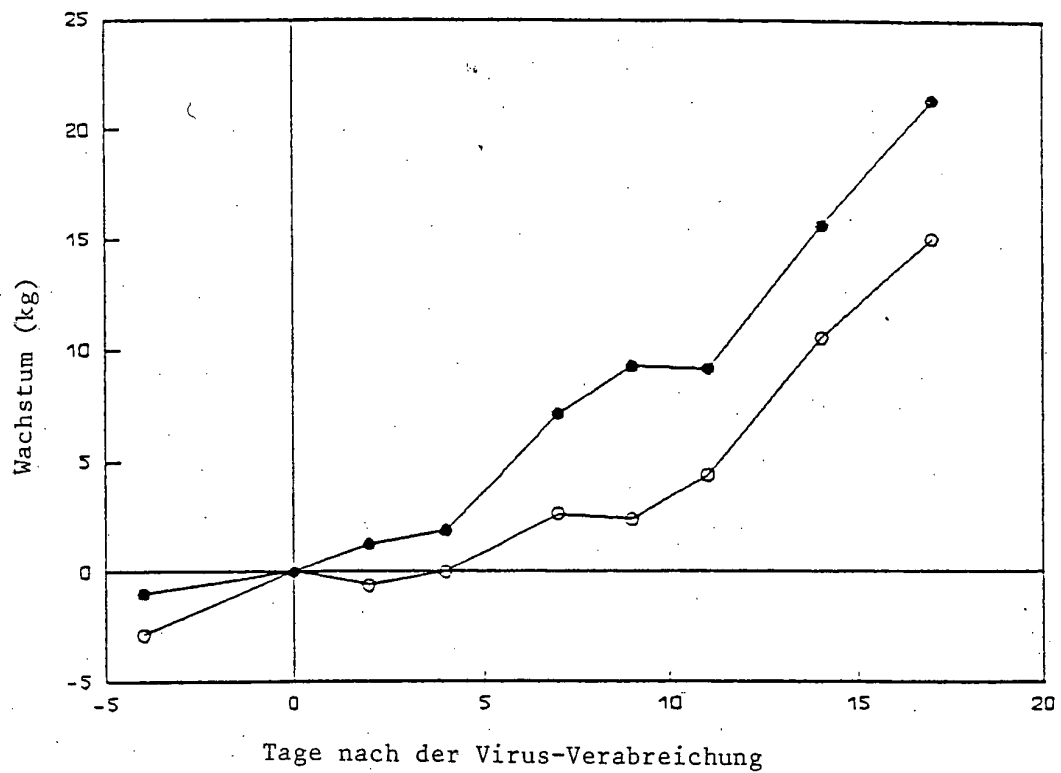


FIG.20

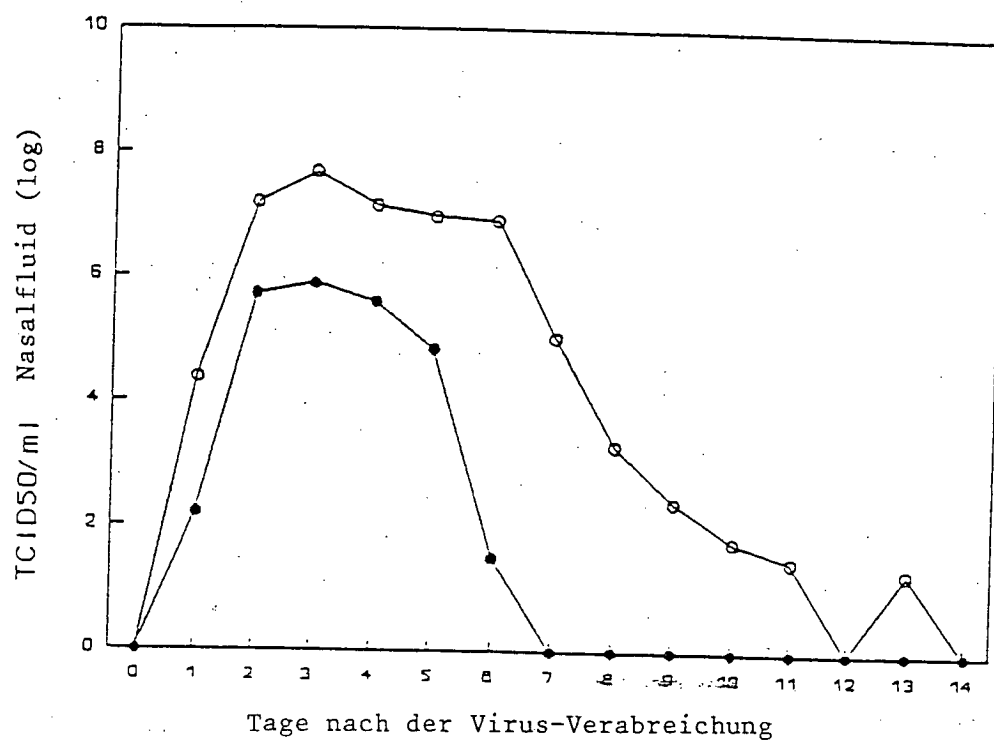


