(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 7/04

(45) 공고일자 2000년03월02일
(11) 등록번호 10-0237144
(24) 등록일자 1999년10월06일

(21) 출원번호	10-1993-0702293	(65) 공개번호	특1993-0703435
(22) 출원일자	1993년07월30일	(43) 공개일자	1993년11월30일
번역문제출일자	1993년07월30일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB 92/00179	(87) 국제공개번호	WO 92/13943
(86) 국제출원일자	1992년01월30일	(87) 국제공개일자	1992년08월20일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 핀란드 국내특허 : 오스트레일리아 브라질 캐나다 헝가리 일본 대한민국 노르웨이 폴란드 미국		
(30) 우선권주장	9102126.1 1991년01월31일 영국(GB)		

(73) 특허권자 더 유니버시티 커트 어브 더 유니버시티 어브 글래스고우 빌리 하킨
스코트랜드 글래스고우 지12 8큐큐 유니버시티 애브뉴
(72) 발명자 수잔 모리아브라운
영국 글래스고우 지이11 5제이아아르 처어치 스트리이트 인스티튜우트 오브 비롤로지 글래스고우 유니버시티 엠아아르시이 비롤로지 유니트
알라스 데어 로드릭 맥리인
영국 글래스고우 지이11 5제이아아르 처어치 스트리이트 인스티튜우트 오브 비롤로지 글래스고우 유니버시티 엠아아르시이 비롤로지 유니트
(74) 대리인 차순영, 차윤근

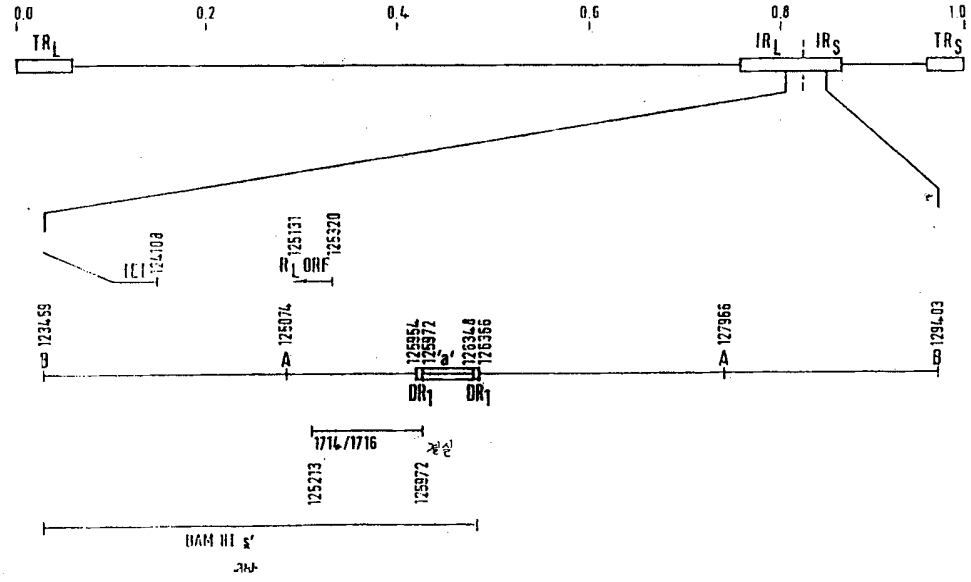
심사관 : 최규환

(54) 단순 포진 비루스-1 결실 변종 및 그의 제조 방법

요약

내로운 단순 포진 비루스 및 상기 새로운 HSV-1 균주를 기재로 한 백신을 서술한다. 특히, R_L의 말단 부분에서 결실을 갖는 비루스가 제공된다. 이 비루스는 이종 항원을 발현하도록 더 변형시킬 수 있고 또한 HSV 경량 입자를 과잉 생산하도록 조작할 수 있다. 이것은 UL 26 유전자내로 ts 돌연변이를 가입시키므로써 성취된다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

단순 포진 비루스-1 결실 변종 및 그의 제조 방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 신경발병력이 결여된 단순 포진 비루스 유형 1(HSV-1)의 변종에 관한 것이다. 상기 변종은 사람의 HSV 감염을 막기 위한 살아있는 약독성 백신의 제조시에 가치 있다.

단순 포진 비루스 유형 1(HSV-1) 및 유형 2(HSV-2)는 일반 인구의 80% 이상을 감염시키고 재발성 점막 피부 병면을 야기하는 중요한 사람 병원체이다. 복제한 후에 HSV는 활성 복제가 비공지 기작에 의해 완료되는 말초 신경계로 들어간다. 그 후에 뉴우런에서의 잠복 감염이 성립되고, 이는 숙주의 수명 동안 지속한다. HSV는 잠복 상태로부터 재활성화되어 감염성 장애를 생성할 수 있다. HSV는 비교적 무해성 피부장애에서 치명적인 비루스성 뇌염에 이르는 범위의 넓은 스펙트럼의 임상질병의 원인이다.

이미 상당량의 연구를 HSV-1 및 HSV-2 모두의 유전자 구성의 해명에 쏟았다. HSV-1 게놈은 두 성분 L 및 S로 구성되는 대략 152 킬로염기 쌍의 신형 이중 가닥 DNA 분자이다. 각각의 성분은 역전된 반복물의 측면에 접한 유일한 서열 U_1 및 U_S로 구성된다. HSV-2 게놈의 구성은 유사하나 동일하지는 않다. HSV-1 및 HSV-2의 유전자 구성의 상세한 설명을 위해서는 McGeoch, 1987 참조.

비루스 병원성 및 그의 정확한 기능의 해명에서 수반된 유전자의 확인은 단순 포진 비루스(HSV)의 생물학을 이해하는데 근본적으로 중요하다. 비루스 게놈의 긴 및 짧은 영역 모두의 유일 및 반복 서열에 정의된 결실을 갖는, HSV 유형 1(균주 17) 및 HSV 유형 2(균주 HG 52)모두의 다수의 변종이 이미 분리되었고 특성화되었다(Brown 일명 1984, Harland 및 Brown 1985, Brown 및 Harland 1987, MacLean 및 Brown, 1987a 및 b, Harland 및 Brown 1989). 그러나, HSV의 신경발병력을 조절하는 분자 기작에 관해서는 거의 알려져 있지 않다. JH2604로 명명된 HSV-2 균주 HG52의 결실 변종이 쥐의 뇌내 접종에 대해 무독성임이 밝혀졌다(Toba 일명, 1989a). JH2604는 게놈의 긴 반복 영역의 두 복사물[즉, 말단의 긴 반복물(TR_L) 및 내부의 역전된 긴 반복물(IR_L) 영역]내에 1488개 염기 쌍 결실을 갖는다.

RE6로 명명된 HSV-1 균주 17/HSV-2 균주 HG 52재조합체(Marsden 일행에 의해 Institute of Virology, Glasgow에서 최초로 분리, 1978)도 또한 쥐에서 무독성이라고 보고되었다(Thompson 일명, 1989).

