

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4583602号  
(P4583602)

(45) 発行日 平成22年11月17日(2010.11.17)

(24) 登録日 平成22年9月10日(2010.9.10)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 12 N 7/08	(2006.01)
A 61 K 39/145	(2006.01)
A 61 P 31/16	(2006.01)
C 07 K 14/11	(2006.01)

請求項の数 30 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-565137 (P2000-565137)
(86) (22) 出願日	平成11年8月12日 (1999.8.12)
(65) 公表番号	特表2002-522078 (P2002-522078A)
(43) 公表日	平成14年7月23日 (2002.7.23)
(86) 國際出願番号	PCT/US1999/018583
(87) 國際公開番号	W02000/009702
(87) 國際公開日	平成12年2月24日 (2000.2.24)
審査請求日	平成18年8月11日 (2006.8.11)
(31) 優先権主張番号	09/133,921
(32) 優先日	平成10年8月13日 (1998.8.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)
微生物の受託番号	ATCC VR-2624
微生物の受託番号	ATCC VR-2625
微生物の受託番号	ATCC VR-2627

(73) 特許権者	501058456 ザ ユニバーシティー オブ ピッツバー グ オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイマー エドゥケーション アメリカ合衆国 15260 ペンシルベ ニア州 ピッツバーグ ウィリアム ピッ ト ユニオン 911
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100096987 弁理士 金久保 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】低温適応性ウマインフルエンザウィルス

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ふ化鶏卵内で、温度約26から約30で複製を行う、低温適応性ウマインフルエンザウィルスであって、前記ウィルスは、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、ならびに前記核酸配列のいずれかと完全に相補的な核酸配列を有する核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子を含む、ウィルス。

## 【請求項 2】

前記低温適応性ウマインフルエンザウィルスが、受託番号ATCCC VR 2627で識別されるMSV+5ウィルスの識別表現型を含む、請求項1に記載のウィルス。 10

## 【請求項 3】

前記低温適応性ウマインフルエンザウィルスが、受託番号ATCCC VR 2627で識別されるMSV+5、ならびに前記受託番号を有するウィルスの子孫である、請求項1に記載のウィルス。

## 【請求項 4】

前記低温適応性ウマインフルエンザウィルスが、優性干渉性表現型を有する、請求項1に記載のウィルス。

## 【請求項 5】

低温適応により作製されたウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つのゲノム分節

20

を有し、前記ウマインフルエンザウィルスが、低温適応性、温度感受性、優性干渉性、弱毒性からなる群より選択される1つの識別表現型を有するようなリアソータントインフルエンザA型ウィルスであって、前記ウマインフルエンザウィルスのゲノム分節が、前記識別表現型の少なくとも1つを前記リアソータントウィルスに与える、リアソータントインフルエンザA型ウィルスであって、前記ウィルスは、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、ならびに前記核酸配列のいずれかと完全に相補的な核酸配列を有する核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子を含む、ウィルス。

## 【請求項6】

10

前記リアソータントインフルエンザA型ウィルスが、ふ化鶏卵内で、温度約26から約30で複製を行う、請求項5に記載のウィルス。

## 【請求項7】

前記リアソータントウィルスが、

a. 供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスのゲノム分節と受容インフルエンザA型ウィルスのゲノム分節とを混合することと、

b. 前記供与ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つの表現型を有するリアソータントウィルスを選別することと、

を含む方法により作製され、前記表現型が、低温適応性、温度感受性、優性干渉性、弱毒性からなる群より選択される、請求項5に記載のウィルス。

20

## 【請求項8】

(a) 低温適応性ウマインフルエンザウィルスと、(b) リアソータントインフルエンザA型ウィルスとからなる群より選択されるウィルスを含む、動物をインフルエンザA型ウィルスに起因する疾患から保護するための治療用組成物であって、前記ウィルスは、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、ならびに前記核酸配列のいずれかと完全に相補的な核酸配列を有する核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子を含む、治療用組成物。

## 【請求項9】

30

前記低温適応性ウマインフルエンザウィルスが、受託番号ATCC VR 2627で識別されるMSV+5ウィルスの識別表現型を含む、請求項8に記載の治療用組成物。

## 【請求項10】

前記低温適応性ウマインフルエンザウィルスが、受託番号ATCC VR 2627で識別されるMSV+5、ならびに前記受託番号を有するウィルスの子孫である、請求項8に記載の治療用組成物。

## 【請求項11】

前記低温適応性ウマインフルエンザウィルスまたは前記リアソータントインフルエンザA型ウィルスが、ふ化鶏卵内で、温度約26から約30で複製を行う、請求項8に記載の治療用組成物。

40

## 【請求項12】

前記動物がウマ科動物である、請求項8に記載の治療用組成物。

## 【請求項13】

前記治療用組成物を、ウィルスが上気道の粘膜細胞に侵入可能であるような経路で前記動物に投与する、請求項8に記載の治療用組成物。

## 【請求項14】

前記治療用組成物が低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有し、前記疾患がウマインフルエンザウィルスに起因し、前記治療用組成物を予防的にウマ科動物に投与することにより、前記ウマ科動物体内のウマインフルエンザウィルスに対する免疫反応を惹起する、請求項8に記載の治療用組成物。

50

**【請求項 15】**

前記治療用組成物が、前記ウィルスを約 $10^5$  T C I D<sub>50</sub> 単位から約 $10^8$  T C I D<sub>50</sub> 単位含有する、請求項 8 に記載の治療用組成物。

**【請求項 16】**

前記治療用組成物が、賦形剤をさらに含有する、請求項 8 に記載の治療用組成物。

**【請求項 17】**

(a) 低温適応性ウマインフルエンザウィルスと、(b) リアソータントインフルエンザ A 型ウィルスと、から選択されるウィルスを有し、前記ウマインフルエンザウィルスが、低温適応性、温度感受性、優性干渉性、弱毒性から選択される 1 つの識別表現型を有する治療用組成物を非ヒト動物に投与することを含む、前記動物をインフルエンザ A 型ウィルスに起因する疾患から保護するための方法であって、前記ウィルスは、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 6、SEQ ID NO : 10、SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 16、SEQ ID NO : 18、SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 25、ならびに前記核酸配列のいずれかと完全に相補的な核酸配列を有する核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの核酸分子を含む、方法。  
10

SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 25、ならびに前記核酸配列のいずれかと完全に相補的な核酸配列を有する核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの核酸分子を含む、方法。

**【請求項 18】**

前記低温適応性ウマインフルエンザウィルスまたは前記リアソータントインフルエンザ A 型ウィルスが、ふ化鶏卵内で、温度約 26 度から約 30 度で複製を行う、請求項 17 に記載の方法。  
20

**【請求項 19】**

前記動物がウマ科動物である、請求項 17 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記治療用組成物を、ウィルスが上気道の粘膜細胞に侵入可能であるような経路で前記動物に投与する、請求項 17 に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記治療用組成物が低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有し、前記疾患がウマインフルエンザウィルスに起因し、前記治療用組成物を予防的にウマ科動物に投与することにより、前記ウマ科動物体内のウマインフルエンザウィルスに対する免疫反応を惹起する、請求項 17 に記載の方法。  
30

**【請求項 22】**

前記治療用組成物が、前記ウィルスを約 $10^5$  T C I D<sub>50</sub> 単位から約 $10^8$  T C I D<sub>50</sub> 単位含有する、請求項 17 に記載の方法。

**【請求項 23】**

単離されたウマインフルエンザ核酸分子であって、前記ウマインフルエンザ核酸分子が、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 6、SEQ ID NO : 10、SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 16、SEQ ID NO : 18、SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 25 及び、前記核酸配列のいずれかと完全に相補的な核酸配列を有する核酸分子からなる群より選択される、単離されたウマインフルエンザ核酸分子。  
40

**【請求項 24】**

前記核酸分子が、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 6、SEQ ID NO : 10、SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 16、SEQ ID NO : 18、SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 25 からなる群より選択される核酸配列を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含む、請求項 23 に記載の単離されたウマインフルエンザ核酸分子。

**【請求項 25】**

前記核酸分子が、M タンパク質をコードする低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含み、前記 M タンパク質が、SEQ ID NO : 5 のアミノ酸配列を有する、請求項 23 に記載の単離されたウマインフルエンザ核酸分子。  
50

**【請求項 2 6】**

前記核酸分子が、H A タンパク質をコードする低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含み、前記H A タンパク質が、SEQ ID NO : 11のアミノ酸配列を有する、請求項 2 3 に記載の単離されたウマインフルエンザ核酸分子。

**【請求項 2 7】**

前記核酸分子が、P B 2 - N タンパク質をコードする低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含み、前記P B 2 - N タンパク質が、SEQ ID NO : 17のアミノ酸配列を有する、請求項 2 3 に記載の単離されたウマインフルエンザ核酸分子。

**【請求項 2 8】**

前記核酸分子が、P B 2 - C タンパク質をコードする低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含み、前記P B 2 - C タンパク質が、SEQ ID NO : 24のアミノ酸配列を有する、請求項 2 3 に記載の単離されたウマインフルエンザ核酸分子。 10

**【請求項 2 9】**

単離されたウマインフルエンザ核酸分子であって、前記ウマインフルエンザ核酸分子が、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 11、SEQ ID NO : 17 およびSEQ ID NO : 24 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする、単離されたウマインフルエンザ核酸分子。

**【請求項 3 0】**

単離されたウマインフルエンザタンパク質であって、前記ウマインフルエンザタンパク質が、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 11、SEQ ID NO : 17 およびSEQ ID NO : 24 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、単離されたウマインフルエンザタンパク質。 20

**【発明の詳細な説明】****【0 0 0 1】****発明の属する技術分野**

本発明は、実験的に作製された低温適応性ウマインフルエンザウィルスに関し、特に、弱毒化、優性干渉、または温度感受性などの付加的表現型を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスに関する。本発明は、そのようなウマインフルエンザウィルスからの、少なくとも 1 つのゲノム分節を有するリアソータントインフルエンザ A 型ウィルスも含み、このため、このリアソータントウィルスは、供与ウマインフルエンザウィルスの複数の表現型を含む。本発明は、リバース遺伝工学により作製された、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスの複数の識別表現型を持つ、遺伝子組換えされたウマインフルエンザウィルスをさらに含む。本発明は、インフルエンザウィルスに起因する疾患から動物を保護するため、これらのウィルスを治療用組成物中で使用する方法にも関する。 30

**【0 0 0 2】****発明の背景**

ウマインフルエンザウィルスは、1956年頃から、ウマ類の呼吸性疾患の主な病原として知られている。ウマインフルエンザウィルスにより引き起こされる疾患の症状は重症となるおそれがあり、また、多くの場合、続発性の細菌感染症を伴う。ウマインフルエンザウィルスの亜型としては、A / ウマ / ブラハ / 1 / 56 ( H7N7 ) を原型とする亜型 - 1 と、A / ウマ /マイアミ / 1 / 63 ( H3N8 ) を原型とする亜型 - 2 との 2 種類が知られている。現在、優勢なウィルス亜型は亜型 - 2 であり、この亜型は、近年ではヨーラシア及び北アメリカ分離菌にさらに分化している。 40

**【0 0 0 3】**

現在認可されているウマインフルエンザワクチンは、不活化（死菌）ウィルスワクチンである。このワクチンがウマ類に対して発揮する保護効果は、あるとしても非常に低く、また、例えば注射部位の炎症性反応などの望ましくない副作用を伴う可能性がある。例えば、Mumford, 1987, Equine Infectious Disease IV, 207-217, 及び Mumford, et al., 1993, Vaccine 11, 1172-1174 を参照されたい。さらに、現在の療法 50

を若齢の子馬に適用することはできない。なぜなら、現在の療法は母子免疫を克服できない可能性があり、また、若齢の動物の場合は耐薬性を誘発するおそれがあるからである。疾患の重症度から考えて、ウマをウマインフルエンザウィルスから保護するための、安全で効果的な治療用組成物が必要とされている。

#### 【0004】

低温適応性ヒトインフルエンザウィルスを含む治療用組成物の製造方法は、例えば、Maassab, et al., 1960, Nature 7, 612-614, 及び Maassab, et al., 1969, J. Immunol. 102, 728-732に述べられている。さらに、これらの研究者らは、低温適応性ヒトインフルエンザウィルス、すなわち、通常の温度よりも低い温度で生育するように適応されたウィルスが、温度感受性表現型を持つ傾向がある、つまり、そのようなウィルスは、野生型ウィルスが生育及び複製可能であるような、ある一定のより高い非許容温度では、十分に生育しないということを指摘した。既存の低温適応性ヒトインフルエンザA型ウイルスとのリアソートメントにより作製した様々な低温適応性ヒトインフルエンザA型ウイルスは、ワクチン接種された個体に良好な免疫反応を惹起することが示されており、また、複数の弱毒性の低温適応性リアソータントヒトインフルエンザA型ウイルスが、ヒトを野生型ウイルスの攻撃から保護することが証明されている。例えば、Clements, et al., 1986, J. Clin. Microbiol. 23, 73-76を参照のこと。1992年9月22日に発行された、Youngner, et al.による米国特許5,149,531号で、本発明の発明者らは、複数のリアソータント低温適応性ヒトインフルエンザA型ウイルスが優性干渉表現型を有する、すなわち、これらのウイルスが、対応する親野生型系統及び異種インフルエンザA型ウイルスの生育を阻害することをさらに示した。1987年7月28日に発行された、Coggins et al.による米国特許4,683,137号及び、1987年9月15日に発行された、Campbellによる米国特許4,693,893号は、野生型ウマインフルエンザウィルスと弱毒性の低温適応性ヒトインフルエンザA型ウイルスとのリアソートメントにより作製された、弱毒性の治療用組成物を開示している。これらの治療用組成物は、ウマに対しては一般に安全で効果的であるものの、ヒトとウマ双方の遺伝子を含むウイルスの環境への導入は、重大な危険を伴う。

#### 【0005】

##### 発明の概要

本発明は、実験的に作製した低温適応性ウマインフルエンザウィルスと、低温適応により作製したウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つのゲノム分節を有し、そのウマインフルエンザウィルスのゲノム分節が、低温適応性ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つの識別表現型をリアソータントウイルスに与えるようなウマインフルエンザウィルスと、リバース遺伝工学により作製され、低温適応性ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つの識別表現型を有する、遺伝子組換えウマインフルエンザウィルスとを提供する。識別表現型は、低温適応性、温度感受性、優性干渉性及び弱毒性を含む。本発明は、インフルエンザA型ウイルスに起因する疾患から動物を保護するための治療用組成物をさらに提供する。この治療用組成物は、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルス、リアソータントインフルエンザA型ウイルス、または遺伝子組換えウマインフルエンザウィルスを含む。また、そのような治療用組成物の投与を含む、インフルエンザA型ウイルスに起因する疾患から動物を保護するための方法も提供される。また、低温適応性ウマインフルエンザウィルスを作製する方法、及び、低温適応性ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つのゲノム分節を有するリアソータントインフルエンザA型ウイルスを作製する方法も含む。後記の方法では、このウマインフルエンザのゲノム分節が、低温適応性ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つの識別表現型を、リアソータントウイルスに与える。

#### 【0006】

低温適応性インフルエンザウィルスは、ふ化鶏卵内で、温度約26℃から約30℃まで

10

20

30

40

50

の範囲で複製を行うインフルエンザウィルスである。本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルス、リアソータントインフルエンザA型ウィルス、又は遺伝子組換えウマインフルエンザウィルスは、健康な動物を罹患させないように、弱毒化されていることが好ましい。

#### 【0007】

一実施例においては、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルス、リアソータントインフルエンザA型ウィルス、又は遺伝子組換えウマインフルエンザウィルスは、このウィルスが、ふ化鶏卵内で、温度約26から約30の範囲で複製を行い、組織培養細胞内で、許容温度約34でブラークを形成するが、組織培養細胞内で、非許容温度約39ではブラークを形成しないような温度感受性でもある。

10

#### 【0008】

一実施例においては、このような温度感受性のウィルスは、2つの突然変異を有する。第1の突然変異は、温度約39でブラーク形成を阻害し、ウィルスの核タンパク質遺伝子をコードするゲノム分節と共に分離する。第2の突然変異は、温度約39で全てのウィルスのタンパク質合成を阻害する。

#### 【0009】

別の一実施例においては、本発明の低温適応性及び温度感受性のウマインフルエンザウィルスは、ふ化鶏卵内で、温度約26から約30の範囲で複製を行い、組織培養細胞内で、許容温度約34でブラークを形成するが、組織培養細胞内で、非許容温度37では、ブラークを形成せず、また、後期ウイルスタンパク質を発現しない。

20

#### 【0010】

典型的には、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、野生型ウマインフルエンザウィルスを1回またはそれ以上継代培養し、次に、低温で安定して生育及び複製を行うウィルスを選別することにより作製される。このようにして作製された低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、複数の実施例においては、優性干渉性表現型を含む。すなわち、このようなウィルスは、親ウマインフルエンザウィルスまたは異種野生型インフルエンザA型ウィルスと共に感染した場合に、これらのウィルスの生育を阻害するであろう。

#### 【0011】

本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスの例は、受託番号ATCC VR\_\_\_\_\_で識別されるEIV-P821、受託番号ATCC VR\_\_\_\_\_で識別されるEIV-P824、受託番号ATCC VR\_\_\_\_\_で識別されるEIV-MSV+5、及びこれらのウィルスの後代を含む。

30

#### 【0012】

本発明の治療用組成物は、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルス、リアソータントインフルエンザA型ウィルス、又は遺伝子組換えウマインフルエンザウィルスを、約 $10^5$ TCID<sub>50</sub>単位から約 $10^8$ TCID<sub>50</sub>単位、好適には約 $2 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>単位含む。

#### 【0013】

本発明は、インフルエンザA型ウィルスに起因する疾患から動物を保護するための方法も含む。この方法は、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルス、リアソータントインフルエンザA型ウィルス、又は遺伝子組換えウマインフルエンザウィルスを含む治療用組成物を動物に投与する工程を含む。保護する対象として好適な動物はウマ科の動物であり、特に好適な動物はウマ及び子馬である。

40

#### 【0014】

本発明のさらに別の実施例は、低温適応性ウマインフルエンザウィルスを作製する方法である。この方法は、野生種ウマインフルエンザウィルスを継代培養する工程と、低温で生育するウィルスを選別する工程とを含む。一実施例においては、この方法は、温度を順次下げながら継代培養と選別とを繰り返すことを含む。ウマインフルエンザウィルスの継代培養は、ふ化鶏卵内で行うことが望ましい。

#### 【0015】

50

別の一実施例は、本発明の供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスのゲノム分節と、受容インフルエンザA型ウィルスのゲノム分節との遺伝子リアソートメントにより、リアソータントインフルエンザA型ウィルスを作製する方法である。本発明のリアソータントインフルエンザA型ウィルスは、(a)供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスのゲノム分節と、受容インフルエンザA型ウィルスのゲノム分節とを混合することと、(b)この供与ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つの識別表現型を含むウィルスを選別することとを含む方法により作製される。識別表現型は、低温適応性、温度感受性、優性干渉性、及び弱毒性を含む。これらのようなリアソータントウィルスは、供与ウィルスの少なくとも1つの弱毒性表現型を含むことが望ましい。典型的なリアソータントウィルスは、受容ウィルスの抗原性を有するであろう。すなわち、受容ウィルスのヘマグルチニン(HA)及びノイラミニダーゼ(NA)表現型を有するであろう。

#### 【0016】

本発明は、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスまたはリアソータントインフルエンザA型ウィルスを増殖させる方法もまた提供する。これらの方法は、ふ化鶏卵内または組織培養細胞内の増殖を含む。

#### 【0017】

##### 発明の詳細な説明

本発明は、いくつかの規定された表現型を有する、実験的に作製された低温適応性ウマインフルエンザウィルスを提供し、それらをここに開示する。ここで使用する「1つの」物体は、1つ又はそれ以上の物体を指す。例えば、「1つの低温適応性ウマインフルエンザウィルス」は、1つ又はそれ以上の低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含みうる。従って、「1つの」、「1つまたはそれ以上の」及び「少なくとも1つの」という語は、ここでは互換的に使用可能である。また、「備える」、「含む」及び「有する」という語も互換的に使用可能であることに留意されたい。さらに、「から選択される」物体は、そのグループの1つまたはそれ以上の物体に関し、それらの組み合わせを含む。

#### 【0018】

本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、実験室内で作製されたウィルスであり、従って、天然に発生するウィルスではない。本発明が、そのような低温適応性ウマインフルエンザウィルスの識別発現型を有するウィルスも含むので、天然に発生したウィルスの混合物から分離された、すなわち、天然の環境から隔離されたがクレームされた表現型を有するウマインフルエンザウィルスは、本発明に含まれる。本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、特定のレベルの純度を必要としない。例えば、ふ化鶏卵内で生育した低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、尿膜腔液(AF)と混合していくてもよいし、また、組織培養細胞内で生育した低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、破碎細胞及び組織培地と混合していくてもよい。

#### 【0019】

ここで使用される「ウマインフルエンザウィルス」という用語は、例えばウマ及び子馬などのウマ科の動物に感染し、その体内で生育するインフルエンザウィルスを指す。ここで使用される、ウィルスの「生育」という用語は、ウィルスが、許容宿主細胞内で生殖または自身を「複製」する能力を意味する。従って、「ウィルスの生育」及び「ウィルスの複製」という用語は、ここでは互換可能に用いられる。特定の宿主細胞内でのウィルスの生育または複製を、ウィルス学の分野の熟練技術者に公知の標準的方法で観察及び測定してもよい。例えば、感染したウマの鼻咽頭分泌物に含まれるような、感染性のウィルスを含有するサンプルを、例えば組織培養細胞中のウィルスブラークなど、細胞変性作用(CPE)を起こさせる能力について検査する。サンプルをふ化鶏卵の尿膜腔内に接種し、次いで、接種された鶏卵のAFを、赤血球細胞を凝集させる能力、すなわち、AF内にインフルエンザウィルスヘマグルチニン(HA)タンパク質が存在することに起因する赤血球凝集反応を引き起こす能力について検査することにより、感染性のウィルスを検出してよい。

#### 【0020】

10

20

30

40

50

天然に発生する、すなわち、野生型のウマインフルエンザウィルスは、温度約34から約39で良好に複製を行う。例えば、野生型ウマインフルエンザウィルスは、ふ化鶏卵内で、温度約34で複製を行い、また、組織培養細胞中では、温度約34から約39で複製を行う。ここで用いられる「低温適応性の」ウマインフルエンザウィルスという用語は、ウマインフルエンザウィルスの最適生育温度よりも低い温度で生育するように適応されたウマインフルエンザウィルスを指す。本発明の低温適応性のウマインフルエンザウィルスの一例に、ふ化鶏卵内で、温度約30で複製を行うウィルスがある。本発明の好適な低温適応性のウマインフルエンザウィルスは、ふ化鶏卵内で、温度約28で複製を行う。本発明の別の好適な低温適応性のウマインフルエンザウィルスは、ふ化鶏卵内で、温度約26で複製を行う。一般に、本発明の好適な低温適応性のウマインフルエンザウィルスは、ふ化鶏卵内で、温度約26から約30の範囲内で、すなわち、野生型ウィルスが殆どまたは全く生育しない温度で、複製を行う。これらのウィルスがこの温度範囲内で複製を行う能力を有することは、これらのウィルスが、より高いまたはより低い温度でも複製を行う能力を排除するものではないことに留意されたい。例えば、一実施例は、ふ化鶏卵内で、温度約26で複製を行うが、組織培養細胞中で、温度約34でも複製を行う低温適応性ウマインフルエンザウィルスである。野生型インフルエンザウィルスと同様に、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスもまた、組織培養細胞中、例えばMadin Darbyイヌ腎臓細胞(MDCK)中で、温度約34で一般にブラークを形成する。本発明の適当な及び好適な低温適応性のウマインフルエンザウィルスの例を、ここに開示する。10

#### 【0021】

本発明の一実施例は、野生型ウマインフルエンザウィルスを継代培養することと、次いで、低温で生育するウィルスを選別することとを含む方法で作製された、低温適応性のウマインフルエンザウィルスである。本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスを、例えば、野生型インフルエンザウィルスを、ふ化鶏卵内で、温度を順次低下させながら連続的に継代培養することにより、ウィルス混合体の中から、低温で安定して複製を行う複数のウィルスを選択して作製してもよい。継代培養の手順の一例を、例の項に詳しく開示する。継代培養工程の間に、1つまたはそれ以上の突然変異が、このインフルエンザウィルスのゲノムを有する一本鎖RNA分節の複数に起こり、これらのRNA分節の遺伝子型、すなわち、これらのRNA分節の初期ヌクレオチド配列を変化させる。ここで使用される「突然変異」という用語は、インフルエンザウィルスゲノムを構成している任意のRNA分節の初期ヌクレオチド配列の変化を指す。突然変異の例には、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの置換、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの欠失、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの挿入、または、2つまたはそれ以上のヌクレオチド切片の逆位がある。ウィルス混合体の中から、低温で安定して複製を行う複数のウィルスを選択することにより、低温適応性表現型を有するウィルスを選別する。ここで使用される「表現型」という用語は、細胞やウィルスのような生物学的実体の観察可能なまたは測定可能な特徴を指し、この観察される特徴は、その生物学的実体の特定の遺伝子構成、すなわち、ある遺伝子型に帰するものである。従って、低温適応性表現型は、ウィルスゲノムの1つまたはそれ以上の突然変異の結果である。ここで使用される「突然変異」、「ゲノム」、「遺伝子型」または「表現型」という用語は、1つまたはそれ以上の、または少なくとも1つの突然変異、ゲノム、遺伝子型、または表現型をそれぞれ指す。30

#### 【0022】

低温適応性ウマインフルエンザウィルスのさらに別の、観察可能な表現型が発現してもよく、それらの表現型は、一般に、そのようなウィルスのゲノムにおける1つまたはそれ以上の別の突然変異の結果として発現するであろう。例えば、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、さらに、弱毒性であり、優性干渉性を発揮し、及び/又は温度感受性であってもよい。40

#### 【0023】

一実施例においては、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、弱毒性の特50

徴を持つ表現型を有する。低温適応性ウマインフルエンザウィルスが「弱毒性」であるというのは、このウィルスを、ウマインフルエンザウィルス感受性の動物に投与した結果、その動物に観察される臨床症状が、野生型ウマインフルエンザウィルスに感染した動物に観察される臨床症状と比較して、軽症であるか、または全く観察されない場合を指す。例えば、野生型ウマインフルエンザウィルスに感染した動物は、発熱、くしゃみ、咳、抑え、及び鼻汁などの症状を呈するであろう。これに対し、本発明の弱毒化された低温適応性ウマインフルエンザウィルスを投与された動物は、臨床症状を呈示するとしても最小であるか、または全く呈示しない、すなわち、症状が検出不可能であろう。