FIG. 21

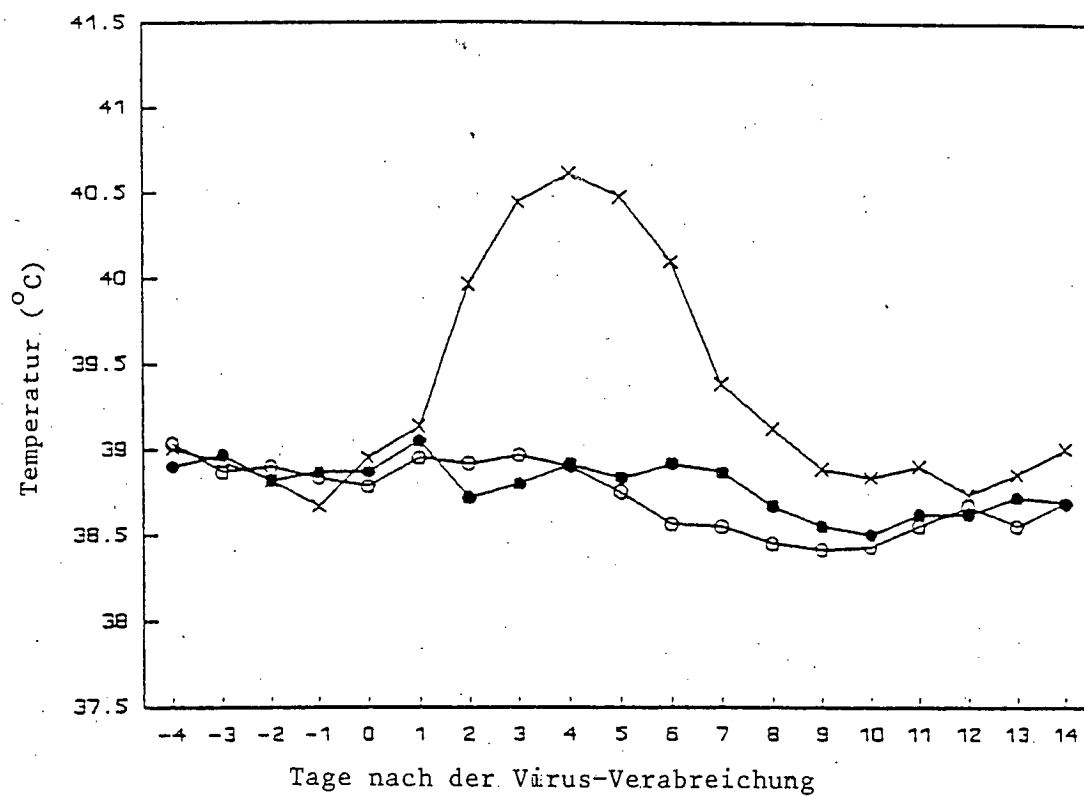


FIG. 22