HSV-1에서, ab 및 b′ a′ 으로 명명된 L성분의 역전된 반복물은 각각 대략 9Kbp인 반면 S성분 c′ a′ 및 ca는 각각 대략 6.5Kbp이다. L 및 S 성분의 역전된 반복물에 의해 공유된 서열은 'a' 서열로 명명된다. 이 서열이 L성분의 역전된 반복물의 b서열에 위치한 이배체 유전자에 대한 전사 개시부위 및 프로모터-조절 서열을 함유한다고 보고되었다(Chou 및 Roizman 1986). HSV 균주 F로 작업하여 이들 저자들은 'a' 서열과 IE1로 명명된 바로 앞의 유전자 사이에 전사된 오픈리딩 프레임(ORF)이 있음을 보고했다. 항펩티드 혈청을 사용하여 그들은 ORF가 ICP 34.5로 명명된 단백질을 지정함을 밝힐 수 있었다.(Ackermann 일명 1986). 최근에 Chou 및 Roizman(1990)은 그들의 지금 예측된 ORF가 분석된 2개의 다른 HSV-1 균주에서는 보존되나 글래스고(Glasgow) 균주 HSV-1(17) syn+에서는 보존되지 않음을 보고했다. Chou 일행(1990)에 의해 HSV-1의 신경발병력 좌위가 ICP 34.5와 함께 맵핑하고 그의 발현을 필요로함을 시사했다.

놀랍게도 R_L의 말단 부분에서 변형된 HSV-1 글래스고 균주 17변종이 신경발병력이 결여되어 있음을 발견했다.

상기 변종들은 CNS 뉴우런에서는 복제할 수 없으나, 말초 조직에서 복제할 수 있으므로 생쥐에서 우수한 면역학적 및 세포 중재반응을 유도할 수 있다. 이 능력은 이들 백신의 백신 효능을 강조한다.

본 발명에 따라 Bam HIS (0-0.02 및 0.81-0.83mu)내에 R_L의 말단 부분이 변형된 게놈인 HSV-1 균주를 제공한다.

Bam HI 이 의미하는 바가 HSV R_L 영역의 대략 3Kb Bam HI 분절의 각각의 복사물임을 인지할 수 있다.

여기서 사용된 용어 "변형된"은 하나이상의 뉴클레오티드의 결실에 의한 Bam HI 단편의 분열, 부가적인 뉴클레오티드의 삽입 또는 재배열 같은 뉴클레오티드 서열의 임의 다른 변경, 또는 치환을 나타낸다.

HSV-1은 동시에 분리된 결실 변종일 수 있거나 원하는 변형이 도입된 야생형 균주일 수 있다.

HSV 균주에서의 상기 변형은 유전자 조작에 의해, 예컨대 부위-조작된 돌연변이에 의하거나, 필요 변형물을 가입하는 미리-제조된 DAN 카세트로 치환하지 않거나 치환한 게놈의 부분을 삭제하여 제조할 수 있다. 대안적으로 자연적으로 HSV-1 변종을 유발하는 분리물, 예컨대 결실 변종일 수 있다.

바람직하게는 본 발명의 HSV-1 균주는 글레스고 균주 17변종이다.

한 바람직한 측면에서 HSV-1 균주는 서열내 125074np 및 125972np의 Alu I 부위 사이의 Bam HI 영역 및 TR_L내 그의 대응물(counterpart) 서열내 적어도 100뉴클레오티드가 결실된 균주이다.

보다 바람직하게는 Bam HI 영역 및 TR_L내 그의 대응물의 0.5 내지 3kb가 결실되고 더 바람직하게 약

0.7-2.5kb가 결실된다.

한 특정 실시예에서 HSV-1 변종은 변종 1702와 동시에 발생하는 결실 변종이고 하기 서술되는 바와같이 R_L 영역의 Bam HI 단편의 각각의 복사물내에 759bp가 결여된, 1714로 명명된 균주이며, 비(非)-신경발병력과 관련된 결실은 뉴클레오티드 위치 125213 및 125972 사이에 위치한다.

상기 결실은 'a' 서열의 18bp DR_1요소의 하나의 완전한 복사물을 제거하고 인접한 전의 유전자 1의 5′ 말단의 1105bp 상류를 종결시킨다.

또다른 특정 실시예에서, HSV-1 변종은 변종 1714 내 759bp 결실이 야생형 글래스고 균주 17^+내로 도입된, 1716으로 명명된 변종이다.

본 발명을 보다 명확하게 이해하기 위하여 하기에 제1도를 참고한다. 제1도는 : (a) 원형 배향의 HSV-1 게놈을 보여준다(지도 단위 표시함); 및 (b) Bam HI 을 확대한 것을 보여준다. Bam HI(B) 및 1714/1716에서의 결실 측면에 접한 AluI(A)부위를 표시했다. 모든 좌표는 McGeoch 일행(1988)의 번호 매김에 근거한다. 또한 IE1의 5′ 말단의 위치, 'a' 서열, 'a' 서열내 DR_1/U_b 결합, HSV-1과 HSV-2 사이의 189bp가 보존된 오픈 리딩프레임(R_LORF) 및 1714/1716 내 759bp 결실의 말단 지점을 나타낸다. 결실은 DR_1/U_b 결합으로부터 뻗어 R_LORF의 5′ 107bp를 제거한다.

본 발명은 그 밖에 본 발명에 따른 HSV-1 균주를 함유하는 전비루스 백신을 제공하며 상기 백신은 본 발명 균주의 면역보호 및 비-독성양을 포함한다. 상기 백신은 단독으로 또는 기타 항원 및/또는 보조약과 함께 상기 균주를 함유할 수 있다.

그들의 비-병원성 성질로 인하여, 본 발명의 비루스는 부가적인 변형을 위한 예기치 못한 후보이다. 예컨대 이종 항원을 운반하기 위하여 그들을 부가적으로 변형할 수 있다. HSV-2, 예컨대 HSV-2 gD로부터 항원을 발현시키도록 비루스를 처리할 수 있다. 상기 비루스는 항체 및 유형 1 및 유형 2 비루스에 대한 CTL 반응을 유도하고, 또한 전체 면역 반응을 증진시킨다. 유사하게 다른 병원체로부터의 다른 항원을 본 발명의 비루스로 발현시킬 수 있다. 예컨대, HCMV, VZV, EBV, HHV6, HHV7 및 HIV로 부터의 유전자 생성물 및 기타 엔벨로프 비루스도 참여할 수 있다.

또한, 본 발명의 비루스는 돌연변이, 전형적으로 온도 감수성 돌연변이를 캡시드 단백질, P40(Liu & Roizman 1991 a+b)을 암호화하는 유전자 UL 26a 내로 도입시켜 변형할 수 있다.

허용할 수 없는 온도에서의 상기 돌연변이는(전형적으로 38.5℃) 경량 입자(light particle)의 과잉생산을 결과하고; 그것은 뉴클레오캡시드 및 핵산이 결여된, 및 따라서 전염성이 결여된 비루스 입지이다. J. of Gen Virology(1991 72 p661 Szilagyi 및 Cunningham.

따라서 본 발명은 여기서 서술된 비루스로부터 유도된 경량입자를 제공한다.

