



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 114719

(13) C2

(51) МПК

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/38 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 08626	(72) Винахідник(и):	Вандерплассхен Ален Франсіс Клод (BE)
(22) Дата подання заявки:	20.12.2012	(73) Власник(и):	Гесваль С.А., Avenue Pré-Aily 4 4031 Angleur, Belgium (BE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.07.2017	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11196171.0	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Costes B et al: "Cloning of the koi herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome demonstrates that disruption of the thymidine kinase locus induces partial attenuation in Cyprinus carpio koi", Journal of virology, The American society for microbiology, US, vol. 82, no. 10, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 4955-4964 Krzysztof L. Rakus et al: "Gene expression analysis of common carp (Cyprinus carpio L.) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses", Developmental & comparative immunology, vol. 37, no. 1, 24 December 2011 (2011-12-24), pages 65-76 WO 2009027412 A1, 05.03.2009 WO 2004061093 A1, 22.07.2004
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	30.12.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.11.2014, Бюл.№ 22		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.07.2017, Бюл.№ 14		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2012/076496, 20.12.2012		

## (54) РЕКОМБІНАНТНИЙ ГЕРПЕСВІРУС КОЇ (KHV) І ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ЗАХВОРЮВАННЯ, ЩО ВИКЛИКАЄТЬСЯ KHV

### (57) Реферат:

Винахід стосується живого рекомбінантного герпесвірусу кої (KHV), в якому відкрита рамка зчитування є неповноцінною, з одержанням в результаті живого рекомбінантного KHV, який є атенуїваним, способів продукування такого KHV, клітин, що містять такий KHV, і застосування такого KHV як вектора і у вакцинах для профілактики і/або терапевтичного лікування у риби захворювання, що викликається герпесвірусом кої у коропа, такого як Cyprinus carpio carpio або Cyprinus carpio кої.

UA 114719 C2



Даний винахід стосується рекомбінантного герпесвірусу кої (KHV), способу продукування такого KHV, клітин, що містять такий KHV, і застосування такого KHV як вектора і у вакцинах для профілактики і/або терапевтичного лікування захворювання у риби, викликаного герпесвірусом кої у коропа, такого як *Cyprinus carpio carpio* або *Cyprinus carpio koi*.

Звичайний короп (*Cyprinus carpio carpio*) є найбільш широко культивованою для споживання людиною рибою, в основному в Азії, Європі і на Середньому Сході. На відміну від цього, підвиди кої (*Cyprinus carpio koi*) культивуються як домашня риба для естетичного задоволення або для змагальних виставок, особливо в Японії, а також і по всьому світу. Вірус, що спричиняє летальне захворювання як у звичайного, так і у коропа кої, спочатку названий герпесвірусне захворювання кої (KHVD), був детектований у 1996 в Великобританії. Потім вірус був швидко ідентифікований як причина масової загибелі кої і звичайного коропа в Ізраїлі, США і Німеччині. Інтенсивне вирощування звичайного коропа, виставки кої і міжнародна торгівля привели до швидкого глобального поширення цього високозаразного і надзвичайно вірулентного захворювання. Після виникнення KHVD викликав серйозні фінансові і економічні втрати для підприємств, що вирощують як кої, так і звичайного коропа по всьому світу.

Первинна характеристика вірусу продемонструвала подібну до герпесу структуру з оболонкою і ікосаедральною електронічною серцевиною 100-110 нм, оточеною подібною до тегументу структурою. Геном вірусу містить лінійну дволанцюжкову ДНК (длДНК) з ~295 т.п.о., подібну до ДНК герпесвірусу 1 сімейства коропових 1 (CyHV-1), але більше ніж ДНК членів Herpesviridae, що звичайно варіюється від 125 до 240 т.п.о. за розміром. Послідовність геному KHV була зовсім нещодавно опублікована (Aoki et al., J Virol, 81, pages 5058-5065 (2007)). Геном KHV містить значну кількість послідовності ДНК без гомології з будь-якою іншою відомою вірусною послідовністю. Крім того, вона містить надзвичайно дивергентні послідовності ДНК, що кодують поліпептиди, які мають схожість з деякими длДНК вірусів, таких як герпесвірус, поксвірус, іридовірус і інші великі ДНК-віруси.

Унікальні характеристики цього вірусу привели до трьох різних номенклатур: по-перше, герпесвірус кої (KHV) відповідно до його морфологічного вияву; по-друге, інтерстиціальний нефрит коропа і вірус некрозу зябер (CNGV) відповідно до його патогенетичних ефектів у риби; і на закінчення, герпесвірус 3 сімейства коропових (CyHV-3) згідно зі схожістю вмісту генів з CyHV-1 і з CyHV-2. Остання номенклатура була додатково підтверджена нещодавнім секвенуванням повної довжини вірусного геному. Однак надалі буде використана назва KHV.

KHV має геном приблизно 295 т.п.о., що представляє найбільший геном, коли-небудь ідентифікований серед членів Herpesvirales. Хоч перше виділення KHV було здійснене в 1996 р., лише невелика кількість інформації доступна про роль окремих генів в патогенезі KHV і в біології інфікування природного хазяїна.

