

(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 I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 7/08 (2006.01)

C 1 2 N 7/08

A 6 1 K 39/145 (2006.01)

A 6 1 K 39/145

A 6 1 P 31/16 (2006.01)

A 6 1 P 31/16

C O 7 K 14/11 (2006.01)

C O 7 K 14/11

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) 国際出願番号 PCT/US1999/018583  
 (87) 国際公開番号 W02000/009702  
 (87) 国際公開日 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 オブ ピッツバー  
 グ オブ ザ コモンウェルス システム  
 オブ ハイヤー エドゥケーション  
 アメリカ合衆国 1 5 2 6 0 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 9 1 1  
 (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 2 6 から約 3 0 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 ATCC VR 2 6 2 7 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。

【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 ATCC VR 2 6 2 7 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

10

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】

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。

【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】

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。

【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。

## 【請求項 15】

前記治療用組成物が、前記ウィルスを約  $10^5$  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

## 【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 から約 30 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  $10^5$  TCID<sub>50</sub> 単位から約  $10^8$  TCID<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 26】

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 27】

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 28】

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 29】

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 30】

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。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

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、リバーズ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。

## 【0002】

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/プラハ/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、近年ではユーラシア及び北アメリカ分離菌にさらに分化している。

## 【0003】

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

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型ウィ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型ウィルスは、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型ウィルスが、ヒトを野生型ウィ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型ウィルスが優性干渉表現型を有する、すなわち、これらのウィルスが、対応する親野生型系統及び異種インフルエンザA型ウィ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型ウィ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ィ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ィルスに与えるようなウマインフルエンザウィルスと、リバーシ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型ウィ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、リアソータントウィルスに与える。

#### 【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

の範囲で複製を行うインフルエンザウイルスである。本発明の低温適応性ウマインフルエンザウイルス、リアソータントインフルエンザA型ウイルス、又は遺伝子組換えウマインフルエンザウイルスは、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イルス、リアソータントインフルエンザA型ウイルス、又は遺伝子組換えウマインフルエンザウイルスは、このウイルスが、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 でプラークを形成するが、組織培養細胞内で、非許容温度約39 ではプ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イルスは、2つの突然変異を有する。第1の突然変異は、温度約39 でプラーク形成を阻害し、ウイ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分離する。第2の突然変異は、温度約39 で全てのウイ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イルスは、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 でプ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、プラークを形成せず、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イルスは、野生型ウマインフルエンザウイルスを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イ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イルスは、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、このようなウイルスは、親ウマインフルエンザウイルスまたは異種野生型インフルエンザA型ウイルスと共感染した場合に、これらのウイ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イルスの例は、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、及びこれらのウイルスの後代を含む。

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イルス、リアソータントインフルエンザA型ウイルス、又は遺伝子組換えウマインフルエンザウイルスを、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イルス、リアソータントインフルエンザA型ウイルス、又は遺伝子組換えウマインフルエンザウイ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一実施例は、低温適応性ウマインフルエンザウイ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イルスを継代培養する工程と、低温で生育するウイ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イルスの継代培養は、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。これらのようなり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。典型的なり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。

10

## 【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での増殖を含む。

## 【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。

20

## 【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表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てもよい。

30

## 【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ンクなど、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もよい。

40

## 【0020】

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 M a d i n D a r b y イヌ腎臓細胞 ( M D C K ) 中で、温度約 34 で一般にプラークを形成する。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。

#### 【 0 0 2 1 】

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。

#### 【 0 0 2 2 】

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。

#### 【 0 0 2 3 】

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



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、抑うつ、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。

#### 【 0 0 2 4 】

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プ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プ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わ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プ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プ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プ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プラークを形成しない。

#### 【 0 0 2 5 】

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、M D C K 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 / 9 1 ( H 3 N 8 ) と共感染した場合、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。

#### 【 0 0 2 6 】

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、M D C K 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もよい。これらの感染は全て、細胞当たり約 2 プラーク形成単位 ( p f u ) の感染多重度 ( M O I ) 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、複製プ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、非許容温度ではプ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プ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産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ィルス E I V - P 8 2 1 は、( a ) 例えば、ふ化鶏卵内で、温度約 2 6 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 3 7 では、組織培養細胞内でプ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 3 9 では、組織培養細胞中でプラーク形成及びいかなるウィルスタンパク質の合成も行わないことなどの温度感受性、( c ) ウマインフルエンザウィ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ィルス E I V - P 8 2 4 は、( a ) 例えば、ふ化鶏卵内で、温度約 2 8 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 3 9 では、組織培養細胞中でプラーク形成を行うことができないことなどの温度感受性、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ィルス E I V - M S V + 5 は、( a ) 例えば、温度約 2 6 で、ふ化鶏卵内で複製を行うことができることなどの低温適応性、( b ) 例えば、非許容温度約 3 9 では、組織培養細胞中でプラーク形成を行うことができないことなどの温度感受性、及び、( c ) ウマインフルエンザウィ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つの突然変異と相関する、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 3 9 でプ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ィルスゲノム中の、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 3 9 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、いかなるウィ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ィ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 3 9 でプラーク形成及びウィルスタンパク質の合成を阻害する

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℃で後期遺伝子を発現し及びプ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℃では、ふ化鶏卵内で複製を行い、温度約39℃では、プラーク形成もいかなるウィ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℃では、MDCK細胞でプラークを形成せず、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、特異なウィ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℃での全てのウィ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質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、ブダベスト条約に基づき、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

, et al., 同上、及び Palesse, 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ィルスであり、例えば、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、又は、受託番号 ATCC VR \_\_\_\_\_ で識別される EIV - MSV + 5 である。好適な受容インフルエンザ A 型ウィルスは、別のウマインフルエンザウィルス、例えば、A / ウマ / サフォーク / 89 (H3N8) などのユーラシア亜型 2 ウマインフルエンザウィルスまたは A / プラハ / 1 / 56 (H7N7) などの亜型 1 インフルエンザウィルスであってもよい。受容インフルエンザ A 型ウィルスもまた、供与低温適応性ウマインフルエンザウィルスを用いてリアソータントウィルスを作製することの可能な任意のインフルエンザ A 型ウィルスであってもよい。そのようなインフルエンザ A 型ウィルスの例には、A / プエルトリコ / 8 / 34 (H1N1)、A / 香港 / 156 / 97 (H5N1)、A / シンガポール / 1 / 57 (H2N2) 及び A / 香港 / 1 / 68 (H3N2) などのヒトインフルエンザウィルス、A / ブタ / アイオワ / 15 / 30 (H1N1) などのブタウィルス、及び A / マガモ / ニューヨーク / 6750 / 78 (H2N2) 及び A / ニワトリ / 香港 / 258 / 97 (H5N1) などの鳥ウィルスがあるが、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ィルスは、その結果得られるリアソータントインフルエンザウィルスが供与ウィルスの少なくとも 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。

【0034】

本発明のリアソータントウィルスの一例は、" 6 + 2 " リアソータントウィルスである。このウィルスの 6 つの「内部遺伝子分節」、すなわち、NP、PB2、PB1、PA、M 及び NS 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ィルスに由来し、また、このウィルスの 2 つの「外部遺伝子分節」、すなわち、HA 及び NA 遺伝子を持つ分節は、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。

【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ィルスを、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、リバーシ遺伝工学的方法を用いて野生型ウマインフルエンザウィルス株に再導入する。リバーシ遺伝工学的方法では、インフルエンザウィルスに感染した細胞から分離した RNA 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ィルスゲノム分節を転写し、この合成された RNA 分節を、ヘルパーウィルスを用いてウィルス粒子内に組み込み、所望の変化を含むウィルスを選別する。インフルエンザウィルスへのリバーシ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、Palesse, 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、所望のウィ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ボ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ィルスを作製できる。