부가적인 실시양태에서, 본 발명은 이종 항원을 운반하는 포진성 비루스 경량 입자를 제공한다. 예컨대 본 발명의 한 실시양태에서 HSV-1 1716은 HSV-2 gD를 발현하도록 변형시켰고 또한 38.5℃에서 UL26a 유전자내에 온도 감수성 돌연변이를 함유하도록 변형시켰으며; 이 돌연변이체는 HSV-2 gD를 함유하는 경량 입자를 과잉 생산한다. 다른 HSV-2 단백질도 상기 비루스, 특히 HSV-2 유전자 생성물 ICP0, ICP4 및 Vmw 65kD 내로 가입시킬수 있다. 다른 포진성 비루스 예컨대 HCMV, VZV, EBV, HHV6, HHV7, 및 기타 엔벨로핑된 비루스 예컨대 HSV-1 및 HSV-2로 부터의 막 단백질이 존재할 수 있다. 예컨대 HCMV로 부터의 gB, HSV-1 또는 HSV 2로 부터의 gp120을 비루스 경량 입자내로 가입시킬 수 있다. 이론적으로 세포내로 비루스가 들어가는 것을 방해하지 않는 임의 이종 막단백질은 본 발명에 따른 경량 입자에 의해 운반될 수 있다.

따라서, 본 발명은 이종 항원을 운반하는 포진성 비루스 경량 입자들 제공한다. 특히, 본 발명은 단순 포진 비루스, 바람직하게 유형 1의, 이종 항원을 운반하는 경량 입자를 제공한다. 본 발명은 상기 측면의 실시양태는 HSV-1 1716, $gD1^+$, $gD2^+$, UL26a ts 및 그로부터 유래한 경량 입자이다.

본 발명의 경량 입자는 Szilagyi & Cunningham의 방법의 변형에 의해 제조할 수 있다(상기 참조). 간단히, 세포를 허용할 수 없는 온도(npt) 38.5℃에서 5pfu/세포로 감염시키고 감염후 30분에 상등 비루스를 수확한다. 이 제제를 미리 형성된 5-15% Ficoll(Eagle′ s 배지에서 제조) 구배상에서 2시간 동안 12K로 원심분리한다. 경량 입자 띠를 26G 바늘로 떼어내고 정상 세포 성장 배지(Eagles)에서 밤새도록 20K로 펠릿화 했다.

본 발명의 경량 입자는 백신 용도에 유용하다. 따라서 본 발명의 부가적인 측면에서 이종 항원을 운반하는 포진성 비루스로 부터의 경량 비루스를 함유하는 백신을 제공한다. 부가적인 측면에서 BamHI (0-0.01 및 0.81-0.83mu)내 R_L의 말단 부분에서의 변형을 포함하는 비루스로부터 유래된 HSV-1 비루스 경량 입자를 함유하는 백신을 제공한다.

대안적으로, 또는 상기 언급된 변형(들)에 더하여, 본 발명의 비루스는 돌연변이, 전형적으로 LAT 프로모터를 무력하게 만드는 결실을 도입하여 변형할 수 있다. 상기 돌연변이는 안정성 수준을 더욱 상승시켜 잠복기로부터 재활성화하는 빈도 및 속도 모두를 감소시킨다.

따라서, 본 발명은 BamHI (0-0.02 및 0.18-0.83mu)내 R_L의 말단 부분이 변형되고 또한 LAT 프로모터를 무력하게 하도록 변형된 HSV-1 비루스를 제공한다. 상기 변형된 비루스는 상기 숙고된 방식으로 이종 항원 예컨대 HSV-2 gD를 생성하기 위해 더 변형시킬 수 있다. 또한 이종 항원 발현에 부가적으로 또는 대안적으로, 경량 입자의 과잉생산을 가능케하여 존재하는 잠재적으로 감염성인 비루스의 양을 감소시키기 위

해 온도 감수성 돌연변이를 유전자 UL26a 내로 가입할 수 있다. 상기 경량 입자는 비루스 입자의 Ficoll 원심분리에 의해 감염성 비루스와 분리할 수 있다. 보통, 경량 입자 띠내 중량(heavy) 입자 대 경량 입자의 비율은 $1:10^3$일 것이나, UL26a 내에 돌연변이가 가입된다면 중량 입자 대 경량입자의 비율은 전형적으로 약 $1:10^6$이다.

또한 본 발명은 적당한 부형제 또는 보조약과 본 발명에 따른 균주를 혼합하는 것으로 구성되는 전비루스 백신 제조방법을 제공한다.

살아있는 약독성 백신의 제조를 위해, 표준 방법론을 사용할 수 있다.

부가적인 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 백신의 면역학적 유효량을 그를 필요로 하는 사람 대상에게 투여하는 것으로 구성되는 사람의 HSV 감염 치료 방법을 제공한다.

본 발명 백신의 투여방법은 대상에게 본 발명의 균주 또는 경량 입자의 면역보호량을 전달하는 임의 적당한 경로일 수 있다. 그러나, 백신은 바람직하게 근육 내 또는 심피하 경로를 통해 비경구적으로 투여한다. 또한 기타 투여 방법을, 원한다면, 경구 투여와 같이 또는 기타 비경구적 경로, 즉 피내, 비내, 또는 정맥내로 사용할 수 있다.

상기 백신의 적당한 면역 보호 및 비-독성 투여량은 당업자에 의해 용이하게 측정될 수 있다. 즉 본 발명의 백신에 함유된 본 발명의 균주 또는 경량 입자의 적당한 면역보호 및 비-독성량이 통상적인 전비루스 백신내 항원의 유효량의 범위내이다. 그러나, 임의 특정 환자에 대한 특정 투여 수준은 연령, 전체 건강, 성별, 및 환자의 식단; 투여 시간; 투여경로; 투여되는 임의 다른 약물과의 상승 효과; 및 원하는 보호 정도를 포함하는 다양한 변수에 좌우될 것이다. 물론, 투여는 필요하다면 적당한 간격으로 반복할 수 있다.

하기 실시예는 본 발명을 예시한다.

[실시예]

[방법]

[세포]

새끼 햄스터 콩팥 클론 13세포(BHK21/C13)(MacPherson 및 Stoker 1963)를 정상 농도 두배의 비타민 및 아미노산, 5%(v/v) 트립토스 포스페이트 브로쓰 및 10%(v/v) 송아지 혈청(ETC 10)을 함유하는 Eagle′s 배지에서 증식시켰다.

[비루스]

비루스 축적물을 성장시키고 예전에 서술된 바와 같이(Brown 일부 1973) BHK21/C13 세포에서 적정시켰다. 모 HSV-1 균주는 글래스고 균주 17(Brown 일부 1973) 이었다. 네 개의 정상적으로 발생하는 HSV-1 Xbal 부위가 전혀없는 변종 1702는 1714가 분리된 모비루스이다(MacLean 및 Brown 1987a).

[비루스 게놈의 제한 효소 분석]

제한 효소 분석은 Lonsdale의 기술(1979)의 변형에 의해 수행했다. BHK21/C13 세포를 1%(v/v) 송아지 혈청을 함유하는 포스페이트가 없는 Eagle′s 배지에서 ^{32}Pi의 존재하에 감염시키고 31℃에서 48시간동안 항온처리했다. 비루스 DNA를 SDS 및 침전된 페놀 및 에탄올로써 추출했다. DNA를 제조업자의 권장 조건을 사용하여 다양한 제한 효소로 처리했다. 소화물을 TBE 완충액(89mM-트리스, 89mM붕산, 2mM 나트륨 EDTA) 내 적당한 농도(0.5-0.8%)의 아가로스 겔상에서 전기영동에 의해 분석했다. 겔을 공기 건조시키고 코닥 XS1 필름에 노출시켰다.

[DNA-DNA 혼성체화]

제한 엔도뉴클라제 소화물로부터의 DNA 단편을 서어던의 방법(1975)에 의해 아가로스 겔로부터 하이본드 나일론 막(Amersham)에로 이동시키고 PAT153 내로 클로닝된 Bam HI 노 (로+오) 단편으로부터 제조된 무작위로 개시된 DNA와 혼성체화했다.