Атенуований KHV і його потенційне застосування як вакцини-кандидата було описано в міжнародній заявці на патент WO 2004/061093 A1. Однак ця вакцина-кандидат несе потенційну небезпеку. Атенуація являє собою послідовність випадкових мутацій, які відбулися під час вірусної реплікації *in vitro*. Отже, характер атенуації невідомий і не може бути виключене повернення до повністю патогенного фенотипу.

Для використання і фундаментального дослідження KHV потрібне продукування рекомбінантного вірусу. Останнім часом маніпулювання великими герпесвірусними геномами стало можливим за допомогою використання векторів на основі штучної бактеріальної хромосоми (BAC) (Messerle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 14759-14763 (1997); Wagner et al., Trends Microbiol., 10, 318-324 (2002) див. нижче). Ці вектори дозволяють підтримання і ефективний мутагенез вірусного геному в *Escherichia coli* (*E. coli*) з подальшим відтворенням віріонів потомства трансфекцією плазміді BAC в пермісивні еукаріотичні клітини. До цього часу геноми деяких герпесвірусів були успішно розмножені у вигляді інфекційних BAC-клонів, включаючи людський цитомегаловірус (HCMV), який являє собою другий по величині герпесвірусний геном, клонований у вигляді BAC до цього часу (230 т.п.о.) (Borst et al., J. Virol., 73, 8320-8329 (1999)).

Останнім часом декілька рекомбінантних KHV були уперше сконструйовані із застосуванням технології BAC; ці рекомбінанти описані в заявці на патент згідно з PCT WO 2009/027412. У цій заявці розкритий спосіб одержання рекомбінантних KHV, що мають нестачу одного в одному або більше генах, вибраних з групи, що складається з ORF55: гена тимідинкінази; ORF12: передбачуваного гена рецептора фактора некрозу пухлин (TNF); ORF16: гена передбачуваного зв'язаного з G-білком рецептора (GPCR); ORF134: передбачуваного гена гомолога інтерлейкіну-10; ORF140: передбачуваного гена тимідилаткінази або їх комбінації. Такі мутанти застосовували у вигляді живого атенуованого вакцинного вірусу.

Було продемонстровано, що деякі з таких мутантів були безпечними при застосуванні відносно конкретної SPF риби певного розміру і віку. Однак в даній галузі виробники риби зацікавлені в ранній вакцинації, тобто коли риба є відносно молодою/маленькою і має місце відносно великий розкид риби за розміром. Виявилось, що в таких умовах вакцини на основі делеційних мутантних вірусів, як розкрито в міжнародній заявці на патент WO 2009/027412, можуть в деяких ситуаціях не бути достатньо безпечними: такі рекомбінантні KHV є надто вірулентними для застосування відносно молодої/маленької риби. Це означає, що на даний час все ще має місце нестача безпечних і ефективних атенуйованих рекомбінантних вакцин для контролю захворювання в такій галузі як вирощування риби.

Метою даного винаходу є одержання нових рекомбінантних KHV-вірусів, які можуть бути використані для розробки безпечних і ефективних атенуйованих вакцин для контролю інфекції KHV в даній галузі.

Несподівано було виявлено, що рекомбінантний KHV, в якому відкрита рамка зчитування 57 (ORF57) є неповноцінною, демонструє сильно знижену смертність або відсутність смертності взагалі, навіть у дуже молодого/маленького коропа, інфікованого цим герпесвірусним рекомбінантом, і надає імунітет до герпесвірусу кої дикого типу. Такий рекомбінантний KHV, таким чином, надає безпечний і ефективний атенуйований вакцинний вірус, який може бути відповідно використаний відносно молодого і/або маленького коропа.

Це відкриття є навіть більш несподіваним з точки зору того факту, що ORF57 до даного часу вважався обов'язковим, без якого не було б можливе життя вірусу.

Отже, перший варіант здійснення даного винаходу стосується рекомбінантного герпесвірусу кої, в якому ORF57 є неповноцінним, що приводить в результаті до KHV, який є атенуйованим і індукує рівень смертності 40% або менш у коропа, переважно *Cyprinus carpio carpio* або *Cyprinus carpio* кої, при інфікуванні вказаним герпесвірусом.

У використовуваному в даному описі значенні "неповноцінний" ORF57 означає ORF57, який більше не є функціональним, тобто більше не здатний до кодування функціонального білка. Неповноцінний ORF57 у використовуваному в даному описі значенні в результаті приводить до KHV, що є атенуйованим до рівня, який індукує рівень смертності 40% або менше у коропа. Така неповноцінність може, наприклад, бути одержана мутацією, такою як вставка або делеція одного або більше нуклеотидів в гені, що кодує ORF57, або в його промоторній області. Така мутація може, наприклад, бути мутацією зі зсувом рамки в 5'-сайті гена або делецією (частини) промоторної області або (частини) самого гена.

Прикладом послідовності ДНК ORF57 є послідовність ДНК ORF57, як наведено в Genbank під номером доступу NC\_009127, де стартовий кодон і стоп-кодон ORF57 розташовані в положенні 99382 і 100803. Абсолютно очевидно, що розташування ORF57 може відрізнитися в інших KHV-штамах через природну мінливість. Також через природну мінливість можуть мати місце невеликі відмінності в послідовності ORF57 в одному KHV-штамі при порівнянні з іншим KHV-штамом. Отже, ORF57, як описано в даному документі, є відкритою рамкою зчитування, що має ідентичність послідовності більше ніж 80% з послідовністю ДНК ORF57, наведеною в Genbank під номером доступу NC\_009127.