#### 【0024】

別の一実施例においては、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、温度感受性表現型を有する。ここで説明される温度感受性の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、低温では複製を行うが、野生型ウィルスが複製及びブラーク形成を行うようなより高い温度では、組織培養細胞中で複製またはブラーク形成を行わない。理論に拘束されるわけではないが、温度感受性表現型を有するウマインフルエンザウィルスが複製を行う場所は、主として上気道の低温の通路に限られ、ウィルスがより疾患の症状を引き起こしやすい下気道内では良好に複製を行ないと信じられている。温度感受性のウィルスが生育する温度は、ここでは、その温度感受性ウィルスにとっての「許容」温度として述べられる。そして、その温度感受性ウィルスが生育しないが、対応する野生型ウィルスが生育するような、より高い温度は、ここでは「非許容」温度として述べられている。例えば、本発明の複数の温度感受性の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、ふ化鶏卵内で、約30またはそれ以下の温度で複製を行い、好適には約28または約26で複製を行い、許容温度約34では組織培養細胞中でブラークを形成するが、非許容温度約39

では組織培養細胞中でブラークを形成しない。本発明の他の温度感受性の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、ふ化鶏卵内で、約30またはそれ以下の温度で複製を行い、好適には約28または約26で複製を行い、許容温度約34では組織培養細胞中でブラークを形成するが、非許容温度約37では組織培養細胞中でブラークを形成しない。

#### 【0025】

本発明の複数の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、優性干渉性表現型を有する。すなわち、細胞内に別のインフルエンザA型ウィルスと共に感染した時に、優先的に感染することにより、この別のウィルスの生育を抑制する。例えば、優性干渉性表現型を有する本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスが、MDCK細胞に、野生型親ウマインフルエンザウィルス、A/ウマ/ケンタッキー/1/91(H3N8)と共に感染した場合、この親ウィルスの生育が阻害される。従って、ビルレントインフルエンザウィルス、すなわち、疾患症状を引き起こすインフルエンザウィルスに最近曝された、またはまもなく曝されるかもしれない動物の上気道に、優性干渉性表現型を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する治療用組成物を投与すれば、そのビルレントウィルスの生育が阻害されるので、そのウィルスに対する免疫反応がない場合でも、その動物の疾患は改善または軽減されるであろう。

#### 【0026】

温度感受性を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスの優性干渉性を、標準的なウィルス学的手法により測定してもよい。例えば、MDCK細胞の分離単層を、(a)ビルレント野生型インフルエンザA型ウィルス、(b)温度感受性、低温適応性ウマインフルエンザウィルス、及び(c)これら両方のウィルスに感染させててもよい。これらの感染は全て、細胞当たり約2ブラーク形成単位(pfu)の感染多密度(MOI)でなされる。感染後、様々な感染細胞からのウィルス産生量を、複製ブラークアッセイにより、その低温適応性ウマインフルエンザウィルスの許容温度および非許容温度で測定する。温度感受性表現型を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、非許容温度ではブラークを形成できないが、野生型ウィルスは、許容温度でも非許容温度でもブラークを形成できる。従って、野生型ウィルスのみに感染した細胞の非許容温度でのウィルス産生量を、両

10

20

30

40

50

方のウィルスに感染した細胞の非許容温度でのウィルス產生量と比較することにより、低温適応性ウィルスが存在する条件下での野生型ウィルスの生育を測定することが可能である。

#### 【0027】

本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、主な特徴として、以下の識別表現型：低温適応性、温度感受性、優性干渉性、及び／又は弱毒性のうちの1つまたはそれ以上を有する。ここで用いられる「ウマインフルエンザウィルスが低温適応性、温度感受性、優性干渉性、及び／又は弱毒性の識別表現型を有する」という表現は、そのような表現型の1つまたはそれ以上を有するウィルスに関する。そのようなウィルスの例には、受託番号 A T C C V R \_\_\_\_\_で識別される E I V - P 8 2 1、受託番号 A T C C V R \_\_\_\_\_で識別される E I V - P 8 2 4、受託番号 A T C C V R \_\_\_\_\_で識別される E I V - M S V + 5、及び E I V - M S V 0、E I V、M S V + 1、E I V - M S V + 2、E I V - M S V + 3、E I V - M S V + 4 があるが、これらに限定されることはない。これらのウィルスの作製については、例で説明する。例えば、低温適応性ウマインフルエンザウイルス E I V - P 8 2 1 は、(a) 例えば、ふ化鶏卵内で、温度約 26 で複製を行う能力などの低温適応性と、(b) 例えば、非許容温度約 37 では、組織培養細胞内でブラーク形成及び後期遺伝子産物の発現を行うことができず、また、非許容温度約 39 では、組織培養細胞中でブラーク形成及びいかなるウイルスタンパク質の合成も行うことができないなどの温度感受性、(c) ウマインフルエンザウイルス感受性の動物に投与した場合の弱毒性、及び、(d) 例えば、細胞内に野生型インフルエンザ A 型ウィルスと共に感染した場合に、その野生型ウィルスの生育を阻害するなどの優性干渉性により特徴づけられる、すなわち、これらの識別表現型を有する。同様に、低温適応性ウマインフルエンザウイルス E I V - P 8 2 4 は、(a) 例えば、ふ化鶏卵内で、温度約 28 で複製を行う能力などの低温適応性と、(b) 例えば、非許容温度約 39 では、組織培養細胞中でブラーク形成を行うことができないなどの温度感受性、及び、(c) 例えば、細胞内に野生型インフルエンザ A 型ウィルスと共に感染した場合に、その野生型ウィルスの生育を阻害するなどの優性干渉性により特徴づけられる。別の一例では、低温適応性ウマインフルエンザウイルス E I V - M S V + 5 は、(a) 例えば、温度約 26 で、ふ化鶏卵内で複製を行うことができるなどの低温適応性、(b) 例えば、非許容温度約 39 では、組織培養細胞中でブラーク形成を行うことができないなどの温度感受性、及び、(c) ウマインフルエンザウイルス感受性の動物に投与した場合の弱毒性により特徴づけられる。

#### 【0028】

複数の例では、ある表現型に関与する1つ又はそれ以上の突然変異が発生する R N A 分節を、ここに述べる標準的な方法を用いたリアソートメント分析により決定してもよい。一実施例においては、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、このウィルスのゲノム中の少なくとも2つの突然変異と相關する、温度感受性表現型を有する。この実施例では、ここに述べるリアソートメント分析により位置決定された、前記2つの突然変異のうちの1つが、ウィルスが組織培養細胞中で非許容温度 39 でブラークを形成する能力を抑制、すなわち、阻害または防止する。この突然変異は、ウマインフルエンザウイルスゲノム中の、このウィルスの核タンパク質 (N P) 遺伝子をコードする分節と共に分離する。すなわち、この突然変異は、この N P 遺伝子と同じ R N A 分節に位置する。この実施例の第2の突然変異は、非許容温度約 39 で、全てのタンパク質の合成を阻害する。従って、この非許容温度では、このウィルスのゲノムは、いかなるウイルスタンパク質も発現できない。これらの特徴を持つ低温適応性ウマインフルエンザウィルスの例に、E I V - P 8 2 1 及び E I V M S V + 5 がある。E I V - P 8 2 1 を、例 1 A で説明する方法を用いて、ふ化鶏卵内で野生型インフルエンザウイルスを連続的に継代培養することにより作製した。E I V M S V + 5 を、例 1 E で説明する方法を用いて、E I V - P 8 2 1 をさらに連続的に継代培養することにより得た。

#### 【0029】

さらに、非許容温度約 39 でブラーク形成及びウイルスタンパク質の合成を阻害する

10

20

30

40

50

2つの突然変異を有する、低温適応性かつ温度感受性のウマインフルエンザウィルスは、そのウィルスが組織培養細胞中で非許容温度約37度で後期遺伝子を発現し及びブラークを形成する能力を阻害する、1つまたはそれ以上の突然変異を有してもよい。これらの特徴を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスの一例に、EIV-P821がある。このウィルス分離株は、温度約26度では、ふ化鶏卵内で複製を行い、温度約39度では、ブラーク形成もいかなるウイルスタンパク質の合成も行わない。さらに、EIV-P821は、非許容温度約37度では、MDCK細胞でブラークを形成せず、また、この温度では、後期遺伝子の発現が阻害される。この阻害は、後期遺伝子が生成されない、すなわち、通常レベルのNPタンパク質が合成され、低レベル又は検出不可能なレベルのM1又はHAタンパク質が合成され、高レベルのポリメラーゼタンパク質が合成されるような方法で行われる。この表現型は、特異なウイルスタンパク質合成により特徴づけられるため、非許容温度約39度での全てのウイルスタンパク質合成の阻害により特徴づけられるタンパク合成表現型との相違は明白である。

### 【0030】

米国連邦規制基準37の1.802(a-c)により、ここでEIV-P821及びEIV-P824として表される低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、ブダペスト条約に基づき、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC、20110-2209バージニア州、マナッサス、ユニバーシティ・ブルヴァール10801)に、それぞれATCC受託番号ATCC VR-\_\_\_\_\_及びATCC VR-\_\_\_\_\_として、1998年7月11日に寄託された。低温適応性ウマインフルエンザウィルスEIV-MSV+5は、ATCCに、ATCC受託番号ATCC VR-\_\_\_\_\_として、1998年8月3日に寄託された。米国連邦規制基準37の1.806により、寄託は少なくとも30年間維持され、かつ当該サンプルの最終の分譲請求を寄託期間が受領したのち少なくとも5年間維持される。連邦規則コード37の1.808(a)(2)により、寄託者が分譲に関して設けた全ての制限は、特許の取得と同時に無効となり、これを取り消すことはできない。

### 【0031】

本発明の好適な低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、EIV-P821、EIV-P824及びEIV-MSV+5の識別表現型を有する。特に好適な低温適応性ウマインフルエンザウィルスは、EIV-P821、EIV-P824及びEIV-MSV+5、及びこれらのウィルスの後代を包含する。ここで使用される「後代」とは、「子孫」であり、従って、親ウィルスと比較してわずかに異なる表現型であってもよいが、その親ウィルスの、例えば低温適応性、温度感受性、優性干渉性、または弱毒性などの識別表現型を保持する。例えば、低温適応性ウマインフルエンザウィルスEIV-MSV+5は、低温適応性ウマインフルエンザウィルスEIV-P821の「後代」である。「後代」は、供与親ウィルスの1つまたはそれ以上の識別表現型を有するリアソータントインフルエンザA型ウィルスもまた包含する。

### 【0032】

本発明のリアソータントインフルエンザA型ウィルスは、本発明の供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスのゲノム分節と受容インフルエンザA型ウィルスのゲノム分節との遺伝子リアソートメントを行った後に、8つのRNAゲノム分節のうちの少なくとも1つが供与ウィルスに由来するリアソータントウィルスを選別することにより、このリアソータントウィルスが、供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つの識別表現型を獲得するような方法で作製される。識別表現型は、低温適応性、温度感受性、弱毒性及び優性干渉性を含む。好適には、本発明のリアソータントインフルエンザA型ウィルスの少なくとも弱毒性表現型は、供与ウィルスに由来する。リアソータントインフルエンザウィルスを分離する方法は、ウィルス学の分野の熟練技術者に公知であり、例えば、Fields, et al., 1996, Fields Virology, 3d ed., Lippincott-Raven, Palese, et al., 1976, J. Virol., 17, 876-884. Fields 50

, et al., 同上、及び Palese, et al., 同上、に開示されている。

### 【0033】

好適な供与ウマインフルエンザウィルスは、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウイルスであり、例えば、受託番号 A T C C V R \_\_\_\_\_で識別される E I V - P 8 2 1 10  
、受託番号 A T C C V R \_\_\_\_\_で識別される E I V - P 8 2 4、又は、受託番号 A T C C V R \_\_\_\_\_で識別される E I V - M S V + 5 である。好適な受容インフルエンザ A 型ウイルスは、別のウマインフルエンザウイルス、例えば、A / ウマ / サフォーク / 8 9 ( H 3 N 8 )などのユーラシア亜型 2 ウマインフルエンザウイルスまたは A / プラハ / 1 / 5 6 ( H 7 N 7 )などの亜型 1 インフルエンザウイルスであってもよい。受容インフルエンザ A 型ウイルスもまた、供与低温適応性ウマインフルエンザウイルスを用いてリアソータントウイルスを作製することの可能な任意のインフルエンザ A 型ウイルスであってもよい。そのようなインフルエンザ A 型ウイルスの例には、A / プエルトリコ / 8 / 3 4 ( H 1 N 1 )、A / 香港 / 1 5 6 / 9 7 ( H 5 N 1 )、A / シンガポール / 1 / 5 7 ( H 2 N 2 )及び A / 香港 / 1 / 6 8 ( H 3 N 2 )などのヒトインフルエンザウイルス、A / ブタ / アイオワ / 1 5 / 3 0 ( H 1 N 1 )などのブタウイルス、及び A / マガモ / ニューヨーク / 6 7 5 0 / 7 8 ( H 2 N 2 )及び A / ニワトリ / 香港 / 2 5 8 / 9 7 ( H 5 N 1 )などの鳥ウイルスがあるが、これらに限定されることはない。本発明のリアソータントウイルスは、その結果得られるリアソータントインフルエンザウイルスが供与ウイルスの少なくとも 1 つの識別表現型を有する限り、供与及び受容遺伝子分節の任意の組み合わせを含んでもよい。 20

### 【0034】

本発明のリアソータントウイルスの一例は、" 6 + 2 " リアソータントウイルスである。このウイルスの 6 つの「内部遺伝子分節」、すなわち、N P、P B 2、P B 1、P A、M 及び N S 遺伝子を持つ分節は、供与低温適応性ウマインフルエンザウイルスに由来し、また、このウイルスの 2 つの「外部遺伝子分節」、すなわち、H A 及び N A 遺伝子を持つ分節は、受容インフルエンザ A 型ウイルスに由来する。このようにして作製されたウイルスは、供与低温適応性ウマインフルエンザウイルスの弱毒性、低温適応性、温度感受性、及び / 又は優性干渉性表現型を有するが、受容株の抗原性は有しない。 30

### 【0035】

さらに別の一実施例においては、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウイルスを、組換え手段により作製してもよい。この方法では、識別された低温適応性、弱毒性、温度感受性または優性干渉性表現型に関連する 1 つまたはそれ以上の特異的突然変異を同定し、リバース遺伝工学的方法を用いて野生型ウマインフルエンザウイルス株に再導入する。リバース遺伝工学的方法では、インフルエンザウイルスに感染した細胞から分離した R N A ポリメラーゼ複合体を使用して、当該変異を有する人工インフルエンザウイルスゲノム分節を転写し、この合成された R N A 分節を、ヘルパーウイルスを用いてウイルス粒子内に組み込み、所望の変化を含むウイルスを選別する。インフルエンザウイルスへのリバース遺伝工学的方法の使用は、例えば、Enami, et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 3802 - 3805 及び 1996 年 11 月 26 日に発行された、Palese, et al. による米国特許 5,578,473 に述べられている。この方法を用いて、当業者は、冗長な低温適応工程を経ることなく、また、所望のウイルス表現型を有する突然変異体を、インヴィトロおよびインヴィヴォの両方で選別する工程を経ることなく、本発明の別の低温適応性ウマインフルエンザウイルスを作製できる。 40

### 【0036】

本発明の低温適応性ウマインフルエンザウイルスを、当業者に公知の標準的なウイルス学的方法を用いて増殖させてよい。そのような方法の例をここに開示する。例えば、低温適応性ウマインフルエンザウイルスを、ふ化鶏卵中で生育させてもよいし、真核性組織培養細胞中で生育させてもよい。本発明の低温適応性ウマインフルエンザウイルスがその 50

中で生育可能な、好適な無限継代真核細胞株は、インフルエンザウィルスの生育を補助する、例えばM D C K 細胞などの細胞株を含む。本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスがその中で生育可能な、他の好適な細胞には、サル、子ウシ、ハムスターまたはニワトリの初代腎臓細胞があるが、これらに限定されることはない。

#### 【 0 0 3 7 】

一実施例においては、本発明は、インフルエンザA型ウィルスに起因する疾患から動物を保護するための治療用組成物を提供する。この治療用組成物は、低温適応性ウマインフルエンザウィルスまたは低温適応により作製されたウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つのゲノム分節を有するリアソータントインフルエンザA型ウィルスのいずれかを含む。このウマインフルエンザウィルスのゲノム分節は、低温適応性ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つの識別表現型を付与する。さらに、本発明の治療用組成物は、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスのある識別表現型を付与することが識別されている1つまたはそれ以上の突然変異を有するように遺伝子操作されたウマインフルエンザウィルスを含んでもよい。ここで使用される「インフルエンザA型ウィルスに起因する疾患」という語句は、ビルレントインフルエンザA型ウィルスに感染している動物に観察される臨床症状に関する。そのような臨床症状の例には、発熱、くしゃみ、咳、鼻汁、水疱音、食欲減退および抑うつがあるが、これらに限定されることはない。さらに、「インフルエンザA型ウィルスに起因する疾患」は、ここでは、感染した動物によるビルレントウィルスの放散を包含するものとして定義される。ある動物に観察される臨床症状と、ビルレントウマインフルエンザウィルスによる感染との関連は、その動物中のウマインフルエンザウィルスに対する特定の抗体及び/又はT細胞応答の検出を含めた複数の方法で確認してもよい。好適には、ある動物に観察される臨床症状と、ビルレントウマインフルエンザウィルスによる感染との関連を、例えば、感染した動物の鼻咽頭腔から、ウィルスを含有する分泌物を綿棒で採取して、感染した動物からウィルスを分離することにより確認する。ウィルス分離は、分離された分泌物を接種した組織培養細胞中の細胞変性効果を検出するか、分離された分泌物をふ化鶏卵内に接種し、そこで、接種された卵から採取したA F の持つ、インフルエンザウィルスのヘマグルチニンタンパク質の存在を示唆する赤血球凝集能力から、ウィルス複製を検出するか、または、例えば、D i r e c t i g e n (登録商標) F L U A テストなどの、一般に利用可能な診断テストを行うことにより、確認される。

#### 【 0 0 3 8 】

ここで使用される「保護する」という用語は、例えば、被験動物のインフルエンザA型ウィルス感染の防止または治療を含む。従って、本発明の治療用組成物を、例えば予防接種ワクチンとして、被験動物が当該ビルレントウィルスに曝される以前のある時点で、その動物に投与し、その動物をインフルエンザ疾患から保護するために使用してもよい。

#### 【 0 0 3 9 】

優性干渉性表現型を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する本発明の治療用組成物を、ビルレントインフルエンザA型ウィルスに最近感染した、または今後数日以内にそのようなウィルスに曝される可能性のある動物を保護するために使用してもよい。この場合、この治療用組成物は、動物がそのビルレントウィルスに対する抗体を産生する以前に、そのビルレントウィルスの生育を迅速に阻害する。優性干渉性表現型を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する治療用組成物を、今後予想される曝露の前に、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスが、治療される動物の上気道で複製を行うおよその期間、例えば約7日間まで、に相当する期間、効果的に投与してもよい。優性干渉性表現型を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する治療用組成物を、ビルレントウマインフルエンザウィルスに曝された後に、感染した動物が疾患症状を呈示するのに必要な期間、例えば約2日間まで、に相当する期間、効果的に投与してもよい。

#### 【 0 0 4 0 】

本発明の治療用組成物は、例えば、ヒト、ブタ、ウマ及びその他のウマ科動物、水生鳥

類、家禽、闘鶏、アザラシ、ミンク、クジラなどの、インフルエンザウィルス疾患感受性の任意の動物に投与可能である。より好適には、本発明の治療用組成物は、ウマインフルエンザウィルス疾患から保護するために、ウマに投与される。

#### 【0041】

ウマをウマインフルエンザウィルス疾患から保護するために利用できる現在のワクチンは、子馬の保護には有効ではないが、それはおそらく、これらのワクチンは、子馬の体内に存在する母親の抗体を克服することができないためであり、このため、多くの場合、例えば生後3ヶ月などの若齢でのワクチン投与は、免疫性よりもむしろ薬剤耐性に結びつくおそれがある。一実施例においては、既存のウマインフルエンザウィルスワクチンとは異なり、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する治療用組成物は、明らかに若齢の動物に免疫性を付与することが可能である。従って、本発明の治療用組成物を、生後約3ヶ月程度の子馬に、薬剤耐性を誘発することなくウマインフルエンザ疾患から保護するために、安全かつ効果的に投与することが可能である。10

#### 【0042】

一実施例においては、本発明の治療用組成物は、多価性であってもよい。例えば、本発明の1つまたはそれ以上の低温適応性ウマインフルエンザウィルス、1つまたはそれ以上のリアソータントインフルエンザA型ウィルス、及び／又は、本発明の1つまたはそれ以上の遺伝子組換えされたウマインフルエンザウィルスの組み合わせを提供することにより、ある動物を1つまたはそれ以上のインフルエンザA型ウィルス株から保護してもよい。20  
 多価性治療用組成物は、例えば、A / ウマ / ケンタッキー / 1 / 91 (H1N8) のような北米亜型 - 2 ウィルス分離株と A / ウマ / サフォーク / 89 (H3N8) のようなユーラシア亜型 - 2 ウィルス分離株、または、1つまたはそれ以上の亜型 - 2 ウィルス分離株と A / ウマ / プラハ / 1 / 56 (H7N7) のような1つの亜型 - 1 ウィルス分離株に抗する、少なくとも2つの低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含んでもよい。同様に、本発明の多価性治療用組成物は、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスとリアソータントインフルエンザA型ウィルス、または、本発明の2つのリアソータントインフルエンザA型ウィルスを含んでもよい。本発明の多価性治療用組成物は、インフルエンザA型ウィルスに加えて、1つまたはそれ以上の他の感染因子からも保護するための1つまたはそれ以上の製剤をさらに含んでもよい。そのような別の感染因子には、ウィルス類、細菌類、真菌類及び真菌類微生物類、及び寄生虫類があるが、これらに限定されることはない。好適な多価性治療用組成物には、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルス、リアソータントインフルエンザA型ウィルス、または遺伝子組換えウマインフルエンザウィルスと、ウマを罹患させる1つまたはそれ以上の感染因子から防御するための1つまたはそれ以上の組成物との組み合わせがあるが、これらに限定されることはない。対抗すべき好適な感染因子には、ウマ感染性貧血症ウィルス、ウマヘルペスウィルス、東部、西部、またはベネズエラウマ脳炎ウィルス、破傷風、ストレプトコッカス - エクイ、及び *Ehrlichia risticii* があるが、これらに限定されることはない。30

#### 【0043】

本発明の治療用組成物を、治療されるべき動物が許容可能な賦形剤中で調剤してもよい。そのような賦形剤の例として、水、生理食塩水、リングル液、ブドウ糖液、ハンクス液、及びその他の生理的平衡食塩水がある。賦形剤はまた、等張性及び、化学的または生物学的安定性を増強する物質のような微量の添加物も含有してもよい。バッファの例には、リン酸バッファ、重炭酸バッファおよびトリスバッファがあり、安定化剤の例には、アイオワ州デモイン、ダイアmond・アニマル・ヘルス社より入手可能なA1/A2安定化剤がある。標準的な製剤は、動物へ投与するための懸濁液または溶液に適した液体中に溶解可能な、液体または固体のいずれでもよい。一実施例においては、非液体製剤は、投与の前に滅菌水または生理食塩水を加えることの可能な食塩、バッファ、安定化剤などの添加剤を含有してもよい。40

#### 【0044】

本発明の治療用組成物は、1つまたはそれ以上のアジュvantまたは担体を含有しても50

よい。典型的なアジュバントは、特定の抗原に対する動物の免疫反応を増強する物質であり、また、担体は、治療される動物の体内での治療用組成物の半減期を延ばす化合物を含む。本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスまたはリアソータントインフルエンザA型ウィルスを含有する治療用組成物の利点の一つは、有効なワクチンの調製にアジュバント及び担体を必要としないことである。さらに、当業者に公知の多くの場合において、アジュバントまたは担体の使用が、本発明の治療用組成物の利点を妨げることがあるかもしれない。しかし、本発明はアジュバントまたは担体の使用を予め排除するものではないことに留意すべきである。

#### 【0045】

本発明の治療用組成物は、ビルレントウマインフルエンザウィルスの攻撃からある動物を保護するのに十分な量の低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含む。一実施例においては、本発明の治療用組成物は、50%組織培養感染価(TCID<sub>50</sub>)約10<sup>5</sup>単位から約10<sup>8</sup>単位の低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含んでもよい。ここで使用される「TCID<sub>50</sub>単位」とは、感染した培養細胞の50%に細胞変性効果を及ぼすウイルス量である。TCID<sub>50</sub>を測定及び算出する方法は、当業者に周知であり、例えば、Reed and Muench, 1938, Am. J. of Hyg. 27, 493-497に記載されている。本発明の好適な治療用組成物は、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスまたはリアソータントインフルエンザA型ウィルスを、約10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub>単位から約10<sup>7</sup>TCID<sub>50</sub>単位含有し、より好適には、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスまたはリアソータントインフルエンザA型ウィルスを、約2×10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub>単位含有している。

#### 【0046】

本発明は、本発明の治療用組成物の動物への投与を含めた、動物をインフルエンザA型ウィルスに起因する疾患から保護するための方法も含む。好適な方法は、ウマ科動物をウマインフルエンザウィルスに起因する疾患から保護するための方法であり、これらの方針は、そのウマ科動物への低温適応性ウマインフルエンザウィルスの投与を含む。効果的な方法で治療用組成物を投与するための容認可能なプロトコルは、個別の投与量、投与回数、投与頻度及び投与方式を含む。これらのプロトコルの決定は当業者によってなされ、ここにその例を開示する。

#### 【0047】

インフルエンザA型ウィルスにより引き起こされる疾患から動物を保護するための好適な方法は、本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルス、リアソータントインフルエンザウィルスまたは遺伝子組換えウマインフルエンザウィルスを含有する治療用組成物を1回量投与することを含む。好適な1回量は、適切な間隔で1回またはそれ以上の回数投与した時に、動物を疾患から保護することの可能な投与量である。本発明の方法は、治療用組成物の後続的、またはブースター投与も含んでもよい。ブースター投与は、最初の投与後約2週間から約2年間行われてもよい。ブースター投与は、その動物の免疫反応が、その動物を疾患から保護するのに不十分となった時に行われることが望ましい。適切かつ好適な投与スケジュールを、例の項に記載する。

#### 【0048】

本発明の治療用組成物を、治療される動物の上気道の粘膜細胞内にウィルスが入って複製を行うような様々な手段を用いて、その動物に投与してもよい。そのような手段には、経鼻投与、経口投与及び眼内投与があるが、これらに限定されることはない。インフルエンザウィルスは、元来、上気道の粘膜に感染するので、本発明の治療用組成物を、経鼻投与により投与することが望ましい。そのような投与は、カニューレを装着した注射器を用いて、または、ワクチン投与される動物の鼻と口とに装着した噴霧器を用いて行ってよい。