65℃에서 16시간동안 pH 7의, 7% SDS 및 0.5M NaP를 함유하는 혼성체화 완충액에서 혼성체화를 수행했다. 예비 혼성체화는 수행하지 않았다. 필터를 앞서 서술된 바와 같이(Brown 일부 1984) 세척했다.

[동물 접종]

3주된 BALB/C 생쥐(Bantin 및 Kingman)를 개개의 비루스 축적물로써 심장내에 접종했다. 생쥐를 에테르로 마취시키고 포스페이트 완충 실란(PBS) 5% 송아지 혈청내 적당한 비루스희석물 0.025ml를 좌측 대 뇌반구의 중앙 영역내로 접종시켰다. 네 마리 생쥐를 10^1 내지 10^7pfu/동물의 투여량으로 각각 비루스로써 접종했다. 항상 비루스 축적물을 접종된 정확한 적정량을 측정하기 위해 접종한 날에 재적정하였다. 접종 후에 생쥐를 매일 관찰하고 21일까지의 사망을 기준으로 Reed 및 Muench(1938)의 식에 의해 LD_{50} 을 계산했다. 접종 후에 죽은 동물로부터 뇌를 떼어내고, 균질화하고, 초음파처리하고 결과의 현탁액을 BHK21/C13 세포에 대해 적정했다. 비루스 플라크를 집고 그들의 제한 효소 프로필을 하기와 같이 측정했다.

[생체의 비루스 성장 특성]

BHK21/C13(2×10^6)세포를 5pfu/세포의 모아(moi)로 감염시켰다. 37℃에서 45분동안 흡착을 수행하고 5% CS를 함유하는 포스페이트 완충 살린으로 두번 세척하고 10% CS를 함유하는 Eagle′ s 배지의 2ml 오버레이를 첨가한 후 37℃에서 항온처리를 계속했다. 표본을 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 및 24시간에 수확하고 초음파 처리에 의해 방출된 비루스를 37℃에서 적정했다.

[티미딘 키나아제 검정]

사용된 방법은 Jamieson 및 Subak-Sharpe(1974)의 것이었다. BHK21/C13 세포를 5pfu/세포의 모아로 야생형 또는 돌연변이체 비루스로써 모방 감염시키거나 감염시켰다. 37℃에서 1시간동안 흡착하고 37℃에서 6시간동안 항온 처리한 후에, 세포를 찬 PBS 내로 긁어 모으고 펠릿화했다. 펠릿을 5분동안 얼음 상에서 유지된 용해 완충액(20mM 트리스-HCl pH 7.5, 2mM $MgCl_2$, 10mM NaCl, 0.5% v/v 노니데트 P40, 6.5mM 2 메르캅토에탄올)에 재현탁시키고, 간단히 혼합하고 부가적으로 5분동안 얼음상에 되돌려 놓았다. 표본을 원심분리하고 상등액을 그대로 유지하였다. 5μl의 추출물을 총부피 50μl의 반응완충액(0.5M Na_2PO_4 pH 6, 100mM $MgCl_2$, 2mM dTTP, 100ml ATP, 5μl 수성 Me^3H 티미딘 1m(C/ml)과 혼합시켰다.

1시간동안 항온처리한 후에 10μl의 100mM EDTA 및 1mM 티미딘의 첨가에 의해 반응을 중지시켰다. 표본을 100℃에서 3분동안 가열하고 얼음상에서 3분동안 놓았다. 원심분리한 후에, 상등액을 DE81 원판 상에 점을 찍고, 이를 4mM 암모늄 포름에이트 pH 6.0 및 10μM 티미딘으로 3번(매번 37℃에서 10분)세척했다. 에탄올로 부가적으로 2번 세척한 후에 원판을 건조하고 3H 티미딘으로 인한 방사선활성을 측정했다.

[야생형 글레스고 균주 17내로 결실의 도입]

야생형 균주 17내로 1714 결실을 도입하기 위하여, 1714의 클로닝된 새로운 BamHI 단편을 BamHI로 선형화하고 17^+로부터의 무상 DNA와 함께 1, 2, 5, 10 및 20배 몰과량으로 동시 트랜스펙트 시켰다.

결과의 개별 플라크를 분리시키고 Lonsdale(1979)의 방법에 의해 그들의 DNA를 검정했다.

획득된 결실을 가짐을 나타내는 비루스는 비루스 축적물을 성장시키기 전에 부가적으로 3번 정제한 플라크 이었다.

[서열분석]

1714의 새로운 BamHI 단편을 표준 절차(Maniatis 1982)를 사용하여 pGEM 3z의 BamHI 부위내로 클로닝시켰다.

양성 클론을 제한 효소 분석에 의해 확인하고 서어던 블롯팅에 의해 전체 HSV-1 DNA를 및 양성 클론으로부터 무작위로 개시된 DNA를 사용하여 확증했다. 부가적인 제한 효소 분석은 결실의 크기가 대략 800bp이고, 2.8kb AluI 단편내에 있음을 확증했다. 이 단편을 겔로부터 용리하고 SmaI으로써 소화시키고 몇몇 작은 단편을 M13mp8로 서브클로닝시켰다. 단일 가닥 주형 DNA를 제조하고 Sanger 일행(1980)의 방법에 의해 ^{35}s 라벨된 dATP를 사용하여 서열화했다. 서열화 생성물을 단일 농도 6% 아크릴아미드, 1×TBE, 8.3M 우레아 겔상에서 주행시켰다.

[잠복성 연구]

삼주된 BALB/C 생쥐(Bantin & Kingman)의 오른쪽 뒤 각부를 앞서 서술된 바와 같이(Clements & Subak-Sharpe 1983, 1988)접종했다. 접종과 동시에 비루스를 BHK21/C13 세포 상에 적정하여 투여된 정확한 양을 확인했다. 각각의 비루스의 경우에 일련의 100배 희석물을 접종하고 생쥐를 관찰하고 매일 임상 증상을 기록했다. 생쥐가 살아남은 6주에 잠재 비루스에 존재를 관찰했다. 생쥐들을 죽이고, 해부하여 두개의 최저 흉관, 6개 허리 부분 및 최상의 두개의 천골신경절을 접종 측면으로부터 떼어내고, 배양 배지에 놓고 BHK21/C13 세포를 억제하는 배양 배지를 옮겨 매 두번째 날에 감염성 비루스의 방출을 스크리닝했다. 접종된 BHK21/C13 세포를 염색하고 비루스 플라크 또는 cpe의 존재를 관찰하기 전에 2일동안 37℃에서 항온처리했다.

[실시예 1]

(a) 변종 1714의 분리 및 게놈 분석

HSV 내 재조합을 연구하기 위하여 우리는 선택되지 않은 마커로 사용되는 특정 제한 효소 부위가 전혀없는 비루스를 구성했다(Brown 일행 ; Harland 및 Brown 1985; Maclean 및 Brown 1987c). HSV-1 균주 17 돌연변이체 1702(MacLean 및 Brown 1987c)(네개의 HSV-1 XbaI 부위 및 TK^-가 전혀없는)는 부위 조작 돌연변이원에 의해 다양한 HindIII 부위를 제거하기 위해 사용된 모비루스였다. 1702로부터 유래된, 그러나 0.91mu HindIII 부위가 결여된 비루스 분리물 H1으로부터의 DNA를 0.18mu HindIII 부위가 전혀없는 돌연변이 플라스미드와 동시 트랜스펙트시켰다. 많은 수의 결과의 후대 플라크를 집고 그들의 DNA를 제한 효소 분석에 적용시켰다. 0.18mu HindIII 부위가 손실된 원하는 돌연변이체를 성공적으로 분리하는데 더하여, HindIII부위의 손실과 관련되지 않은 변이 RE 프로필을 갖는 비루스를 검출했다.