Нуклеотидна послідовність області, що містить ORF56, 57 і 58, яка охоплює нуклеотиди 96630-101558, представлена в SEQ ID NO: 12. Див. також фіг. 1.

Очевидно, що найбільш екстенсивний шлях створення неповноцінного гена, тобто делеція всього ORF57, приведе в результаті до повної відсутності вироблення білка ORF57.

З практичної точки зору і з точки зору безпеки логічно було б здійснити стадію такої повної делеції. Однак, як випливає з фіг. 1, передбачувана промоторна область розташована в положенні 100212-100261, яка, можливо, задіяна в експресії сусіднього ORF58. Через цю причину мутація в ORF57 переважно не повинна поширюватися на цю область. Таким чином, переважно вводити мутації в ORF57 в область зліва від положення 100212 або справа від положення 100261.

Також на фіг. 1 видно, що дві передбачувані промоторні області розташовані відповідно в положенні 99451-99500 і положенні 99794-99843, які, можливо, можуть бути задіяні в експресії сусіднього ORF56. Отже, теоретично можливо, що делеція в області в ORF57 перешкоджає експресії ORF56. У цьому випадку можливо, що рекомбінантний KHV, в якому ORF57 є неповноцінним відповідно до винаходу, просто виявляє себе атенуйованим внаслідок більш низької експресії ORF56. Однак в розділі приклади показано, що 1) ORF56 не є необхідним геном, і 2) неповноцінний ORF56 не додає внесок в атенуйований характер рекомбінантного KHV відповідно до винаходу. У цих прикладах показано, що великі делеції можуть бути внесені в ORF56 без впливу на життєздатність рекомбінантного KHV і без значної зміни атенуйованого

характеру рекомбінантного KHV. Це в числі іншого має на увазі, що передбачувані промоторні сайти ORF56, розташовані в ORF57, можуть без проблем бути видалені.

Також з фіг. 1 випливає, що два передбачуваних промоторних сайти для ORF57 розташовані в ORF56 в положеннях 97075-97124 і 98712-98761. Отже, не можна виключати те, що делеція маленької частини ORF57, такої як ORF57 Del1, забезпечує укорочений, але все ще функціональний ORF57-кодований білок. Для того, щоб виключити цю можливість, вносили велику подвійну делецію ORF56-ORF57, як описано в розділі приклади, яка охоплює область положень 97001-99750. Ця делеція виявляється по суті однаково з одиночними ORF57-мутантами, як можна побачити на фіг. 5 при порівнянні з фіг. 7. Отже, можна зробити висновок, що кодований ORF57 білок не є необхідним для вірусу.

Делеція тільки маленької частини ORF57 є можливою, вона навіть може бути переважною можливістю, внаслідок причин, наведених вище, але необхідно здійснити деяку обробку, щоб одержаний в результаті укорочений білок не був нефункціональним. Якщо фахівець в даній галузі через яку-небудь причину вирішить видалити менше ніж повний ORF57, він легко може бути здатний перевірити неповноцінність ORF57: ORF57, що не є неповноцінним, приведе до вірусу, що має дуже високий рівень вірулентності, тобто дуже низький рівень атенуації.

Переважно, рекомбінантний KHV є додатково неповноцінним по одному або більше вірусних генах, які додають внесок у вірулентність, але не є необхідними для реплікації вірусу. Таким чином, переважна форма цього варіанта здійснення стосується рекомбінантного герпесвірусу кої відповідно до винаходу, який є неповноцінним щонайменше по одному додатковому гену, який додає внесок у вірулентність, але не є необхідним для реплікації вірусу.

Більш переважна форма цього варіанта здійснення стосується рекомбінантного герпесвірусу кої відповідно до винаходу, який є неповноцінним щонайменше по одному додатковому гену, який додає внесок у вірулентність, де вказаний ген вибраний з групи, що складається з гена тимідинкінази; ORF12: передбачуваного гена рецептора фактора некрозу пухлин (TNF); ORF16: передбачуваного гена зв'язаного з G-білком рецептора (GPCR); ORF134: передбачуваного гена гомолога інтерлейкіну-10; ORF140: передбачуваного гена тимідилаткінази або будь-якої їх комбінації.

У ще більш переважній формі цього варіанта здійснення рекомбінантний KHV є додатково неповноцінним щонайменше по гену тимідинкінази або передбачуваному гену тимідилаткінази.

У іншій ще більш переважній формі цього варіанта здійснення рекомбінантний KHV відповідно до даного винаходу є додатково неповноцінним по гену тимідинкінази і щонайменше по одному додатковому гену, який додає внесок у вірулентність, вибраному з групи, що складається з ORF12: передбачуваного гена рецептора фактора некрозу пухлин (TNF); ORF16: передбачуваного гена зв'язаного з G-білком рецептора (GPCR); ORF134: передбачуваного гена гомолога інтерлейкіну-10; або ORF140: передбачуваного гена тимідилаткінази.

У ще більш переважній формі цього варіанта здійснення рекомбінантний KHV є додатково неповноцінним щонайменше по гену тимідинкінази і передбачуваному гену тимідилаткінази.