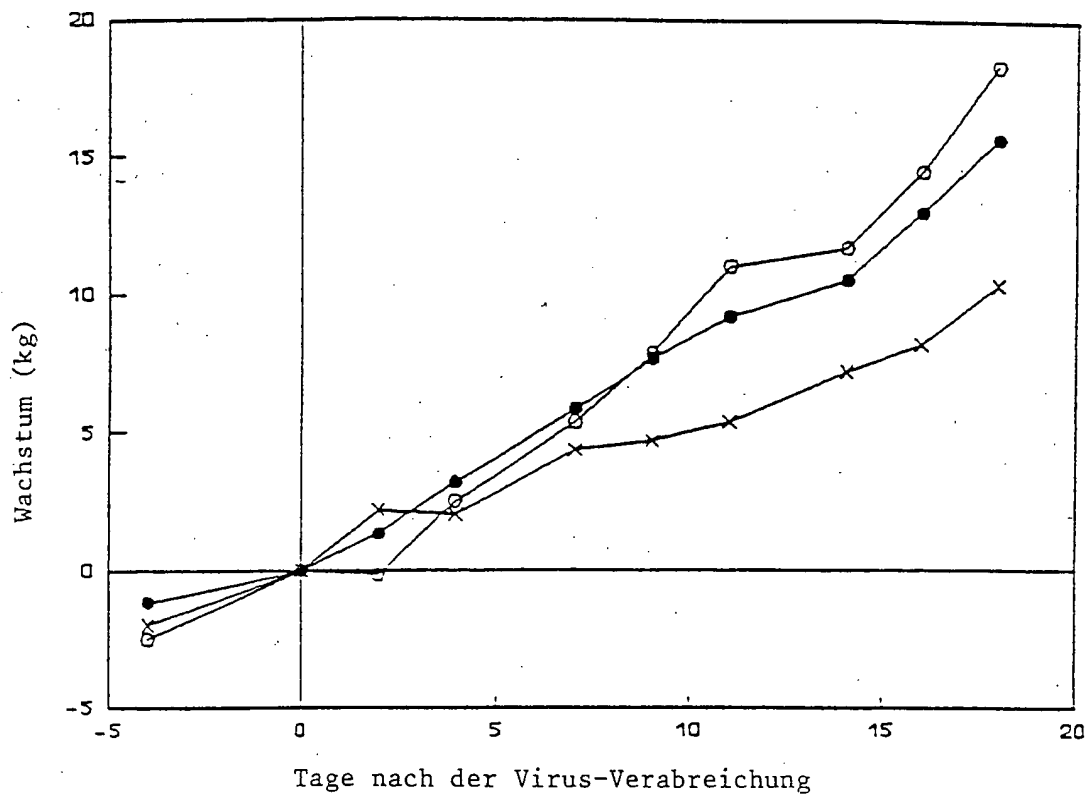


FIG. 23

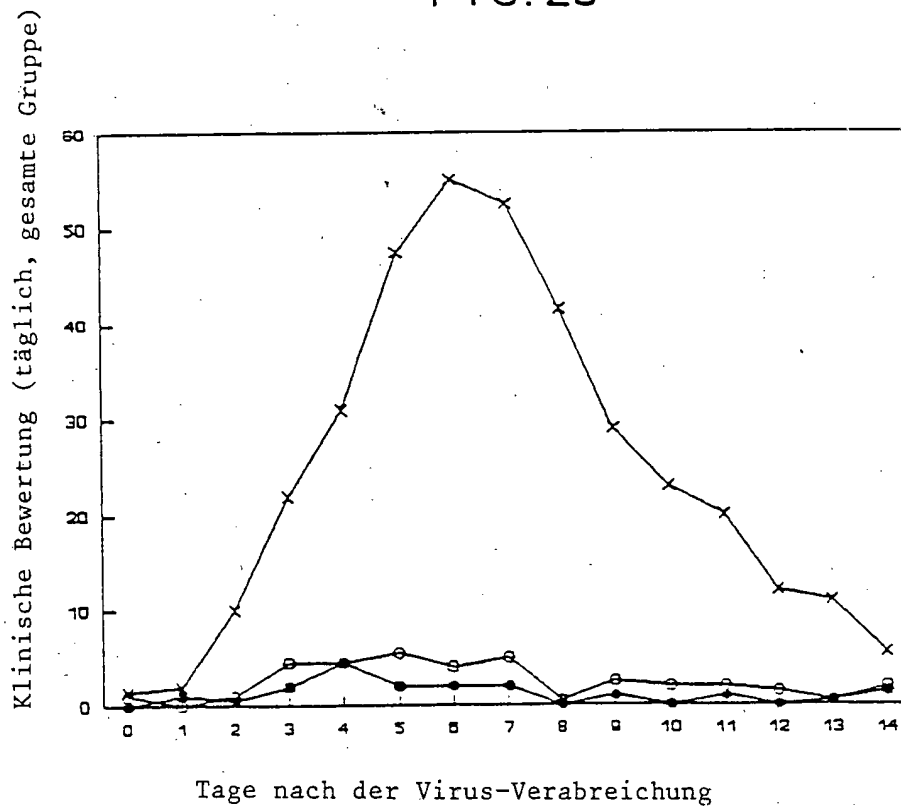


FIG. 24