【0036】

本発明の低温適応性ウマインフルエンザウィルスを、当業者に公知の標準的なウィルス学的方法を用いて増殖させてもよい。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ィルスを、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ィルスがその

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。

【0037】

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、ウィルスを含む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AF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、Directigen（登録商標）FLU 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。

【0038】

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。

【0039】

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。

【0040】

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、鬩鶏、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。

#### 【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。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。

#### 【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、リンゲル液、ブドウ糖液、ハックス液、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、ダイヤモンド・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。

#### 【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バントまたは担体を含有しても

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ィルス量である。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、これらの方法は、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、カニユ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もよい。

#### 【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もよい。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で、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ビ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。

#### 【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。

#### 【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、NP、PB2、PB1、PA、M及びNS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、HA及びNA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。

#### 【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EIV-P821から分離された核酸分子を含む。

#### 【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

10

20

30

40

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、 $nei_{wt}M_{1023}$ ,  $nei_{wt1}M_{1023}$ ,  $nei_{wt2}M_{1023}$ ,  $nei_{wt}M_{756}$ ,  $nei_{wt1}M_{756}$ ,  $nei_{wt2}M_{756}$ ,  $nei_{ca1}M_{1023}$ ,  $nei_{ca2}M_{1023}$ ,  $nei_{ca1}M_{756}$  及び/又は  $nei_{ca2}M_{756}$  であり、それらのコドン鎖は、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、 $nei_{wt}HA_{1762}$ ,  $nei_{wt}HA_{1695}$ ,  $nei_{ca1}HA_{1762}$ ,  $nei_{ca2}HA_{1762}$ ,  $nei_{ca1}HA_{1695}$  及び/又は  $nei_{ca2}HA_{1695}$  であり、それらのコドン鎖は、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、 $nei_{wt}PB2-N_{1241}$ ,  $nei_{wt}PB2-N_{1214}$ ,  $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$ ,  $nei_{ca2}PB2-N_{1241}$ ,  $nei_{ca1}PB2-N_{1214}$ ,  $nei_{ca2}$  及び/又は  $PB2-N_{1214}$  であり、それらのコドン鎖は、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、 $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$ ,  $nei_{wt2}PB2-C_{1232}$ ,  $nei_{wt}PB2-C_{1194}$ ,  $nei_{ca1}PB2-C_{1232}$ ,  $nei_{ca2}PB2-C_{1231}$  及び/又は  $nei_{ca1}PB2-C_{1194}$  であり、それらのコドン鎖は、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、 $nei_{wt}M_{1023}$ ,  $nei_{wt1}M_{1023}$ ,  $nei_{wt2}M_{1023}$ ,  $nei_{wt}M_{756}$ ,  $nei_{wt1}M_{756}$ ,  $nei_{wt2}M_{756}$ ,  $nei_{ca1}M_{1023}$ ,  $nei_{ca2}M_{1023}$ ,  $nei_{ca1}M_{756}$  及び/又は  $nei_{ca2}M_{756}$  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、 $Pei_{wt}M_{252}$ ,  $Pei_{ca1}M_{252}$  及び/又は  $Pei_{ca2}M_{252}$  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、newt HA<sub>1762</sub>, newt HA<sub>1695</sub>, newt HA<sub>1762</sub>, newt HA<sub>1762</sub>, newt HA<sub>1695</sub>及び/又はnewt 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、Pei HA<sub>565</sub>, Pei HA<sub>565</sub>及び/又はPei HA<sub>565</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、newt PB2-N<sub>1241</sub>, newt PB2-N<sub>1214</sub>, newt PB2-N<sub>1241</sub>, newt PB2-N<sub>1241</sub>, newt PB2-N<sub>1214</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、Pw PB2-N<sub>404</sub>, Pw PB2-N<sub>404</sub>及び/又はPw 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、newt PB2-C<sub>1233</sub>, newt PB2-C<sub>1232</sub>, newt PB2-C<sub>1194</sub>, newt PB2-C<sub>1232</sub>, newt PB2-C<sub>1231</sub>及び/又はnewt 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、Pw PB2-C<sub>398</sub>, Pw PB2-C<sub>398</sub>及び/又はPw 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。

#### 【0065】

核酸配列SEQ ID NO: 1は、ここでnewt M<sub>1023</sub>及びnewt M<sub>1023</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newt M<sub>1023</sub>及びnewt M<sub>1023</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: 7は、ここでnewt HA<sub>1762</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: 10は、ここでnewt HA<sub>1762</sub>及びnewt HA<sub>1762</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: 13は、ここでnewt 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。核酸分子SEQ ID NO: 16は、ここでne

10

20

30

40

50

$i_{c a 1} P B 2 - N_{1 2 4 1}$  及び  $n e i_{c a 2} P B 2 - N_{1 2 4 1}$  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  $n e i_{w t 1} P B 2 - C_{1 2 3 3}$  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  $n e i_{w t 2} P B 2 - C_{1 2 3 2}$  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  $n e i_{c a 1} P B 2 - C_{1 2 3 2}$  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。

10

#### 【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 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 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 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む。核酸分子を含む。

20

#### 【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, H A, 及び P B 2 - N, 及び P B 2 - 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, H A, P B 2 - N, P B 2 - C, P B 2 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, H A, P B 2 - N, P B 2 - C, P B 2 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。

30

#### 【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。

40

#### 【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・チャンバースより入手) 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 (p f u) の親ウマインフルエンザウィルスを含む約 0.1 ミリリットル (m l) の非希釈 A F 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

50

ュベータ内で、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、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、それ以降の継代培養では、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。

10

【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	

20

\*=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）ではプラーク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をプラークアッセイで約34で力価測定した。アッセイを行った個々のプラークのプラーク領域を周期的に切り出し、切り出した寒天培地を、MDC K細胞の単層を含有する96ウェルのトレイに置いて、当該プラーク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プラークの数を、プラーク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。

30

【0074】

【表2】

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

## 【 0 0 7 5 】

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EIV-P821を枝Bの継代49回目から選択し、また、クローンEIV-P824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、どちらの分離株のプラーク形成も、温度約39で阻害された。この温度では、タンパク質合成はEIV-P821では完全に阻害されたが、EIV-P824は通常のレベルのタンパク質合成を示した。加えて、EIV-P821のプラーク形成は、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、NPタンパク質合成は通常レベルであり、M1またはHA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、すべてのウィ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EIV-P821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EIV-P824は、ATCCに受託番号ATCC VR-\_\_\_\_\_で寄託されている。

20

30

## 【 0 0 7 6 】

C. 分離株EIV-P821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Palessé, et al., 同上、に説明されている。EIV-P821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EIV-P821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、MOI2、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、個々のプラークを約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、ウィ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HA、NP及びNS-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、これらの各ウィルスタンパク質は、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

40

50

で、少なくともHA、NP及びNS-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分離するか否かを調べることができる。EIV-P821のHA、NP及びNS-1タンパク質のそれぞれについて、a)非許容温度約39℃でのプラーク形成を阻害する、すなわち、CPE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。

【0077】

【表3】

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℃でのプ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>+</sup> <sup>1</sup>	ts <sup>-</sup> <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℃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℃でCPEを誘発する能力を阻害されるクローン分離株の数

【0078】

【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℃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>+</sup> <sup>1</sup>	ts <sup>-</sup> <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

1 温度約39℃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℃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

【0079】

検査の結果、ウマNP遺伝子と、非許容温度約39℃でEIV-P821のプ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、HA、NPまたはNS-1遺伝子のいずれについても、非許容温度約39℃でEIV-P821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EIV-P821のプ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。