У іншій переважній формі цього варіанта здійснення рекомбінантний герпесвірус кої відповідно до винаходу представлений в живій формі. Переважно, рекомбінантний герпесвірус кої має здатність відтворювати інфекційні частинки, тобто реплікуватися при введенні в пермісивні еукаріотичні клітини або індивідуумам риби, переважно коропа, більш переважно *Cyprinus carpio*, ще більш переважно *Cyprinus carpio carpio* i/або *Cyprinus carpio* кої.

У альтернативному варіанті здійснення рекомбінантний KHV відповідно до винаходу є додатково неповноцінним по одному або більше вірусних генах, які є необхідними для реплікації (і необов'язково неповноцінним по одному або більше вірусних генах, які додають внесок у вірулентність, але не є необхідними для реплікації вірусу), таким чином забезпечуючи рекомбінантний герпесвірус кої відповідно до винаходу в нереплікативній формі.

Таким чином, альтернативний варіант здійснення стосується рекомбінантного KHV відповідно до винаходу, де вказаний герпесвірус представлений в нереплікативній формі.

"Нереплікативна форма" означає, що рекомбінантний герпесвірус кої все ще має здатність інфікувати клітини або індивідуумів риби (наприклад, *Cyprinus carpio*, *Cyprinus carpio carpio* або *Cyprinus carpio* кої), але не здатний реплікуватися для поширення вірусного потомства. Нереплікативний рекомбінантний штам виробляється інактивацією (за допомогою відомих технологій, таких як вставка, делеція або мутація, наприклад, із застосуванням клонування ВАС) гена KHV, який необхідний для реплікації.

Такий делетований вірус культивується в пермісивній клітинній лінії, стабільно експресуючій делетований ген (транскомплементация).

Цей підхід є добре відомим в даній галузі підходом. Крім іншого він був успішно використаний для різних герпесвірусів, таких як Suid herpesvirus 1 (вірус Аujeszкі) з делетованим gH (Babic et al., 1996) і Bovine herpesvirus 1 (Schroder and Keil, 1999).

Будь-який ген, який бере участь в реплікації, може бути зроблений неповноцінним для того, щоб одержати рекомбінантний герпесвірус кої, що не реплікується. Іншими словами, будь-який ген, інактивація якого веде до нереплікативного рекомбінантного герпесвірусу кої, може бути делетований. Переважно, ген рекомбінантного KHV відповідно до винаходу, який є делетованим для того, щоб забезпечити нереплікативну форму вірусу, вибраний з групи що складається з: ORF25, ORF31, ORF32, ORF34, ORF35, ORF42, ORF43, ORF45, ORF51, ORF59, ORF60, ORF62, ORF65, ORF66, ORF68, ORF70, ORF72, ORF78, ORF81, ORF84, ORF89, ORF90, ORF92, ORF95, ORF97, ORF99, ORF108, ORF115, ORF131, ORF132, ORF136, ORF137, ORF148 і ORF149.

Рекомбінантний герпесвірус кої відповідно до винаходу переважно містить послідовність вектора штучної бактеріальної хромосоми (BAC).

Приблизно півтора десятиліття тому маніпулювання великими герпесвірусними геномами було значно полегшене за допомогою застосування таких бактеріальних штучних хромосом. Ці вектори дозволяють підтримання і мутагенез вірусного геному *Escherichia coli* з подальшим відтворенням віріонів потомства трансфекцією плазмиди BAC в пермісивні еукаріотичні клітини. На першій стадії послідовності для вектора BAC вводять в герпесвірусний геном загальноприйнятою гомологічною рекомбінацією в інфікованих клітинах. Лінійна дволанцюжкова ДНК геному герпесвірусів циклізується під час реплікації. Цього достатньо для виділення реплікаційного інтермедиату BAC-мутанта і перенесення його за допомогою ДНК-трансформації в *E. coli*. Це човникове перенесення потрібне тільки один раз для стабілізації системи. Герпесвірус BAC потім репродукують і мутують в *E. coli*. Гомогенну ДНК клонованого герпесвірусу BAC човниково переносять зворотно в еукаріотичні пермісивні клітини тільки для відтворення вірусу. Оскільки вірусні функції не є необхідними, вірусний геном залишається сплячим в *E. coli*, при цьому зберігаючи вірусні функції представленими під час клонування. Це є важливим для вірусів, коли процедури *in vitro* культивування міняють аутентичні властивості ізолятів.

У використовуваному в даному описі значенні термін "гомологічна рекомбінація" означає, що, коли дві різні гомологічні молекули нуклеїнової кислоти зустрічаються одна одну, відбувається кросовер і генерується нова комбінація нуклеїнової кислоти. У використовуваному в даному описі значенні термін "послідовність, опосередковуюча гомологічну рекомбінацію," стосується послідовності, що викликає гомологічну рекомбінацію, яка залежить від специфічного рекомбінаційного білка, який каталізує, здійснює і сприяє гомологічній рекомбінації. Такий рекомбінаційний білок переважно діє специфічно на "послідовність, опосередковуючу гомологічну рекомбінацію," і не впливає на інші послідовності.