#### 【0049】

インフルエンザA型ウィルスに起因する疾患から動物を保護するための本発明の治療用組成物の有効性について、様々な方法で検査を行ってよい。そのような方法には、例え

10

20

30

40

50

ば赤血球凝集抑制（HAI）検査による抗体の検査、治療される動物の細胞免疫の検査、または、治療される動物について、ビルレントインフルエンザウィルスを用いて誘発試験を行い、その治療される動物が罹患に対する抵抗性を持つかどうかを調べること、があるが、これらに限定されることはない。さらに、ビルレントな野生型ウマインフルエンザウィルスを過去に接種された、または接種感受性の動物の疾患症状を緩和または減退させる優性干渉性表現型を有する低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する本発明の治療用組成物の有効性を、治療される動物の疾患症状の減退または消失について判別することにより検査してもよい。

#### 【0050】

本発明は、本発明の治療用組成物を調製する方法も含む。本発明の治療用組成物を調製する好適な方法を以下に開示する。本発明の治療用組成物の1類型、すなわち低温適応性ウマインフルエンザウィルスの調製に関する適切な工程は、(a)野生型ウマインフルエンザウィルスを、例えばふ化鶏卵内などのインヴィトロで継代培養することと、(b)低温で生育するウィルスを選別することと、(c)継代培養および選別工程を、1回またはそれ以上の回数、温度を順次低下させながら繰り返し、ウィルスが所望の低温で安定して生育するようなウィルス個体数を選択することと、(d)得られたウィルス製剤を適切な賦形剤と混合することと、を含む。

10

#### 【0051】

本発明の治療用組成物の別の1類型、すなわち、適応により作製されたウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つのゲノム分節を有するリアソータントインフルエンザウィルスを調製する適切な工程は、次の工程を含む：(a)好適には弱毒性、温度感受性または優性干渉性の表現型も有する供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスのゲノム分節を、受容インフルエンザA型ウィルスのゲノム分節と混合することと、(b)供与ウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つの認識表現型を有するリアソータントウィルスを選別すること。選別を行うための認識表現型は、弱毒性、低温適応性、温度感受性及び優性干渉性を含む。これらの表現型を判別する方法は、当業者に周知であり、それらをここに開示する。少なくとも弱毒性の表現型を持つウィルスについて判別検査を行うことが望ましい。

20

#### 【0052】

低温適応により作製されたウマインフルエンザウィルスの少なくとも1つのゲノム分節を有するリアソータントインフルエンザA型ウィルスを、この方法を用いて作製する時、選別されるリアソータントウィルスの1類型は、「6+2」リアソータントである。このウィルスの6つの「内部遺伝子分節」、すなわち、N P、P B 2、P B 1、P A、M及びN S遺伝子をコードする分節は、供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスのゲノムに由来し、また、2つの「外部遺伝子分節」、すなわち、H A及びN A遺伝子をコードする分節は、受容インフルエンザA型ウィルスに由来する。このようにして作製されたウィルスは、供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスの低温適応性、弱毒性、温度感受性及び/又は干渉性表現型を有するが、受容株の抗原性は有しない。

30

#### 【0053】

本発明は、ウマインフルエンザウィルス野生型系統A / ウマ / ケンタッキー / 1 / 91 (H3N8) 及び低温適応性ウマインフルエンザウィルスE I V - P 8 2 1から分離された核酸分子を含む。

40

#### 【0054】

本発明によれば、分離された核酸分子とは、自然環境から隔離された（すなわち、人間により操作されてきた）核酸分子であり、DNA、RNA、または、DNAまたはRNAのいずれかの誘導体であってもよい。従って、「分離された」という用語は、核酸分子が精製されている程度を反映するものではない。

#### 【0055】

本発明は、野生型及び低温適応性ウマインフルエンザウィルスタンパク質をコードする核酸分子を含む。本発明の核酸分子を、当業者に周知の方法で作製してもよい。本発明の

50

タンパク質を、当業者に周知の方法、すなわち、組換えDNA技術により作製してもよい。好適な核酸分子は、核酸配列SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25及び/又はそれらの相補体を含むコドン鎖を有する。相補体は、核酸の2本の一本鎖であり、そのヌクレオチド配列が全長にわたって塩基対合することによりハイブリッドを形成するようなものとして定義される。ヌクレオチド配列が分かれれば、当業者はその相補体を導き出すことが可能である。10

#### 【0056】

ウマインフルエンザMタンパク質をコードする好適な核酸分子は、neiw<sub>wt</sub>M<sub>1023</sub>, neiw<sub>wt1</sub>M<sub>1023</sub>, neiw<sub>wt2</sub>M<sub>1023</sub>, neiw<sub>wt</sub>M<sub>756</sub>, neiw<sub>wt1</sub>M<sub>756</sub>, neiw<sub>wt2</sub>M<sub>756</sub>, neic<sub>a1</sub>M<sub>1023</sub>, neic<sub>a2</sub>M<sub>1023</sub>, neic<sub>a1</sub>M<sub>756</sub>及び/又はneic<sub>a2</sub>M<sub>756</sub>であり、これらのコドン鎖は、SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4及び/又はSEQ ID NO: 6で表される。

#### 【0057】

ウマインフルエンザHAタンパク質をコードする好適な核酸分子は、neiw<sub>wt</sub>HA<sub>1762</sub>, neiw<sub>wt</sub>HA<sub>1695</sub>, neic<sub>a1</sub>HA<sub>1762</sub>, neic<sub>a2</sub>HA<sub>1762</sub>, neic<sub>a1</sub>HA<sub>1695</sub>及び/又はneic<sub>a2</sub>HA<sub>1695</sub>であり、これらのコドン鎖は、SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10及び/又はSEQ ID NO: 12で表される。20

#### 【0058】

ウマインフルエンザPB2-Nタンパク質をコードする好適な核酸分子は、neiw<sub>wt</sub>PB2-N<sub>1241</sub>, neiw<sub>wt</sub>PB2-N<sub>1214</sub>, neic<sub>a1</sub>PB2-N<sub>12</sub><sub>41</sub>, neic<sub>a2</sub>PB2-N<sub>1241</sub>, neic<sub>a1</sub>PB2-N<sub>1214</sub> neic<sub>a2</sub>及び/又はPB2-N<sub>1214</sub>であり、これらのコドン鎖は、SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16及び/又はSEQ ID NO: 18で表される。30

#### 【0059】

ウマインフルエンザPB2-Cタンパク質をコードする好適な核酸分子は、neiw<sub>wt</sub>PB2-C<sub>1233</sub>, neiw<sub>wt2</sub>PB2-C<sub>1232</sub>, neiw<sub>wt</sub>PB2-C<sub>194</sub>, neic<sub>a1</sub>PB2-C<sub>1232</sub>, neic<sub>a2</sub>PB2-C<sub>1231</sub>及び/又はneic<sub>a1</sub>PB2-C<sub>1194</sub>であり、これらのコドン鎖は、SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23及び/又はSEQ ID NO: 25で表される。

#### 【0060】

本発明は、SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20及び/又はSEQ ID NO: 24を有するタンパク質と、これらのタンパク質をコードする核酸分子とを含む。40

#### 【0061】

本発明の好適なウマインフルエンザMタンパク質は、neiw<sub>wt</sub>M<sub>1023</sub>, neiw<sub>wt1</sub>M<sub>1023</sub>, neiw<sub>wt2</sub>M<sub>1023</sub>, neiw<sub>wt</sub>M<sub>756</sub>, neiw<sub>wt1</sub>M<sub>756</sub>, neiw<sub>wt2</sub>M<sub>756</sub>, neic<sub>a1</sub>M<sub>1023</sub>, neic<sub>a2</sub>M<sub>1023</sub>, neic<sub>a1</sub>M<sub>756</sub>及び/又はneic<sub>a2</sub>M<sub>756</sub>を有する核酸分子によりコードされるタンパク質を含む。好適なウマインフルエンザMタンパク質は、Peiw<sub>wt</sub>M<sub>252</sub>, Peic<sub>a1</sub>M<sub>252</sub>及び/又はPeic<sub>a2</sub>M<sub>252</sub>である。一実施例に50

おいては、本発明の好適なウマインフルエンザMタンパク質は、SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4及び/又はSEQ ID NO: 6によりコードされ、従って、SEQ ID NO: 2及び/又はSEQ ID NO: 5を含むアミノ酸配列を有する。

#### 【0062】

本発明の好適なウマインフルエンザHAタンパク質は、nei<sub>wt</sub>HA<sub>1762</sub>, nei<sub>wt</sub>HA<sub>1695</sub>, nei<sub>ca1</sub>HA<sub>1762</sub>, nei<sub>ca2</sub>HA<sub>1762</sub>, nei<sub>ca1</sub>HA<sub>1695</sub>及び/又はnei<sub>ca2</sub>HA<sub>1695</sub>を有する核酸分子によりコードされるタンパク質を含む。好適なウマインフルエンザHAタンパク質は、Pe<sub>iwt</sub>HA<sub>565</sub>, Pei<sub>ca1</sub>HA<sub>565</sub>及び/又はPei<sub>ca2</sub>HA<sub>565</sub>である。  
10 一実施例においては、本発明の好適なウマインフルエンザHAタンパク質は、SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10及び/又はSEQ ID NO: 12によりコードされ、従って、SEQ ID NO: 8及び/又はSEQ ID NO: 11を含むアミノ酸配列を有する。

#### 【0063】

本発明の好適なウマインフルエンザPB2-Nタンパク質は、nei<sub>wt</sub>PB2-N<sub>1241</sub>, nei<sub>wt</sub>PB2-N<sub>1214</sub>, nei<sub>ca1</sub>PB2-N<sub>1241</sub>nei<sub>ca2</sub>PB2-N<sub>1241</sub>, nei<sub>ca1</sub>PB2-N<sub>1214</sub>nei<sub>ca2</sub>及び/又はPB2-N<sub>1214</sub>を有する核酸分子によりコードされるタンパク質を含む。好適なウマインフルエンザPB2-Nタンパク質は、P<sub>wt</sub>PB2-N<sub>404</sub>, P<sub>ca1</sub>PB2-  
20 N<sub>404</sub>及び/又はP<sub>ca2</sub>PB2-N<sub>404</sub>である。一実施例においては、本発明の好適なウマインフルエンザPB2-Nタンパク質は、SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16及び/又はSEQ ID NO: 18によりコードされ、従って、SEQ ID NO: 14及び/又はSEQ ID NO: 17を含むアミノ酸配列を有する。

#### 【0064】

本発明の好適なウマインフルエンザPB2-Cタンパク質は、nei<sub>wt1</sub>PB2-C<sub>1233</sub>, nei<sub>wt2</sub>PB2-C<sub>1232</sub>, nei<sub>wt</sub>PB2-C<sub>1194</sub>, nei<sub>ca1</sub>PB2-C<sub>1232</sub>, nei<sub>ca2</sub>PB2-C<sub>1231</sub>及び/又はnei<sub>ca1</sub>PB2-C<sub>1194</sub>を有する核酸分子によりコードされるタンパク質を含む。好適なウマインフルエンザPB2-Nタンパク質は、P<sub>wt</sub>PB2-C<sub>398</sub>, P<sub>ca1</sub>PB2-C<sub>398</sub>及び/又はP<sub>ca2</sub>PB2-C<sub>398</sub>である。一実施例においては、本発明の好適なウマインフルエンザPB2-Cタンパク質は、SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23及び/又はSEQ ID NO: 25によりコードされ、従って、SEQ ID NO: 20及び/又はSEQ ID NO: 24を含むアミノ酸配列を有する。  
30

#### 【0065】

核酸配列SEQ ID NO: 1は、ここでnei<sub>wt1</sub>M<sub>1023</sub>及びnei<sub>wt2</sub>M<sub>1023</sub>として表される、PCR增幅された核酸分子のコドン鎖から導き出されたコンセンサス配列を表し、その製法については例の項で開示する。核酸配列SEQ ID NO: 4は、ここでnei<sub>ca1</sub>M<sub>1023</sub>及びnei<sub>ca2</sub>M<sub>1023</sub>として表される、PCR增幅された核酸分子のコドン鎖から導き出された配列を表し、その製法については例の項で開示する。核酸配列SEQ ID NO: 7は、ここでnei<sub>wt</sub>HA<sub>1762</sub>として表される、PCR增幅された核酸分子のコドン鎖から導き出された配列を表し、その製法については例の項で開示する。核酸配列SEQ ID NO: 10は、ここでnei<sub>ca1</sub>HA<sub>1762</sub>及びnei<sub>ca2</sub>HA<sub>1762</sub>として表される、PCR增幅された核酸分子のコドン鎖から導き出された配列を表し、その製法については例の項で開示する。核酸配列SEQ ID NO: 13は、ここでnei<sub>wt</sub>PB2-N<sub>1241</sub>として表される、PCR增幅された核酸分子のコドン鎖から導き出された配列を表し、その製法については例の項で開示する。核酸分子SEQ ID NO: 16は、ここでne  
40

*i<sub>c</sub>a<sub>1</sub>PB2-N<sub>1241</sub>* 及び *nei<sub>c</sub>a<sub>2</sub>PB2-N<sub>1241</sub>* として表される、PCR 増幅された核酸分子のコドン鎖から導き出された配列を表し、その製法については例の項で開示する。核酸配列 SEQ ID NO: 19 は、ここで *neiw<sub>t</sub>1PB2-C<sub>1233</sub>* として表される。PCR 増幅された核酸分子のコドン鎖から導き出された配列を表し、その製法については例の項で開示する。核酸配列 SEQ ID NO: 22 は、ここで *neiw<sub>t</sub>2PB2-C<sub>1232</sub>* として表される、PCR 増幅された核酸分子のコドン鎖から導き出された配列を表し、その製法については例の項で開示する。核酸配列 SEQ ID NO: 23 は、ここで *neic<sub>a</sub>1PB2-C<sub>1232</sub>* として表される、PCR 増幅された核酸分子のコドン鎖から導き出された配列を表し、その製法については例の項で開示する。さらなる核酸分子、核酸配列、タンパク質及びアミノ酸配列については、例の項で説明する。

#### 【0066】

本発明は、SEQ ID NO: 5 を持つアミノ酸配列を有する M タンパク質をコードする低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する核酸分子を含む。本発明の別の一実施例は、SEQ ID NO: 11 を持つアミノ酸配列を有する HA タンパク質をコードする低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する核酸分子を含む。本発明の別の一実施例は、SEQ ID NO: 17 を持つアミノ酸配列を有する PB2-N タンパク質をコードする低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する核酸分子を含む。本発明の別の一実施例は、SEQ ID NO: 24 を持つアミノ酸配列を有する PB2-C タンパク質をコードする低温適応性ウマインフルエンザウィルスを含有する核酸分子を含む。

#### 【0067】

核酸の配列決定技術は誤りが全くないわけではないため、ここで表される核酸配列及びアミノ酸配列は、それぞれ、本発明の核酸分子の見かけの核酸配列と、本発明の見かけの M, HA, 及び PB2-N, 及び PB2-C タンパク質をそれぞれ表すことに留意されたい。

#### 【0068】

本発明の別の一実施例は、本発明の野生型ウィルス M, HA, PB2-N, PB2-C, PB2 タンパク質と選択的に結合する抗体である。本発明の別の一実施例は、本発明の低温適応性ウィルス M, HA, PB2-N, PB2-C, PB2 と選択的に結合する抗体である。好適な抗体は、SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 及び / 又は SEQ ID NO: 24 と選択的に結合する。

#### 【0069】

以下の例は説明の目的で提供されるものであり、本発明の範囲を限定するものとしては意図されていない。

#### 【0070】

##### 例 1

本例は、本発明の複数の低温適応性ウマインフルエンザウィルスの製法及び表現型の特徴を説くものである。

#### 【0071】

A. 親ウマインフルエンザウィルス A / ウマ / ケンタッキー / 1 / 91 (H3N8)  
 (ケンタッキー州レキシントン、ケンタッキー大学、トム・チャンバーズより入手) を、外来宿主種、すなわち、ふ化鶏卵中で、次の方法で低温適応させた。例えば、メリーランド州チェスタータウン、トラスロー・ファームまたアイオワ州アデル、ハイバック社より入手可能な、ふ化後 10 日目または 11 日目の鶏卵の殻に穿孔した小さな孔を介して、尿膜腔内に、約  $10^6$  プラーク形成単位 (pfu) の親ウマインフルエンザウィルスを含有する約 0.1 ミリリットル (ml) の非希釀 AF を注射することにより、このウィルスを接種した。これらの孔を、マニキュア液で密封した後、これらの卵を、加湿したインキ

10

20

30

40

50

ユベータ内で、適切な温度で3日間インキュベートした。インキュベート後、これらの卵を検卵し、無生育性の卵をすべて廃棄した。卵殻の一部を無菌的に除去し、滅菌ピンセットで漿尿膜(CAM)を剥がし、AFを滅菌ピペットで取り出して、生育可能な胚からAFを回収した。回収したAFを、次の継代培養まで冷凍した。次に、このAFを、未希釈の状態で、または表1に示したように、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で1000倍に希釈して使用し、2回目以降の継代培養に用いる新たな卵をインキュベートした。合計69回の継代培養を行った。初期の継代培養は、約34(継代1-2回目)または約30で行い、それ以後の継代培養では、培養温度を約28または約26に低下させた。安定した弱毒性のウィルスの所望の表現型の選択の可能性を高めるため、表1に示すように、初回の連続継代を、連続継代培養ツリーの5つの異なる枝、AからEまでに展開した。

【0072】

【表1】

枝AからEまでの継代培養歴

温度	継代培養回				
	枝A	枝B	枝C	枝D	枝E
34°C	1-2	1-2	~1-2	1-2	1-2
30°C	3-8	3-29	3-29	3-29	3-29
28°C		30-33*	30-68*	30-33	30-69
26°C	9-65	34-69*		34-65	

\* =これらの継代培養では感染尿膜腔液を1000倍に希釈した

【0073】

B.セクションAに記載の低温適応法で得られたウィルス分離株の温度感受性、すなわち、当該低温適応ウィルスが比較的低温または許容温度(例えば約34)では生育するが、比較的高温または非許容温度(例えば約37)ではplaquesを形成しないような表現型について、下記のように検査を行った。低温適応継代培養の各回に、AFをplaquesアッセイで約34で力価測定した。アッセイを行った個々のplaquesのplaques領域を周期的に切り出し、切り出した寒天培地を、MDCK細胞の単層を含有する96ウェルのトレイに置いて、当該plaquesをクローン分離した。この96ウェル・トレイを一晩インキュベートし、その産物の温度感受性を、約34及び約39でインキュベートした複製96ウェル・トレイで、CPEアッセイによりアッセイした。このアッセイにより温度感受性変異体であるとして判別されたクローンのパーセント、すなわち、34では生育するが39では生育しないウィルス性のplaquesの数を、plaquesの総数で割ったものを算出し、図2に示す。次に、温度感受性分離株の非許容温度でのタンパク合成について、放射線標識されたウィルス合成タンパク質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)で視覚化することにより、測定した。

【0074】

【表2】

10

20

30

40

## 温度感受性クローン分離株のパーセント

継代培養回	温度感受性パーセント				
	枝A	枝B	枝C	枝D	枝E
p36	56%	66%	0%	66%	54%
p46		80%	60%		75%
p47			80%		
p48			100%		
p49		100%		100%	50%
p50			90%		
p51		100%			
p52					57%
p62	100%			100%	
p65			100%		
p66		100%			88%

10

## 【0075】

温度感受性について検査を行ったクローン分離株から、2つを選択してさらなる検査に使用した。表1に示すように、クローンE I V - P 8 2 1を枝Bの継代49回目から選択し、また、クローンE I V - P 8 2 4を枝Cの継代48回目から選択した。これらのウィルス分離株は、両方とも温度感受性であり、どちらの分離株のブラーク形成も、温度約39で阻害された。この温度では、タンパク質合成はE I V - P 8 2 1では完全に阻害されたが、E I V - P 8 2 4は通常のレベルのタンパク質合成を示した。加えて、E I V - P 8 2 1のブラーク形成は、温度約37で阻害され、また、この温度では、後期遺伝子発現が阻害された。すなわち、N Pタンパク質合成は通常レベルであり、M 1またはH Aタンパク質の合成は少ないか全く行われず、ポリメラーゼタンパク質の合成レベルは高かった。ウィルス特異的なタンパク質合成を特徴とする、37で観察された表現型は、すべてのウイルスタンパク質合成の阻害を特徴とする、39で観察された表現型とは異なる。ウィルスE I V - P 8 2 1は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に、受託番号ATCC VR - \_\_\_\_\_で寄託され、また、ウィルスE I V - P 8 2 4は、ATCCに受託番号ATCC VR - \_\_\_\_\_で寄託されている。

20

## 【0076】

C. 分離株E I V - P 8 2 1の突然変異のさらなる特徴を、リアソートメント分析により、次のように明らかにした。インフルエンザウィルスのリアソートメント分析により、当業者は、いくつかの条件下で、任意のウィルスの表現型と、あるインフルエンザA型ウィルスゲノムを有する8つのRNA分節の複数に発生していると推定される突然変異とを関連づけることができる。この技術は、例えばPalese, et al., 同上、に説明されている。E I V - P 8 2 1と、鳥類インフルエンザウィルス、A / マガモ / ニューヨーク / 6750 / 78との混合感染を、次のように行った。MDCK細胞とE I V - P 8 2 1との共感染を、感染多重度(MOI)2pfu/細胞で、また、MDCK細胞とA / マガモ / ニューヨーク / 6750 / 78との共感染を、MOI 2、5、または10pfu/細胞で行った。感染した細胞を、温度約34でインキュベートした。これら様々な共感染の産物を力価測定し、個々のブラークを約34で分離した。そして、その結果得られたクローン分離株について、約39及び約37で生育できるか否か、また、約39、約37及び約34で遺伝子発現、すなわち、ウイルスタンパク質の合成ができるか否かを調べた。タンパク質の合成を、放射線標識された感染細胞の溶解産物のSDS-PAGE分析により評価した。これら2つの親ウィルスのH A、N P及びN S - 1タンパク質は、それぞれ分離ゲノム分節でコードされ、SDS-PAGE分析で区別可能である。なぜなら、これらの各ウイルスタンパク質は、ウマまたは鳥類インフルエンザウィルスのいずれかに由来し、異なる見掛け分子量で移動するからである。このような方法

30

40

50

で、少なくとも H A、N P 及び N S - 1 遺伝子については、親ウィルスの温度感受性表現型やタンパク質合成表現型などのいくつかの表現型が、これらの遺伝子を有するゲノム分節と共に分離するか否かを調べることができる。E I V - P 8 2 1 の H A、N P 及び N S - 1 タンパク質のそれぞれについて、a) 非許容温度約 39° でのブラーク形成を阻害する、すなわち、C P E を誘発する突然変異、または b) 非許容温度約 39° でのタンパク質合成を阻害する突然変異の共分離を、リアソートメント分析により調べ、その結果を表 3 及び表 4 にそれぞれ示す。

【 0 0 7 7 】

【表 3】

10

EIV-P821及び鳥類インフルエンザウィルスA/マガモ/ニューヨーク  
/6750/78の39°Cでのブラーク形成表現型のリアソートメント分析

遺伝子	ウィルス	ts <sup>+1</sup>	ts <sup>-2</sup>
HA	鳥類	26	13
	ウマ	11	44
NP	鳥類	37	8
	ウマ	0	49
NS-1	鳥類	9	8
	ウマ	12	20

1 組織培養細胞中で、温度約39°CでCPEを誘発可能なクローン分離株の数

2 組織培養細胞中で、温度約39°CでCPEを誘発する能力を阻害される  
クローン分離株の数

20

【 0 0 7 8 】

【表 4】

EIV-P821及び鳥類インフルエンザウィルスA/マガモ/ニューヨーク  
/6750/78の39°Cでのタンパク質合成表現型のリアソートメント分析

遺伝子	ウィルス	ts <sup>+1</sup>	ts <sup>-2</sup>
HA	鳥類	18	1
	ウマ	11	7
NP	鳥類	34	5
	ウマ	7	8
NS-1	鳥類	10	4
	ウマ	14	5

30

1 温度約39°Cで全てのウィルスタンパク質を合成するクローン分離株の数

2 温度約39°Cで全てのウィルスタンパク質を合成する能力を阻害される  
クローン分離株の数

【 0 0 7 9 】

検査の結果、ウマ N P 遺伝子と、非許容温度約 39° で E I V - P 8 2 1 のブラーク形成を阻害する突然変異との関連性が示された。しかし、H A、N P または N S - 1 遺伝子のいずれについても、非許容温度約 39° で E I V - P 8 2 1 のウィルスタンパク質発現を阻害する突然変異との関連性は示されなかった。従って、これらのデータは、ウィルス E I V - P 8 2 1 のブラーク形成表現型とタンパク質合成表現型とが、異なる突然変異の結果であることも示した。

40

【 0 0 8 0 】

D . 本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスが優性干渉性表現型を持つか否か、すなわち、野生型親ウィルス A / ケンタッキー / 1 / 9 1 ( H 3 N 8 ) との混合感染の場合にこれらのウィルスを抑制するか否か . についても研究を行った。ウィルス E I V - P 8 2 1 及び E I V - P 8 2 4 の優性干渉性表現型を、次の方法で測定した。M D C K 細胞の分離単層を、親ウィルス A / ケンタッキー / 1 / 9 1 ( H 3 N 8 ) に M O I 2 で単感染させるか、低温適応性ウィルス E I V - P 8 2 1 または E I V - P 8 2 4 のいずれかに

50

M O I 2 で単感染させるか、又は、これら親ウィルスと、低温適応性ウィルスの 1 つとに M O I 2 + 2 で同時に二重感染させた。このときの温度はいずれの場合も約 3 4 であった。感染後 2 4 時間で、培養株から培地を採取し、これらの様々な感染細胞からのウィルス産生を測定した。測定は、温度約 3 4 及び約 3 9 の複製ブラークアッセイで行った。このアッセイでは、低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 または E I V - P 8 2 4 が温度感受性であり、従って、非許容温度約 3 9 ではブラークを形成できないが、親ウィルスはいずれの温度でもブラークを形成できるため、これら低温適応性ウィルスの存在下でも親ウィルスの生育を測定できるという事実を利用した。具体的には、これらの低温適応性ウィルスがこの親ウィルスの生育に及ぼす優性干渉作用を、約 3 9 で親ウィルスに単感染させた細胞のウィルス産出量と、二重感染させた細胞の親ウィルス産出量とを比較することにより、定量した。E I V - P 8 2 1 は、混合感染で、親ウィルスの産出量をおよそ 2 0 0 分の 1 まで減少させることができ、また、E I V - P 8 2 4 は、混合感染で、親ウィルスの産出量をおよそ 3 2 0 0 分の 1 まで減少させることができた。従って、このアッセイは、低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 及び E I V - P 8 2 4 が、両方とも優性干渉性表現型を発揮することを示した。10