【0080】

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/1/91(H3N8)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EIV-P821及びEIV-P824の優性干渉性表現型を、次の方法で測定した。MDC細胞の分離単層を、親ウィルスA/ケンタッキー/1/91(H3N8)にMOI2で単感染させるか、低温適応性ウィルスEIV-P821またはEIV-P824のいずれかに

10

20

30

40

50

MOI 2で単感染させるか、又は、これら親ウイルスと、低温適応性ウイルスの1つとにMOI 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34であった。感染後24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イルス産生を測定した。測定は、温度約34及び約39の複製プ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イルスEIV - P821またはEIV - P824が温度感受性であり、従って、非許容温度約39ではプラークを形成できないが、親ウイルスはいずれの温度でもプラークを形成できるため、これら低温適応性ウイルスの存在下でも親ウイ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イルスがこの親ウイルスの生育に及ぼす優性干渉作用を、約39で親ウイルスに単感染させた細胞のウイルス産出量と、二重感染させた細胞の親ウイルス産出量とを比較することにより、定量した。EIV - P821は、混合感染で、親ウイルスの産出量をおよそ200分の1まで減少させることができ、また、EIV - P824は、混合感染で、親ウイルスの産出量をおよそ3200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イルスEIV - P821及びEIV - P824が、両方とも優性干渉性表現型を発揮することを示した。

#### 【0081】

E・ウイルス分離株EIV - MSV + 5を、次の方法でEIV - P821から誘導した。EIV - P821を、上述の方法で卵内で1回継代培養し、ここでEIV - MSV0として表されるマスター・シード・ウイルス分離株を作製した。次に、EIV - MSV0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イルス分離株を、それぞれEIV - MSV + 1、EIV - MSV + 2、EIV - MSV + 3とした。EIV - MSV + 3を、次の方法で、MDCK細胞内でさらに2回継代培養した。MDCK細胞を、150 cm<sup>2</sup>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MEM組織培養培地で生育させた。次に、細胞を滅菌PBSで洗浄し、生育培地を、フラスコ当たり約8 mlの感染培地（ハンクス液、1 µg / mlのTPCKトリプシン溶液、0.125%のウシ血清アルブミン（BSA）及び10 mMのHEPESバッファからなるMEM組織培養培地）と取り替えた。MDCK細胞に、ウイルスEIV - MSV + 3（MDCK細胞の継代培養1回目）またはEIV - MSV + 3（MDCK細胞の継代培養2回目）から採取したウイルスストックを含有するAFを接種し、これらのウイルスを約34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PBSで洗浄し、フラスコ当たり約100 mlの感染培地を加えた。感染した細胞を、約34で24時間インキュベートした。フラスコを強く揺すって細胞単層を破碎することにより、ウイルス感染したMDCK細胞を採集し、ウイルス分離株EIV - MSV + 4（MDCK細胞の継代培養1回目）及びEIV - MSV + 5（MDCK細胞の継代培養2回目）を得た。

#### 【0082】

ウイルスEIV - MSV0及びEIV - MSV + 5の表現型を、上記セクションBで述べた方法で分析し、これらのウイルスが温度約34、約37及び約39でプラーク形成及びタンパク質合成を行う能力を測定した。EIV - MSV0及びEIV - MSV + 5は、いずれも温度約34では組織培養細胞内でプラークを形成したが、温度約39では、いずれのウイルス分離株も、プラーク形成または検出可能なウイルスタンパク質合成を行わなかった。ウイルスEIV - MSV0は、温度約37でEIV - P821と類似した温度感受性表現型を示した。すなわち、プ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、EIV - MSV + 5の場合は、その親ウイルスEIV - P821とは異なり、温度約37で、組織培地内でプラークを形成し、また、この温度で、全てのタンパク質を通常量合成した。ウイルスEIV - MSV + 5は、受託番号ATCC VR - \_\_\_\_\_でATCCに寄託されている。

#### 【0083】

##### 例2

本発明の治療用組成物を、次の方法で作製した。

#### 【0084】

A. E I V - P 8 2 1 の大量のストックを、次の方法で卵内で増殖させた。約 6 0 個の S P F 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 3 4 °C 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、ダイヤモンド・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、2 5 % V / V (安定化剤 / A F) で混合した。採取した A F を遠心分離管内でパッチにして、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、1 0 分間、1 0 0 0 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 - 7 0 °C で冷凍した。ウィルスストックを、M D C K 細胞中で、約 3 4 °C で、C P E 及びプ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、次の方法で M D C K 細胞内で増殖させた。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 . 0 0 5 p f u の範囲の M O I で接種し、ウィルスを約 3 4 °C 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 1 0 0 m l の感染培地を加えた。感染した細胞を、約 3 4 °C で 2 4 時間インキュベートした。フラスコを強く揺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 2 5 % 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、- 7 0 °C 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 . 1 2 5 % 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・カニユ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 3 0 分間及び約 4 時間後に観察した。これらの動物の、情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、顎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を行うための補助的アッセイ」(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価				
動物	HAI価(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価は、ウマインフルエンザウイ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イルス 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イルス 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イ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、ウイルス  $10^7$  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 のウイルスを、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、ウイ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

30

## 【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。

## 【0100】

例 3 に記載の方法で、ウイ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イルス 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イ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イルスを、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、ウイルスは 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、この方法でウイルスが分離されなかったことにより、ウイ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イルス分離

動物ID	ウイルス分離(ワクチン接種後日数)												
	経路	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
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イ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	HAI価(ワクチン接種後日数)					
	経路	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】

ワクチンウイ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イルス株A/ウマ/ケンタッキー/1/91 (H3N8) 10<sup>7</sup> 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イルスに対する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イ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、ワクチン接種されなかった4頭はいずれもウイルスを放散し、ウマインフルエンザウイ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イルスEIV-P821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イ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イルスEIV-P821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EIV-P821を、例2Aに記載の方法で卵内で生育させ、例2Cに記載した方法で、ウイルス $10^7$  pfu/水5ml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。

## 【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

## 【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。

## 【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+

＋ 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、EIV-P821を $10^7$  pfu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

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 1 1 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 1 1 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 1 0 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 1 0】

ワクチン接種後のウィルス分離

			ウィルス分離(ワクチン接種後日数)											
グループ	動物ID	運動	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	12	なし	—	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—
	16		—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	
	17		—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—
	165		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	688		—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—
2	7	あり	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	44		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	435		—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	907		—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
	968		—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—

20

【 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、1 4 日目、2 1 日目及び 2 8 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 1 1 に示す。

30

【 1 2 0 】

【表 1 1】

## ワクチン接種後及び90日目の攻撃後のHAI価

		ワクチン接種後日数									
グループ	動物ID	-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 $10^7$  pfuのウマインフルエンザウイルス株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イ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イ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イルスは、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、このウイルスが感染力を得るためには、ウイ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イ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中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イルスが選別されるかもしれないが、そのためにウイルスの感染力が影響を受けるかもしれない。なぜなら、ウイルスは、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、インビ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、ウィルスを 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ィルス調製物を、例 2 C で述べたように、ウィルス  $10^7$  p f u / B S A - M E M 溶液 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ィルスに対する H A I 価を、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。

#### 【 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 1 1 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 1 1 日間の毎日、鼻咽頭スワブを採取した。鼻スワブ中のウィルス物質の存在を、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により、測定した。検査したのは、ウィルスの存在についてのみであり、サンプル中のウィルスの力価については検査しなかった。ウィ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、1 4 日目、2 1 日目及び 2 8 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 価も表 1 2 に示す。