Послідовності вектора BAC добре відомі в даній галузі і їх використання в конструюванні рекомбінантних вірусів, таких як герпесвіруси, часто описувалося в даній галузі (Borst E. M., Hahn G., Koszinowski U. H. & Messerle M. (1999), *J. Virol.* 73, 8320-9; Costes B., Fournier G., Michel B., Delforge C., Raj V. S., Dewals B., Gillet L., Drion P., Body A., Schynts F., Lieftrig F., Vanderplasschen A., 2008. *J. Virol.* 82, 4955-4964; Dewals B., Boudry C., Gillet L., Markine-Goriaynoff N., de Leval L., Haig D. M. & Vanderplasschen A. (2006), *J. Gen. Virol.* 87, 509-17; Gillet L., Daix V., Donofrio G., Wagner M., Koszinowski U. H., China B., Ackermann M., Markine-Goriaynoff N. & Vanderplasschen A. (2005), *J. Gen. Virol.* 86, 907-17; Messerle M., Crnkovic I., Hammerschmidt W., Ziegler H. & Koszinowski U. H. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14759-63; Warming S., Costantino N., Court D. L., Jenkins N. A. & Copeland N. G. (2005), *Nucleic. Acids. Res.* 33, e36; Wagner M., Ruzsics Z. & Koszinowski U. H. (2002), *Trends Microbiol.* 10, 318-24).

Послідовність вектора BAC не обов'язково повинна бути вставлена в ORF57. Альтернативно, вона може бути вставлена в інший вірусний ген, який додає внесок у вірулентність, і/або будь-який інший вірусний ген, який є або не є необхідним для вірусної реплікації, і/або будь-яку міжгенну область.

Однак, в більш переважній формі, рекомбінантний герпесвірус кої містить послідовність BAC-вектора, яка вбудована в ORF57. Така вставка має ту перевагу, що, за допомогою вбудовування вектора BAC в ORF57, ORF57 при цьому стає неповноцінним, таким чином, безпосередньо забезпечуючи рекомбінантний KHV відповідно до винаходу.

Приклад рекомбінантного KHV відповідно до винаходу був виконаний за допомогою клонування геному KHV інсерцією модифікованої loxP-фланкованої касети BAC в ORF55 (див. нижче). Ця вставка привела до BAC-рекомбінантного вірусу, геном якого стабільно зберігався в бактеріях і був здатний генерувати віріони при трансфекції в пермісивні клітини (див. Costes B.,

Fournier G., Michel B., Delforge C., Raj V. S., Dewals B., Gillet L., Drion P., Body A., Schynts F., Lieffrig F., Vanderplasschen A., 2008, J. Virol. 82, 4955-4964; для подробиць про ВАС-вектор, і див. нижче технічні подробиці). Цей вектор використовували для введення делеції в ORF57.

Термін "вектор ВАС" стосується плазмиди, продукованої з використанням F-плазмиди *E. coli*, і вектора, який може стабільно зберігатися і вирощувати фрагмент ДНК великого розміру приблизно 300 т.п.о. або більше в бактеріях, таких як *E. coli* і ним подібні. Вектор ВАС містить щонайменше одну послідовність ВАС-вектора, необхідну для реплікації ВАС-вектора. Приклади такої області, необхідної для реплікації, містять, але не обмежені ними, точку початку реплікації F-плазмиди і її варіанти.

У використовуваному в даному описі значенні термін "послідовність вектора ВАС" стосується послідовності, яка містить послідовність, необхідну для функції вектора ВАС. Необов'язково, послідовність вектора ВАС може додатково містити "залежну від рекомбінаційного білка рекомбінантну послідовність" і/або "селектований маркер".

Подробиці "залежної від рекомбінаційного білка рекомбінантної послідовності" і/або "селектованого маркера" наведені, наприклад, в наведеній вище літературі і в WO 22009/027412.

Незалежно від місця, де вектор ВАС вбудований в геном, переважно, щоб послідовність вектора ВАС була фланкована послідовностями, опосередковуючими гомологічну рекомбінацію, переважно *loxP*. Також переважно послідовність вектора ВАС містить селектований маркер (див. нижче). У більш переважній формі селектований маркер є лікарським маркером (див. нижче). У іншому переважному варіанті здійснення геном вказаного рекомбінантного герпесвірусу представлений у формі плазмиди. Це досягається виділенням циклічних форм вищезазначеного рекомбінантного герпесвірусу кої, що містить послідовність вектора ВАС, і введенням в бактеріальні клітини. Як згадано вище, для винаходу не є необхідним, щоб послідовність вектора ВАС (бактеріальна штучна хромосома) була вбудована в один або більше вірусних генів, які додають внесок у вірулентність або є необхідними для реплікації, за умови, що один або більше із згаданих генів, які сприяють вірулентності або є необхідними для реплікації, зроблені неповноцінними за допомогою технологій генетичної інженерії.

Отже, послідовність вектора ВАС може бути вбудована в будь-яку область вірусного геному, за умови, що ORF57 і переважно один або більше інших вірусних генів, які сприяють вірулентності, також є неповноцінними.

Без сумніву, опосередковані векторами ВАС технології клонування, як описано вище, можуть бути застосовані багато разів: наприклад, перший раз для того, щоб зробити ORF57 неповноцінним, і другий раз для того, щоб зробити неповноцінним додатковий ген.

Послідовність вектора ВАС може в принципі без проблем залишатися представленою в рекомбінантному KHV відповідно до винаходу в подальших застосуваннях. Однак, для застосування герпесвірусу кої відповідно до винаходу, наприклад у вакцині, переважно, щоб більша частина послідовності ВАС була видалена. Це має місце, наприклад, для ВАС-послідовностей, які містять гени, що кодують селектовані маркери, і навіть більшою мірою для генів стійкості. Наявність таких генів у вакцині вважається не тільки необов'язковою, але навіть небажаною.