1714 DNA의 KpnI 소화시에, KpnI 단편(2.4×10^6mw)이 손실됨이 발견되었고 약 1.9×10^6의 새로운 결합이 발견되었다. KpnI 단편은 Rr(0-0.025mu 및 0.805-0.83mu)의 말단부분이고 연결 단편 (단편 + 1)

및 [illegible] 를 형성한다. 1714 [illegible] 단편이 그의 동등한 야생현 단편보다 가장자리에서 더 빠르게 주행하나 겔의 상층에서의 주행에서 변화를 볼 수 없음을 볼 수 있다. 유사하게 Hpal [illegible] (3.6×10^6mw)가 분실되었고 대략 3.1×10^6몰 중량의 새로운 띠가 [illegible] 아래의 감지할 수 있는 주행이었다.

Hpal [illegible] (0-0.036mu 및 0.79-0.83mu)은 가장자리에서 17^+ 보다 빠르게 주행하는 1714에서 볼수 있는 연결물 [illegible] 및 [illegible] 을 형성한다. 1714 DNA의 BamHI 소화에 따라, BamHI [illegible] (1.95×10^6mw)가 분실되고 약 1.45×10^6의 몰 중량을 갖는 [illegible] 아래에 주행되는 새로운 띠가 나타난다. 또한 연결물 [illegible] 를 함유하는 BamHI [illegible] 는 감지할 수 없으나 결실된 결합물이라고 추정되는 3.5×10^6의 물 중량을 갖는 새로운 띠가 [illegible] 아래에 보인다.

합하면, 제한 효소 프로필은 1714가 0-0.096mu 및 0.81-0.83mu의 말단 부분의 두 복사물에서 결심이 있음을 나타냈다. 결실의 크기는 600-800bp라고 평가되었다.

R/L의 양복사물에서 서열의 손실을 실증하기 위하여, 1714 DNA의 서어던 블롯 분석을 수행했다. 17^+ 및 1714 DNA를 BamHI으로 소화시키고 니트로셀룰로오스 막에로 이동시킨다. 17^+ DNA의 BamHI [illegible] 단편(+)을 무작위로 개시하고 소화된 DNA에로 혼성체화시켰다. 17^+트랙에서, 프로브가 [illegible] 및 [illegible]로 혼성체화함을 발견했다. 1714에서는 프로브를 [illegible]로 혼성체화하는데 실패했으나 새로운 [illegible]로, 부가적인 'a' 서열을 갖는 새로운 [illegible]로, 및 [illegible] 로 혼성체화했다. [illegible]로의 혼성체화는 없으나 그 아래에 주행하는 새로운 [illegible] 로 혼성체화되었다. 크기-사다리의 가입은 결실이 약 800bp임을 나타냈다. 상기 결과는 1714가 R_L의 양 복사물에서 결실되었고 결실분이 BamHI [illegible] 내로 포함되었음을 명백히 입증한다.

(b) 서열분석

HSV-1 균주 17의 BamHI [illegible] 연결 단편(s+g)는 뉴클레오티드 위치(n.p.) 123459 및 129403의 사이에 위치한다(McGeoch [illegible] 1988-). 1714에서 BamHI [illegible] 단편은 약 800bp이 결실된다. 1714의 이 새로운 BamHI [illegible] 는 pGEM의 BamHI 부위에로 클로닝했다. 부가적으로 제한 분석은 결실 변종에서 1714의 크기가 야생형 2.9kb 단편에 비하여 대략 2.1kb이며 AluI 단편(125074-127066 n.p.)내에 결실이 있음을 나타냈다. 1714로 부터의 이 AluI 단편을 아가로스 겔로부터 용리시키고, SmaI으로써 재소화시키고 결과의 부단편을 M13mp8 내로 클로닝시켰다.

SmaI 단편의 디데옥시서열화는 길이가 759bp 이므로 결실을 확인했고 뉴클레오티드 위치 125213 및 125972 사이에 위치했다. 서열된 나머지 SmaI 단편으로부터, 다른 돌연변이는 감지되지 않았다. R_L 내에 유일하게 정확히 정의된 유전자는 IR_L 내 5′ 말단이 124108 n.p., 즉 결실분의 1105bp 하류에 위치하는 IE1이다. HSV-1 균주 17내 IR_L/IR_S 'a' 서열은 뉴클레오티드 위치125954에서 출발한다. 1714에서 'a' 서열의 한 완전한 186bp DRI 요소(AGCCCGGGCCCCCCGCGG)를 정확히 제거했다.

[실시예 2]

a) Balb/c 생쥐에 대한 결실 변종 1714의 신경발병력

우리는 앞서 HSV-2 균주 HG52의 결실변종 JH2604가 야생형 비루스의 경우에 〈10^2 pfu/쥐인데 비해〉 10^7 pfu/쥐의 LD_{50} 값으로써 Balb/c 생쥐에 대해 신경발병력이 없음을 밝혔다.

JH2604의 서열분석은 게놈 긴 반복물(0-0.02mu 및 0.81-0.83mu 사이)의 말단 부분이 균주 HG52에 대해 신경발병력을 제공함을 입증했다.

1714가 HSV-1 게놈의 동등한 부분에서 결실되었으므로, 그의 모 1702 및 17^+와 비교하여 Balb/c 생쥐에서의 LD_{50} 값을 평가하므로써 1714의 신경발병력을 측정하는 실험을 수행했다.

17^+, 1702 및 1714의 상이한 투여량이 25μl 분취량을 3주된 Balb/c 생쥐의 좌측 대 뇌반구 내로 접종했다. 뇌염으로 인한 죽음을 접종 후 21일까지 기록하고 결과를 표 1에 나타낸다. 17^+의 선발 실허실 축적물은 〈$10^{1.5}$ pfu/생쥐의 LD_{50} 값을 나타냈다. tk 음성이라도 돌연변이체 1702는(MacLean 및 Brown 1987a) 5×10^2 pfu/생쥐의 가장자리에 더 높은 LD_{50} 값을 제공했다. 1714의 경우에 10^6 pfu의 접종으로는

동물이 죽지 않았으나 7×10^6 pfu/생쥐의 LD_{50} 값을 제공하는 10^7 pfu로써 3/4가 죽었다. 따라서 결실 변종 1714는 모 1702 비루스보다 적어도 2×10^4배 덜 신경발병성이고 야생형 17^+보다 적어도 7×10^5배 더 높게 신경발병성이다. 죽은 1714 감염된 생쥐의 뇌로부터 단일 플라크를 분리시키고 플라크의 DNA를 제한 효소로써 소화시켰다. RE 프로필은 1714의 것과 동일했으며 야생형 오염물 없음을 보였다. 17^+의 경우에 72:1 및 1714의 경우에 58:1의 입자:pfu 비율이 동등하고 HSV-1의 경우에 값의 정상 범위내이다.