#### 【 0 1 2 8 】

#### 【表 1 2】

ワクチン接種後の H A I 価及びウィルス分離

グループ <sup>2</sup>	ID	HAI価(DPV <sup>3</sup> )					ウィルス分離 <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	-	EC	-	C	EC	EC	C	C	EC	-	-	-
	37	<10	40	160	160	160	-	EC	C	C	EC	C	C	C	-	-	-	-
	40	<10	20	80	160	80	-	EC	EC	C	-	C	EC	C	-	EC	EC	-
	41	<10	40	160	160	80	-	EC	EC	C	EC	C	EC	EC	-	-	-	-
2	32	<10	<10	80	80	40	-	EC	-	C	-	C	-	C	-	EC	-	-
	34	<10	20	160	160	160	-	EC	-	C	EC	C	EC	C	-	-	-	-
	35	<10	<10	80	80	40	-	EC	-	C	-	C	-	C	-	EC	-	-
	42	<10	<10	80	80	40	-	-	-	C	-	C	EC	EC	-	-	-	-

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

<sup>2</sup>グループ1: M D C K 細胞内で 5 回継代培養したウィルス;

グループ2: 卵内で 5 回継代培養したウィルス

<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ィ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ィルスを含有する治療用組成物の最小量を評価した。

## 【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む治療用組成物の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。様々な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-ml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

## 【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】



ワクチン接種後及び攻撃後の HAI 価、及び攻撃結果

投与量 TCID <sub>50</sub>		0 日目にワクチン接種、29 日目に攻撃								攻撃に よる 罹患
No.	単位	動物 ID	-1	7	14	21	28	35	42	+/-
1	2x10 <sup>7</sup>	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	2x10 <sup>6</sup>	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	2x10 <sup>5</sup>	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	2x10 <sup>4</sup>	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	<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 / 9 1 ( 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 m l 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 HAI 価が増加した 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  $2 \times 10^6$  TC 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のかもしれない。

【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 6 l o g 含む投与量 1 . 0 m l 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、死亡は突発的なものではなく、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ったので、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 m l 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価を確認した。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。

## 【 0 1 4 5 】

エアロゾル状態の攻撃ウィルスを、超音波ネブライザ（例えばデビルピス・モデル 0 9 9 H D , ペンシルベニア州サマセット、デビルピス・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 1 0 分間投与した。噴霧終了後さらに約 3 0 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 4 0 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。

## 【 0 1 4 6 】

この研究における統計手法には、すべて S A S（ノースカロライナ州ケアリー、S A S 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 1 7 8 日目（攻撃 3 日前）から 1 9 1 日目（攻撃後 1 0 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 1 0 日目までのデータを分析に使用し、表 1 5 に示す。

## 【 0 1 4 7 】

## 【表 1 5】

ワクチン接種ウマ及び対照ウマの日別温度（℃）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 (n=19)	ワクチン非接種 (n=10)	P 値
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
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
プーリングされた	0.27	0.38	
SEM*			

\*標準誤差

## 【 0 1 4 8 】

表 1 5 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。

## 【 0 1 4 9 】

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 <sup>+</sup>	1

10

20

<sup>+</sup>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について採点した。加えて、顎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	0.2015
2	15.1	14.9	0.9812
3	13.3	18.3	0.1331
4	13.5	17.9	0.1721
5	12.4	19.9	0.0237
6	12.7	19.4	0.0425
7	12.1	20.6	0.0074
8	12.6	19.6	0.0312
9	13.1	18.7	0.0729
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。

【 0 1 5 3 】

【表 1 8】

## 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
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

【 0 1 5 4 】

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 1 9 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 ( $P < 0.05$ )。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 5 】

【表 1 9】

攻撃後 1 日当たりのウィ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
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*

\*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順位合計検定（放散日）でも  $P < 0.05$  であった。

【 0 1 5 6 】

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。

【 0 1 5 7 】

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、攻撃後の複数の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ィ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。

【 0 1 5 8 】

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ィ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ィ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。

【 0 1 5 9 】

例 9

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を開示する。

【0160】

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（サスカチュワン大学、ヒューゴ・タウンSEND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。

【0161】

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[H3N8]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。

【0162】

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日目に行った。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った。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。

【0163】

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）。

【0164】

【表20】

10

20

30

ワクチン接種ウマ及び対照ウマの日別温度（℃）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 (n=10)	ワクチン非接種 (n=10)	P 値
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

#### 【 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）

攻撃後の日数	ワクチン接種 (n=10)	ワクチン非接種 (n=10)	P 値*
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

\*ウィルコクソン二標本検定による

#### 【 0 1 6 7 】



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日目にかけて採集した。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<sub>50</sub>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 low 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ー細胞培養アッセイ

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】

## 攻撃後ウィルスを放散していたウマのパーセントー卵感染性アッセイ

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。

## 【 0 1 7 1 】

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係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。

## 【 0 1 7 2 】

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、攻撃後の複数の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。

## 【 0 1 7 3 】

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。

## 【 0 1 7 4 】

## 例 1 0

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。

## 【 0 1 7 5 】

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・チャンパーズより入手）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。

## 【 0 1 7 6 】

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、

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、ケンタッキーノ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。このウイルス0.5mlを解凍し、次に滅菌リン酸緩衝生理食塩水4.5ml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。

【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。

【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】

## 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	
1	100.0	99.6	0.4	
2	103.9	100.2	3.7	
3	99.8	99.2	0.6	10
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

## 【 0 1 8 3 】

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。

## 【 0 1 8 4 】

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。

## 【 0 1 8 5 】

## 【表26】

## 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	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	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

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w584及びw585から、PCR増幅により、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。neiw t 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増幅により、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。シーケンシング用の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、PRISM<sup>TM</sup> ダイ・ターミネータ・サイクル・シーケンシング・レディ・リアクション・キット、PRISM<sup>TM</sup> dRh oダミン・ターミネータ・サイクル・シーケンシング・レディ・リアクション・キット、またはPRISM<sup>TM</sup> BigDye<sup>TM</sup> ターミネータ・サイクル・シーケンシング・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w584とw585、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<sup>TM</sup> モデル377、XLアップグレードDNAシーケンサを使用して、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neiw t M<sub>1023</sub>が、ここではPeiw t 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。Peiw t M<sub>252</sub>をコードする領域は、neiw t 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。neiw t<sub>1</sub> M<sub>1023</sub>のヌクレオチド663、すなわち、neiw t<sub>1</sub> M<sub>756</sub>のヌクレオチド649は、アデニンであるが、neiw t<sub>2</sub> M<sub>1023</sub>のヌクレオチド663、すなわち、neiw t<sub>2</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 Peiw t 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、neic a<sub>1</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増幅により作製し、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 1 1 A 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ケンスを行った。S E Q I D N O : 4 を翻訳すると、核酸分子  $n e i_{c a 1} M_{1023}$  が、ここでは  $P e i_{c a 1} M_{252}$  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。  $P e i_{c a 1} M_{252}$  をコードする領域は、  $n e i_{c a 1} M_{756}$  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、  $n e i_{c a 1} M_{1023}$  と同一の分子  $n e i_{c a 2} M_{1023}$ 、及び  $n e i_{c a 1} M_{756}$  と同一の分子  $n e i_{c a 2} M_{756}$  を作製した。

10

## 【 0 1 9 5 】

C .  $n e i_{w t} M_{1023}$  ( S E Q I D N O : 1 ) と  $n e i_{c a 1} M_{1023}$  ( 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  $P e i_{w t} M_{252}$  ( S E Q I D N O : 2 ) と  $P e i_{c a 1} M_{252}$  ( 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。