Таким чином, переважно щонайменше одну частину (наприклад, частину, яка містить ген стійкості або селектований маркер) або більш переважно більшу частину послідовності вектора ВАС вирізають з геному герпесвірусу, тим самим переважно залишаючи гетерологічну послідовність в сайті вирізання або в колишньому сайті вставки в геномі герпесвірусу. Більш переважно, гетерологічна послідовність має розмір менше ніж 200 нуклеотидів. Вирізання виконується введенням рекомбінантного KHV в пермісивну еукаріотичну клітину, експресуючу рекомбіназу *Cge*, яка вирізає *loxP*-фланковану послідовність ВАС-вектора.

Отже, переважна форма цього варіанта здійснення стосується рекомбінантного герпесвірусу кої відповідно до винаходу, який характеризується тим, що частина послідовності вектора ВАС вирізається з геному герпесвірусу, тим самим залишаючи гетерологічну послідовність в сайті вирізання або в колишньому сайті вставки, відповідно, в геномі герпесвірусу.

І в більш переважній формі цього варіанта здійснення частина послідовності ВАС-вектора, яку вирізають з геному герпесвірусу, містить щонайменше один ген, що кодує селектований маркер і/або ген стійкості.

Також можливо видаляти повністю послідовність касети ВАС-гомологічною рекомбінацією в еукаріотичних клітинах із застосуванням фрагмента ДНК дикого типу вірусного геному, що охоплює сайт вставки касети ВАС (наприклад, ORF55, що кодують ТК). Селекція вірусних

бляшок, які більше не експресують EGFP (що кодується ВАС-касетою), дозволяє селекцію рекомбінантів, які мають обернений сайт ВАС-вставки відносно послідовності дикого типу.

Рекомбінантний герпесвірус кої відповідно до даного винаходу в будь-якій формі, клон ВАС KHV і вищезазначена конструкція KHV, де щонайменше частина послідовності вектора ВАС  
5 вирізана з геному герпесвірусу, можуть бути застосовані для додаткового маніпулювання, включаючи, наприклад, технології генетичної інженерії, для того, щоб зробити геном неповноцінним в додаткових специфічних генах. Неповноцінність таких додаткових генів може бути аналогічно одержана із застосуванням технології ВАС, як вже вказано вище.

Хоч рекомбінантний KHV відповідно до винаходу може бути використаний як вакцина сам по собі (див. нижче), просто для того, щоб захистити рибу, більш конкретно коропа, ще більш конкретно *Cyprinus carpio carpio* або *Cyprinus carpio koï*, від захворювання KHV, він також може  
10 бути ефективно використаний як вірус-носіє для гетерологічного (тобто не з KHV) фрагмента ДНК. У цьому випадку переважні характеристики рекомбінантного KHV відповідно до винаходу будуть повністю використані, і на доповнення вірус, наприклад, набуде додаткових властивостей, таких як маркерні властивості, додаткові імунізуючі властивості або властивості ад'юванту.

"Маркерні властивості" в цьому значенні означає, що фрагмент гетерологічної ДНК дозволяє  
15 напряму або опосередковано встановлювати відмінності між інфекцією польовим вірусом або інфекцією вакцинним вірусом. Прямий шлях для встановлення відмінності між інфекцією польовим вірусом і інфекцією вакцинним вірусом, наприклад, включає ПЛР із застосуванням праймерів, які специфічно реагують з гетерологічним (тобто не з KHV) фрагментом ДНК в рекомбінантному KHV відповідно до винаходу і не реагують з ДНК польового вірусу KHV.

Непрямий шлях встановлення відмінності між інфекцією польовим вірусом і інфекцією вакцинним вірусом буде, наприклад, включати імунологічну реакцію із застосуванням антитіла,  
20 яке специфічно реагує з імуногенним білком, що кодується гетерологічним (тобто не з KHV) фрагментом ДНК в рекомбінантному KHV відповідно до винаходу, і не реагує ні з яким білком польового вірусу KHV.

Таким чином, інший варіант здійснення даного винаходу стосується рекомбінантного KHV  
25 відповідно до винаходу, який містить гетерологічний ДНК-фрагмент, наприклад гетерологічний ген.

Переважно, такий гетерологічний фрагмент ДНК є гетерологічним геном, який кодує імуногенний білок іншого вірусу або мікроорганізму, що є патогенним для риби, більш конкретно коропа, ще більш конкретно *Cyprinus carpio carpio* або *Cyprinus carpio koï*. Більш переважно, гетерологічний ген є G глікопротеїном рабдовірусу, що викликає весняну віремію коропа. Такі  
30 конструкції при застосуванні у вакцині будуть не тільки захищати коропа від KHV, але також від весняної віремії коропа.

Придатні промотори для експресії гетерологічних генів в еукаріотичних клітинах широко відомі в даній галузі. Прикладом придатного промотору для експресії гетерологічного гена,  
35 наприклад G глікопротеїну рабдовірусу, що викликає весняну віремію коропа, є промотор HCMV IE.