(b) 생체내 1714의 성장

HSV-2(HG52) 변종 JH2604는 무독성임이 밝혀졌고; 생쥐내에서 복제되지 않았고 회사한 뇌염을 생성하지 않았다(Taha 외래 1990). 또한 1714의 신경발병력 부재가 생쥐뇌내에서 복제의 실패에 인한 것인지 평가하기 위하여 17^+(10^2 pfu), 1702(10^2 pfu) 및 1714(10^5 pfu)의 표본을 3주된 Balb/c 생쥐의 좌측 대뇌반구에 접종했다. 접종 후 다양한 시간에(비루스당)2마리 생쥐가 죽었고, 그들의 뇌를 떼어내고 -70℃로 동결시켰다. 뇌 조직을 균질화하고, 결과의 현탁액을 초음파처리하고 37℃에서 BHK21/C13에 대해 플라크 적정하여 후대 비루스를 검정했다.

이 결과는 모균주 17의 경우에 감염 후 12시간 및 6일 사이에 비루스가 지수적으로 성장하여, 8×10^6 pfu/뇌의 최종 적정량에 달했다. 1702에서도 마찬가지로, 접종 후 24시간에 감지할 수 있는 비루스가 있었고 지수적 성장은 6일까지 8×10^4pfu/뇌의 적정량에 달했다. 10^5pfu, 2×10^3pfu의 투여량을 투여한 1714 감염 동물에서는 접종 후 즉시 감지할 수 있었다. 복제는 감지할 수 없었고 접종 후 3일에 이를 때까지 감퇴된 투여 비루스는 분석할 수 있는 비루스가 아니었다(〈10pfu).

(c) 생체외 1714의 성장

변종 1714는 BHK21/C13 세포에서 낮은 모아에 따라 다중주기 성장에 의해 높은 역가(〉10^9 pfu)로 성장한다. 31℃, 37℃, 및 38.5℃에서 검정할 때 축적물은 동등한 역가를 나타난다. 그의 성장 패턴을 측정하기 위하여, 37℃에서 BHK21/C13 세포에서 단일 주기 성장 실험을 수행했다. 결과는 17^+ 및 1702 및 1714 변종이 동일하게 우수하게 제공하는 동등한 최종 수율로 성장했음을 보여주었다. 1714의 정상 단일 주기 성장 패턴은 BHK21/C13 세포에서 그의 복제가능한 주기에서의 임의 단계에서 결합을 나타내지 않는다.

비루스가 숙주 제한적인지 측정하기 위하여, 24시간 산출 실험을 5pfu/세포의 모아로 감염된 세포계의 범위에서 수행했다. 사용된 세포계는 BHK/C13(햄스터), BSC1(원숭이), Vero(원숭이), MDCK(개), HFL(사람) 및 3T6(생쥐)였다. 37℃에서 적정된 BHK21/C13 세포에서의 24시간 산출량은 BHK21/C13세포에서의 산출량에 비교하여 특정 세포계에서 성장한 비루스의 산출량의 비율로서 표 2에 나타낸다. 17^+, 1702 및 1714가 근복적으로 유사한 방식으로 행동하며; 그들이 BHK21/C13, 3T6 및 MDCK 세포에서 동일하게 우수하게, Vero 세포에서 더 우수하게, 그리고 HFL 및 BSCI 세포에서 덜 우수하게 성장함을 볼수 있다. 생체내에서 성장의 결함이 종 특이적이지 않음을 나타내는 생쥐 3T6 세포에서 복제 결점이 없었음을 주목하라.

[실시예 3]

[잠복성 연구]

3주된 Balb/c 생쥐의 오른쪽 뒤 각반을 17^+, 1702 및 1714의 일련의 10배 희석물(4생쥐/투여량)로써 접종시키고 2주 동안 매일 질병 또는 죽음의 신호를 감시한다. 접종후 6주에, 살아남은 생쥐를 방법(상기)에 윤곽을 나타낸 바와같이 해부하고 신결정을 배양 배지함유 미소적정 웰에 따로따로 옮겼다.

BHK21/C13 세포를 조절하기 위해 배양 배지의 분취량을 옮기므로써, 외식후 매 두번째 날에 감염성 비루스의 존재에 대한 스크리닝을 수행했다. 그 다음 세포를 37℃에서 2일 동안 항온처리한 다음 염색하고 비루스 플라크 또는 cpe의 존재를 관찰했다.

표 3의 결과는 17^+ 및 10^4 및 10^5 pfu의 투여량에서 외식된 신경절의 20%가 재활성화됨을 나타낸다. 그러나, 접종 후 곧 10^4 pfu 감염된 동물중 1마리 및 10^5pfu 감염된 동물중의 3마리 후지마비를 일으켰고 죽어야 했다. 모두 죽을 것이라고 예측되었으므로 동물을 17^+의 10^6pfu로 접종하지 않았다. 1702 감염된 동물에 있어, 10^4 및 10^5pfu의 투여량에서 신경절의 5%가 재활성화되었고 10^6pfu 투여량에서 17.5% 재활성화되었다. 이는 아마도 상기 변종의 tk 음성 표현형으로 인하여 17^+보다 명백히 덜 효율적이다. 1714접종된 동물에 있어, 10^4pfu 감염된 동물로부터 신경절이 재활성화되지 않았고, 10^5pfu 감염된 생쥐로부터 단지 1/40(2.5%)가 재활성화되었고 10^6pfu 감염된 동물로부터 2/40(5%)가 재활성되었다. 비루스는 외식후 6일에 처음 활성화 되었고 3개 비루스 사이에 재활성화 시간의 유의한 차이는 없었다. 비루스 재활성화는 생쥐의 3개 군에서 요추 신경절에 제한되었다.

tk 음성 표현형을 고려하여, 변종 1714는, 잠복할 수 있더라도, 잠복 상태의 성립 및/또는 외식후 그로부터의 재활성화에서 1702보다 매우 덜 효율적이다.

[실시예 4]

[17^+ 야생형 게놈내로 1714 결실의 도입]

1714 결실이 야생형 배경에는 있지 않으므로, 즉 0.07, 0.29, 0.45 및 0.63mu에서 네 개의 Xbal 부위가 게놈에서 결실되었고 비루스가 tk 음성이므로, 이들 기타 돌연변이에 의해 그의 무독성 표현형이 적어도 부분적으로 있음을 생각할 수 있다. 동일한 Xbal 음성 및 tk 음성 돌연변이를 함유하는 모 균주 1702가

17^+에 근본적으로 동등한 발병 표현형을 가지므로 매우 유사하지 않은 듯이 보였다. 그럼에도 불구하고 우리는 1714 내 결실을 다른 전체적으로 야생형인 게놈내로 도입시키기로 결정했다. 17^+DNA를 1714의 플라스미드 클로닝된 BamHI k 의 10-배 과량과 동시-트랜스펙트했다. 결과의 단일 후대 플라크를 분리하고 Lonsdale(1979)의 방법으로 그들의 DNA 프로필을 분석했다. 1716으로 명명된 1714 BamHI 프로필을 갖는 비루스를 분리하고, 플라크를 부가적으로 3번 정제하고 비루스 축적물을 성장시켰다. 1716이 Xbal부위 및 tk 활성의 면에서 그의 야생형 배경을 보유함을 확인하기 위하여, 1716의 DNA를 Xbal로써 소화시키고 tk 검정을 수행했다. 1716이 U_L 내에 네 개 부위를 보유하는 정상의 야생형 Xbal 프로필을 갖는 반면 1714 및 1702는 Xbal로 소화하지 못함을 발견했다. 17^+, 1702 및 1714에 비교하여 1716에 대한 tk 검정의 결과는 표 4에 제공되고 1716이 합성한 tk 내 17^+만큼 효과적임을 나타낸다. 1716의 신경발병력 표현형을 Balb/c 생쥐의 IC 접종에 의해 시험했다. 17^+ 및 1714와 비교한 그의 LD_{50}값이 표 5에 제시된다. 그것이 7×10^6pfu/생쥐의 LD_{50} 값으로써 비-신경발병성인 한편 상기 실험에서 17^+가 1716내 결실된 서열이 균주 17에 대해 신경발병력을 제공함을 확증하는, 〈10pfu/생쥐의 LD_{50} 값을 가짐을 볼 수 있다.