20

## 【 0 1 9 6 】

## 例 1 2

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。

## 【 0 1 9 7 】

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 : 32 及び S E Q I D N O : 33 のプライマ w 578 及び w 579 から、 P C R 増幅により、ウマ H A 遺伝子を含む P C R 産物を作製した。  $n e i_{w t} H A_{1762}$  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 産物を鋳型として作製し、例 1 1 A 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 1 1 A に記載した方法で精製及び配列決定した。ただし、シーケンシングキットで使用したプライマは、例 1 1 A 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 : 34 で表される H A - 1 及び S E Q I D N O : 35 で表される H A - 2 を使用した。

30

40

## 【 0 1 9 8 】

S E Q I D N O : 7 を翻訳すると、核酸分子  $n e i_{w t} H A_{1762}$  が、ここでは  $P e i_{w t} H A_{565}$  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。  $P e i_{w t} H A_{565}$  をコードする領域は、  $n e i_{w t} H A_{1695}$  で表されるが、こ

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、*nei<sub>c a 1</sub>HA<sub>1 7 6 2</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ケンスを、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*nei<sub>c a 1</sub>HA<sub>1 7 6 2</sub>*が、ここでは*Pei<sub>c a 1</sub>HA<sub>5 6 5</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。*Pei<sub>c a 1</sub>HA<sub>5 6 5</sub>*をコードする領域は、*nei<sub>c a 1</sub>HA<sub>1 6 9 5</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の核酸分子を同じ方法でPCR増幅し、*nei<sub>c a 1</sub>HA<sub>1 7 6 2</sub>*と同一の分子 *nei<sub>c a 2</sub>HA<sub>1 7 6 2</sub>*、及び*nei<sub>c a 1</sub>HA<sub>1 6 9 5</sub>*と同一の分子*nei<sub>c a 2</sub>HA<sub>1 6 9 5</sub>*を作製した。

【0202】

C. *nei<sub>w t</sub>HA<sub>1 7 6 2</sub>* (SEQ ID NO: 7)と*nei<sub>c a 1</sub>HA<sub>1 7 6 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*Pei<sub>w t</sub>HA<sub>5 6 5</sub>* (SEQ ID NO: 8)と*Pei<sub>c a 1</sub>HA<sub>5 6 5</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: 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。*nei<sub>w t</sub>PB2-N<sub>1 2 4 1</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PCR増幅により、上述のPCR産物を鋳型として作製し、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11Bに記載した方法で精製及び配列決定した。ただし、シーケンシングキットで使用したプライマは、T7及びREVのみであった。

#### 【0205】

SEQ ID NO: 13を翻訳すると、核酸分子 $ne i_{wt} PB2 - N_{1241}$ が、ここでは $P_{wt} PB2 - N_{404}$ 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PB2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: 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SEQ ID NO: 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。 $P_{wt} PB2 - N_{404}$ をコードする領域は、 $ne i_{wt} PB2 - N_{1214}$ で表されるが、この領域は、SEQ ID NO: 13のヌクレオチド28から1239までにあるコドン鎖を有し、SEQ ID NO: 15で表される。

10

#### 【0206】

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PB2-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、 $ne i_{ca1} PB2 - N_{1241}$ で表され、SEQ ID NO: 16で表されるコドン鎖を有するが、この核酸分子を、例12Aに記載した方法で作製した。

#### 【0207】

SEQ ID NO: 16を翻訳すると、核酸分子 $ne i_{ca1} PB2 - N_{1241}$ が、ここでは $Pe i_{ca1} PB2 - N_{404}$ 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PB2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SEQ ID NO: 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SEQ ID NO: 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。 $Pe i_{ca1} PB2 - N_{404}$ をコードする領域は、 $ne i_{ca1} PB2 - N_{1214}$ で表されるが、この領域は、SEQ ID NO: 16のヌクレオチド28から1239にあるコドン鎖を有し、SEQ ID NO: 18で表される。

20

#### 【0208】

低温適応性ウマインフルエンザPB2-Nタンパク質をコードする第2の核酸分子を同じ方法でPCR増幅し、 $ne i_{ca1} PB2 - N_{1241}$ と同一の分子 $ne i_{ca2} PB2 - N_{1241}$ 、及び $ne i_{ca1} PB2 - N_{1214}$ と同一の分子 $ne i_{ca2} PB2 - N_{1214}$ を作製した。

30

#### 【0209】

C.  $ne i_{wt} PB2 - N_{1241}$  (SEQ ID NO: 13)と $ne i_{ca1} PB2 - N_{1214}$  (SEQ ID NO: 16)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370のTがC。タンパク質 $P_{wt} PB2 - N_{404}$  (SEQ ID NO: 14)と $P_{ca1} PB2 - N_{404}$  (SEQ ID NO: 17)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PB2タンパク質(RNA依存RNA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PB2-C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: 38及びSEQ ID NO: 39で表されるプライマw5

50

72及びw573から、PCR増幅により、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>w</sub>t 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増幅により、上述のPCR産物を鋳型として作製し、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、シーケ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。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>w</sub>t<sub>1</sub> PB2-C<sub>1233</sub>が、ここではP<sub>w</sub>t 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>w</sub>t PB2-C<sub>398</sub>をコードする領域は、nei<sub>w</sub>t 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増幅し、nei<sub>w</sub>t<sub>2</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>w</sub>t<sub>2</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>w</sub>t<sub>1</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>w</sub>t<sub>1</sub> PB2-C<sub>1233</sub>が、P<sub>w</sub>t 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>w</sub>t<sub>2</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>c</sub>a<sub>1</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>c</sub>a<sub>1</sub> PB2-C<sub>1232</sub>が、ここではP<sub>c</sub>a<sub>1</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>c</sub>a<sub>1</sub> PB2-C<sub>398</sub>をコードする領域は、nei<sub>c</sub>a<sub>1</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増幅し、neica<sub>1</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neica<sub>2</sub>PB2-C<sub>1231</sub>、及びneica<sub>1</sub>PB2-N<sub>1214</sub>と同一の分子neica<sub>2</sub>PB2-N<sub>1214</sub>を作製した。

【0217】

C.nei<sub>w t 1</sub>PB2-C<sub>1233</sub>(SEQ ID NO: 19)とneica<sub>1</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>w t</sub>PB2-C<sub>398</sub>(SEQ ID NO: 20)とP<sub>c a 1</sub>PB2-<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

gcaaaagcag 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 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		
ggg 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			20
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 tgc agt gag cag gca gca gag	627			
Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu				30
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 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 gttattgcag caagtatcat tgggatcttg	820			
Arg Phe Lys				
250				
cacttgatat tgtggattct tgatcgccctt ttcttcaaatt tcatttatcg tcgccttaaa	880			
tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat	940			
cggcaggaac agcagaatgc tgtggatgtt gacgatggtc attttgtcaa catagagctg	1000			
gagtaaaaaa ctaccttggt tct	1023			
<210> 2				
<211> 252				
<212> PRT				50

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;400&gt; 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  
 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  
 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 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  
 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

10

20

30

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 756

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;400&gt; 3

atgagtcttc tgaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcgtaccatc aggccccctc 60  
 aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120  
 gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggatttta 180  
 ggattcgtat tcacgctcac cgtgccaggt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240  
 caaaatgccc ttagtggaac cgagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaactgtac 300  
 aggaagctta aaagagaaat aacattccat ggggcaaaag aggtggcact cagctattcc 360  
 actggtgcac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatgggaac tgtgacaacc 420  
 gaagtggcat ttggcctggt 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