Даний винахід додатково стосується способу продукування інфекційних частинок рекомбінантного герпесвірусу кої (KHV), який включає стадії:

(а) введення рекомбінантного KHV відповідно до винаходу або рекомбінантної ДНК KHV, що містить геном рекомбінантного KHV відповідно до винаходу, в пермісивні еукаріотичні клітини, і  
40 (b) культивування клітини-хазяїна для продукування рекомбінантного герпесвірусу кої (KHV).

Через їх атенуйований характер вищезазначені рекомбінантні герпесвіруси кої відповідно до винаходу і їх ДНК є дуже придатними для імунізації риби, переважно індивідуумів *Cyprinus carpio carpio* або *Cyprinus carpio koï*, ін'єкцією або бальнеотерапією, або перорально.

Отже, ще один варіант здійснення даного винаходу стосується рекомбінантного герпесвірусу кої відповідно до винаходу і/або ДНК KHV, що містять геном рекомбінантного герпесвірусу кої відповідно до винаходу, для застосування в профілактиці і/або терапевтичному  
50 лікуванні захворювання у риби, викликаного герпесвірусом кої (KHV).

Профілактичне застосування являє собою застосування, яке спрямоване на запобігання інфекції або щонайменше клінічним виявам захворювань.

Терапевтичне застосування являє собою застосування вказаного KHV або ДНК KHV  
55 відносно риби, яка вже має захворювання, що викликається KHV.

Ще один варіант здійснення даного винаходу стосується рекомбінантного герпесвірусу кої відповідно до винаходу і/або ДНК KHV, що містять геном рекомбінантного герпесвірусу кої відповідно до винаходу, для застосування у вакцині для профілактики і/або терапевтичного  
60 лікування у риби захворювання, що викликається герпесвірусом кої (KHV).



Ще один варіант здійснення даного винаходу стосується вакцини для профілактики і/або терапевтичного лікування у риби захворювання, що викликається герпесвірусом кої (KHV), яка відрізняється тим, що вказана вакцина містить рекомбінантний герпесвірус кої відповідно до винаходу і/або ДНК KHV, що містять геном рекомбінантного герпесвірусу кої відповідно до

5 винаходу, і фармацевтично прийнятний носій.

Ще один варіант здійснення даного винаходу стосується вакцини для профілактики і/або терапевтичного лікування у риби захворювання, що викликається рабдовірусом, який викликає весняну віремію коропів, причому ця вакцина містить рекомбінантний KHV відповідно до винаходу, який несе ген, що кодує G глікопротеїн вказаного рабдовірусу, який викликає весняну

10 віремію коропів, або послідовність ДНК, що містить геном вказаного рекомбінантного KHV, і фармацевтично прийнятний носій.

У використовуваному в даному описі значенні термін "вакцина" стосується композиції, здатної до профілактики і/або терапевтичного лікування хазяїна від конкретного захворювання. Така вакцина може продукувати профілактичну або терапевтичну стійкість.

15 Фармацевтично прийнятний носій може бути простою водою або буфером. Фармацевтично прийнятний носій може також містити стабілізатори. Він може також містити ад'ювант або може сам бути ад'ювантом.

Звичайно вакцини готують у вигляді рідких розчинів, емульсій або суспензій для ін'єкції або доставки за допомогою занурення риби у воду. Наприклад, рідка емульсія або емульгований

20 концентрат можуть бути приготовані для того, щоб додати їх в резервуар з водою або ванну, де міститься риба. Тверді (наприклад, порошок) форми, придатні для розчинення, або суспензії в рідких основах або для змішування з твердою їжею перед введенням також можуть бути приготовані. Вакцина може бути ліофілізованою культурою в готовій до використання формі для відтворення зі стерильним розріджувачем. Наприклад, ліофілізовані клітини можуть бути

25 відтворені в 0,9% сольовому розчині (необов'язково наданому у вигляді частини упакованого вакцинного продукту). Переважною рецептурою ін'єктованої вакцини є емульсія. Рідкі або відтворені форми вакцини можуть бути розбавлені в маленькому об'ємі води (наприклад, від 1 до 100 об'ємів) перед введенням в шприц, резервуар або ванну.

У одній переважній формі цього варіанта здійснення препарат вакцини, що містить

30 рекомбінантний KHV-штам, представлений в сухій формі, наприклад в порошкоподібній формі, ліофілізованій формі, у формі пресованої пластинки або у формі таблетки і т. д.

У іншій формі цього варіанта здійснення вказаний вірус може бути у формі культурального тканинного текучого середовища. Вказане текуче середовище може зберігатися в навколишніх умовах, переважно при -70°C, найбільш переважно у вигляді розчину, що містить гліцерин. У

35 одному конкретному прикладі тканинне культуральне текуче середовище містить 20% гліцерину.

Рекомбінантний KHV-штам, розкритий у винаході, може бути перетворений в суху форму рядом способів. Особливо переважною формою висушування є ліофілізація. Перед висушуванням, наприклад процедурою ліофілізації, різноманітні інгредієнти можуть бути додані

40 в середовище, такі як консерванти, антиоксиданти або відновні агенти, різноманітні допоміжні речовини і т. д. Такі допоміжні речовини також можуть бути додані до сухого, наприклад, ліофілізованого вірусу з атенуйованою активністю також після стадії висушування.

Коли рекомбінантний KHV відповідно до винаходу використовують як компонент вакцини для перорального введення (наприклад, за допомогою занурення або бальнеотерапії),

45 звичайно не буде необхідності введення ад'юванту.