#### 【 0 0 8 1 】

E . ウィルス分離株 E I V - M S V + 5 を、次の方法で E I V - P 8 2 1 から誘導した。E I V - P 8 2 1 を、上述の方法で卵内で 1 回継代培養し、ここで E I V - M S V 0 として表されるマスター・シード・ウィルス分離株を作製した。次に、E I V - M S V 0 を、卵内でさらに 3 回継代培養し、各回の終了毎に得られたウィルス分離株を、それぞれ E I V - M S V + 1 、 E I V - M S V + 2 、 E I V - M S V + 3 とした。E I V - M S V + 3 を、次の方法で、M D C K 細胞内でさらに 2 回継代培養した。M D C K 細胞を、1 5 0 c m<sup>2</sup> の組織培養フラスコ中で、子ウシ血清を 1 0 % 含むハンクス液の M E M 組織培養培地で生育させた。次に、細胞を滅菌 P B S で洗浄し、生育培地を、フラスコ当たり約 8 m l の感染培地（ハンクス液、1 μ g / m l の T P C K トリプシン溶液、0 . 1 2 5 % のウシ血清アルブミン（ B S A ）及び 1 0 m M の H E P E S バッファからなる M E M 組織培養培地）と取り替えた。M D C K 細胞に、ウィルス E I V - M S V + 3 （ M D C K 細胞の継代培養 1 回目）または E I V - M S V + 3 （ M D C K 細胞の継代培養 2 回目）から採取したウィルスストックを含有する A F を接種し、これらのウィルスを約 3 4 で 1 時間吸収させた。接種物を細胞单層から取り除いた後、細胞を再度 P B S で洗浄し、フラスコ当たり約 1 0 0 m l の感染培地を加えた。感染した細胞を、約 3 4 で 2 4 時間インキュベートした。フラスコを強く搖すって細胞单層を破碎することにより、ウィルス感染した M D C K 細胞を採集し、ウィルス分離株 E I V - M S V + 4 （ M D C K 細胞の継代培養 1 回目）及び E I V - M S V + 5 （ M D C K ）細胞の継代培養 2 回目）を得た。20

#### 【 0 0 8 2 】

ウィルス E I V - M S V 0 及び E I V - M S V + 5 の表現型を、上記セクション B で述べた方法で分析し、これらのウィルスが温度約 3 4 、約 3 7 及び約 3 9 でブラーク形成及びタンパク質合成を行う能力を測定した。E I V - M S V 0 及び E I V - M S V + 5 は、いずれも温度約 3 4 では組織培養細胞内でブラークを形成したが、温度約 3 9 では、いずれのウィルス分離株も、ブラーク形成または検出可能なウィルスタンパク質合成を行わなかった。ウィルス E I V - M S V 0 は、温度約 3 7 で E I V - P 8 2 1 と類似した温度感受性表現型を示した。すなわち、ブラーク形成の阻害及び後期遺伝子発現の阻害が見られた。しかし、E I V - M S V + 5 の場合は、その親ウィルス E I V - P 8 2 1 とは異なり、温度約 3 7 で、組織培地内でブラークを形成し、また、この温度で、全てのタンパク質を通常量合成した。ウィルス E I V - M S V + 5 は、受託番号 A T C C V R - \_\_\_\_\_ で A T C C に寄託されている。30

#### 【 0 0 8 3 】

例 2

本発明の治療用組成物を、次の方法で作製した。

#### 【 0 0 8 4 】

50

A . E I V - P 8 2 1 の大量のストックを、次の方で卵内で増殖させた。約 60 個の S P F ふ化鶏卵を検卵し、無生育卵を廃棄した。ストックウィルスを、滅菌 P B S で、約  $1.0 \times 10^5$  p f u / m l に希釈した。ウィルスを、例 1 A で説明した方法で、卵の尿膜腔に接種した。加湿したインキュベータで、温度約 34 度で 3 日間インキュベートした後に、例 1 A で説明した方法で、A F を卵から採取した。採取した A F を、例えばアイオワ州デモイン、ダイアモンド・アニマル・ヘルス社より入手可能な A 1 / A 2 安定化剤などの安定化剤液と、25% V / V ( 安定化剤 / A F ) で混合した。採取した A F を遠心分離管内でバッチにして、旋回バケットロータを取り付けた I E C C e n t r a - 7 R 冷却卓上遠心機中で、10 分間、1000 r p m で遠心分離して清澄化させた。清澄化した液体を、1 - m l 冷凍バイアルに入れ、約 -70 度で冷凍した。ウィルスストックを、M D C K 細胞中で、約 34 度、C P E 及びブラークアッセイにより力価測定した。  
10

## 【 0 0 8 5 】

B . E I V - P 8 2 1 の大量のストックを、次の方で M D C K 細胞内で増殖させた。M D C K 細胞を、 $150 \text{ cm}^2$  の組織培養フラスコ中で、子ウシ血清を 10% 含むハンクス液の M E M 組織培養培地で生育させた。次に、細胞を滅菌 P B S で洗浄し、生育培地を、フラスコ当たり約 8 m l の感染培地と取り替えた。M D C K 細胞を、ウィルスストックに、細胞当たり約 0.5 p f u から細胞当たり約 0.005 p f u の範囲の M O I で接種し、ウィルスを約 34 度で 1 時間吸収させた。接種物を細胞単層から取り除いた後、細胞を再度 P B S で洗浄し、フラスコ当たり約 100 m l の感染培地を加えた。感染した細胞を、約 34 度で 24 時間インキュベートした。フラスコを強く搖すって細胞単層を破碎することにより、ウィルス感染した M D C K 細胞を採集し、安定化剤をフラスコに 25% V / V ( 安定化剤 / ウィルス溶液 ) で加えた。上清を無菌的に冷凍バイアルに入れて、-70 度で冷凍した。  
20

## 【 0 0 8 6 】

C . 本発明のいくつかの低温適応性温度感受性ウマインフルエンザウィルスを含む治療用組成物を、以下の方法で製剤した。ワクチン接種工程の直前に、以下の例 3 - 7 に記載されているように、E I V - P 8 2 1 又は E I V - M S V + 5 の保存バイアルを解凍し、水または P B S を含む賦形剤、または、0.125% のウシ血清アルブミンを含有するハンクス液を加えた M E M 組織培養培地 ( B S A - M E M 溶液 ) に希釈し、動物への接種のための所望の濃度とした。このワクチン組成物を、投与前に氷冷した。全ての治療用組成物を、ワクチン接種の直前に、M D C K 細胞で、標準的な方法で力価測定し、また、動物に投与された組成物と同一に処理された一定量の組成物を、可能な方法で、ワクチン接種後力価測定し、ウィルスが工程の間生育可能であり続けるようにした。  
30

## 【 0 0 8 7 】

## 例 3

低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物の安全性と複製能力とを、ウマインフルエンザウィルスに対する検出可能な免疫をすでに持っている 3 頭のウマで次のように検査した。例 1 で説明した方法で作製した E I V - P 8 2 1 を、例 2 A で説明した方法により卵内で生育させ、これを用いて例 2 C に述べた  $10^7$  p f u E I V - P 8 2 1 / 2 m l B S A - M E M 溶液を含有する治療用組成物を調剤した。  
40

## 【 0 0 8 8 】

ウマインフルエンザウィルスに対する検出可能なヘマグルチニン阻害 ( H A I ) 価をすでに持っている 3 頭の子馬に、E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物を、次の方法で接種した。各子馬に 2 - m l 量の E I V - P 8 2 1 を、偽鼻孔に十分に届く長さのプラント・カニューレを嵌めた注射器を用いて、各鼻孔に 1 m l ずつ経鼻投与した。

## 【 0 0 8 9 】

これらの子馬の、くしゃみ、唾液分泌過多、呼吸困難または呼吸異常、ふるえ、過敏症、または発熱などの即時型アレルギー反応を、ワクチン投与直後約 30 分間及び約 4 時間後に観察した。これらの動物の、惰眠や食欲低下などの遅延型アレルギー反応を、ワクチ  
50

ン接種後1日目から11日目にわたってさらに観察した。この研究では、3頭の子馬のいずれも、ワクチン接種によるアレルギー反応を示さなかった。

#### 【0090】

これらの子馬の、ウマインフルエンザに一致する臨床症状を、ワクチン接種の2日前からワクチン接種後11日目まで、毎日ほぼ同じ時刻に観察した。これらの子馬の鼻汁、眼球分泌物、食欲低下、気質、心拍数、毛細血管レフィル時間、呼吸数、呼吸困難、肺音、上歯肉上の中毒線の出現及び体温を観察した。加えて、頸下及び腹壁のリンパ節を触診し、異常を記述した。この研究に使用した3頭の子馬のいずれも、観察期間中、いかなる異常反応または顕性の臨床症状も示さなかった。

#### 【0091】

これらの動物のウィルス放散を検査するために、Chambers, et al., 1995, Equine Practice, 17, 19-23. Chambers, et al., 同上に記載されている方法で、ワクチン接種後0日目から11日目にわたって、子馬の鼻咽頭スワブを採取した。簡単に言うと、これらの子馬のそれぞれの鼻孔に、2本の滅菌ダクロンポリエステルチップアプリケータ（例えばメイン州ギルフォード、ハードウッド・プロダクツ社より入手可能）を同時に挿入した。スワブ（合計4本、各鼻孔毎に2本）を、5%のグリセロール、ペニシリン、ストレプトマイシン、ネオマイシン及びゲンタマイシンを含有する生理的pHのPBSからなる冷却輸送培地2.5mlを入れた15-mlコニカル遠心分離管内に折り入れた。サンプルを湿らせた氷上に保持しながら、スワブを無菌的に培地中に絞り出し、鼻咽頭サンプルを2つのアリコートに分けた。アリコートの1つを使用して、例1に記載の方法で、ふ化鶏卵接種によるEIVの分離を行った。次に、接種された鶏卵のAFの赤血球凝集能力を、標準的な方法で検査したところ、当該AF中にウマインフルエンザウィルスの存在が確認された。ワクチン接種後2日目及び3日目に、もう1つのアリコートを使用して、ベクトン・ディッキンソン社（メリーランド州コッキーズヴィル）より入手可能なDirectigen（登録商標）Flu Aテストによるウィルス検査を行った。

#### 【0092】

これら3頭の動物の鼻咽頭分泌物から、卵接種によりEIVを分離しようとした試みは、失敗に終わった。しかし、2日目及び3日目に、検査した全ての動物がDirectigen Flu Aテストによるウィルス放散検査で陽性を示した。このことは、EIV-P821が血清陽性の子馬の体内で複製を行うという仮説を裏付けるものである。

#### 【0093】

本例に述べた被接種動物および例4-7に述べた動物のEIVに対する抗体価を検査するために、ワクチン接種前及び、ワクチン接種後の指定日に当該動物から血液を採取した。血清を分離し、トリプシン/過ヨウ素酸塩またはカオリンのいずれかで処理し、通常の血清に見られる赤血球凝集反応の非特異インヒビターを阻害した。新鮮なEIV分離株に抗する血清サンプルの赤血球凝集反応阻害(HAI)価を、例えば連邦規則コード9の113.2に基づき、U.S.D.A.国立獣医学実用試験所(National Veterinary Services Laboratory)提供の「ウマインフルエンザウィルス抗体の赤血球凝集反応阻害アッセイ」(SAM 124)に記載の標準的な方法で検査した。

#### 【0094】

当該3頭の子馬のHAI価を、表5に示す。図示されるように、EIV-P821接種後の3頭の動物すべてにおいて、血清HAI価は、初期価に関係なく、少なくとも4倍に増加した。

#### 【0095】

これらのデータは、低温適応性ウマインフルエンザウィルスEIV-P821が、安全かつ非反応発生性であることを示し、また、これらの動物が、すでに証明可能な価を持っている場合でも、ウマインフルエンザウィルス抗体価を増加させたことを示している。

#### 【0096】

10

20

30

40

50

## 【表 5】

ワクチン接種された動物のHAI値  
動物 HAI値(ワクチン接種後日数)

ID	0	7	14	21
18	40	80	160	160
19	10	20	40	80
25	20	40	320	80

\*HAI値は、ウマインフルエンザウィルスの新鮮分離株による赤血球凝集反応を阻害した血清の希釈度の最大値の逆数として表される。

10

## 【0097】

## 例 4

この例では、低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物の安全性と有効性を評価するための動物研究を開示する。

## 【0098】

低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物を、弱毒性及び、ビルレントウマインフルエンザウィルスの攻撃からウマを保護する能力について、以下のように検査した。例 1 に記載の方法で作製された E I V - P 8 2 1 を、例 2 A に記載の方法で卵内で生育させ、例 2 C に記載の方法で、ウィルス  $10^7$  p f u / 水 2 m l を含有する治療用組成物を調製した。8 頭の E I V - 血清陰性の子馬を本研究に使用した。これら 8 頭の子馬のうち 3 頭に、例 3 で記載した方法と同様の方法で、E I V - P 8 2 1 治療用組成物を  $10^7$  p f u 含有するワクチンを 2 - m l 経鼻接種した。1 頭の子馬に E I V - P 8 2 1 治療用組成物を  $10^7$  p f u 経口投与した。投与は、6 m l のウィルスを、以下の方法で細かい霧を発生するようにした 10 - m l 注射器を用いて、咽頭に注入することによりなされた。針を取り付けるための突出した「台 (s e a t)」を、モデリング・クレイを用いて密封し、キャップを正しく閉めた。25 ゲージの針を用いて、注射器の底部、すなわち、「台 (s e a t)」の周囲に約 10 個の孔を開けた。注射器を歯間隙内に入れ、ウィルスを口の裏側に強制的に注入した。残り 4 頭の子馬を、非ワクチン接種対照動物とした。

20

## 【0099】

ワクチン接種された子馬の即時型アレルギー反応を、ワクチン接種直後約 30 分間及び約 4 時間後に観察し、さらに、これらの子馬の遅延型アレルギー反応をワクチン接種後 1 日目から 11 日目にわたって観察した。ともに例 3 に記載の方法で行った。この研究に用いたこれら 4 頭のワクチン接種された子馬のいずれも、ワクチン接種による異常な反応を示さなかった。

30

## 【0100】

例 3 に記載の方法で、ウィルスワクチン接種の 2 日前から接種後 11 日目まで毎日ほぼ同じ時刻に、これらの子馬の臨床症状を観察した。この研究でワクチン接種された 4 頭の子馬のいずれも、観察期間中にいかなる臨床症状も示さなかった。この結果、低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 が弱毒性表現型を発揮することが立証された。

40

## 【0101】

これらのワクチン接種動物のウィルス放散を検査するために、ワクチン接種後 0 日目から 11 日目にわたって、例 3 に記載の方法で、鼻咽頭スワブをこれらの子馬から採取した。例 3 に記載の方法で、この鼻咽頭サンプルのウィルスを、ふ化鶏卵中で検査した。

## 【0102】

表 6 に示すように、この鶏卵法では、ウィルスは 1 頭のワクチン接種動物のみから分離された。しかし、例 3 で述べたように、この方法でウィルスが分離されなかつことにより、ウィルスの複製の事実が否定されるわけではない。なぜなら、より感度の高い、例え

50

ば Directigen Flu A テストのような方法では、複製が検出されるかもしれないからである。

【0103】

【表6】

ワクチン接種後の卵内ウィルス分離

動物ID	経路	ウィルス分離(ワクチン接種後日数)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
91	経鼻	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
666	経鼻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
673	経鼻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
674	経口	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10

【0104】

これらのワクチン接種された動物中のウマインフルエンザウィルスに対する抗体価を測定するために、ワクチン接種前及びワクチン接種後7日目、14日目、21日目及び28日目に、これらの動物から血液を採取した。例3に記載の方法に基づき、血清サンプルを分離し、新鮮なEIV分離株に対する赤血球凝集阻害(HAI)価を測定した。

【0105】

これら4頭のワクチン接種された子馬のHAI価を表7に示す。

20

【0106】

【表7】

ワクチン接種後のHAI価

動物ID	経路	HAI価(ワクチン接種後日数)				
		0	7	14	21	28
91	経鼻	<10	<10	<10	<10	<10
666	経鼻	10	10	10	20	20
673	経鼻	10	10	10	20	20
674	経口	20	40	40	40	40

30

【0107】

例3に述べた研究で用いられた3頭の動物では、HAI価の増加が観察されたが、それとは異なり、この例の研究で用いられた動物では、EIV-P821ワクチン接種後、HAI価の著しい増加、すなわち、4倍を超える増加は観察されなかった。

【0108】

ワクチンウィルスの投与後およそ4ヶ月半目に、8頭全ての子馬、すなわち、ワクチン接種された4頭と非ワクチン接種対照動物である4頭とに、以下の処置を施した。1頭毎に、ビルレントウマインフルエンザウィルス株A / ウマ / ケンタッキー / 1 / 91 (H3N8)  $10^7$  pfuを水5mlに懸濁した。マスクをネブライザに接続し、このマスクを、これらの動物の鼻孔を含めた鼻鏡部に被せた。5mlを1頭毎に噴霧した。このとき、5ml全部を噴霧するのに5-10分かかるように調節した。処置の3日前及び処置後11日間の毎日、例3に記載した方法で臨床観察を行った。

40

【0109】

ワクチン接種されたこれらの動物のウマインフルエンザウィルスに対するHAI価に著しい増加が見られなかったという事実にもかかわらず、ワクチン接種された4頭の動物はすべて、ウマインフルエンザウィルスの攻撃から保護された。ワクチン接種された動物はいずれも顕性の臨床症状を示さなかった。ただし、そのうち1頭に微弱な喘鳴が2日間見られた。一方、ワクチン接種されたかった4頭はいずれもウィルスを放散し、ウマインフルエンザウィルス感染に特有の臨床症状及び発熱を示した。従って、この例は、本発明の治療用組成物が、ウマをウマインフルエンザ疾患から保護可能であることを実証している

50

。

## 【0110】

例 5

この例では、低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物の弱毒性と、ワクチン接種されたウマを、その後のビルレントウマインフルエンザウィルスの攻撃から保護する能力とを評価するためのさらなる動物研究を開示する。さらに、この研究では、運動ストレスがこの治療用組成物の安全性と有効性に及ぼす効果についても評価した。

## 【0111】

低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物の安全性と有効性とを、ウマを用いて次のように検査した。例 1 に記載の方法で作製した E I V - P 8 2 1 を、例 2 A に記載の方法で卵内で生育させ、例 2 C に記載した方法で、ウィルス  $10^7$  p f u / 水 5 ml を含有する治療用組成物を調製した。この研究では、15頭の子馬を使用した。これらの子馬を、表 8 に示すように、それぞれ 5 頭からなる 3 つのグループに無作為に分けた。そのうち 2 つのグループにはワクチンを接種し、1 つのグループは非接種対照グループとした。グループ 2 の子馬には、ワクチン接種前に運動ストレスを与えたが、接種グループ 1 の子馬は厩舎に留置した。

10

## 【112】

## 【表 8】

ワクチン接種／攻撃プロトコル				
グループ	子馬No.	運動	ワクチン	攻撃
1	5	-	0日目	90日目
2	5	4日前-0日目	0日目	90日目
3	5	-	-	90日目

20

## 【0113】

グループ 2 の子馬について、次の方法でトレッドミル運動ストレス試験を行った。これらの子馬に、トレッドミルを歩行のみで 6 時間使用させ、慣れさせた。実際の運動負荷ストレス試験では、ワクチン接種の 4 日前からワクチン接種当日（ワクチン接種直前）まで、毎日運動させた。トレッドミル運動の内容を表 9 に示す。

30

## 【114】

## 【表 9】

グループ2の子馬の運動内容		
速度(m/秒)	時間(秒)	傾斜(°)
1.5	2	0
3.5	2	- . 0
3.5	2	7
4.5+	2	7
5.5+	2	7
6.5+	2	7
7.5+	2	7
8.5+	2	7
3.5	2	7
1.5	10	0+

40

+ 各動物の1分当たりの心拍数が200以上に到達及び維持するまで、速度(m/秒)を2分毎に上げた。

## 【0115】

グループ 1 及びグループ 2 に、例 4 に述べた処置で用いた噴霧方法により、E I V - P 8 2 1 を  $10^7$  p f u 含有する治療用組成物を投与した。この研究でワクチン接種した子馬のいずれも、このワクチン接種による即時型または遅延型アレルギー反応を示さなかつ

50

た。

**【 0 1 1 6 】**

これらの子馬の、例 3 で述べた臨床症状を、ワクチン接種の 2 日前からワクチン接種後 11 日目までの毎日、ほぼ同じ時刻に観察した。この研究でワクチン接種した子馬のいずれも、観察期間中に顕性の臨床症状を示さなかった。

**【 0 1 1 7 】**

ワクチン接種した動物のウィルス放散を検査するために、ワクチン接種前及びワクチン接種後 1 日目から 11 日目にかけて、例 3 に記載した方法で、これらの子馬から鼻咽頭スワブを採取した。これらの鼻咽頭サンプルのウィルスを、ふ化鶏卵内で、例 3 に記載の方法に従って検査した。表 10 に示すように、ウィルスを、ワクチン接種した動物、すなわち、グループ 1 及び 2 から分離した。10

**【 1 1 8 】**

**【表 10】**

ワクチン接種後のウィルス分離

グループ	動物ID	運動	ウィルス分離(ワクチン接種後日数)											
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
1	12	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—
	16	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	17 なし	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—
	165	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	688	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—
2	7	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	435 あり	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	907	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
	968	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—

**【 0 1 1 9 】**

ワクチン接種されたこれらの動物のウマインフルエンザウィルスに対する抗体価を検査するために、ワクチン接種前及びワクチン接種後 7 日目、14 日目、21 日目及び 28 日目に血液を採取した。例 3 に記載の方法に従って、血清サンプルを分離し、最近の E I V 分離株に対する H A I 価を検査した。これらの価を表 11 に示す。30

**【 1 2 0 】**

**【表 11】**

## ワクチン接種後及び90日目の攻撃後のHAI値

グループ	動物ID	ワクチン接種後日数									
		-1	7	14	21	28	91	105	112	119	126
1	12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	320	320	640
1	16	<10	<10	20	20	<10	<10	20	160	320	320
1	17	<10	<10	10	10	10	10	80	160	160	160
1	165	<10	<10	10	10	10	10	80	80	80	80
1	688	<10	<10	20	20	20	20	20	20	20	40
2	7	<10	<10	10	10	<10	<10	20	80	80	40
2	44	<10	<10	20	20	20	10	80	320	320	320
2	435	<10	<10	20	20	10	<10	20	80	80	80
2	907	<10	<10	10	10	20	10	10	40	80	80
2	968	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160	160	160
3	2						<10	80	640	640	320
3	56						<10	80	320	320	320
3	196						<10	20	160	80	80
3	198						10	40	160	320	320
3	200						<10	20	80	80	40

グループ	種類
1	ワクチン接種のみ
2	ワクチン接種及び運動
3	対照

10

20

## 【0121】

接種後90日目に、15頭すべての子馬を、ネブライザを用いて、例4に記載の方法により $10^7$  p.f.uのウマインフルエンザウィルス株A／ウマ／ケンタッキー／1／91（H3N8）で攻撃した。例3に記載した臨床症状の観察を、すべての動物について、攻撃の3日前及び、攻撃後11日間の毎日行った。ワクチン接種した動物のいずれも、顕性の臨床症状を示さなかった。ワクチンを接種しなかった5頭のうち4頭は、ウマインフルエンザウィルス感染に特有の発熱及び臨床症状を示した。

## 【0122】

従って、この例は、本発明の治療用組成物は、ウマにワクチン投与前にストレスを与えた場合でも、これらのウマをウマインフルエンザウィルスから保護することを実証するものである。

30

## 【0123】

## 例6

この例では、本発明の治療用組成物の感染力を、卵内で生育させた場合と組織培養細胞中で生育させた場合とで比較した。製剤的見地からすると、本発明の治療用組成物を、ふ化鶏卵内で生育させるよりも、組織培養細胞中で生育させる方が有利である。ウマインフルエンザウィルスは、しかし、細胞内では、卵内ほど高力価にまで生育しない。加えて、このウィルスが感染力を得るために、ウィルスのヘマグルチニンに、トリプシンのようなタンパク分解酵素による細胞外タンパク分解開裂が必要である。血清にはトリプシン抑制物質が含まれるので、細胞培養で生育したウィルスに感染力を付与するためには、トリプシンを含む無血清培地で増殖させなければならない。このような条件が、組織培養細胞の生存力の点では決して最適ではないことは、当業者に周知である。さらに、これらの生育条件のために、ウマ細胞との結合性が変化したウィルスが選別されるかもしれないが、そのためにウィルスの感染力が影響を受けるかもしれない。なぜなら、ウィルスは、複製及び免疫刺激を行うためには、動物の鼻粘膜に効率的に結合する必要があるからである。従って、この例で開示した研究は、本発明の治療用組成物の感染力が、インヴィトロ組織培養における多数の継代にわたる生育により、逆に影響を受けるかどうかを評価することを目的とする。

40

## 【0124】

例1に記載の方法で作製したEIV-P821を、例2Aに記載の方法で卵内で生育さ

50

せるか、または、例 2 B に記載の方法で M D C K 細胞内で生育させる。どちらの場合も、ウイルスを 5 回継代培養した。各継代毎に、E I V - P 8 2 1 の低温適応性表現型及び温度感受性表現型を検査した。これらの卵及び細胞継代ウイルス調製物を、例 2 C で述べたように、ウイルス  $10^7$  p f u / B S A - M E M 液 2 m l を含む治療用組成物に製剤し、卵培養 E I V - P 8 2 1 治療用組成物と、M D C K 細胞培養 E I V - P 8 2 1 治療用組成物とをそれぞれ得た。

#### 【 0 1 2 5 】

8 頭の子馬をこの研究に使用した。それぞれの動物から採取した血清の、ウマインフルエンザウイルスに対する H A I 値を、この研究に先立って検査した。これらの動物を、それぞれ 4 頭からなる 2 つのグループに無作為に分けた。グループ A には、卵培養 E I V - P 8 2 1 治療用組成物を投与し、グループ B には、例 2 B の方法で調製した M D C K 培養 E I V - P 8 2 1 治療用組成物を投与した。これらの治療用組成物を、例 3 C に記載の方法で経鼻投与した。  
10

#### 【 0 1 2 6 】

これらの子馬の、例 3 に記載したアレルギー反応または臨床症状を、ワクチン接種の 2 日前からワクチン接種後 11 日目まで、毎日ほぼ同じ時刻に観察した。これらの動物のいずれも、アレルギー反応または顕性の臨床症状を示さなかった。

#### 【 0 1 2 7 】

ワクチン接種前及びワクチン接種後 11 日間の毎日、鼻咽頭スワブを採取した。鼻スワブ中のウイルス物質の存在を、例 1 に記載したように、M D C K 細胞の C P E を検出することにより、または、例 3 に記載したように、卵へ接種し、感染した A F が赤血球凝集を起こす能力を調べることにより、測定した。検査したのは、ウイルスの存在についてのみであり、サンプル中のウイルスの力価については検査しなかった。ウイルス分離の結果を表 1 2 に示す。血液を採取し、ワクチン接種後 0 日目、7 日目、14 日目、21 日目及び 28 日目の血清サンプルの、新鮮分離株に対する赤血球凝集阻害抗体価を検査した。H A I 値も表 1 2 に示す。  
20