40

50

```

accacccta gctccagtgc cggtttgaaa gatgatctcc ttgaaaattt gcaggcctac 720
cagaaacgga tgggagtgc aatgcagcga ttcaag 756
<210> 4
<211> 1023
<212> DNA
<213> Equine influenza virus H3N8
<220>
<221> CDS
<222> (25)..(780)
<400> 4
gcaaaagcag gtagatatatt 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
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 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 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 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

```

10

20

30

40

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 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  
 cga ttc aag tgatcctctc gttattgcag caagtatcat tgggatcttg 820  
 Arg Phe Lys  
 250  
 cacttgatat tgtggattct tgatcgccctt ttcttcaaatttcatttatcg tgccttaaa 880  
 tacggcttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat 940  
 cggcaggaac agcagaatgc tgtggatgtt gacgatggtc attttgtcaa catagagctg 1000  
 gagtaaaaaa ctaccttggt tct 1023  
 <210> 5  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Equine influenza virus H3N8  
 <400> 5

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  
 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  
 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

10

20

30

40

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	cgaaacgtac	gttctctcta	tcttaccatc	aggccccctc	60	
aaagccgaga	tcgcgcagag	acttgaagat	gtctttgcag	ggaagaacac	cgatcttgag	120	
gcactcatgg	aatggctaaa	gacaagacca	atcctgtcac	ctctgactaa	agggatttta	180	10
ggattcgtat	tcacgctcac	cgtgcccagt	gagcgaggac	tgcagcgtag	acgctttgtc	240	
caaaatgccc	ttagtgga	cgagatcca	aacaacatgg	acagagcagt	aaaactgtac	300	
aggaagctta	aaagagaaat	aacattccat	ggggcaaaag	aggtggcact	cagctattcc	360	
actggtgcac	tagccagctg	catgggactc	atatacaaca	gaatgggaac	tgtgacaacc	420	
gaagtggcat	tggcctgggt	atgcgccaca	tgtgaacaga	tcgctgattc	ccagcatcga	480	
tctcacaggc	agatggtgac	aataaccaac	ccattaatca	gacatgaaaa	cagaatggta	540	
ttagccagta	ccacggctaa	agccatggag	cagatggcag	ggtcgagtga	gcaggcagca	600	
gaggccatgg	aggttgctag	taaggctagg	cagatggtac	aggcaatgag	aaccattggg	660	
accacccta	gctccagtgc	cggtttgaaa	gatgatctcc	ttgaaaattt	gcaggcctac	720	
cagaaacgga	tgggagtgca	aatgcagcga	ttcaag			756	20

<210> 7

<211> 1762

<212> DNA

<213> Equine influenza virus H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (30)..(1724)

<400> 7

agcaaaagca	ggggatattt	ctgtcaatc	atg aag aca	acc att att	ttg ata	53	
			Met Lys Thr	Thr Ile Ile	Leu Ile		30
			1	5			
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	ggg	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		10
		155					160				165						
cta	aca	gaa	tct	gga	aac	tct	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					20
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	ggg	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	30
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		40
		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					50

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		
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 agg 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	10
Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala		
425 430 435 440		
gaa ttg ctg gtg gct cta aaa aat caa cat aca att gac tta aca gat	1397	
Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys 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	20
Asn Ala Glu Asp Met Gly 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	
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		30
ata tca tgc ttc tta att tgc gtt 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		
540 545 550		
gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgagtaaact	1734	
Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile		
555 560 565		
gatagttaaaa 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  
 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  
 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  
 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 Lys Asn  
 435 440 445  
 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu  
 450 455 460

10

20

30

40

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

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1695

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;400&gt; 9

atgaagacaa ccattatattt gataccactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60  
 agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggacattg 120  
 gtaaaaacaa taactgatga ccaaattgag gtgacaaatg ctactgaatt agttcagagc 180  
 atttcaatag ggaaaatatg caacaactca tatagagttc tagatggaag aaattgcaca 240  
 ttaatagatg caatgctagg agacccccac tgtgatgtct ttcagtatga gaattgggac 300  
 ctcttcatag aaagaagcag cgctttcagc agttgctacc catatgacat ccctgactat 360  
 gcatcgctcc ggtccattgt agcatcctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420  
 acatggacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaagggg atcagccgat 480  
 agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttacc cacttgaat 540  
 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca tctgggggat tcatcaccgc 600  
 agtcaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaagaat cgggacgagt aacagtctca 660  
 acaaaaagaa gtcaacaaac aataatccct aacatcggat ctagaccgcg ggtcaggggt 720  
 caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaaac ctggagatat cctaatagata 780  
 aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatatttta aattgaaaac agggaaaagc 840  
 tctgtaatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaaat 900  
 ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960  
 cccaagtata tcaggcaaaa cactttaaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020  
 aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg ctgggaagga 1080  
 atggttgatg ggtggtatgg attccgatat caaaactcgg aaggaacagg acaagctgca 1140  
 gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgatt 1200  
 gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaat tctcagaagt agaagggagg 1260  
 atccaggact tggagaagta ttagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca 1320  
 gaattgctgg tggctctaaa aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaaatgaat 1380  
 aaattattcg agaagactag acgccagtta agagaaaacg cggaagacat gggaggtgga 1440  
 tgtttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattg gatcaataag aaatgggaca 1500  
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacaacc ggtttcaa atcaaagggtgtt 1560  
 gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt cattcgccat atcatgcttc 1620  
 ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcatt atgtgggctt gccaaaaagg caacatcaga 1680  
 tgcaacattt gcatt 1695

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1762

10

20

30

40

50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (30)..(1724)