1716에 의한 단일 주기 성장 실험의 결과는 1716이 야생형 17^+비루스 만큼 효과적으로 성장함을 밝혔다.

[표 1]

비루스	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	LD_{50} (pfu/생쥐)
17^+	4/4*	4/4	ND	ND	ND	ND	$<10^{1.5}$
1702	2/4	3/4	4/4	4/4	ND	ND	5×10^2
1714	ND	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	7×10^6

* 죽은 숫자/접종된 숫자

ND = 접종하지 않음

[표 2]

세포 / 유형 / 비루스	BHK21/C13 표준	Vero	BSC1	3T6	MDCK	HFL
17^+	7.6×10^6*	1.83+	0.43	0.98	0.68	0.65
1702	5.2×10^6	2.8	0.48	1.31	1.11	0.29
1714	5.6×10^6	1.34	0.39	0.97	1.07	0.42

* 37℃ 에서 24시간에 걸친 비루스 산출량은 pfu/5 x 10^5 세포로 표현되었다.

+ BHK21/C13 세포에서의 산출량에 비교한 특정 세포 유형에서의 비루스의 산출량 비율

[표 3]

접종 투여량 / 비루스	10^4 pfu/생쥐	10^5	10^6
17^+	6/30* (20^+)	2/10 (20)++	ND
1702	2/40 (5)	2/40 (5)	7/40 (17.5)
1714	0/40 (0)	1/40 (2.5)	2/40 (5)

* 재활성화한 신경절의 수 / 의식된 신경절의 수

+ 재활성화한 %

++ 네마리 동물을 감염시키고 / 각각으로부터 10 신경절의 외식했다.

17^+ 감염된 동물에 있어, 10^4pfu 에서 1마리 동물 및 10^5pfu 투여량에서 3마리가 감염후 곧 마비를 일으켰고 죽여야 했다.

[표 4]

글랙스코 균주 17 및 변종 1714 및 1716 에 대한 tk 검정	
	방사선활성 cpm / μg 단백질
모방 감염됨	11267
글랙스코 균주 17	143894
1714	8399
1716	131987

[표 5]

뇌 내 (IC) 접종원 / 생쥐 (pfu)								
비루스	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	LD_{50} (pfu/ 생쥐)
17^+	4/4*	4/4	ND	ND	ND	ND	ND	<10
1714	ND	ND	ND	ND	0/4	0/4	4/4	5×10^6
1716	ND	ND	ND	0/4	0/4	0/4	3/4	7×10^6

* 죽은 수 / 접종한 수

ND = 접종하지 않음음

[실시예 5]

[HSV-1 1716 $gD1^+$, $gD2^+$의 구성]

HSV 2 균주 HG52 (Mcgeoch 일례 1987a)의 Hind III 1 단편을 함유하는 재조합 플라스미드를 제한 엔도뉴클라제 Bst EII 및 Dra I 로써 소화시키고 np 5893의 Dra I 부위로부터 np 8893 의 Bst EII 부위까지의 3 Kb 를 정제했다. 이 단편은, 프로모터, 오픈리딩 프레임 및 3′ 공동 말단의 유전자 UL 6 (gD-2) 및 US 7 (gI-2) 의 폴리 A 신호를 포함한다. Bst EII 부위의 5′ 오버행은 클레나우 폴리머라제를 사용하여 평편하게 종결되었다. 상기 gD-2 함유 단편을 불필수 일체 막 단백질 (Maclean C 일례 1991), UL 43 (McGeoch 일례 1988)을 함유하는 RSV1 의 Bam HI/ECoR1 91610/96751 np 단편에 삽입시켰다. 삽입부위는 UL 43의 5′ 말단의 유일한 Nsi I 부위 np 94911 이었다. Nsi I 부위의 5′ 오버행을 클레나우 폴리머라제를 사용하여 평편하게 종결시켰다. 모든 클로닝 기술은 1982년에 Maniatis 일행에 의해 서술된 바와 같다.

재조합 UL 43 gD2 HSV1 단편을 무상 HSV1 1716 변종 DNA 로써 동시트랜스펙트시켰고 재조합 게놈을 서술된 바대로 분리시켰다(실시예 4 및 Maclean 일례 1991). gD2 를 함유하는 HSV 재조합체를 분리시켰다. 이 비루스 $gD1^+$ $gD2^+$, ICP34.5는 1716로서 구별된다.

[실시예 6]

a) HSV-1 1716 U126 ts 의 구성

ts 1201 (Preston 일명 1983)의 클로닝된 ECORI f 단편은 ts 지점 돌연변이를 갖는 UL 26을 함유한다. 이것을 1716내로 재조합시켜 실시예 4에서 앞서 서술된 바와 같이 HSV-1716 UL 26 ts를 생성했다.

HSV -1 1716 $gD1^+$ $gD2^+$UL 26 ts의 구성.

b)표준 방법론을 사용하여 상기 실시예로부터의 HSV-1 1716 UL 26 ts 및 HSV-1 1716 $gD1^+$ $gD2^+$ 를 재조합시켜 HSV-1 1716 $gD1^+$, $gD2^+$, UL 26 ts 비루스를 제공했다.

[실시예 7]

1716 $gD1^+$, $gD2^+$ LAT P^- 및 1716 $gD1^+$ $gD2^+$ UL 26 ts LAP P^- 의 구성

HSV-1 1704 로 부터 분리된 단편(Steiner 일명 1989, JuneJo 일명 1991)은 LAT 프로모터의 양 복사물에서 942 bp 결실을 운반한다. 이 단편을 1716 $gD1^+$, $gD2^+$ 및 1716 $gD1^+$ $gD2^+$ UL 26 DNA 및 분석된 단일 플라크로써 동시 트랜스펙트시켜 1716 $gD1^+$ $gD2^+$ LAP P^- 및 1716 $gD1^+$ $gD2^+$ UL 26 ts, LAP P^- 를 제공하였다.

HSV-1 균주 1714 및 HSV 균주 1716은 유러피안 콜렉션 오브 애니멀 셀 컬쳐, 백신 리서치 앤드 프로덕션 연구소, 프로톤시의 공공 보건 연구소 서비스, 살리스버리 윌트쉬트 SP4, 0J9, UK 에 1992년 1월 28일자로 기탁했고 주어진 수탁 번호는 각각 V92012802 및 V92012803 이었다.