#### 【 0 1 2 8 】

#### 【 表 1 2 】

ワクチン接種後の HAI 値及びウイルス分離

グループ <sup>2</sup>	ID	HAI 値 (DPV <sup>3</sup> )					ウイルス分離 <sup>1</sup> (DPV <sup>3</sup> )											
		0	7	14	21	28	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	31	<10	20	160	160	160	-	E C	-	C	E C	E C	C	C	E C	-	-	-
	37	<10	40	160	160	160	-	E C	C	C	E C	C	C	C	-	-	-	-
	40	<10	20	80	160	80	-	E C	E C	C	-	C	E C	C	-	E C	E C	-
	41	<10	40	160	160	80	-	E C	E C	C	E C	C	E C	E C	-	-	-	-
2	32	<10	<10	80	80	40	-	E C	-	C	-	C	-	C	-	E C	-	-
	34	<10	20	160	160	160	-	E C	-	C	E C	C	E C	C	-	-	-	-
	35	<10	<10	80	80	40	-	E C	-	C	-	C	-	C	-	E C	-	-
	42	<10	<10	80	80	40	-	-	-	C	-	C	E C	E C	-	-	-	-

<sup>1</sup>E = 卵分離陽性； C = CPE 分離陽性； - = いずれの方法でもウイルス検出せず

<sup>2</sup>グループ 1: MDCK 細胞内で 5 回継代培養したウイルス；

グループ 2: 卵内で 5 回継代培養したウイルス

<sup>3</sup>ワクチン接種後の日数

#### 【 0 1 2 9 】

表 1 2 の結果は、卵培養 E I V - P 8 2 1 治療用組成物と M D C K 培養 E I V - P 8 2 1 治療用組成物との間で、感染性も免疫抗原性も著しい差がなかったことを示している。

例 7

#### 【 0 1 3 0 】

この例では、ウマをウマインフルエンザウイルス感染から保護するために必要な、低温適応性ウマインフルエンザウイルスを含有する治療用組成物の最小量を評価した。  
40

30

40

50

## 【0131】

例3から例6で開示した動物研究により、本発明の治療用組成物が有効かつ安全であることが示された。これらの研究で用いられた投与量は $10^7$ pfuであり、これは約 $10^8$ TCID<sub>50</sub>単位に相当する。しかし、費用及び安全面から考えると、ウマインフルエンザウィルスに起因する疾患からウマを保護するであろう最小ウィルス力価を用いると有利である。この研究では、低温ウマインフルエンザウィルスを含有する治療用組成物の4種類の異なる量を子馬にワクチン接種し、ビルレントウマインフルエンザウィルスの攻撃からウマを保護する最小量を決定した。

## 【0132】

例1Aに記載の方法で作製したEIV-P821を、例2Bに記載の方法でMDCK細胞内で継代培養して生育させ、例2Cに記載したように、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$ または $2 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>単位/BSA-MEM溶液1mlの治療用組成物を製剤した。様々に異なる年齢及び血統の19頭のウマを使用した。これらのウマを、3頭のグループ1つと4頭のグループ3つからなる4つのワクチングループと、4頭からなる対照グループ1つとに分けた(表13参照)。ワクチングループの各子馬に、例3に記載したのと同様の方法で、指示された治療用組成物を1-m1量投与した。

## 【0133】

## 【表13】

ワクチン接種プロトコル

グループNo.	動物数	ワクチン投与量、 TCID <sub>50</sub> 単位
1	3	$2 \times 10^7$
2	4	$2 \times 10^6$
3	4	$2 \times 10^5$
4	4	$2 \times 10^4$
5	4	対照

10

20

30

## 【0134】

これらの子馬の即時型反応を、ワクチン接種直後約30分間及びワクチン接種後約4時間後に観察し、また、これらの動物の遅延型反応を、ワクチン接種後1日目から11日目にかけて観察した。ともに例3に記載の方法を用いた。この研究では、これらのワクチン接種した動物のいずれも、ワクチン接種による異常な反応や顕性の臨床症状を示さなかった。

## 【0135】

ワクチン接種の3日前、ワクチン接種後7日目、14日目、21日目、28日目、及びワクチン接種後35日目及び42日目の攻撃後に、血清分析用の血液を採集した。例3に記載の方法に従い、新鮮なEIV分離株に抗するHAI価について、血清サンプルを検査した。これらの価を表14に示す。29日目の攻撃の前に、グループ1の3頭のうち2頭、グループ2の4頭のうち4頭、グループ3の4頭のうち3頭及びグループ4の4頭のうち4頭のHAI価が、ワクチン接種後少なくとも4倍に増加した。加えて、4頭の対照ウマのうち2頭も、HAI価が増加した。この結果に対する説明の一つとして、対照ウマが、ワクチン接種されたウマのワクチンウィルスに感染したのかもしれない。なぜなら、この研究で用いたウマはすべて同じ厩舎で飼育されていたからである。

## 【0136】

## 【表14】

40

## ワクチン接種後及び攻撃後の HAI 値、及び攻撃結果

No.	投与量 TCID <sub>50</sub>	単位 $2 \times 10^7$	動物 ID	0 日目にワクチン接種、29 日目に攻撃							攻撃による罹患 +/-
				-1	7	14	21	28	35	42	
1	$2 \times 10^7$	41 42 200	41	<10	<10	10	40	10	20	80	-
			42	40	40	40	40	40	<10	80	-
			200	<10	<10	80	40	160	40	40	-
2	$2 \times 10^6$	679 682 795 R	679	<10	10	40	40	40	20	20	-
			682	<10	<10	40	40	40	40	40	-
			795	20	80	160	160	320	320	640	-
			R	<10	10	40	20	160	40	40	-
3	$2 \times 10^5$	73 712 720 796	73	<10	<10	160	40	80	160	160	-
			712	<10	<10	20	20	40	40	20	-
			720	<10	20	80	40	80	80	160	-
			796	<10	<10	<10	<10	<10	10	80	+
4	$2 \times 10^4$	75 724 789 790	75	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	+
			724	<10	>10	<10	<10	<10	20	320	+
			789	<10	10	320	160	320	320	320	-
			790	<10	<10	80	40	160	80	40	-
5	対照	12 22 71 74	12	<10	<10	<10	20	20	40	40	-
			22	10	20	40	10	160	40	640	-
			71	<10	<10	<10	<10	10	20	160	+
			74	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	+

## 【 0 1 3 7 】

ワクチン接種後 29 日目に、19 頭の子馬すべてを、例 4 に記載のネブライザ法を用いて、ウマインフルエンザウィルス株 A / ウマ / ケンタッキー / 1 / 91 ( H 3 N 8 ) で攻撃した。攻撃の投与量を見込み計算し、1 頭当たり、容量 5 ml に約  $10^8$  TCID<sub>50</sub> 単位の攻撃ウィルスが含まれるようにした。攻撃の 2 日前、攻撃当日及び攻撃後 11 日間、例 3 に記載された臨床観察を行った。表 14 に示されるように、グループ 1 及び 2 のいずれの動物も、ウマインフルエンザ疾患の臨床症状を示さず、また、グループ 3 の 4 頭のうち 1 頭だけが罹患した。グループ 4 の 4 頭のうち 2 頭が罹患し、また、4 頭の対照動物のうち 2 頭だけが罹患した。表 14 の結果は、血清変換と疾患からの保護との関連性を示唆している。なぜなら、例えば、ワクチン接種期間中に H A I 値が増加した 2 頭の対照動物は、攻撃後はウマインフルエンザ疾患の臨床症状を示さなかったからである。しかし、別の解釈として、攻撃ウィルスの実際の力価が、計算した量  $10^8$  TCID<sub>50</sub> 単位よりも少なかったのかもしれない。なぜなら、前出の結果に基づけば、このレベルの攻撃は、全ての対照動物を罹患させたはずだからである。

## 【 0 1 3 8 】

それでもなお、低温適応性ウマインフルエンザウィルスを少なくとも  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> 50

I D<sub>50</sub> 単位含む治療用組成物を投与されたグループにおける血清変換のレベル及び臨床症状の欠如は、この量が、ウマインフルエンザ疾患からウマを保護するのに十分な量であったことを示唆している。さらに、 $2 \times 10^5$  T C I D<sub>50</sub> 単位の投与で血清変換が誘発され、4頭のうち3頭が攻撃から臨床的に保護されたことから、この量でも、ウマをウマインフルエンザウィルスから効果的に保護するのには十分であるかも知れない。

#### 【0139】

##### 例 8

この例では、低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物の免疫性の持続時間を評価するための動物研究について開示する。

#### 【0140】

例 1 に記載の方法で作製した低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物を、例 2 A に記載した方法と同様に卵内で生育させ、例 2 B に記載した方法と同様に M D C K 細胞内で継代培養により展開し、例 2 C に記載した方法と同様に治療用組成物に製剤した。生後およそ 11 ヶ月から 12 ヶ月の 30 頭のウマをこの研究に使用した。これらのうち 19 頭のそれぞれに、E I V - P 8 2 1 治療用組成物 T C I D<sub>50</sub> 単位を 610 g 含む投与量 1.0 ml をのワクチンを、端部に送出装置の先端を取り付けた注射器を使用して、片方の鼻孔に経鼻接種した。ワクチン接種を 0 日目に行った。

#### 【0141】

これらのウマを、0 日目（ワクチン接種前及びワクチン接種後 4 時間以内）及び、ワクチン接種後の研究日 1 日目、2 日目、3 日目、7 日目、15 日目及び 169 日目に観察した。これらの日に、少なくとも 15 分間の遠隔検査を行った。この遠隔検査には、様子、行動、咳、くしゃみ及び鼻汁の観察が含まれた。169 日目の検査でも、これらのウマは、ワクチン接種場所から約 360 マイル離れた攻撃場所までの輸送に適する健康状態であったことが確認された。

#### 【0142】

これらの動物は攻撃場所に慣らされ、ほぼ毎日、獣医師または動物専門技術者により疾患の徴候を観察された。ワクチン接種後 171 日目に、次の項目について、一般的な身体検査を行った：様子、行動、咳、くしゃみ及び鼻汁。172 日目から 177 日目までは、これらのウマそれぞれの異常な臨床症状を観察する担当獣医の判断に基づき、同様の検査に加えて、直腸温を記録した。

#### 【0143】

ワクチン接種したウマのいずれも、ワクチン接種後に有害反応を示さなかった。そのうち 1 頭は、ワクチン接種の約 2 ヶ月後に死亡した。このウマは、ワクチン接種後少なくとも 1 ヶ月間の観察時には、有害反応の徴候を全く示さなかった。死因を確定することはできないとしても、死亡は突然的なものではなく、疝痛、骨折または重症の寄生虫性の負担などの要因と関連があるのではないかと考えられた。他のワクチン接種したウマには、ワクチン接種後に有害反応は見られなかつたので、この場合、ワクチンが何らかの有害反応の原因となったとは考えにくい。

#### 【0144】

ワクチン接種後 181 日目に攻撃を行った。ウマの疾患を引き起こすことが予め確認されている、次のウマインフルエンザウィルスの野生型分離株：A / ウマ / 2 / ケンタッキー / 91 を、攻撃ウィルスとして使用した。各攻撃グループの感染の前に、攻撃材料を約 37 度で急速解凍した。ウィルスをリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、総量約 21 ml とした。この希釈した材料を、接種の直前まで氷冷保存した。各攻撃グループの接種前及び噴霧終了時に、希釈した攻撃ウィルスのサンプルを採集して、接種前及び接種後のウィルス力値を確認した。ワクチン接種ウマと対照ウマとを、それぞれ 6 頭からなる 4 つの攻撃グループと、5 頭からなる 1 つの攻撃グループとに無作為に分け、各攻撃グループが、4 頭のワクチン接種ウマと 2 頭の対照ウマ、または 3 頭のワクチン接種ウマと 2 頭の対照ウマの組み合わせから構成されるようにした。

10

20

30

40

50

## 【0145】

エアロゾル状態の攻撃ウィルスを、超音波ネプライザ（例えばデビルビス・モデル099HD、ペンシルベニア州サマセット、デビルビス・ヘルスケア社）を用いて、プラスチックのシーリングの中央に開けた小さな孔から挿入した管を介して、約10分間投与した。噴霧終了後さらに約30分間、これらのウマをチャンバ内に留置した（曝露時間合計約40分間）。この時点でプラスチックを取り除いてチャンバを換気し、これらのウマを解放してそれぞれの厩舎に戻した。この攻撃工程を各グループについて繰り返した。

## 【0146】

この研究における統計手法には、すべてSAS（ノースカロライナ州ケアリー、SASインスティテュート社）を使用し、 $P < 0.05$ を統計上有意であるとした。ワクチン接種後178日目（攻撃3日前）から191日目（攻撃後10日目）まで、これらのウマを遠隔検査及び個体検査の双方により、毎日観察した。この時、直腸温を測定した。0日目（攻撃当日）から攻撃後10日目までのデータを分析に使用し、表15に示す。  
10

## 【0147】

## 【表15】

ワクチン接種ウマ及び対照ウマの日別温度（°C）に対する攻撃の作用（最小自乗法）

攻撃後の日数	ワクチン接種	ワクチン非接種	P値	20
	(n=19)	(n=10)		
0	100.7	100.8	0.8434	
1	100.5	100.4	0.7934	
2	103.4	104.9	0.0024	
3	101.8	103.9	0.0001	
4	101.5	103.2	0.0002	
5	101.7	103.8	0.0001	30
6	101.3	103.6	0.0001	
7	100.7	102.3	0.0007	
8	100.5	101.4	0.0379	
9	100.1	100.3	0.7416	
10	100.3	100.5	0.7416	40
ブーリングされた	0.27	0.38		
SEM*				

\*標準誤差

## 【0148】

表15は、攻撃後2日目から8日目まで、ワクチン接種ウマの温度が、ワクチン非接種対照ウマの温度よりも低い（ $P < 0.05$ ）ことを示している。

## 【0149】

遠隔検査の時間は20分間であり、その中で次の観察を行った：咳、鼻汁、呼吸及び抑うつ。採点基準を表16に示す。

## 【0150】

【表16】

## 臨床症状及び採点指標

臨床症状	記載	スコア
せき	15分間の観察中、正常	0
	観察中、咳1回	1
	観察中、咳2回以上	2
鼻汁	正常	0
	異常、漿液性	1
	異常、粘液膿性	2
	異常、大量	3
呼吸	正常	0
	異常（呼吸困難、呼吸促迫）	1
抑うつ	正常	0
	抑うつあり+	1

10

20

\*抑うつは、以下を含む各動物の行動を主観的に評価した：食物に迅速に近付かない、全身性の無気力、欲望欠如、食欲不振。

## 【0151】

それぞれのウマを、これらの各カテゴリーについて採点した。加えて、頸下リンパ節を触診し、細菌感染の有無を調べた。同じ日に行われた観察で、遠隔検査の主観臨床症状スコアと個別検査の主観臨床症状スコアとが異なる場合は、結果の整理分析の際に、大きい方のスコアを用いた。最終処理の前にこれらのウマの健康状態を評価する目的で、攻撃後14日目、18日目及び21日目に遠隔検査を行った。この分析には、攻撃後1日目から10日目までのデータも使用した。これらのスコアを1頭毎に日別に合計し、ウィルコクソン順位合計検定により、ワクチン接種ウマと対照ウマとを比較した。さらに、1頭毎に全ての日のスコアを合計し、同じ方法で比較した。平均順位及び平均臨床スコアを、表17及び表18にそれぞれ示す。接種後5日目では、ワクチン接種ウマのスコアの平均順位は、ワクチン非接種対照ウマのスコアの平均順位よりも低かった（ $P < 0.05$ ）。そして、この結果は、6日目、7日目、8日目、9日目及び10日目でも同様であった（ $P < 0.05$ ）。検査期間全体の累積順位についても、ワクチン接種ウマの方がワクチン非接種対照ウマよりも低かった（ $P < 0.05$ ）。

30

## 【0152】

【表17】

40

## ワクチン接種ウマ及び対照ウマの臨床症状スコアへの攻撃の作用（平均順位）

攻撃後の日数	ワクチン接種(n=19) 平均順位*	ワクチン非接種(n=10) 平均順位	P値
0	13.6	17.6	0.1853
1	16.4	12.4	
2	15.1	14.9	
3	13.3	18.3	
4	13.5	17.9	
5	12.4	19.9	
6	12.7	19.4	
7	12.1	20.6	
8	12.6	19.6	
9	13.1	18.7	
10	12.3	20.1	0.0135
11 日間 の合計	11.8	21.2	0.0051

\* ウィルコクソン順位合計検定による。

【0153】

【表18】

## ワクチン接種ウマ及び対照ウマの臨床症状スコアへの攻撃の作用（平均スコア）

攻撃後の日数	ワクチン接種(n=19)	ワクチン非接種(n=10)	
0	1.2	1.6	30
1	1.5	0.9	
2	2.4	2.5	
3	3.2	4.1	
4	3.4	4.3	
5	3.2	4.7	
6	3.4	4.8	
7	3.3	4.7	
8	3.2	4.5	
9	3.2	3.9	
10	2.4	3.4	40

【0154】

鼻咽頭スワブを、例3で述べたように、攻撃前日及び攻撃後1日目から8日目にかけて採取し、放散されたウィルスを細胞培養アッセイにより検査した。攻撃ウィルスを放散していたウマの各グループのパーセンテージを、表19に示す。攻撃ウィルスを放散していたウマのワクチン接種グループでのパーセントは、攻撃後5日目及び6日目では、非ワクチン接種対照グループでのパーセントよりも低かった( $P < 0.05$ )。攻撃ウィルスが放散された平均日数も、ワクチン接種グループは、非ワクチン接種対照グループよりも低かった( $P < 0.05$ )。

【0155】

【表19】

攻撃後1日当たりのウイルス放散ウマのパーセント、及びグループ当たりの平均放散日数

攻撃後の日数	ワクチン接種 (n=19)	ワクチン非接種 (n=10)	
-1	0	0	
1	63.2	90	
2	100	100	10
3	84.2	100	
4	100	100	
5	47.4	88.9*	
6	10.5	77.8*	
7	5.3	20	
8	0	0	
平均放散日数	4.1	5.6*	20

\*ある期間、ワクチン接種グループと非ワクチン接種グループとの差は、  
フィッシャーの正確検定（パーセントデータ）でもウイルコクソン順位合計検定  
(放散日) でも P<0.05 であった。

【0156】

ワクチン接種グループのインフルエンザに関する臨床徴候スコア及び客観的温度測定のスコアは共に、対照グループと比較して低く、その差は統計的に有意であった；このことは、このワクチンが疾患からの著しい保護効果を有することを説明するものである。

【0157】

攻撃後にウマがインフルエンザウイルスを放散する能力についても、攻撃後の複数日の放散陽性のウマの出現率と、1頭当たりの放散日数とが、共に、ワクチン接種グループの方が対照グループよりも著しく少なかった。ワクチン接種グループによる放散が少ないというこの事実は、重要な意味を持つ。なぜなら、このことが、インフルエンザ流行時に、感受性の動物が野生型ウイルスに曝露される潜在的な可能性を減少させるのに役立つと予想されるからである。

【0158】

この研究の結果は、このワクチンが、ウマインフルエンザに起因する臨床疾患を6ヶ月間安全に防止し、天然に発生するビルレントウマインフルエンザウイルスの放散の可能性を減少させたということを説明するものである。疾患からの保護の程度は完全ではないが（ワクチン接種された19頭のうち13頭が保護されたのに対し、10頭の対照ウマのうち10頭が罹患した）、臨床疾患の重度及び期間は明らかに軽減され、また、ウマインフルエンザのビルレント株への曝露後にウイルスが放散する潜在的な可能性に大きな影響を与えた。ワクチン接種ウマと対照ウマとが、免疫接種後6ヶ月目の攻撃の直前に、双方とも血清陰性であったという結果は、血清抗体以外の何かにより伝達される免疫力が、このワクチンの測定可能なかつ恒久性の保護能力を最も大きく左右するのかもしれないということを示唆している。

【0159】

例9

この例では、低温適応性ウマインフルエンザウイルスEIV-P821を含有する治療

30

40

50

用組成物の、ウマインフルエンザウィルスの異種株への曝露後の疾患を予防する能力を評価するための動物研究を開示する。

【 0 1 6 0 】

検査に使用した異種株は、遺伝学的にはユーラシア系統株（サスカチエワン大学、ヒューゴ・タウンセンドより入手）として述べられる A / ウマ / 2 / サスカトゥーン / 90 であった。20頭の約15月齢（ワクチン接種時）のペルシュロン種の雌ウマを、有効性研究に使用した。これらのウマを、10頭からなるワクチン接種グループと、10頭からなるワクチン非接種対照グループとの2グループに分けた。0日目に、例8に述べた方法でワクチン接種グループにワクチンを接種した。

【 0 1 6 1 】

攻撃材料、すなわちウマインフルエンザ株 A / ウマ / 2 / サスカトゥーン / 90 [ H 3 N 8 ] を、例8で述べた製法と同様の方法で調製した。ワクチン接種ウマと対照ウマとを、それぞれ5頭からなる4つの攻撃グループに無作為に分け、各攻撃グループが2頭のワクチン接種ウマと3頭の対照ウマ、または3頭のワクチン接種ウマと2頭の対照ウマから構成されるようにした。攻撃の工程は、例8で述べた工程と同様であった。ワクチン接種後28日目に攻撃を行った。

10

【 0 1 6 2 】

ワクチン接種ウマと対照ウマとの臨床観察を、ワクチン接種4日前と、研究日0日目（ワクチン接種前からワクチン接種後4時間まで）、1日目から7日目、12日目、15日目から17日目まで、19日目から23日目、25日目から38日目、及び42日目に行つた。ワクチン接種4日前からワクチン接種後42日目までの間の臨床観察日に、1頭毎に、異常な臨床症状を観察する担当獣医の判断に基づき、直腸温を含めた臨床観察を記録した。例8（表15）で使用したのと同じ基準を用いて、ウマのスコアをつけた。これらの日に、例8で述べた遠隔検査を行つた。20日目及び25日目から38日目にかけては、これらのウマを遠隔検査と個別検査の両方により（例8で述べたのと同じ方法で）観察した。

20

【 0 1 6 3 】

直腸温を、攻撃の3日前から攻撃後10日目まで毎日測定した。攻撃0日目は攻撃の当日である。攻撃後0日目から10日目までのデータを分析に使用した。例8で使用したのと同じ統計的手法と基準とを用いた。攻撃後2日目、5日目及び7日目には、ワクチン接種されたウマは、非ワクチン接種対照ウマよりも統計上有意的に低い体温を示した（表20）。

30

【 0 1 6 4 】

【表20】

ワクチン接種ウマ及び対照ウマの日別温度 (°C) に対する  
攻撃の作用 (最小自乗法)

攻撃後の日数	ワクチン接種	ワクチン非接種	P 値
	(n=10)	(n=10)	
0	99.9	99.8	0.9098
1	100.5	100.3	0.4282
2	101.0	102.8	0.0001
3	100.7	100.6	0.7554
4	101.0	101.3	0.4119
5	100.8	102.1	0.0004
6	100.4	100.4	0.9774
7	100.3	101.1	0.0325
8	100.6	100.7	0.8651
9	100.5	100.6	0.8874
10	100.5	100.1	0.2465

標準平均誤差=0.249

10

20

【 0 1 6 5 】

攻撃後 1 日目から 10 日目までのデータを、分析に使用した。これらのスコアを 1 頭毎に日別に合計し、ウィルコクソン順位合計検定により、ワクチン接種ウマと対照ウマとを比較した。統計的手法はすべて例 9 で述べたのと同じ手法を用いた。さらに、1 頭毎に全ての日のスコアを合計し、同じ方法で比較した。平均順位を表 2-1 に示す。

【 0 1 6 6 】

【 表 2-1 】

ワクチン接種ウマ及び対照ウマの臨床症状スコアへの攻撃の作用 (平均順位)

30

攻撃後の日数	ワクチン接種	ワクチン非接種	P 値*
	(n=10)	(n=10)	
1	8.85	12.15	0.1741
2	8.80	12.20	0.1932
3	8.90	12.10	0.2027
4	7.60	13.40	0.0225
5	6.90	14.10	0.0053
6	7.00	14.00	0.0059
7	6.90	14.10	0.0053
8	7.60	13.40	0.0251
9	6.90	14.10	0.0048
10	6.10	14.90	0.0006
10 日間全体	5.70	15.30	0.0003

40

\* ウィルコクソン二標本検定による

【 0 1 6 7 】

50

接種後4日目では、ワクチン接種ウマのスコアの平均順位は、ワクチン非接種対照ウマのスコアの平均順位よりも低かった( $P < 0.05$ )。そして、この結果は、この研究の期間全体を通して同じであった( $P < 0.05$ )。検査期間全体の累積順位についても、ワクチン接種ウマの方がワクチン非接種対照ウマよりも低かった( $P < 0.05$ )。

## 【0168】

鼻咽頭スワブを、例3で述べた方法で、攻撃後1日目から8日目にかけて採取した。鼻サンプルを、ウィルスの存在について分析した。分析は、細胞に接種して、細胞変性効果(CPE)によりウィルスを検出するか、または、卵に接種して、赤血球凝集(HA)によりウィルスを検出して行った。細胞培養アッセイを、Youngner et al., 1994, J. Clin. Microbiol. 32, 750-754に概説されている方法で行った。連続的に希釈した鼻サンプルを、マディン・ダービー・イヌ腎臓(MDCK)単層を含むウェルに加えた。インキュベート後、細胞変性効果の存在及び程度について、ウェルを検査した。ウィルスのTCID<sup>50</sup>単位量を、リード・ミュエンチ法により算出した。例1に述べた方法で、卵感染性アッセイを行った。各グループで攻撃ウィルスを放散していたウマのパーセンテージを、アッセイ別に表22及び表23に示す。ワクチン接種グループでは、攻撃後2日目から7日目までの間に攻撃ウィルスを放散していたウマのパーセントは、どちらの方法でも比較的低かった( $P < 0.05$ )。攻撃後1日目または8日目は、差異が見られなかった。また、攻撃ウィルス放散日数も、ワクチン接種グループの方が、非ワクチン接種対照グループよりも低かった( $P < 0.05$ )；表22及び表23を参照のこと。

## 【0169】

## 【表22】

攻撃後ウィルスを放散していたウマのパーセント—細胞培養アッセイ

攻撃後の日数	ワクチン接種(n=10)	ワクチン非接種(n=10)
1	0	0
2	0	70*
3	0	70*
4	20	100*
5	10	100*
6	20	100*
7	0	80*
8	0	30
平均放散日数	0.5	5.5*

\*ある期間、ワクチン接種グループと非ワクチン接種グループとの差は、フィッシャーの正確検定(パーセントデータ)でもウィルコクソン二標本検定(放散日)でも $P < 0.05$ であった。

## 【0170】

## 【表23】

10

20

30

40

## 攻撃後ウィルスを放散していたウマのパーセント一卵感染性アッセイ

攻撃後の日数	ワクチン接種(n=10)	ワクチン非接種(n=10)
1	0	0
2	0	70*
3	10	70*
4	0	90*
5	10	70*
6	20	90*
7	0	50*
8	0	0
平均放散日数	0.4	4.4*