&lt;400&gt; 10

```

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

cta ctg 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 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

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 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 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

cta aca gaa tct gga aac tct 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 tca 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 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 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	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			20
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	1205			
Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile				30
380	385	390		
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	440	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 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 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 tgagtaaact	1734
Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile	
555 560 565	
gatagttaaaa 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	30
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	
Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ser Cys Lys Arg Glu Ser Ala Asp	
145 150 155 160	40
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	
Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly	
225 230 235 240	50

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 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

10

20

30

40

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1695

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;400&gt; 12

atgaagacaa ccattatittt gatactactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60  
 agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggaacattg 120  
 gtaaaaacaa taactgatga ccaaattgag gtgacaaatg ctactgaatt agttcagagc 180

50



atttcaatag ggaaaatatg caacaactca tatagagttc tagatggaag aaattgcaca 240  
 ttaatagatg caatgctagg agacccccac tgtgatgtct ttcagtatga gaattgggac 300  
 ctcttcatag aaagaagcag cgctttcagc agttgctacc catatgacat ccctgactat 360  
 gcatcgctcc ggtccattgt agcatcctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420  
 acatggacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaagga atcagccgat 480  
 agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttacc cacttgaat 540  
 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactatata tctgggggat tcatcaccgc 600  
 agtcaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaagaat caggacgagt aacagtctca 660  
 aaaaaagaa gtcaacaaac aataatccct aacatcggat ctagaccgtg ggtcaggggt 720  
 caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaaac ctggagatat cctaacgata 780  
 aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatatttta aattgaaaac agggaaaagc 840  
 tctgtaatga gatcagatgc acccatagac atttgttgtt ctgaatgtat tacaccaa 900  
 ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960  
 cccaagtata tcaggcaaaa cactttaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020  
 aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg ctgggaagga 1080  
 atggttgatg ggtggtatgg attccgatat caaaactcgg aaggaacagg acaagctgca 1140  
 gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgatt 1200  
 gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaat tctcagaagt agaagggaga 1260  
 atccaggact tggagaagta tgtagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca 1320  
 gaattgctgg tggctctaga aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaatgaat 1380  
 aaattattcg agaagactag acgccagtta agagaaaacg cggaagacat gggagggtgga 1440  
 tgtttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattg gatcaataag aaatgggaca 1500  
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacaacc ggtttcaaat caaagggtgtt 1560  
 gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt cattcgccat atcatgcttc 1620  
 ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcatt atgtgggctt gccaaaaagg caacatcaga 1680  
 tgcaacattt gcatt 1695

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1241

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (28)..(1239)

&lt;400&gt; 13

agcaaaagca 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

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

10

20

30

40

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	10	
			125						130					135			
caa	gtc	aag	ata	aga	cgg	aga	gtt	gat	gta	aac	cct	ggt	cac	gcg	gac	486	
Gln	Val	Lys	Ile	Arg	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	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	30
Leu	Thr	Gln	Gly	Thr	Cys	Trp	Glu	Gln	Met	Tyr	Thr	Pro	Gly	Gly	Glu		
			235						240					245			
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	ggc	gga	ata	agg	atg	gta	gac	atc	918	
Glu	Met	Cys	His	Ser	Thr	Gln	Ile	Gly	Gly	Ile	Arg	Met	Val	Asp	Ile	40	
			285						290					295			
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	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  
 340 345 350  
 Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly 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

10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1214

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;400&gt; 15

atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcacccg cgagatacta 60  
 aaaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120  
 aagaaccccg cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagat 180  
 aagaggataa tggaaatgat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa 240  
 acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgac atggtggaat 300  
 aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tctacaaaac ttattttgaa 360  
 aaagttagaa gattaaaaca cggaaccttt ggccccgttc attttagtaa tcaagtcaag 420  
 ataagacgga gagttgatgt aaaccctggt cacgcggacc tcagtgcaa agaagcacia 480  
 gatgtgatca tgggaagtgt tttcccaaat gaagtgggag ccagaattct aacatcgga 540  
 tcacaactaa caataaccaa agagaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600  
 ttgatggtag catacatgct agaaagagag ttggtccgaa aaacaagatt cctcccagtg 660  
 gctggcggaa caagcagtgt atacattgaa gtgttgatc tgactcaggg aacatgctgg 720  
 gaacaaatgt acaccccgagg aggagaagtt agaaacgatg acattgatca aagtttaatt 780  
 attgtgccc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcag cagatccact agcatccctg 840  
 ctggaaatgt gccacagtac acagattggt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900  
 aatccaacag aggaacaagc tgtggatata tgcaaagcag caatgggggtt aagaattagc 960  
 tcatcattca gctttggtgg attcaccttt aagagaacaa gtggatcatc agtcaagaga 1020  
 gaagaagaaa tgcttacggg caaccttcaa acattgaaaa taagagtgca tgaaggctat 1080  
 gaagaattca caatggtcgg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140  
 ttgattcaat tgatagtaag tgggagagat gaacaatcaa ttgctgaagc aataattgta 1200  
 gccatggtgt ttcc 1214

30

40

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 1241

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

50

&lt;222&gt; (28)..(1239)

&lt;400&gt; 16

agcaaaagca 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

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

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 cac aaa act tat ttt gaa aaa 390

Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro Lys Val His 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

caa gtc aag ata aga cgg aga gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac 486

Gln Val Lys Ile Arg 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

acc aaa gag aaa aaa gaa gaa ctt cag gac tgc aaa att gcc ccc ttg 630

Thr Lys Glu Lys 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

10

20

30

40

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 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		
acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa ata aga gtg cat gaa ggc tat gaa	1110	20
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	
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  
 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  
 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 Gly 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

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1214

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Equine influenza virus H3N8

&lt;400&gt; 18

atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcacccg cgagatacta 60  
 acaaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120  
 aagaaccccg cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagat 180  
 aagaggataa tggaaatgat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa 240  
 acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgac atggtggaat 300  
 agaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tccacaaaac ttattttgaa 360  
 aaagttagaa gattaaaaca cggaaccttt ggccccgttc attttaggaa tcaagtcaag 420  
 ataagacgga gagttgatgt aaaccttggt cacgcggacc tcagtgccaa agaagcacia 480  
 gatgtgatca tggaagttgt tttcccaa at gaagtgggag ccagaattct aacatcgga 540

10

20

30

40

50

tcacaactaa caataaccaa agagaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600  
 ttgatggttag catacatgct agaaagagag ttggtccgaa aaacaagatt cctcccagtg 660  
 gctggcggaa caagcagtggt atacattgaa gtgttgcac tgactcaggg aacatgctgg 720  
 gaacaaatgt acaccccagg aggagaagtt agaaacgatg acattgatca aagtttaatt 780  
 attgctgccc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcag cagatccact agcatccctg 840  
 ctggaaatgt gccacagtac acagattggt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900  
 aatccaacag aggaacaagc tgtggatata tgcaaagcag caatgggggtt aagaattagc 960  
 tcatcattca gctttggtgg attcaccttt aagagaacaa gtggatcacc agtcaagaga 1020  
 gaagaagaaa tgcttacggg caaccttcaa acattgaaaa taagagtgc tgaaggctat 1080  