[참고문헌]

Ackermann, m., Chou, J., Sarmiento., M., Lerner, R.A. & Roizman, B. (1986). Identification by antibody to a synthetic peptide of a protein specified by a diploid gene located in the terminal repeats of the L component of herpes simpiex virus genome. J. Virol. 58, 845-850.

Brown, S.M., Ritchie, D.A. & subak-Sharpe, H.H.(1973).

Genetic studies whit herpes simplex virus type I. The isolation of temperature sensitive mutants, their arrangement into compleementation groups and Recombination analysis leading to a linkage map. J. Gen. Virol. 18, 329-346.

Brown, S.M. Harland, J. & Subak-Sharpe, J.H.(1984).

Isolation of restriction endonulease site deletion mutants of herpes simplex virus. J. Gen. Virol. 65, 1053-1068.

Brown, S.M. & Harland, J. (1978). Three mutants of herpes simplex virus type 2: on lacking the genes US10, US11 & Us12 and two in which Rss has been extended by 6kb to 0.91 map units with loss of U_S sequences between 0.94 and the U_S/TR_S junction. J. Gen. Virol. 68, 1-18.

Chou, J & Roizman, B. (1986). The terminal 'a' sequence of the herpes simplex virus genome contains the promoter of a gene located in the repeat sequences of the L component. J. Virol. 57, 629-637.

Choum, J & Roizman, B. (1990). The herpes simplex virus I gene for ICP34.5 which maps in inverted repeats is conserved in several limited passage isolated but not in strain 17 syn^+. J. Virol. 64, 1014-1020.

Chou, J.m kern, E.R., Whitley, R.J. and Roizman, B. (1990).

Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to γ_1 34.5; a gene nonessential for growth in culture. Science. 250; 1262-1266.

Clements, G.B. & Subak-Sharpe, J.H. (1983). Recovery of herpes simplex virus I ts mutants from the dorsal root ganglia of mice. In: Immunology of Nervous System Infections. Progress in Brain Research Vol 59 pp 203-208.

Edited by P.O. Baker, V ter Moulen & F. Clifford Rose, Amsterdam Elsevier.

Clememts, G.B. & Subak-Sharpe, J.H. (1988). Herpes simplex virus type 2 establishes latency in the mouse footpad. J. Gen. Virol. 69, 375-383.

Harland, J. & Brown, S.M. (1985). Isolation and characterisation of deletion mutants of herpes simplex virus type 2 (strain HG52). J. Gen. Virol. 66, 1305-1321.

Harland, J. & Brown, S.M. (1985). A herpes simplex virus type 2 variant in which a deletion across the L-S junction is replaced by single or multiple reiterations of extraneous DNA. J. Gen, Virol. 70, 2121-2137.

Jar son, A.T. & Subak-Sharpe, J.H. (1974). Biochemical studies on the herpes simplex virus specified deoxypyrimidine kinase activity. J. Gen. Virol. 24, 481-493.

JuneJo F, Maclean A.R. & Brown S.M. (1991). Sequence analysis of HSV1 Strain 17 variants 1704,

1705 and 1706 with respect to their origin and effect on the latency associated transcript sequence, J. General Virology 72, 2311-2315.

Lonsdale, D.H. (1979). A rapid technique for distinguishing herpes simplex virus type I from type 2 by restriction enzyme technology. Lancet i, 849-582.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982).

Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

MacLean, A.R. & Brown, S.M. (1987a), Generation of a herpes simplex virus type I variant devoid of Xbal sites. J. Gene Virol. 68, 68 1165-1171.

MacLean, A.R. & Brown, S.M. (1987b). A herpes simplex virus type 1 variant which fails to synthesise the immediate early polypeptide Vmw IE63. J. Gen. Virol. 68, 1339-1350.

MacLean, A.R. & Brown, S.M. (1987c). Deletion and duplication variants around the long repeats of herpes simplex virus strain 17. J. Gen. Virol. 68, 3019-3031.

MacLean, C.A., Efstathiou S., Elliott M.L., Jamieson F.E., & McGeoch D.J. (1991). Investigation of HSVI genes encoding multiple inserted membrane proteins. J. of Gen. Virol. 72 897-906.

MacPherson, I. & Stoker, M.G. (1962). Polyoma transformation of hamster cell clones-an investigation of genetic factors affecting cell competence. Virology 16, 147-151.

McGeoch, D.J., (1987). The genome of herpes simplex virus : structure, replication and evolution. J. Cell Science, 7 (supplement) 5194-5222.

McGeoch D. J. et al (1987)a) DNA sequence and Genetic content of the Hind III I region of the short unique component of the HSV-2 genome; identifcation of the gene encoding glycoprotein G and evolutionary comparision. J. Gen Virol 19 38.

McGeoch, D. J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.c., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E. & Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type I. J. Gen. Virol. 69, 1531-1574.

Marsden, H.S., Stow, N.D, Preston, U.G, Timbury, M.C. and Wilkie, N.M. (1978). J. Virologq, 28, 624-642.

Liu F P and Roizman B (1991a). The Herpes Simplex Virus I Gene encoding a Protease also contains within its conding Domain the Gene Encoding the more abundant Substrate. J. Virologq p5149.

Liu F and Roizman B, (1991b) The Promoter, Transcriptional Unit and Coding Swquence of Herpes Simplex Virus I family 35 proteins are contined within and in Frame with the U_L26 Open Reading Frame, J of Virology p206-212.

Perry, L.J. & McGeoch, D.J. (1988). The DNA sequences of the long repeat region and adjoining parts of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type I. J. Gen Virol. 69, 2831-2846.

Preston V.G., Coates J.A. + Rixon F.J. (1983).

Identification and characterisation of a herpes simplex virus gene product required for encapisation of virus DNA. J. Virol 45 1056-1064.

(57) 청구의 범위

청구항 1

HSV-1 균주의 게놈에 대하여 내부 반복 R_L 의 Bam H1 s 영역(0.81-0.83mu) 내 및 대응하는 말단 R_L 영역(0-0.02mu) 내에서 변형되어 신경 발병력이 결여된 HSV-1 균주 17의 변종.

청구항 2

제1항에 있어서, 게놈이 각 영역에서 결실에 의하여 변형된 변종.

청구항 3

제2항에 있어서, 뉴클레오티드 제 125074 내지 125972 사이의 내부 R_L 및 말단 R_L의 대응 영역에서 HSV-1 균주 17의 게놈에 대하여 100개 이상의 뉴클레오티드가 결실된 변종.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 각각 0.5 내지 3Kb 크기로 결실된 변종.

청구항 5

제4항에 있어서, 각각 0.7 내지 2.5Kb 크기로 결실된 변종.

청구항 6

HSV-1 1714.

청구항 7

HSV-1 1716.

청구항 8

제1항, 제6항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서, UL26 유전자 내에 온도 민감성 돌연변이를 포함하므로써 더욱 변형된 변종.

청구항 9

제1항, 제6항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서, LAT 프로모터를 불활화시키는 돌연변이를 포함하므로써 더욱 변형된 변종.

청구항 10

제9항 변종으로부터 유래된 경량 입자.

청구항 11

HSV-1 균주 17이 내부 반복 R_L의 Bam H1 s 영역(0.81-0.83mu) 내 및 말단 R_L (0-0.02mu) 영역에 변형을 도입하므로써 결과 생성된 변종의 신경 발병력이 결여되도록 하는 것을 포함하여 구성되는, 제1항에서 청구한 바와 같은 변종의 제조 방법.

도면

도면1