\*ある期間、ワクチン接種グループと非ワクチン接種グループとの差は、フイッシャーの正確検定（パーセントデータ）でもウイルコクソン二標本検定（放散日）でも P<0.05 であった。

## 【0171】

ワクチン接種グループのインフルエンザ臨床徴候の程度（重度及び期間）は、対照グループと比較して概ね軽かった。インフルエンザに関する臨床徴候のスコア及び客観的温度測定結果は、共に、ワクチン接種グループの方が対照グループよりも統計的有意に低かった。このことは、このワクチンに、異種株による疾患からの著しい保護効果があることを示す。

## 【0172】

攻撃後にウマがインフルエンザウィルスを放散する能力についても、攻撃後の複数日の放散陽性のウマの出現率と、1頭当たりの放散日数とが、共に、ワクチン接種グループの方が対照グループよりも著しく低かった。ワクチン接種グループによる放散が少ないというこの事実は重要な意味をもつ。なぜなら、このことが、インフルエンザ流行時に、感受性の動物が野生型ウィルスに曝露される可能性を減少させるのに役立つであろうからである。

## 【0173】

総合すると、この研究の結果は、このワクチンが、ユーラシア系ウマインフルエンザウィルス株の一種による異種攻撃に対する保護効果を発揮したことを示した。

## 【0174】

例10

この例では、低温適応性ウマインフルエンザウィルス E I V - P 8 2 1 を含有する治療用組成物の、ウマインフルエンザウィルスの異種株への曝露後の疾患を予防する能力を評価するための動物研究について開示する。

## 【0175】

検査した異種株は、A / ウマ / ケンタッキー / 1 / 9 1 ( H 3 N 8 ) (ケンタッキー大学、トム・チャンバーズより入手) であった。生後5ヶ月から7ヶ月の8頭の子馬を、この有効性研究に使用した。これらのウマを、ワクチン接種する4頭と、非ワクチン接種対照の4頭の2グループに分けた。例8に述べた方法で、0日目に子馬にワクチンを接種した。

## 【0176】

研究日0日目（ワクチン接種前及びワクチン接種の4時間後）及び接種後1日目から8日目まで、23日目、30日目から50日目まで、及び57日目に、ワクチン接種グループの臨床観察を行った。対照グループの臨床観察を、接種後29日目から50日目まで、

10

20

30

40

50

及び 57 日目に行った。例 8 に述べた方法で、観察及び採点を行った。

**【0177】**

攻撃材料、すなわち、ケンタッキー / 98 からのウマインフルエンザ株を、この分離ウイルスを卵内で 2 回継代培養して作製した。このウィルス 0.5 ml を解凍し、次に滅菌リン酸緩衝生理食塩水 4.5 ml に希釈して、それぞれのウマへの接種材料を調製した。この接種材料を、ワクチン接種後 36 日目に、マスクを使用した噴霧により、それぞれのウマに投与した。

**【0178】**

臨床観察スコアを、日別に 1 頭毎に合計し、攻撃後 1 日目から 9 日目の累積合計スコアに基づき、ウマを順位付けした。これらの結果を表 24 に示す。

10

**【0179】**

**【表 24】**

臨床徴候観察： 合計スコアを順位付けした

グループ	ホルター (Halter) ID	合計スコア#
		攻撃後 1 日目 - 9 日目
1 - ワクチン接種	50	0
1 - ワクチン接種	52	0
1 - ワクチン接種	55	1
1 - ワクチン接種	15	2
2 - 対照	61	21
2 - 対照	20	25
2 - 対照	7	26
2 - 対照	13	26

\*合計スコアは日別スコアの合計を表し（日別スコアは、咳、鼻汁、呼吸及び抑うつのスコアの合計に等しい）、最小スコア（最も軽度）から最大スコア（最も重度）までに順位付けした。

20

**【0180】**

表 24 の結果は、ワクチン接種グループのスコアが 0 から 2 の間であり、対照グループのスコア 21 から 26 までと比較して著しく低かったことを示している。

**【0181】**

攻撃の 6 日前から攻撃後 9 日目まで、直腸温を毎日測定した。0 日目は攻撃の当日である。攻撃後 0 日目から 9 日目までのデータを分析に使用した。これらの結果を表 25 に示す。

**【0182】**

**【表 25】**

30

40

## ワクチン接種グループ及び対照グループの日別平均温度(°C)への攻撃の作用

攻撃後の日数	対照	ワクチン接種	差	
0	99.7	99.5	0.2	10
1	100.0	99.6	0.4	
2	103.9	100.2	3.7	
3	99.8	99.2	0.6	
4	99.6	99.1	0.5	
5	99.8	99.3	0.5	
6	99.6	99.3	0.3	
7	99.3	99.0	0.3	
8	99.7	99.6	0.1	
9	99.5	99.1	0.4	20

## 【0183】

全ての日で、対照ウマの温度は、ワクチン接種ウマの温度よりも高かった。対照ウマの温度は、2日目に顕著に高かった。

## 【0184】

例3に述べた方法で、攻撃後1日目及び8日目に鼻咽頭スワブを採集した。例1に述べた卵感染性アッセイにより、これらのサンプルの放散ウィルスを検査した。このアッセイの結果を表26に示す。

## 【0185】

## 【表26】

30

## 卵感染性により検出した攻撃後のウィルス放散

研究日	35	37	38	39	40	41	42	43	44		
攻撃後の日数	-1	1	2	3	4	5	6	7	8		
グループ	ID No..	ウィルス検出*								1頭当たり陽性日数	
ワクチン接種	15	0	2	0	3	3	0	2	1	0	5
	50	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	52	0	0	3	3	2	2	0	0	0	4
	55	0	2	3	1	3	0	0	0	0	4
陽性ウマ数／日	0	2	2	3	3	2	1	1	0		
対照	07	0	3	3	3	3	3	1	0	7	
	13	0	3	3	3	3	3	3	1	0	7
	20	0	2	3	3	3	3	3	1	0	7
	61	0	3	3	3	3	3	2	0	7	
陽性ウマ数／日	0	4	4	4	4	4	4	4	0		

\*値は、1サンプル当たりの検査卵3個のうち、陽性を示した卵の数に相当する。

統計分析上、1サンプル当たり少なくとも1個の卵が陽性の場合、そのサンプルはウィルス陽性であるとした。

## 【0186】

表26の結果は、1日当たりの陽性ウマの数が、対照グループの方がワクチン接種グループよりも高かったことを示している。さらに、対照ウマはワクチン接種ウマよりも陽性を示した日数が多くかった。

## 【0187】

インフルエンザに関連する臨床徴候のスコア及び客観的温度測定結果は、共に、ワクチン接種グループと対照グループとの間に著しい相違を示した；このことは、このワクチンが、異種株ケンタッキー/98に起因する疾患からの高い保護効果を有することを示している。

## 【0188】

ウマが攻撃後にインフルエンザウィルスを放散する能力についても、ワクチン接種グループの1頭当たりの平均放散日数は、対照グループと比較して著しく低かった。ワクチン接種グループによる放散が少ないというこの事実は重要な意味をもつ。なぜなら、このことが、インフルエンザ流行時に、感受性の動物が野生型ウィルスに曝露される可能性を減少させるのに役立つと予想されるからである。

## 【0189】

総合すると、この研究の結果は、このワクチンが、新鮮な及び臨床的に近似した分離株による異種攻撃に対する安全な保護効果を有することを示している。この研究結果を、ユーラシア系統株による異種攻撃に対して発揮した保護効果（例9）に照らして見ると、この調製生ワクチンが、同種ウマインフルエンザ感染だけではなく異種ウマインフルエンザ感染に対しても保護効果を有することは明らかである。

## 【0190】

例11

10

20

30

40

50

この例では、野生型及び低温適応性ウマインフルエンザウィルスの、ウマインフルエンザM（基質）タンパク質核酸分子のクローニング及び配列決定について説明する。

#### 【0191】

A. 野生型または低温適応性ウマインフルエンザウィルスMタンパク質をコードする核酸分子を、次の方法で作製した。ウマインフルエンザウィルスDNA及び、それぞれSEQ ID NO: 26及びSEQ ID NO: 27のプライマw 584及びw 585から、PCR增幅により、ウマインフルエンザM遺伝子を含有するPCR産物を作製した。*nei<sub>wt</sub>M<sub>1023</sub>*として表され、核酸配列SEQ ID NO: 1のコドン鎖を有する、ヌクレオチド1023個からなる核酸分子を、さらなるPCR增幅により、上述のPCR産物を鋳型として作製し、カリフォルニア州カールズバッド、インヴィトロゲン社より入手可能なPCR 2.1（登録商標）TAクローニングベクターに、製造者が保証する標準的な方法でクローニングした。使用したプライマは、SEQ ID NO: 29のT7プライマ及びSEQ ID NO: 28のREVプライマであった。プラスミドDNAを、カリフォルニア州バレンシア、キアゲン社より入手可能なミニプレップ法で精製した。シークエンシング用のPCR産物を、それぞれカリフォルニア州フォスター・シティ、ピーイー・アプライド・バイオシステムズ社より入手可能な、PRIISM™ダイ・ターミネータ・サイクル・シークエンシング・レディ・リアクション・キット、PRIISM™dRhodamin・ターミネータ・サイクル・シークエンシング・レディ・リアクション・キット、またはPRIISM™BigDye™ターミネータ・サイクル・シークエンシング・レディ・リアクション・キットを用いて、製造者のプロトコルに従って作製した。キットで使用したPCR条件は、95℃で10秒間加熱、50℃で5秒間加熱、60℃で4分間加熱、このサイクルを25回繰り返した。異なる反応では、異なるプライマの組み合わせを用いた：第1の反応ではT7とREV、第2の反応ではw 584とw 585、第3の反応ではSEQ ID NO: 31のefM-a1及びSEQ ID NO: 30のefM-s1を使用した。PCR産物を、エタノール/塩化マグネシウム沈降法により精製した。ピーイー・アプライド・バイオシステムズ社より入手可能なABI Prism™モデル377、XLアップグレードDNAシークエンサを使用して、DNAサンプルの自動配列決定を行った。

#### 【0192】

SEQ ID NO: 1を翻訳すると、核酸分子*nei<sub>wt</sub>M<sub>1023</sub>*が、ここではPei<sub>wt</sub>M<sub>252</sub>と言及されるアミノ酸約252個からなる全長ウマインフルエンザMタンパク質をコードすることが判明し、このタンパク質のアミノ酸配列はSEQ ID NO: 2で表されるが、ただしこのとき、開いた読み枠の開始コドンがSEQ ID NO: 1のヌクレオチド25からヌクレオチド28にあり、終了コドンがSEQ ID NO: 1のヌクレオチド781からヌクレオチド783にあることを想定している。Pei<sub>wt</sub>M<sub>252</sub>をコードする領域は、*nei<sub>wt</sub>M<sub>756</sub>*で表されるが、この領域は、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド25から780までにあるコドン鎖を有し、SEQ ID NO: 3で表される。

#### 【0193】

SEQ ID NO: 1及びSEQ ID NO: 3は、2つの野生型核酸分子から得たコンセンサス配列を表し、これらの野生型核酸分子とはヌクレオチドが1つ異なる。*nei<sub>wt1</sub>M<sub>1023</sub>*のヌクレオチド663、すなわち、*nei<sub>wt1</sub>M<sub>756</sub>*のヌクレオチド649は、アデニンであるが、*nei<sub>wt2</sub>M<sub>1023</sub>*のヌクレオチド663、すなわち、*nei<sub>wt2</sub>M<sub>756</sub>*のヌクレオチド649は、グアニンであった。これらの配列を翻訳しても、対応するアミノ酸は変化せず、双方ともPei<sub>wt</sub>M<sub>252</sub>の残基221のバリンに翻訳する。

#### 【0194】

B. 低温適応性ウマインフルエンザウィルスMをコードする1023個のヌクレオチドからなる核酸分子は、*nei<sub>ca1</sub>M<sub>1023</sub>*で表され、SEQ ID NO: 4で表されるコドン鎖を有するが、この核酸分子をさらなるPCR增幅により作製し、インヴィト

ロゲン社より入手可能なp C R (登録商標) - B l u n t クローニングベクターに、製造者が保証する標準的な方法でクローニングした。このとき使用したプライマはT 7 及びR E Vであった。例11Aに記載した方法で、プラスミドD N A 精製及びサイクルシークエンスを行った。S E Q I D N O : 4 を翻訳すると、核酸分子n e i c a 1 M 1 0 2 3 が、ここではP e i c a 1 M 2 5 2 と言及されるアミノ酸約252個からなる全長ウマインフルエンザMタンパク質をコードすることが判明し、このタンパク質のアミノ酸配列はS E Q I D N O : 5 で表されるが、ただしこのとき、開放読み取り枠の開始コドンがS E Q I D N O : 4 のヌクレオチド25からヌクレオチド28にあり、終了コドンがS E Q I D N O : 4 のヌクレオチド781からヌクレオチド783にあることを想定している。P e i c a 1 M 2 5 2 をコードする領域は、n e i c a 1 M 7 5 6 を指定するが、この領域は、S E Q I D N O : 4 のヌクレオチド25から780までにあるコドン鎖を有し、S E Q I D N O : 6 で表される。低温適応性ウマインフルエンザMタンパク質をコードする第2の核酸分子を同じ方法でP C R 増幅し、n e i c a 1 M 1 0 2 3 と同一の分子 n e i c a 2 M 1 0 2 3 、及びn e i c a 1 M 7 5 6 と同一の分子n e i c a 2 M 7 5 6 を作製した。

## 【0195】

C . n e i w t M 1 0 2 3 ( S E Q I D N O : 1 ) と n e i c a 1 M 1 0 2 3 ( S E Q I D N O : 4 ) のコドン鎖の核酸配列をD N A アライメントで比較すると、次の相違が判明する：塩基67のGがTに変化、塩基527のCがTに変化、塩基886のGがCに変化。タンパク質P e i w t M 2 5 2 ( S E Q I D N O : 2 ) と P e i c a 1 M 2 5 2 ( S E Q I D N O : 5 )とのアミノ酸配列を比較すると、次の相違が判明する：D N A 配列の塩基67のGからTへの変化に対応する、アミノ酸23のVからLへの変化、及びD N A 配列の塩基527のCからTへの変化に対応する、アミノ酸187のTからIへの変化。

## 【0196】

## 例12

この例では、野生型または低温適応性ウマインフルエンザウィルスのウマインフルエンザH A (ヘマグルチニン)タンパク質核酸分子のクローニング及び配列決定について説明する。

## 【0197】

A . 野生型または低温適応性ウマインフルエンザウィルスH A タンパク質をコードする核酸分子を、次の方法で作製した。ウマインフルエンザウィルスD N A 及び、それぞれS E Q I D N O : 3 2 及びS E Q I D N O : 3 3 のプライマw 5 7 8 及びw 5 7 9 から、P C R 増幅により、ウマH A 遺伝子を含有するP C R 産物を作製した。n e i w t H A 1 7 6 2 として表され、核酸配列S E Q I D N O : 7 を含むコドン鎖を有する、野生型H A タンパク質をコードするヌクレオチド1762個からなる核酸分子を、さらなるP C R 増幅により、上述のP C R 産物を鑄型として作製し、例11Aに記載した方法でp C R 2 . 1 (登録商標) T A クローニングベクターにクローニングした。プラスミドD N A を、例11Aに記載した方法で精製及び配列決定した。ただし、シークエンシングキットで使用したプライマは、例11AではT 7 及びR E Vであったが、この例では、S E Q I D N O : 3 4 で表されるH A - 1 及びS E Q I D N O : 3 5 で表されるH A - 2 を使用した。

## 【0198】

S E Q I D N O : 7 を翻訳すると、核酸分子n e i w t H A 1 7 6 2 が、ここではP e i w t H A 5 6 5 と言及されるアミノ酸約565個からなる全長ウマインフルエンザH A タンパク質をコードすることが判明し、このタンパク質のアミノ酸配列はS E Q I D N O : 8 で表されるが、ただしこのとき、開いた読み枠の開始コドンがS E Q I D N O : 7 のヌクレオチド30からヌクレオチド33にあり、終了コドンがS E Q I D N O : 7 のヌクレオチド1725からヌクレオチド1727にあることを想定している。P e i w t H A 5 6 5 をコードする領域は、n e i w t H A 1 6 9 5 で表されるが、こ

10

20

30

40

50

の領域は、SEQ ID NO: 7 のヌクレオチド 30 から 1724 までにあるコドン鎖を有し、SEQ ID NO: 9 で表される。

#### 【0199】

B. 低温適応性ウマインフルエンザウィルス HA タンパク質をコードする 1762 個のヌクレオチドからなる核酸分子は、neic<sub>a1</sub>HA<sub>1762</sub> で表され、SEQ ID NO: 10 で表されるコドン鎖を有するが、この核酸分子を、例 11B に記載した方法で作製した。プラスミド DNA 精製及びサイクルシークエンスを、例 12A に記載した方法で行った。

#### 【0200】

SEQ ID NO: 10 を翻訳すると、核酸分子が neic<sub>a1</sub>HA<sub>1762</sub> が、ここでは Peic<sub>a1</sub>HA<sub>565</sub> と言及されるアミノ酸約 565 個からなる全長ウマインフルエンザ HA タンパク質をコードすることが判明し、このタンパク質のアミノ酸配列は SEQ ID NO: 11 で表されるが、ただしこのとき、開いた読み枠の開始コドンが SEQ ID NO: 10 のヌクレオチド 30 からヌクレオチド 33 にあり、終了コドンが SEQ ID NO: 10 のヌクレオチド 1725 からヌクレオチド 1727 にあることを想定している。Peic<sub>a1</sub>HA<sub>565</sub> をコードする領域は、neic<sub>a1</sub>HA<sub>1695</sub> で表されるが、この領域は、SEQ ID NO: 10 のヌクレオチド 30 から 1724 までにあるコドン鎖を有し、SEQ ID NO: 12 で表される。

#### 【0201】

低温適応性ウマインフルエンザ HA タンパク質をコードする第 2 の核酸分子と同じ方法で PCR 増幅し、neic<sub>a1</sub>HA<sub>1762</sub> と同一の分子 neic<sub>a2</sub>HA<sub>1762</sub>、及び neic<sub>a1</sub>HA<sub>1695</sub> と同一の分子 neic<sub>a2</sub>HA<sub>1695</sub> を作製した。

#### 【0202】

C. neiw<sub>t</sub>HA<sub>1762</sub> (SEQ ID NO: 7) と neic<sub>a1</sub>HA<sub>1762</sub><sub>2</sub> (SEQ ID NO: 10) とのコドン鎖の核酸配列を DNA アライメントで比較すると、次の相違が判明する：塩基 55 の C が T に変化、塩基 499 の G が A に変化、塩基 671 の G が A に変化、塩基 738 の C が T に変化、塩基 805 の T が C に変化、塩基 1289 の G が A に変化、塩基 1368 の A が G に変化。。タンパク質 Peiw<sub>t</sub>HA<sub>565</sub> (SEQ ID NO: 8) と Peic<sub>a1</sub>HA<sub>565</sub> (SEQ ID NO: 11) とのアミノ酸配列を比較すると、次の相違が判明する：DNA 配列の塩基 55 の C から T への変化に対応する、アミノ酸 18 の P から L への変化、DNA 配列の塩基 499 の G から A への変化に対応する、アミノ酸 166 の G から E への変化、DNA 配列の塩基 738 の C から T へ温変化に対応する、アミノ酸 246 の R から W への変化、DNA 配列の塩基 805 の T から C への変化に対応する、アミノ酸 268 の M から T への変化、DNA 配列の塩基 1368 の A から G への変化に対応する、アミノ酸 456 の K から E への変化。DNA 配列の塩基 671 の G から A への変化に対応する、残基 223 のセリン (S) は変化せず、また、DNA 配列の塩基 1289 の G から A への変化に対応する、残基 429 のアルギニン (R) も変化しなかった。

#### 【0203】

例 13

この例では、野生型又は低温適応性ウマインフルエンザウィルスの、ウマインフルエンザ PB2 タンパク質 (RNA 依存 RNA ポリメラーゼ) の N - 末端部分に対応する核酸分子のクローニング及び配列決定について説明する。

#### 【0204】

A. 野生型または低温適応性ウマインフルエンザウィルス PB2 - N タンパク質をコードする核酸分子を、次の方で作製した。ウマインフルエンザウィルス DNA 及び、それぞれ SEQ ID NO: 36 及び SEQ ID NO: 37 で表されるプライマ w570 及び w571 から、PCR 増幅により、ウマ PB2 遺伝子の N - 末端部分を含有する PCR 産物を作製した。neiw<sub>t</sub>PB2 - N<sub>1241</sub> として表され、核酸配列 SEQ ID NO: 13 で表されるアミノ酸配列を有するコドン鎖を有する、野生型 PB2 - N

10

20

30

40

50

タンパク質をコードするヌクレオチド 1241 個からなる核酸分子を、さらなる P C R 増幅により、上述の P C R 産物を鋳型として作製し、例 11 B に記載した方法でクローニングした。プラスミド D N A を、例 11 B に記載した方法で精製及び配列決定した。ただし、シークエンシングキットで使用したプライマは、T 7 及び R E V のみであった。

## 【0205】

S E Q I D N O : 13 を翻訳すると、核酸分子 n e i<sub>w t</sub> P B 2 - N<sub>1 2 4 1</sub> が、ここでは P<sub>w t</sub> P B 2 - N<sub>4 0 4</sub> と言及されるアミノ酸約 404 個からなるウマインフルエンザ P B 2 タンパク質をコードすることが判明し、このタンパク質のアミノ酸配列は S E Q I D N O : 14 で表されるが、ただしこのとき、開いた読み枠の開始コドンが S E Q I D N O : 13 のヌクレオチド 28 からヌクレオチド 30 にあり、終了コドンがヌクレオチド 1237 からヌクレオチド 1239 にあることを想定している。P<sub>w t</sub> P B 2 - N<sub>4 0 4</sub> をコードする領域は、n e i<sub>w t</sub> P B 2 - N<sub>1 2 1 4</sub> で表されるが、この領域は、S E Q I D N O : 13 のヌクレオチド 28 から 1239 までにあるコドン鎖を有し、S E Q I D N O : 15 で表される。  
10

## 【0206】

B . インフルエンザ P B 2 低温適応性ウマインフルエンザウィルス P B 2 - N タンパク質の N - 末端をコードする 1239 個のヌクレオチドからなる核酸分子は、n e i<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>1 2 4 1</sub> で表され、S E Q I D N O : 16 で表されるコドン鎖を有するが、この核酸分子を、例 12 A に記載した方法で作製した。  
20

## 【0207】

S E Q I D N O : 16 を翻訳すると、核酸分子 n e i<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>1 2 4 1</sub> が、ここでは P e i<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>4 0 4</sub> と言及されるアミノ酸約 404 個からなるウマインフルエンザ P B - 2 タンパク質の N - 末端をコードすることが判明し、このタンパク質のアミノ酸配列は S E Q I D N O : 17 で表されるが、ただしこのとき、開いた読み枠の開始コドンが S E Q I D N O : 16 のヌクレオチド 28 からヌクレオチド 30 にあり、終了コドンがヌクレオチド 1237 からヌクレオチド 1239 にあることを想定している。P e i<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>4 0 4</sub> をコードする領域は、n e i<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>1 2 1 4</sub> で表されるが、この領域は、S E Q I D N O : 16 のヌクレオチド 28 から 1239 にあるコドン鎖を有し、S E Q I D N O : 18 で表される。  
30

## 【0208】

低温適応性ウマインフルエンザ P B 2 - N タンパク質をコードする第 2 の核酸分子を同じ方法で P C R 増幅し、n e i<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>1 2 4 1</sub> と同一の分子 n e i<sub>c a 2</sub> P B 2 - N<sub>1 2 4 1</sub>、及び n e i<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>1 2 1 4</sub> と同一の分子 n e i<sub>c a 2</sub> P B 2 - N<sub>1 2 1 4</sub> を作製した。  
30

## 【0209】

C . n e i<sub>w t</sub> P B 2 - N<sub>1 2 4 1</sub> (S E Q I D N O : 13) と n e i<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>1 2 1 4</sub> (S E Q I D N O : 16) とのコドン鎖の核酸配列を D N A アライメントで比較すると、次の相違が判明する：塩基 370 の T が C。タンパク質 P<sub>w t</sub> P B 2 - N<sub>4 0 4</sub> (S E Q I D N O : 14) と P<sub>c a 1</sub> P B 2 - N<sub>4 0 4</sub> (S E Q I D N O : 17) とのアミノ酸配列を比較すると、次の相違が判明する：D N A 配列の塩基 370 の T から C への変化に対応する、アミノ酸 124 の Y から H への変化。  
40

## 【0210】

## 例 14

この例では、野生型又は低温適応性ウマインフルエンザウィルスの、ウマインフルエンザ P B 2 タンパク質 (R N A 依存 R N A ポリメラーゼ) の C - 末端部分に対応する核酸分子のクローニング及び配列決定について説明する。

## 【0211】

A . 野生型または低温適応性ウマインフルエンザウィルス P B 2 - C タンパク質をコードする核酸分子を、次の方で作製した。ウマインフルエンザウィルス D N A 及び、それぞれ S E Q I D N O : 38 及び S E Q I D N O : 39 で表されるプライマ w 5  
50

72及びw573から、PCR增幅により、ウマPB2遺伝子のC-末端部分を含有するPCR産物を作製した。nei<sub>wt</sub>PB2-C<sub>1233</sub>として表され、核酸配列SEQ ID NO:19を含むコドン鎖を有する、野生型PB2-Cタンパク質をコードするヌクレオチド1233個からなる核酸分子を、さらなるPCR增幅により、上述のPCR産物を鑄型として作製し、例11Bに記載した方法でクローニングした。プラスミドDNAを、例11Aに記載した方法で精製及び配列決定した。ただし、シークエンシングキットでは異なるプライマを使用した。例11AではT7及びREVを使用したが、この例では、SEQ ID NO.40で表されるefPB2-a1とSEQ ID NO.41で表されるefPB2-s1、及びSEQ ID NO.42で表されるefPB2-a2とSEQ ID NO.43で表されるefPB2-s2を使用した。

10

## 【0212】

SEQ ID NO:19を翻訳すると、核酸分子nei<sub>wt1</sub>PB2-C<sub>1233</sub>が、ここではP<sub>wt</sub>PB2-C<sub>398</sub>と言及されるアミノ酸約398個からなるウマインフルエンザPB2タンパク質のC-末端をコードすることが判明し、このタンパク質のアミノ酸配列はSEQ ID NO:20で表されるが、ただしこのとき、開いた読み枠の開始コドンがSEQ ID NO:19のヌクレオチド3からヌクレオチド5にあり、終了コドンがヌクレオチド1197からヌクレオチド1199にあることを想定している。SEQ ID NO:19は単なる部分的な遺伝子配列であるので、開始コドンを含まない。P<sub>wt</sub>PB2-C<sub>398</sub>をコードする領域は、nei<sub>wt</sub>PB2-C<sub>1194</sub>で表されるが、この領域は、SEQ ID NO:19のヌクレオチド3から1196までにあるコドン鎖を有し、SEQ ID NO:21で表される。