 gaagaattca caatgggtcgg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140  
 ttgattcaat tgatagtaag tgggagagat gaacaatcaa ttgctgaagc aataattgta 1200  
 gccatggtgt tttc 1214

<210> 19

<211> 1233

<212> DNA

<213> Equine influenza virus H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(1196)

<400> 19

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

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

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 gtg agc att gac cgt ttt tta aga gtt 431

Ser Ser Thr Glu Arg Val 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

10

20

30

40

50



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	20
Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln		
260 265 270		
ttc tct tct ttg act gtt aat gta aga gga tgc 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		
tagtgttgaa ttgttttaaaa acgaccttgt ttctact	1233	
<210> 20		
<211> 398		
<212> PRT		
<213> Equine influenza virus H3N8		50

&lt;400&gt; 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  
 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  
 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  
 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  
 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

10

20

30

40

50

385	390	395	
<210> 21			
<211> 1194			
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			
<400> 21			
gaattcaca	tggtcgaag	aagagcaaca	gccatttctca gaaaggcaac cagaagattg 60
attcaattga	tagtaagtgg	gagagatgaa	caatcaattg ctgaagcaat aattgtagcc 120
atggtgtttt	cgcaagaaga	ttgcatgata	aaagcagttc gaggcgattt gaacttcgtt 180
aatagagcaa	atcagcgctt	gaaccccatg	catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240
gcaaaagtgc	ttttccagaa	ttgggggatt	gaaccccatcg acaatgtgat gggaatgatt 300
ggaatatgtc	ctgacatgac	cccaagcacc	gagatgtcat tgagaggagt gagagtcagc 360
aaaatgggag	tggatgagta	ctccagcact	gagagagtgg tggtagcat tgaccgtttt 420
ttaagagttc	gggatcaaag	gggaaacata	ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaacaa 480
caaggaacgg	aaaagctgac	aataatttat	tcatcatcaa tgatgtggga gattaatgg 540
cccgaatcag	tgttgggtcaa	tacttatcaa	tggatcatca ggaactggga aattgtgaaa 600
attcaatggg	cacaggatcc	cacaatgtta	tacaataaga tagaatttga gccattccag 660
tccctgggtc	ctagggccac	cagaagccaa	tacagcgttt tcgtaagaac cctgttttcag 720
caaatgcgag	atgtacttgg	aacatttgat	actgctcaaa taataaaact cctccctttt 780
gccgtgctc	ctccggaaca	gagtaggatg	cagttctctt ctttgactgt taatgtaaga 840
ggatcgggaa	tgaggatact	tgtagaggc	aatccccag tgttcaacta caataaagcc 900
actaagaggc	tcacagtcct	cggaaaggat	gcagggtgcg ttactgaaga cccagatgaa 960
ggtacggctg	gagtagaatc	tgtgtttcta	agagggtttc tcattttagg taaagaaaac 1020
aagagatatg	gcccagcact	aagcatcaat	gaactgagca aacttgcaa aggggagaaa 1080
gctaattgtc	taattgggca	aggggacgtg	gtgttggtaa tgaaacggaa acgtgactct 1140
agcatactta	ctgacagcca	gacagcgacc	aaaaggattc ggatggccat caat 1194
<210> 22			
<211> 1232			
<212> DNA			
<213> Equine influenza virus H3N8			
<400> 22			
agaattcaca	atggtcggaa	gaagagcaac	agccatttctc agaaaggcaa ccagaagatt 60
gattcaattg	atagtaagtg	ggagagatga	acaatcaatt gctgaagcaa taattgtagc 120
catggtgttt	tcgcaagaag	attgcatgat	aaaagcagtt cgaggcgatt tgaacttcgt 180
taatagagca	aatcagcgct	tgaaccccat	gcatcaactc ttgaggcatt tccaaaaaga 240
tgcaaaaagt	cttttccaga	attgggggat	tgaacccatc gacaatgtga tgggaatgat 300
tggaaatatg	cctgacatga	cccaagcac	cgagatgtca ttgagaggag tgagagtcag 360
caaaatggga	gtggatgagt	actccagcac	tgagagagtg gtggtgagca ttgaccgttt 420
tttaagagtt	cgggatcaaa	ggggaaacat	actactgtcc cctgaagagg tcagtgaaac 480
acaaggaacg	gaaaagctga	caataattta	ttcatcatca atgatgtggg agattaatgg 540
tcccgaatca	gtgttgggtc	atacttatca	atggatcatc aggaactggg aaattgtgaa 600
aattcaatgg	tcacaggatc	ccacaatgtt	atacaataag atagaatttg agccattcca 660
gtccctgggc	cctagggcca	ccagaagcca	atacagcggc ttcgtaagaa ccctgtttca 720
gcaaatgcga	gatgtacttg	gaacatttga	tactgtctaa ataataaaac tcctcccttt 780
tgccgtgct	cctccggaac	agagtaggat	gcagttctct tctttgactg ttaatgtaag 840
aggatcggga	atgaggatac	ttgtaagagg	caattcccca gtgttcaact acaataaagc 900
cactaagagg	ctcacagtcc	tcggaaagga	tgcagggtcg ctactgaag acccagatga 960
aggtacggct	ggagtagaat	ctgctgttct	aagagggttt ctcattttag gtaaaagaaa 1020
caagagatat	ggccagcac	taagcatcaa	tgaactgagc aaacttgcaa aaggggagaa 1080
agctaattgt	ctaattgggc	aaggggacgt	ggtgttggta atgaaacgga aacgtgactc 1140

tagcatactt actgacagcc agacagcgac caaaaggatt cggatggcca tcaattagtg 1200  
 ttgaattgtt taaaaacgac ctgttttcta 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

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

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 Gly Val Asp Glu Tyr Ser

115

120

125

agc act gag aga gtg gtg gtg agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg 433

Ser Thr Glu Arg Val 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

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 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

20

30

40

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	ggc	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	ggc	gca	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
ggc	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			
ggc	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	cgg	aaa	cgt	gac	tct	agc	ata	ctt	act	1153	30
Asp	Val	Leu	Val	Met	Lys	Arg	Lys	Arg	Asp	Ser	Ser	Ile	Leu	Thr			
				370					375					380			
gac	agc	cag	aca	gca	acc	aaa	agg	att	cgg	atg	gcc	atc	aat			1195	
Asp	Ser	Gln	Thr	Ala	Thr	Lys	Arg	Ile	Arg	Met	Ala	Ile	Asn				
				385					390					395			
tagt	gttgaa	ttgttt	aaaa	acgac	cttgt	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	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		
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		
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		
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				
385					390					395							

10

20

30

40

<210> 25

<211> 1194

<212> DNA

<213> Equine influenza virus H3N8

<400> 25

gaattcacaa tggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagattg 60  
attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattg ctgaagcaat aattgtagcc 120  
atgggtgttt cgcaagaaga ttgcatgata caagcagttc gaggcgattt gaacttcgtt 180  
aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt ccaaaaaaat 240

50

gcaaaagtgc ttttccagaa ttgggggatt gaacccatcg acaatgtgat gggaatgatt 300  
 ggaatatgtc ctgacatgac cccaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtcagc 360  
 aaaatgggag tggatgagta ctccagcact gagagagtgg tggtagcat tgaccgtttt 420  
 ttaagagttc gggatcaaag gggaacata ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaacaa 480  
 caaggaacgg aaaagctgac aataatttat tcatcatcaa tgatgtggga gattaatgg 540  
 cccgaatcag tgttgggtcaa tacttatcaa tggatcatca ggaactggga aattgtgaaa 600  
 attcaatggc cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660  
 tccctgggtc ctagggccac cagaagccaa tacagcgggt tcgtaagaac cctgtttcag 720  
 caaatgagag atgtacttgg aacatttgat actgctcaa taataaaact cctccctttt 780  
 gccgtgctc ctccggaaca gagtaggatg cagttctctt ctttgactgt taatgtaaga 840  
 ggatcgggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tgttcaacta caataaagcc 900  
 actaagaggc tcacagtcct cggaaaagat gcaggtgcgc ttactgaaga cccagatgaa 960  
 ggtacggctg gagtagaatc tgctgttcta agagggtttc tcatttttagg taaagaaaac 1020  
 aagagatatg gccagcact aagcatcaat gaactgagca aacttgcaaa aggggagaaa 1080  
 gctaattgtc taattgggca aggggacgtg gtgttggtta tgaaacggaa acgtgactct 1140  
 agcatactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggattc ggatggccat caat 1194

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Primer

<400> 26

agcaaaagca ggtagatatt gaa 23

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Primer

<400> 27

agtagaaaca aggtagtttt ttac 24

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Primer

<400> 28

caggaaacag ctatgacc 18

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Primer

10

20

30

40

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
tggtgcacta gccagctg	18	
<210> 31		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 31		20
ttgcctgtac catctgcc	18	
<210> 32		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 32		30
agcaaaagca ggggatattt ctg	23	
<210> 33		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 33		40
agtagaaaca aggggtgtttt taa	23	
<210> 34		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 34		50
gacatccctg actatg	16	
<210> 35		
<211> 16		
<212> DNA		



<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  
 agcaaaagca ggtcaaatat 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 30  
     Primer  
 <400> 38  
 agaattcaca atggtcggaa gaagagc 27  
 <210> 39  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 40  
     Primer  
 <400> 39  
 agtagaaaca aggtcgtttt taaacaa 27  
 <210> 40  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
     Primer  
 <400> 40 50

agccgtacct tcattctggg	19	
<210> 41		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 41		
agcactgaga gactgggtgg	19	10
<210> 42		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 42		
gtaagaggca attccccag	19	
<210> 43		20
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 43		
cagcttttcc 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 1 5 2 1 3 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 2 2 0 アンパーソン 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 1 5 2 1 7 ペンシルベニア州 ピッツバーグ マルボロ アベニュー 5 8 3  
 1

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第 8 3 / 0 0 3 5 5 6 (WO , A 1 )  
 J. Gen. Virol. , 1 9 9 6 年 , Vol.77 , P.661-671  
 Arch. Virol. , 1 9 9 8 年 , Vol.143 , P.1585-1598  
 J. Virol. , 1 9 9 1 年 , Vol.65, No.10 , P.5491-5498  
 J. Virol. , 1 9 9 0 年 , Vol.64, No.10 , P.4893-4902

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 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