20

## 【0213】

野生型インフルエンザPB2-Nタンパク質をコードする第2の核酸分子を同様の方法でPCR增幅し、nei<sub>wt2</sub>PB2-N<sub>1232</sub>として表され、核酸配列SEQ ID NO:22を含むコドン鎖を有する、ヌクレオチド1232個からなる核酸分子を作製した。nei<sub>wt2</sub>PB2-N<sub>1232</sub>は、5'-末端のヌクレオチド1個の欠失を除いては、nei<sub>wt1</sub>PB2-C<sub>1233</sub>と同一である。SEQ ID NO:22を翻訳すると、核酸分子nei<sub>wt1</sub>PB2-C<sub>1233</sub>が、P<sub>wt</sub>PB2-C<sub>398</sub>(SEQ ID NO.20)もコードすることが判明するが、ただしこのとき、開いた読み枠の開始コドンがSEQ ID NO:22のヌクレオチド2からヌクレオチド4にあり、終了コドンがヌクレオチド1196からヌクレオチド1198にあることを想定している。SEQ ID NO:22は単なる部分的な遺伝子配列であるので、開始コドンを含まないSEQ ID NO:22のヌクレオチド2から1195までにあるヌクレオチドを含むコドン鎖を有する核酸分子は、nei<sub>wt2</sub>PB2-C<sub>1194</sub>で表され、SEQ ID NO:21と同一である。

30

## 【0214】

B.インフルエンザPB2低温適応性ウマインフルエンザウィルスPB-2タンパク質のC-末端部分をコードする1232個のヌクレオチドからなる核酸分子は、nei<sub>ca1</sub>PB2-C<sub>1232</sub>で表され、SEQ ID NO:23で表されるコドン鎖を有するが、この核酸分子を、pCR(登録商標)-Bluntクローニングベクターを使用した点以外では例14Aに記載した方法と同じ方法で作製した。

40

## 【0215】

SEQ ID NO:23を翻訳すると、核酸分子nei<sub>ca1</sub>PB2-C<sub>1232</sub>が、ここではP<sub>ca1</sub>PB2-C<sub>398</sub>と言及されるアミノ酸約398個からなるウマインフルエンザPB-2タンパク質のC-末端をコードすることが判明し、このタンパク質のアミノ酸配列はSEQ ID NO:24で表されるが、ただしこのとき、開いた読み枠の開始コドンがSEQ ID NO:23のヌクレオチド2からヌクレオチド4にあり、終了コドンがヌクレオチド1196からヌクレオチド1198にあることを想定している。SEQ ID NO:23は単なる部分的な遺伝子配列であるので、開始コドンを含まない。P<sub>ca1</sub>PB2-C<sub>398</sub>をコードする領域は、nei<sub>ca1</sub>PB2-C<sub>1194</sub>

50

で表されるが、この領域は、SEQ ID NO: 23のヌクレオチド2から1195までにあるヌクレオチドを含むコドン鎖を有し、SEQ ID NO: 25で表される。

【0216】

低温適応性ウマインフルエンザPB2-Cタンパク質をコードする第2の核酸分子を同じ方法でPCR增幅し、neic<sub>a1</sub>PB2-N<sub>1241</sub>と比較して3'末端のヌクレオチド1個が欠失しているneic<sub>a2</sub>PB2-C<sub>1231</sub>、及びneic<sub>a1</sub>PB2-N<sub>1214</sub>と同一の分子neic<sub>a2</sub>PB2-N<sub>1214</sub>を作製した。

【0217】

C.neic<sub>wt1</sub>PB2-C<sub>1233</sub>(SEQ ID NO: 19)とneic<sub>a1</sub>PB2-C<sub>1232</sub>(SEQ ID NO: 23)のコドン鎖の核酸配列をDNAアライメントで比較すると、次の相違が判明する：SEQ ID NO: 19の塩基153のAがCに変化、及びSEQ ID NO: 19の塩基929のGがAに変化。タンパク質P<sub>wt</sub>PB2-C<sub>398</sub>(SEQ ID NO: 20)とP<sub>c<sub>a1</sub></sub>PB2-C<sub>398</sub>(SEQ ID NO: 24)とのアミノ酸配列を比較すると、次の相違が判明する：DNA配列の塩基153のAからCへの変化に対応する、アミノ酸51のKからQへの変化。塩基929のGからAへの変化によるアミノ酸の変化はない。

【0218】

本発明の様々な実施例を詳細に説明したが、これらの実施例に修正及び変更が加えられるであろうことは当業者に明白である。しかしながら、そのような修正及び変更は、以下の請求の範囲で述べるような、本発明の範囲内で行われるものであることを、理解されたい。

【0219】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The University of Pittsburgh-of the Commonwealth System of Higher Education

<120> COLD-ADAPTED EQUINE INFLUENZA VIRUSES

<130> F103K65325

<140> JP 2000-565137

<141> 1999-08-12

<150> US 09/133,921

<151> 1998-08-13

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1023

<212> DNA

<213> Equine influenza virus H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(780)

<400> 1

gcaaaaggcag gtagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg 51

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr

1 5

tac gtt ctc tct atc gta cca tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg 99

Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala

10 15 20 25

cag aga ctt gaa gat gtc ttt gca ggg aag aac acc gat ctt gag gca 147

Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala

10

20

30

40

50

30	35	40	
ctc atg gaa tgg cta aag aca aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa			195
Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys			
45	50	55	
ggg att tta gga ttc gta ttc acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga			243
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly			
60	65	70	
ctg cag cgt aga cgc ttt gtc caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat			291
Leu Gln Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp			
75	80	85	10
cca aac aac atg gac aga gca gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga			339
Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg			
90	95	100	105
gaa ata aca ttc cat ggg gca aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act			387
Glu Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr			
110	115	120	
ggt gca cta gcc agc tgc atg gga ctc ata tac aac aga atg gga act			435
Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr			
125	130	135	
gtg aca acc gaa gtg gca ttt ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag			483
Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln			
140	145	150	
atc gct gat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca aca acc			531
Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr			
155	160	165	
aac cca tta atc aga cat gaa aac aga atg gta tta gcc agt acc acg			579
Asn Pro Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr			
170	175	180	185
gct aaa gcc atg gag cag atg gca ggg tcg agt gag cag gca gca gag			627
Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu			
190	195	200	
gcc atg gag gtt gct agt aag gct agg cag atg gtr cag gca atg aga			675
Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Xaa Gln Ala Met Arg			
205	210	215	
acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc			723
Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu			
220	225	230	
ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag			771
Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln			
235	240	245	40
cga ttc aag tgatcctctc gtattgcag caagtatcat tggatcttg			820
Arg Phe Lys			
250			
cacttgatat tgtggattct tgcgcctt ttcttcaa at tcatttatcg tcgccttaaa			880
tacgggttga aaagaggccc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaataat			940
cggcaggaac agcagaatgc tgtggatgtt gacgatggtc atttgtcaa catagagctg			1000
gagtaaaaaa ctaccttgtt tct			1023
<210> 2			
<211> 252			
<212> PRT			50

<213> Equine influenza virus H3N8

<400> 2

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro				
1	5	10	15	
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe				
20	25	30		
Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr				
35	40	45		
Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe				10
50	55	60		
Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val				
65	70	75	80	
Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala				
85	90	95		
Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala				
100	105	110		
Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met				
115	120	125		
Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe				20
130	135	140		
Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg				
145	150	155	160	
Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu				
165	170	175		
Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met				
180	185	190		
Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Lys				
195	200	205		
Ala Arg Gln Met Xaa Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser				
210	215	220		30
Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr				
225	230	235	240	
Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys				
245	250			

<210> 3

<211> 756

<212> DNA

<213> Equine influenza virus H3N8

<400> 3

atagagtcttc tgaccgaggt cgaaaacgtac gttctctcta tcgttaccatc aggccccctc	60			40
aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag	120			
gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggatttta	180			
ggattcgtat tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc	240			
caaaatgccc ttatgtgaaa cggagatcca aacaacatgg acagagcgt aaaactgtac	300			
aggaagctta aaagagaaat aacattccat gggcaaaag aggtggcact cagctattcc	360			
actggtgac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatggaaac tgtgacaacc	420			
gaagtggcat ttggcccttgt atgcgccaca tgtgaacaga tcgctgattc ccagcatcga	480			
tctcacaggc agatggtgac aacaaccaac ccattaatca gacatgaaaa cagaatggta	540			
ttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcaggcagca	600			
gaggccatgg aggttgctag taaggctagg cagatggtrc aggcaatgag aaccattggg	660			50

acccacccta gctccagtgc cggtttgaaa gatgatctcc ttgaaaattt gcaggcctac 720  
 cagaaacgga tggagtgca aatgcagcga ttcaag 756  
 <210> 4  
 <211> 1023  
 <212> DNA  
 <213> Equine influenza virus H3N8  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (25)..(780)  
 <400> 4 10  
 gcaaaagcag gttagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg 51  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr  
 1 5  
 tac gtt ctc tct atc tta cca tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg 99  
 Tyr Val Leu Ser Ile Leu Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala  
 10 15 20 25  
 cag aga ctt gaa gat gtc ttt gca ggg aag aac acc gat ctt gag gca 147  
 Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala  
 30 35 40  
 ctc atg gaa tgg cta aag aca aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa 195 20  
 Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys  
 45 50 55  
 ggg att tta gga ttc gta ttc acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga 243  
 Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly  
 60 65 70  
 ctg cag cgt aga cgc ttt gtc caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat 291  
 Leu Gln Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp  
 75 80 85  
 cca aac aac atg gac aga gca gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga 339  
 Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala Val Lys Leu Tyr Lys Leu Lys Arg 30  
 90 95 100 105  
 gaa ata aca ttc cat ggg gca aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act 387  
 Glu Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr  
 110 115 120  
 ggt gca cta gcc agc tgc atg gga ctc ata tac aac aga atg gga act 435  
 Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr  
 125 130 135  
 gtg aca acc gaa gtg gca ttt ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag 483  
 Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln  
 140 145 150 40  
 atc gct gat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca ata acc 531  
 Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Ile Thr  
 155 160 165  
 aac cca tta atc aga cat gaa aac aga atg gta tta gcc agt acc acg 579  
 Asn Pro Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr  
 170 175 180 185  
 gct aaa gcc atg gag cag atg gca ggg tcg agt gag cag gca gca gag 627  
 Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu  
 190 195 200  
 gcc atg gag gtt gct agt aag gct agg cag atg gta cag gca atg aga 675 50

Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg  
           205                  210                  215  
 acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc   723  
 Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu  
           220                  225                  230  
 ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cggtatg gga gtg caa atg cag   771  
 Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln  
           235                  240                  245  
 cga ttc aag tgatcccttc gttattgcag caagtatcat tggatcttg           820  
 Arg Phe Lys   10  
 250  
 cacttgatat tgtggattct tgcgcctt ttcttcaaataat tcatttatcg tcgccttaaaa 880  
 tacggcttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaataat 940  
 cgccaggaac agcagaatgc tgtggatgtt gacgatggtc atttgtcaa catagagctg 1000  
 gagtaaaaaaa ctaccttgtt tct                       1023  
 <210> 5  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Equine influenza virus H3N8  
 <400> 5   20  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Leu Pro  
     1              5                          10                  15  
 Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe  
     20                  25                          30  
 Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr  
     35                  40                          45  
 Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe  
     50                  55                          60  
 Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val  
     65                  70                          75                  80                   30  
 Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala  
     85                  90                          95  
 Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala  
     100                 105                          110  
 Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met  
     115                 120                          125  
 Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe  
     130                 135                          140  
 Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg  
     145                 150                          155                  160                   40  
 Ser His Arg Gln Met Val Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu  
     165                 170                          175  
 Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met  
     180                 185                          190  
 Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Lys  
     195                 200                          205  
 Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser  
     210                 215                          220  
 Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr  
     225                 230                          235                  240                   50

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys

245

250

<210> 6

<211> 756

<212> DNA

<213> Equine influenza virus H3N8

<400> 6

atgagtcttc tgaccgaggt cggaaacgtac gttctctcta tcttaccatc aggccccctc 60  
 aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120  
 gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggattta 180  
 ggattcgtat tcacgcgtcac cgtgcccagt gagcggaggac tgcagcgtag acgcgttgtc 240  
 caaaaatgccc ttagtgaaaa cggagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaactgtac 300  
 aggaagctta aaagagaaaat aacattccat ggggcaaaag aggtggcact cagctattcc 360  
 actgggtcac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatgggaac tgtgacaacc 420  
 gaagtggcat ttggcctggt atgcgccaca tgtgaacaga tcgcgtgatt ccagcatcga 480  
 tctcacaggc agatggtgac aataaccaac ccattaatca gacatgaaaa cagaatggta 540  
 tttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcagggcagca 600  
 gaggccatgg aggttgctag taaggctagg cagatggtac aggcaatgag aaccattggg 660  
 acccacccta gctccagtcg cgggttgaaa gatgatctcc ttgaaaattt gcaggccctac 720  
 cagaaacgga tgggagtgca aatgcagcga ttcaag 756

10

20

<210> 7

<211> 1762

<212> DNA

<213> Equine influenza virus H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (30)..(1724)

<400> 7

agcaaaagca gggatattt ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata 53  
 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile

1

5

30

cca ctg acc cat tgg gtc tac agt caa aac cca acc agt ggc aac aac 101  
 Pro Leu Thr His Trp Val Tyr Ser Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn  
 10 15 20

aca gcc aca tta tgt ctg gga cac cat gca gta gca aat gga aca ttg 149  
 Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu  
 25 30 35 40

gta aaa aca ata act gat gac caa att gag gtg aca aat gct act gaa 197  
 Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu  
 45 50 55

40

tta gtt cag agc att tca ata ggg aaa ata tgc aac aac tca tat aga 245  
 Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg  
 60 65 70

gtt cta gat gga aga aat tgc aca tta ata gat gca atg cta gga gac 293  
 Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp  
 75 80 85

ccc cac tgt gat gtc ttt cag tat gag aat tgg gac ctc ttc ata gaa 341  
 Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu  
 90 95 100

aga agc agc gct ttc agc agt tgc tac cca tat gac atc cct gac tat 389

50

Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr			
105	110	115	120
gca tcg ctc cgg tcc att gta gca tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca			437
Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr			
125	130	135	
gca gag gga ttc aca tgg aca ggt gtc act caa aac gga aga agt gga			485
Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly			
140	145	150	
tcc tgc aaa agg gga tca gcc gat agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg			533
Ser Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp			
155	160	165	
ctc aca gaa tct gga aac tac ccc aca ttg aat gtg aca atg cct			581
Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro			
170	175	180	
aac aat aaa aat ttc gac aaa cta tac atc tgg ggg att cat cac ccg			629
Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro			
185	190	195	200
agc tca aac aaa gag cag aca aaa ttg tac atc caa gaa tcg gga cga			677
Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg			
205	210	215	
gta aca gtc tca aca aaa aga agt caa caa aca ata atc cct aac atc			725
Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile			
220	225	230	
gga tct aga ccg cgg gtc agg ggt caa tca ggc agg ata agc ata tac			773
Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr			
235	240	245	
tgg acc att gta aaa cct gga gat atc cta atg ata aac agt aat ggc			821
Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly			
250	255	260	
aac tta gtt gca ccg cgg gga tat ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc			869
Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser			
265	270	275	280
tct gta atg aga tca gat gca ccc ata gac att tgt gtg tct gaa tgt			917
Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys			
285	290	295	
att aca cca aat gga agc atc ccc aac gac aaa cca ttt caa aat gtg			965
Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val			
300	305	310	
aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc ccc aag tat atc agg caa aac act			1013
Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr			
315	320	325	
tta aag ctg gcc act ggg atg agg aat gta cca gaa aag caa atc aga			1061
Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg			
330	335	340	
gga atc ttt gga gca ata gcg gga ttc ata gaa aac ggc tgg gaa gga			1109
Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly			
345	350	355	360
atg gtt gat ggg tgg tat gga ttc cga tat caa aac tcg gaa gga aca			1157
Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr			
365	370	375	

gga caa gct gca gat cta aag agc act caa gca gcc atc gac cag atc Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile 380 385 390	1205	
aat gga aaa tta aac aga gtg att gaa agg acc aat gag aaa ttc cat Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His 395 400 405	1253	
caa ata gag aag gaa ttc tca gaa gta gaa ggg agg atc cag gac ttg Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu 410 415 420	1301	
gag aag tat gta gaa gac acc aaa ata gac cta tgg tcc tac aat gca Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala 425 430 435 440	1349	10
gaa ttg ctg gtg gct cta aaa aat caa cat aca att gac tta aca gat Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp 445 450 455	1397	
gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu 460 465 470	1445	
aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgt ttc aag ata tac cac aaa tgt Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys 475 480 485	1493	20
gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr 490 495 500	1541	
ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtt Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val 505 510 515 520	1589	
gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala 525 530 535	1637	30
ata tca tgc ttc tta att tgc gtt gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp 540 545 550	1685	
gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgatcaaact Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile 555 560 565	1734	
gatagttaaa aacacccttg tttctact	1762	
<210> 8		
<211> 565		
<212> PRT		40
<213> Equine influenza virus H3N8		
<400> 8		
Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Pro Leu Thr His Trp Val Tyr Ser 1 5 10 15		
Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His 20 25 30		
His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln 35 40 45		
Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly 50 55 60		50

Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr  
     85 90 95  
 Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys  
     100 105 110  
 Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala  
     115 120 125  
 Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly  
     130 135 140 10  
 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ser Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr  
     165 170 175  
 Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu  
     180 185 190  
 Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys  
     195 200 205  
 Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser  
     210 215 220 20  
 Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg Gly  
 225 230 235 240  
 Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp  
     245 250 255  
 Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr  
     260 265 270  
 Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro  
     275 280 285  
 Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro  
     290 295 300 30  
 Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg  
     325 330 335  
 Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
     340 345 350  
 Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe  
     355 360 365  
 Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser  
     370 375 380 40  
 Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile  
 385 390 395 400  
 Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu  
     405 410 415  
 Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys  
     420 425 430  
 Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn  
     435 440 445  
 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu  
     450 455 460 50

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly  
 465 470 475 480  
 Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile  
     485 490 495  
 Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn  
     500 505 510  
 Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp  
     515 520 525  
 Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val  
     530 535 540  
 Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg  
 545 550 555 560  
 Cys Asn Ile Cys Ile  
     565  
 <210> 9  
 <211> 1695  
 <212> DNA  
 <213> Equine influenza virus H3N8  
 <400> 9  
 atgaagacaa ccattatttt gataccactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60  
 agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggaacattg 120  
 gtaaaaaacaa taactgatga ccaaatttagt gtgacaaaatg ctactgaatt agttcagagc 180  
 atttcaatag ggaaaatatg caacaactca tatagagttc tagatggaag aaattgcaca 240  
 ttaatagatg caatgctagg agaccccccac tttgtatgtct ttcatgtatga gaattgggac 300  
 ctcttcatacg aaagaagcag cgctttcagc agttgttacc catatgacat ccctgactat 360  
 gcatcgctcc ggtccattgtt agcatccctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420  
 acatggacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaagggg atcagccat 480  
 agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttaccc cacattgaat 540  
 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca tctggggat tcatacccg 600  
 agctcaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaagaat cgggacgagt aacagtctca 660  
 acaaaaaagaa gtcaacaaac aataatccct aacatcgat ctagaccgcg ggtcagggt 720  
 caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaaac ctggagatat cctaataatgata 780  
 aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatattttt aattgaaaac agggaaaagc 840  
 tctgtatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtt ctgaatgtat tacaccaaatt 900  
 ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtaaaca aagttacata tggaaaatgc 960  
 cccaaatata tcaggcaaaa cactttaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020  
 aagcaaatac gagaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg ctgggaagga 1080  
 atggtttatg ggtgttatgg attccgatataa caaaactcgg aaggaacagg acaagctgca 1140  
 gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtattt 1200  
 gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaat tctcagaat agaagggagg 1260  
 atccaggact tggagaagta tftagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca 1320  
 gaattgttgg tggctctaaa aaatcaacat acaatttgact taacagatgc agaaaatgaat 1380  
 aaatttattcg agaagactag acgccagtttta agagaaaacg cggaaagacat gggaggttgg 1440  
 tggttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattt gatcaataag aaatgggaca 1500  
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacaacc ggtttcaaat caaagggttt 1560  
 gagttgaaat caggctacaa agatggata ctgtggattt cattcgccat atcatgcttc 1620  
 ttaatttgcg ttgttctattt gggtttcatat atgtggcattt gccaaaaagg caacatcaga 1680  
 tgcaacatttt gcatt 1695  
 <210> 10  
 <211> 1762 50

<212> DNA

<213> Equine influenza virus H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (30) . . (1724)

<400> 10

agcaaaaagca gggatattt ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata 53  
Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile  
1 5

ctt ctt acc cat tgg gtc tac agt caa aac cca acc agt ggc aac aac 101  
Leu Leu Thr His Trp Val Tyr Ser Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn  
10 15 20

```

aca gcc aca tta tgt ctg gga cac cat gca gta gca aat gga aca ttg 149
Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu
25          30          35          40

```

gta aaa aca ata act gac caa att gag gtg aca aat gct act gaa 197  
Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu  
45 50 55

tta gtt cag agc att tca ata ggg aaa ata tgc aac aac tca tat aga 245  
Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg  
60 65 70

gtt cta gat gga aga aat tgc aca tta ata gat gca atg cta gga gac 293

Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp  
75 80 85

ccc cac tgt gat gtc ttt cag tat gag aat tgg gac ctc ttc ata gaa 341  
 Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu  
                  90                 95                 100

```

aga agc agc gct ttc agc agt tgc tac cca tat gac atc cct gac tat 389
Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr
105          110          115          120

```

gca tcg ctc cg<sup>g</sup> tcc att gta gca tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca 437  
Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr

125 130 135  
gca gag gga ttc aca tgg aca ggt gtc actcaa aac gga aga agt gga 485  
Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asp Gly Arg Ser Gly

140 145 150  
tcc tgc aaa agg gaa tca gcc gat agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg 533

Ser Cys Lys Arg Glu Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp		
155	160	165
ctt aca gaa tct gga aac tct tac ccc aca ttg aat qtq aca atq cct	581	

Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro  
 170                    175                    180  
 aac aat aaa aat ttc gac aaa cta tac atc tgg ggg att cat cac cca 629

Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro  
185 190 195 200  
agg tca ggc gac gaa cgg ccc ttg tac atc ctt gtt tca ggt cgg 677

age tea das daa gag tag daa daa ttg tac ate daa gaa tea gga ega 377  
 Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg  
                  205                 210                 215  
 atc acc atc tac acc acc acc acc acc acc atc atc atc atc 375

Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile

220	225	230	
gga tct aga ccg tgg gtc agg ggt caa tca ggc agg ata agc ata tac			773
Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr			
235	240	245	
tgg acc att gta aaa cct gga gat atc cta acg ata aac agt aat ggc			821
Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Thr Ile Asn Ser Asn Gly			
250	255	260	
aac tta gtt gca ccg cggttat ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc			869
Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser			
265	270	275	10
tct gta atg aga tca gat gca ccc ata gac att tgt gtg tct gaa tgt			917
Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys			
285	290	295	
att aca cca aat gga agc atc ccc aac gac aaa cca ttt caa aat gtg			965
Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val			
300	305	310	
aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc ccc aag tat atc agg caa aac act			1013
Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr			
315	320	325	
tta aag ctg gcc act ggg atg agg aat gta cca gaa aag caa atc aga			1061
Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg			
330	335	340	
gga atc ttt gga gca ata gcg gga ttc ata gaa aac ggc tgg gaa gga			1109
Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly			
345	350	355	20
atg gtt gat ggg tgg tat gga ttc cga tat caa aac tcg gaa gga aca			1157
Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr			
365	370	375	
gga caa gct gca gat cta aag agc act caa gca gcc atc gac cag atc			1205
Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile			
380	385	390	30
aat gga aaa tta aac aga gtg att gaa agg acc aat gag aaa ttc cat			1253
Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His			
395	400	405	
caa ata gag aag gaa ttc tca gaa gta gaa ggg aga atc cag gac ttg			1301
Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu			
410	415	420	
gag aag tat gta gaa gac acc aaa ata gac cta tgg tcc tac aat gca			1349
Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala			
425	430	435	40
gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat caa cat aca att gac tta aca gat			1397
Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp			
445	450	455	
gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa			1445
Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu			
460	465	470	
aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgt ttc aag ata tac cac aaa tgt			1493
Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys			
475	480	485	
gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac			1541
			50

Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr			
490	495	500	
ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtt	1589		
Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val			
505	510	515	520
gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc	1637		
Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala			
525	530	535	
ata tca tgc ttc tta att tgc gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg	1685		
Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp			10
540	545	550	
gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att ttagttaact	1734		
Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile			
555	560	565	
gatagttaaa aacacccttg tttctact	1762		
<210> 11			
<211> 565			
<212> PRT			
<213> Equine influenza virus H3N8			
<400> 11			20
Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Val Tyr Ser			
1	5	10	15
Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His			
20	25	30	
His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln			
35	40	45	
Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly			
50	55	60	
Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr			
65	70	75	80
Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr			30
85	90	95	
Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys			
100	105	110	
Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala			
115	120	125	
Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly			
130	135	140	
Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ser Cys Lys Arg Glu Ser Ala Asp			
145	150	155	160
Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr			40
165	170	175	
Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu			
180	185	190	
Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys			
195	200	205	
Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser			
210	215	220	
Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly			
225	230	235	240

Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp			
245	250	255	
Ile Leu Thr Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr			
260	265	270	
Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro			
275	280	285	
Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro			
290	295	300	
Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys			
305	310	315	320
Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg			
325	330	335	
Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly			
340	345	350	
Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe			
355	360	365	
Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser			
370	375	380	
Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile			
385	390	395	400
Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu			
405	410	415	
Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys			
420	425	430	
Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn			
435	440	445	
Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu			
450	455	460	
Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly			
465	470	475	480
Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile			
485	490	495	
Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn			
500	505	510	
Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp			
515	520	525	
Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val			
530	535	540	
Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg			
545	550	555	560
Cys Asn Ile Cys Ile			
565			
<210> 12			
<211> 1695			
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			
<400> 12			
atgaagacaa ccattattt gatactactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc	60		
agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggaacattg	120		
gtaaaaacaa taactgatga ccaaatttagt gtgacaaatg ctactgaatt agttcagagc	180		
			50

attcaatag ggaaaatatg caacaactca tatagagttc tagatggaag aaattgcaca 240  
 ttaatagatg caatgtttagg agaccccccac tggatgtct ttcatgtatga gaattggac 300  
 ctcttcatacg aaagaagcag cgcttcagc agttgttacc catatgacat ccctgactat 360  
 gcatcgctcc ggtccatgtt agcatcctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420  
 acatggacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaaggga atcagccat 480  
 agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttaccc cacattgaat 540  
 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca tctggggat tcatcacccg 600  
 agctcaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaagaat caggacgagt aacagtctca 660  
 acaaaaagaa gtcaacaac aataatccct aacatcgat cttagccgt ggtcaggggt 720  
 caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaaac ctggagatat cctaacgata 780 10  
 aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatattttt aatgtaaaac agggaaaacg 840  
 tctgtatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaaat 900  
 ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960  
 cccaagtata tcaggcaaaa cactttaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020  
 aagcaaatac gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg ctgggaagga 1080  
 atggttgatg ggtggatgg attccgatat caaaactcgg aaggaacagg acaagctgca 1140  
 gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgatt 1200  
 gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaat tctcagaagt agaagggaga 1260  
 atccaggact tggagaagta tggatggac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca 1320  
 gaattgctgg tggctctaga aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaaaatgaat 1380 20  
 aaatttattcg agaagactag acgccagttt agagaaaacg cggaagacat gggaggtgga 1440  
 tggatcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattt gatcaataag aaatggaca 1500  
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacaacc ggttcaaattt caaagggttt 1560  
 gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt cattcgccat atcatgcttc 1620  
 ttaatttgcg ttgttctatt gggtttattt atgtggctt gccaaaaagg caacatcaga 1680  
 tgcaacattt gcatt 1695  
 <210> 13  
 <211> 1241  
 <212> DNA  
 <213> Equine influenza virus H3N8 30  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (28)..(1239)  
 <400> 13  
 agcaaaaagca ggtcaaatat attcaat atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat 54  
 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp  
 1 5  
 cta atg tca caa tcc cgc acc cgc gag ata cta aca aaa act act gtg 102  
 Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val  
 10 15 20 25 40  
 gac cac atg gcc ata atc aag aaa tac aca tca gga aga caa gag aag 150  
 Asp His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys  
 30 35 40  
 aac ccc gca ctt agg atg aag tgg atg atg gca atg aaa tac cca att 198  
 Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile  
 45 50 55  
 aca gca gat aag agg ata atg gaa atg att cct gag aga aat gaa cag 246  
 Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln  
 60 65 70  
 ggg caa acc ctt tgg agc aaa acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta 294 50

Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val				
75	80	85		
atg gta tca cct ctg gca gtg aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca			342	
Met Val Ser Pro Leu Ala Val Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr				
90	95	100	105	
acg agc aca att cat tat cca aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aaa			390	
Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys				
110	115	120		
gtt gaa aga tta aaa cac gga acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat			438	
Val Glu Arg Leu Lys His Gly Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn				
125	130	135	10	
caa gtc aag ata aga cgg aga gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac			486	
Gln Val Lys Ile Arg Arg Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp				
140	145	150		
ctc agt gcc aaa gaa gca caa gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca			534	
Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro				
155	160	165		
aat gaa gtg gga gcc aga att cta aca tcg gaa tca caa cta aca ata			582	
Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile				
170	175	180	185	20
acc aaa gag aaa aaa gaa gaa ctt cag gac tgc aaa att gcc ccc ttg			630	
Thr Lys Glu Lys Glu Glu Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu				
190	195	200		
atg gta gca tac atg cta gaa aga gag ttg gtc cga aaa aca aga ttc			678	
Met Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe				
205	210	215		
ctc cca gtg gct ggc gga aca agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat			726	
Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His				
220	225	230		
ctg act cag gga aca tgc tgg gaa caa atg tac acc cca gga gga gaa			774	
Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu				
235	240	245	30	
gtt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gcc cg aac			822	
Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn				
250	255	260	265	
ata gtg aga aga gcg aca gta tca gca gat cca cta gca tcc ctg ctg			870	
Ile Val Arg Arg Ala Thr Val Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu				
270	275	280		
gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata agg atg gta gac atc			918	
Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile				
285	290	295	40	
ctt aag cag aat cca aca gag gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca			966	
Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala				
300	305	310		
gca atg ggg tta aga att agc tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc			1014	
Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr				
315	320	325		
ttt aag aga aca agt gga tca tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt			1062	
Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu				
330	335	340	345	50

acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa ata aga gtg cat gaa ggc tat gaa 1110  
 Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu  
                      350                     355                     360  
 gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca 1158  
 Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala  
                      365                     370                     375  
 acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca 1206  
 Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser  
                      380                     385                     390  
 att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tc 1241 10  
 Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe  
                      395                     400  
 <210> 14  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Equine influenza virus H3N8  
 <400> 14  
 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr  
     1                  5                     10                     15  
 Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys 20  
     20                  25                     30  
 Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys  
     35                  40                     45  
 Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met  
     50                  55                     60  
 Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys  
     65                  70                     75                     80  
 Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val  
     85                  90                     95  
 Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro 30  
     100                 105                     110  
 Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly  
     115                 120                     125  
 Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg  
     130                 135                     140  
 Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln  
     145                 150                     155                     160  
 Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile  
     165                 170                     175  
 Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu 40  
     180                 185                     190  
 Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu  
     195                 200                     205  
 Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr  
     210                 215                     220  
 Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp  
     225                 230                     235                     240  
 Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp  
     245                 250                     255  
 Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val 50

260	265	270	
Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln			
275	280	285	
Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu			
290	295	300	
Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser			
305	310	315	320
Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser			
325	330	335	
Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu			10
340	345	350	
Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gln Arg			
355	360	365	
Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu			
370	375	380	
Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val			
385	390	395	400
Ala Met Val Phe			
<210> 15			
<211> 1214			20
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			
<400> 15			
atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcacccg cgagatacta 60			
acaaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaaat acacatcagg aagacaagag 120			
aagaaccccg cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagat 180			
aagaggataa tggaaatgat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa 240			
acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcaccc tggcagtgac atggtggaat 300			
aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tctacaaaac ttatttgaa 360			
aaagtggaaa gattaaaaca cggAACCTTt ggccccgttc atttttaggaa tcaagtcaag 420			30
ataagacgga gagtttatgtt aaacccttgtt cacgcggacc tcagtgc当地 agaaggcaca 480			
gatgttatca tggaaatgtt tttccaaat gaagtggag ccagaattct aacatcgaa 540			
tcacaactaa caataaccaa agagaaaaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600			
tttatggtag catacatgct agaaagagag ttggtccgaa aaacaagatt cctcccttg 660			
gctggcggaa caagcgtgtt atacattgaa gtgttgatc tgactcagg aacatgctgg 720			
gaacaaatgtt acacccagg aggagaagtt agaaacgtg acatttatca aagttaatt 780			
attgtgtccc ggaacatagt gagaagagcg acagtaicag cagatccact agcatccctg 840			
ctggaaatgtt gccacagtac acagatttgtt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900			
aatccaacag aggaacaagc tgtggatata tgcaaagcag caatggggtt aagaatttagc 960			
tcatcattca gcttttgtt attcacctt aagagaacaa gtggatcatc agtcaagaga 1020			40
gaagaagaaa tgcttacggg caacattcaa acattgaaaa taagagtgc tgaaggctat 1080			
gaagaattca caatggtcgg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140			
ttgattcaat tgatgatcaag tggagagat gaacaatcaa ttgtctgaagc aataattgta 1200			
gccatggtgtt ttcc 1214			
<210> 16			
<211> 1241			
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			
<220>			
<221> CDS			50



gtt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gcc cgg aac	822	
Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn		
250 255 260 265		
ata gtg aga aga gcg aca gta tca gca gat cca cta gca tcc ctg ctg	870	
Ile Val Arg Arg Ala Thr Val Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu		
270 275 280		
gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata agg atg gta gac atc	918	
Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile		
285 290 295		
ctt aag cag aat cca aca gag gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca	966	10
Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala		
300 305 310		
gca atg ggg tta aga att agc tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc	1014	
Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr		
315 320 325		
ttt aag aga aca agt gga tca tca gtc aag aga gaa gaa atg ctt	1062	
Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu		
330 335 340 345		
acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa ata aga gtg cat gaa ggc tat gaa	1110	
Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu		20
350 355 360		
gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca	1158	
Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala		
365 370 375		
acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca	1206	
Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser		
380 385 390		
att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tc	1241	
Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe		
395 400		30
<210> 17		
<211> 404		
<212> PRT		
<213> Equine influenza virus H3N8		
<400> 17		
Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr		
1 5 10 15		
Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys		
20 25 30		
Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys		40
35 40 45		
Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met		
50 55 60		
Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys		
65 70 75 80		
Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val		
85 90 95		
Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro		
100 105 110		
Lys Val His Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly		50

115	120	125	
Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg			
130	135	140	
Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln			
145	150	155	160
Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile			
165	170	175	
Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu			
180	185	190	
Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu			10
195	200	205	
Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr			
210	215	220	
Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp			
225	230	235	240
Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp			
245	250	255	
Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val			
260	265	270	
Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln			20
275	280	285	
Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu			
290	295	300	
Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser			
305	310	315	320
Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser			
325	330	335	
Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu			
340	345	350	
Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gln Arg			30
355	360	365	
Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu			
370	375	380	
Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val			
385	390	395	400
Ala Met Val Phe			
<210> 18			
<211> 1214			
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			40
<400> 18			
atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcacccg cgagatacta	60		
acaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag	120		
aagaaccccg cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagat	180		
aagaggataa tggaaatgat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa	240		
acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgc acatggaaat	300		
aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tccacaaaac ttatttgaa	360		
aaagtggaaa gattaaaaca cggAACCTT ggccccgttc atttttagaa tcaagtcaag	420		
ataagacgga gagtttatgt aaacccttgtt cacgcggacc tcagtgcacaa agaagcaca	480		
gatgttatca tggaaatgtt tttccaaat gaagtggag ccagaattct aacatcgaa	540		

tcacaactaa caataaccaa agagaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgccccc 600  
 ttatggtag catabatgtc agaaaagagag ttggccgaa aaacaagatt cctcccgatg 660  
 gctggcgaa caagcagtgt atacattgaa gtgtgcac tgactcaggg aacatgctgg 720  
 gaacaaatgt acacccagg aggagaagtt agaaacatgt acattgtca aagttaatt 780  
 attgctgcc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcatc cagatccact agcatccctg 840  
 ctggaaatgt gccacagtac acagatggt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900  
 aatccaacag aggaacaacg tggatata tgcaaagcag caatggggtt aagaattagc 960  
 tcatcattca gctttgggg attcacctt aagagaacaa gtggatcatc agtcaagaga 1020  
 gaagaagaaa tgcttacggg caaccccaa acattgaaaa taagagtgc tgaaggctat 1080  
 gaagaattca caatggtcgg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140  
 ttgattcaat tgatagtaag tggagagat gaacaatcaa ttgctgaagc aataattgt 1200  
 gccatggtgt ttcc 1214  
 <210> 19  
 <211> 1233  
 <212> DNA  
 <213> Equine influenza virus H3N8  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)...(1196)  
 <400> 19 20  
 ta gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag 47  
 Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys  
     1              5              10              15  
 gca acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa caa 95  
 Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln  
     20              25              30  
 tca att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tcg caa gaa gat 143  
 Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp  
     35              40              45  
 tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc gat ttg aac ttc gtt aat aga gca 191 30  
 Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala  
     50              55              60  
 aat cag cgc ttg aac ccc atg cat caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa 239  
 Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys  
     65              70              75  
 gat gca aaa gtg ctt ttc cag aat tgg ggg att gaa ccc atc gac aat 287  
 Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn  
     80              85              90              95  
 gtg atg gga atg att gga ata ttg cct gac atg acc cca agc acc gag 335  
 Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu 40  
     100            105            110  
 atg tca ttg aga gga gtg aga gtc agc aaa atg gga gtg gat gag tac 383  
 Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr  
     115            120            125  
 tcc agc act gag aga gtg gtg agc att gac cgt ttt tta aga gtt 431  
 Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val  
     130            135            140  
 cgg gat caa agg gga aac ata cta ctg tcc cct gaa gag gtc agt gaa 479  
 Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu  
     145            150            155

aca caa gga acg gaa aag ctg aca ata att tat tca tca tca atg atg	527	
Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met		
160 165 170 175		
tgg gag att aat ggt ccc gaa tca gtg ttg gtc aat act tat caa tgg	575	
Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp		
180 185 190		
atc atc agg aac tgg gaa att gtg aaa att caa tgg tca cag gat ccc	623	
Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro		
195 200 205		
aca atg tta tac aat aag ata gaa ttt gag cca ttc cag tcc ctg gtc	671	10
Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val		
210 215 220		
cct agg gcc acc aga agc caa tac agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt	719	
Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe		
225 230 235		
cag caa atg cga gat gta ctt gga aca ttt gat act gct caa ata ata	767	
Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile		
240 245 250 255		
aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct cct ccg gaa cag agt agg atg cag	815	
Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln		20
260 265 270		
ttc tct tct ttg act gtt aat gta aga gga tcg gga atg agg ata ctt	863	
Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu		
275 280 285		
gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc aac tac aat aaa gcc act aag agg	911	
Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg		
290 295 300		
ctc aca gtc ctc gga aag gat gca ggt gcg ctt act gaa gac cca gat	959	
Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp		
305 310 315		30
gaa ggt acg gct gga gta gaa tct gct gtt cta aga ggg ttt ctc att	1007	
Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile		
320 325 330 335		
tta ggt aaa gaa aac aag aga tat ggc cca gca cta agc atc aat gaa	1055	
Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu		
340 345 350		
ctg agc aaa ctt gca aaa ggg gag aaa gct aat gtg cta att ggg caa	1103	
Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln		
355 360 365		
ggg gac gtg gtg ttg gta atg aaa cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt	1151	40
Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu		
370 375 380		
act gac agc cag aca gcg acc aaa agg att cgg atg gcc atc aat	1196	
Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn		
385 390 395		
tagtgttcaa ttgtttaaaa acgacccgtt ttctact	1233	
<210> 20		
<211> 398		
<212> PRT		
<213> Equine influenza virus H3N8		50

<400> 20

Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala  
 1 5 10 15

Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser  
 20 25 30

Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys  
 35 40 45

Met Ile Lys Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn  
 50 55 60

Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp  
 65 70 75 80 10

Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val  
 85 90 95

Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met  
 100 105 110

Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser  
 115 120 125

Ser Thr Glu Arg Val Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg  
 130 135 140

Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr  
 145 150 155 160 20

Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp  
 165 170 175

Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile  
 180 185 190

Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr  
 195 200 205

Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro  
 210 215 220

Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln  
 225 230 235 240 30

Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys  
 245 250 255

Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe  
 260 265 270

Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val  
 275 280 285

Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu  
 305 310 315 320 40

Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu  
 325 330 335

Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu  
 340 345 350

Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly  
 355 360 365

Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr  
 370 375 380

Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn 50

385	390	395	
<210> 21			
<211> 1194			
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			
<400> 21			
gaattcacaa tggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagattg 60			
attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattt ctgaagcaat aatttgttagcc 120			
atgggtttt cgcaagaaga ttgcatacata aaagcagttc gaggcgattt gaacttcgtt 180			
aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240			
gcaaaaagtgc tttccagaa ttggggattt gaacccatcg acaatgttat gggaatgattt 300			10
ggaatattgc ctgacatgac cccaaggcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtccgc 360			
aaaatgggag tggatgagta ctccagcact gagagagtgg tggtgagcat tgaccgtttt 420			
ttaagagttc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggtt cagtgaacaa 480			
caaggaacgg aaaagctgac aataattttt tcatacatcaa tgaatgtggg gattaatgtt 540			
cccgaaatcag tggatgttcaa tacttatcaa tggatcatca ggaactgggaa aattgtgaaa 600			
attcaatggt cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660			
tccctggtcc cttagggccac cagaagccaa tacagcggtt tcgttcaagaac cctgtttcag 720			
caaatacgag atgtacttgg aacattttat actgtctaaa taataaaaact cctccctttt 780			
gccgctgctc ctccggaaaca gagtaggatg cagttctt ctttgcgtt taatgtaa 840			20
ggatcggaa tgaggatact tggatgttcaacttccatc aattccccatc tggatgttcaacttcaataaagcc 900			
actaagaggc tcacagtccctt cggaaaggat gcagggtgcgc ttactgttcaaga cccagatgaa 960			
ggtagcggctg gagtagaaatc tgctgttcta agagggttt tcatttttagg taaagaaaaac 1020			
aagagatatg gcccagactt aagcatcaat gaactgttca aacttgcataa aggggagaaa 1080			
gctaattgtgc taattggca aggggacgtt gtgttggtaa tggatgttcaac acgttactt 1140			
agcataactta ctgacagccaa gacagcgacc aaaaggattt ggatggccat caat 1194			
<210> 22			
<211> 1232			
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			30
<400> 22			
agaattcaca atggtcgaa gaagagcaac agccattctc agaaaggcaac ccagaagattt 60			
gattcaatttga atagtaagtgg gagagatgaa acaatcaattt gctgaagcaat taatttgttagc 120			
catgggtttt tcgcaagaag attgcatacata aaaagcagttt cgaggcgattt tgaacttcgtt 180			
taatagagca aatcagcgctt tgaacccatg gcatcaactt ttgaggcattt tccaaaaaga 240			
tgc当地ggatgttccatg ccccaaggcac cgagatgtca ttgagaggagt tgagagtccgc 360			
caaaaatgggaa gtggatgttacttccagcacttccatg tggatgttcaacttccatg tggatgttcaacttcaataaagcc 420			
tttaagagttt cggatcaaaa gggaaacat actactgttcc tctgttcaacttcaacttcaataaagcc 480			
acaaggaacgc gaaaagcttcaacttcaataaatttta ttcatcatca atgatgtggg agattaatgg 540			40
tccctggatca gtgttggatca atacttatca atggatcatc aggaacttggg aatttgttcaataaagcc 600			
aattcaatgg tcacaggatc ccacaatgtt atacaataag atagaatttgc tggatgttcaacttcaataaagcc 660			
gtccctggatca cttagggccaa ccagaagccaa atacagcggtt tctgttcaacttcaataaagcc 720			
gcaaatgcgtt gatgtacttgc tggatgttcaacttcaataaagcc tcttccctttt 780			
tgc当地ggatgttccatg agagtaggat gcagttctt tcttgcgtt ttaatgttcaacttcaataaagcc 840			
aggatcggatc atgaggatact tggatgttcaacttcaataaagcc tcttccctttt 900			
cactaagagg ctccacgttcc tggatgttcaacttcaataaagcc tggatgttcaacttcaataaagcc 960			
agttacggatc ggatgttcaacttcaataaagcc tcttccctttt 1020			
caagagatatg gcccagactt aagcatcaat tggatgttcaacttcaataaagcc tggatgttcaacttcaataaagcc 1080			
agctaattgtgc taattggca aggggacgtt ggtgttggtaa tggatgttcaacttcaataaagcc 1140			50

tagcatactt actgacagcc agacagcgac caaaaggatt cgatggcca tcaatttagt 1200  
 ttgaattgtt taaaaacgcac ctgtttcta ct 1232  
 <210> 23  
 <211> 1232  
 <212> DNA  
 <213> Equine influenza virus H3N8  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2)..(1195)  
 <400> 23 10  
 a gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca 49  
 Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala  
 1 5 10 15  
 acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca 97  
 Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser  
 20 25 30  
 att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tcg caa gaa gat tgc 145  
 Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys  
 35 40 45  
 atg ata caa gca gtt cga ggc gat ttg aac ttc gtt aat aga gca aat 193 20  
 Met Ile Gln Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn  
 50 55 60  
 cag cgc ttg aac ccc atg cat caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat 241  
 Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp  
 65 70 75 80  
 gca aaa gtg ctt ttc cag aat tgg ggg att gaa ccc atc gac aat gtg 289  
 Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val  
 85 90 95  
 atg gga atg att gga ata ttg cct gac atg acc cca agc acc gag atg 337  
 Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met  
 100 105 110 30  
 tca ttg aga gga gtg aga gtc agc aaa atg gga gtg gat gag tac tcc 385  
 Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gln Val Asp Glu Tyr Ser  
 115 120 125  
 agc act gag aga gtg gtg agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg 433  
 Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg  
 130 135 140  
 gat caa agg gga aac ata cta ctg tcc cct gaa gag gtc agt gaa aca 481  
 Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr  
 145 150 155 160 40  
 caa gga acg gaa aag ctg aca ata att tat tca tca tca atg atg tgg 529  
 Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Met Met Trp  
 165 170 175  
 gag att aat ggt ccc gaa tca gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc 577  
 Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile  
 180 185 190  
 atc agg aac tgg gaa att gtg aaa att caa tgg tca cag gat ccc aca 625  
 Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr  
 195 200 205  
 atg tta tac aat aag ata gaa ttt gag cca ttc cag tcc ctg gtc cct 673 50

Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro				
210	215	220		
agg gcc acc aga agc caa tac agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag			721	
Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln				
225	230	235	240	
caa atg cga gat gta ctt gga aca ttt gat act gct caa ata ata aaa			769	
Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys				
245	250	255		
ctc ctc cct ttt gcc gct gct cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc			817	
Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe				10
260	265	270		
tct tct ttg act gtt aat gta aga gga tcg gga atg agg ata ctt gta			865	
Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val				
275	280	285		
aga ggc aat tcc cca gtg ttc aac tac aat aaa gcc act aag agg ctc			913	
Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu				
290	295	300		
aca gtc ctc gga aaa gat gca ggt gcg ctt act gaa gac cca gat gaa			961	
Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu				
305	310	315	320	20
ggt acg gct gga gta gaa tct gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta			1009	
Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu				
325	330	335		
ggt aaa gaa aac aag aga tat ggc cca gca cta agc atc aat gaa ctg			1057	
Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu				
340	345	350		
agc aaa ctt gca aaa ggg gag aaa gct aat gtg cta att ggg caa ggg			1105	
Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly				
355	360	365		
gac gtg gtg ttg gta atg aaa cg <sup>g</sup> aaa cgt gac tct agc ata ctt act			1153	30
Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr				
370	375	380		
gac agc cag aca g <sup>c</sup> acc aaa agg att cg <sup>g</sup> atg g <sup>c</sup> atc aat			1195	
Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn				
385	390	395		
tagtgtt <sup>g</sup> aaa ttgtt <sup>aaaa</sup> acgac <sup>tt</sup> ttgt ttctact			1232	
<210> 24				
<211> 398				
<212> PRT				
<213> Equine influenza virus H3N8				40
<400> 24				
Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala				
1	5	10	15	
Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser				
20	25	30		
Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys				
35	40	45		
Met Ile Gln Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn				
50	55	60		
Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp				50

65	70	75	80
Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val			
85	90	95	
Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met			
100	105	110	
Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser			
115	120	125	
Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg			
130	135	140	
Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr			10
145	150	155	160
Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp			
165	170	175	
Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile			
180	185	190	
Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr			
195	200	205	
Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro			
210	215	220	
Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln			20
225	230	235	240
Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys			
245	250	255	
Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe			
260	265	270	
Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val			
275	280	285	
Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu			
290	295	300	
Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu			30
305	310	315	320
Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu			
325	330	335	
Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu			
340	345	350	
Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly			
355	360	365	
Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr			
370	375	380	
Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn			40
385	390	395	
<210> 25			
<211> 1194			
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			
<400> 25			
gaattcacaa tggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagatgg 60			
attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattt ctgaagcaat aattgttagcc 120			
atgggtttt cgcaagaaga ttgcataata caagcagttt gaggcgattt gaacttcgtt 180			
aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt caaaaagat 240			50

gcaaaaagtgc tttccagaa ttggggatt gaacccatcg acaatgtgat ggaaatgatt 300  
 ggaatattgc ctgacatgac cccaaggcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtca 360  
 aaaatggag tggatgagta ctccagcaact gagagagtgg tggtagcat tgaccgttt 420  
 ttaagagttc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaaaca 480  
 caaggaacgg aaaagctgac aataatttcatcatcaa tgatgtgggat gattaatgg 540  
 cccgaatcag tggatgtaa tacttatcaa tggatcatca ggaactgggaa aattgtgaaa 600  
 attcaatggt cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660  
 tccttgtcc cttagggcac cagaagccaa tacagcggtt tcgtaagaac cctgtttcag 720  
 caaatgcgag atgtacttgg aacatttgat actgctcaaa taataaaaact cctcccttt 780  
 gccgctgctc ctccggaaaca gagtaggatg cagttctt cttgactgt taatgtaaga 840  
 gnatcggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tggtaactca caataaagcc 900  
 actaagaggc tcacagtccct cgaaaaagat gcaggtgcgc ttactgaaga cccagatgaa 960  
 ggtacggctg gagtagaaatc tgctgttcta agagggtttc tcattttagg taaagaaaaac 1020  
 aagagatatg gcccagcaact aagcatcaat gaactgagca aacttgcaaa aggggagaaaa 1080  
 gctaattgtgc taattggca aggggacgtg gtgttggtaa tgaaacggaa acgtgactct 1140  
 agcataactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggattc ggtggccat caat 1194  
 <210> 26  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 20  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     Primer  
 <400> 26  
 agcaaaaagca ggttagatatt gaa 23  
 <210> 27  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220> 30  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     Primer  
 <400> 27  
 agtagaaaaca aggtagtttt ttac 24  
 <210> 28  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 40  
     Primer  
 <400> 28  
 caggaaacag ctatgacc 18  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     Primer 50

<400> 29  
taatacgact cactataggg 20  
<210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 30 10  
tggtgacta gccagctg 18  
<210> 31  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 31  
ttgcctgtac catctgcc 18 20  
<210> 32  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 32  
agcaaaagca gggatattt ctg 23 30  
<210> 33  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 33  
atggataaaagggttttt taa 23  
<210> 34  
<211> 16 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 34  
gacatccctg actatg 16  
<210> 35  
<211> 16  
<212> DNA 50

<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 35  
gcatctgtta agtcaa 16  
<210> 36  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 36  
agcaaaaagca ggtcaaaat attca 25  
<210> 37  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220> 20  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 37  
gaaaacacca tggctacaat tattgc 26  
<210> 38  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer 30  
<400> 38  
agaattcaca atggtcggaa gaagagc 27  
<210> 39  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer 40  
<400> 39  
agtagaaaaca aggtcgaaaa taaacaa 27  
<210> 40  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer  
<400> 40 50

agccgtacct tcatctggg	19	
<210> 41		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 41		
agcactgaga gagtggtgg	19	10
<210> 42		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 42		
gtaagaggca attccccag	19	20
<210> 43		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 43		
cagctttcc gttccttg	18	

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 R 1/93 (2006.01) C 1 2 N 7/08  
C 1 2 R 1:93

(72)発明者 ドウリング パトリシア ダブリュー.  
アメリカ合衆国 15213 ペンシルベニア州 ピッツバーグ ベイヤード ロード 5 ア  
パートメント 220 アンバーソン タワーズ  
(72)発明者 ヤングナー ジュリウス エス.  
アメリカ合衆国 15217 ペンシルベニア州 ピッツバーグ マルボロ アベニュー 583  
1

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 國際公開第83/003556 (WO , A1 )  
J. Gen. Virol. , 1996年, Vol.77 , P.661-671  
Arch. Virol. , 1998年, Vol.143 , P.1585-1598  
J. Virol. , 1991年, Vol.65, No.10 , P.5491-5498  
J. Virol. , 1990年, Vol.64, No.10 , P.4893-4902

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/09  
A61K 39/145  
A61P 31/16  
C07K 14/11  
C12N 7/08  
C12R 1/93  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
PubMed