Якщо, однак, препарат вакцини ін'єктують напряму в організм риби, застосування ад'юванту є необов'язковим. Якщо рекомбінантний KHV відповідно до винаходу має нерепліковану форму, то додавання імуностимуляторів може бути переважним.

Загалом, для того, щоб посилити імунну відповідь, препарат може містити різноманітні

50 ад'юванти, цитокіни або інші імуностимулятори, особливо у випадку, якщо препарати призначені для ін'єкції.

Ад'ювант являє собою імуностимулюючу речовину, що посилює імунну відповідь хазяїна неспецифічним чином. Ад'ювант може бути гідрофільним ад'ювантом, наприклад гідроксидом алюмінію або ортофосфатом алюмінію, або гідрофобним ад'ювантом, наприклад ад'ювантами

55 на основі мінерального масла. Ад'юванти, такі як мураміддипептид, авідин, гідроксид алюмінію, ортофосфат алюмінію, масла, масляні емульсії, сапоніни, декстрансульфат, глюкани, цитокіни, блок-співполімери, імуностимулюючі олігонуклеотиди і інші відомі в даній галузі, можуть бути змішані з рекомбінантним KHV відповідно до винаходу. Прикладами ад'ювантів, що часто застосовуються у вирощуванні риби, є мураміддипептиди, ліпополісахариди, деякі глюкани і

60 глікани і Карбопол® (гомополімер). Придатними ад'ювантами є, наприклад, вода в масляних

(в/м) емульсіях, м/в емульсії і в/м/в подвійні емульсії. Масляними ад'ювантами, придатними для застосування у в/м емульсії, є наприклад, мінеральні масла або метаболізовані масла. Мінеральні масла являють собою, наприклад, Bayol®, Marcol® і Drakeol®; метаболізовані масла являють собою, наприклад, рослинні олії, такі як арахісова олія і соєва олія, або тваринні масла, такі як риб'ячі масла, сквалан і сквален. Альтернативно, солюбілізат вітаміну Е (токоферол), як описано в EP 382271, може бути переважно застосований. Особливо придатні м/в емульсії, наприклад, можуть бути одержані, починаючи від 5-50% мас./мас. водної фази і 95-50% мас./мас. масляного ад'юванту, більш переважно застосовується 20-50% мас./мас. водної фази і 80-50% мас./мас. масляного ад'юванту. Кількість доданого ад'юванту залежить від природи самого ад'юванту і інформації відносно таких кількостей, наданої виробником.

У переважному варіанті здійснення вакцина відповідно до винаходу додатково містить стабілізатор. Стабілізатор може бути доданий до вакцини відповідно до винаходу, наприклад, для захисту від руйнування, для збільшення терміну зберігання або для поліпшення ефективності заморожуванням-висушуванням. Придатними стабілізаторами є, в числі інших, SPGA (Bovarnik et al., 1950, J. Bacteriology, vol. 59, p. 509), сепароване молоко, желатин, бичачий сироватковий альбумін, вуглеводи, наприклад сорбіт, маніт, трегалоза, крохмаль, сахароза, декстран або глюкоза, лактози, білки, такі як альбумін або казеїн, або продукти їх руйнування, і буфери, такі як фосфати лужних металів.

Антибіотики, такі як неоміцин і стрептоміцин, можуть бути додані для запобігання потенційному росту мікроорганізмів.

На доповнення, вакцина може містити одну або більше придатних поверхнево-активних сполук або емульгаторів, наприклад Span® або Tween®. Вакцина може також містити так званий "носії". Носій являє собою сполуку, до якої KHV-вірус (або у формі вірусної частинки, або у формі ДНК) відповідно до винаходу приєднується, не зв'язуючись з нею ковалентно. Такими основами в числі іншого є біомікрокапсули, мікроальгінати, ліпосоми і макрозоли, відомі в даній галузі. Спеціальною формою такого носія є Іском. Абсолютно очевидно, що домішування інших стабілізаторів, носіїв, розріджувачів, емульсій і подібного до вакцин відповідно до винаходу також входить в обсяг даного винаходу. Такі добавки, наприклад, описані в добре відомому керівництві, такому як: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), і "Veterinary vaccinology" (Pastoret P. et al., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN: 0444819681).

Рекомбінантний KHV при застосуванні в його сухій формі у вакцині може додатково містити текуче середовище відтворення, переважно стерильну воду, сольовий розчин або фізіологічний розчин. Він також може включати невеликі кількості залишкових матеріалів з процесу виробництва, таких як клітинні білки, ДНК, РНК і т. д. Хоч ці матеріали не є добавками самі по собі, вони можуть, проте, бути представлені в складі вакцини.

Вакцина може бути введена рибі індивідуально перорально, наприклад з кормом або за допомогою примусового перорального введення, або за допомогою ін'єкції (наприклад, через внутрішньом'язовий або внутрішньоочеревинний шлях).

Альтернативно, вакцина може бути введена одночасно всій популяції риби, що міститься у водному об'ємі, розпиленням, розчиненням і/або імерсією вакцини. Ці способи застосовні для вакцинації всіх типів риби, наприклад харчова і декоративна риби, і в різноманітних умовах навколишнього середовища, таких як ставки, акваріуми, природне середовище мешкання і резервуари зі свіжою водою.

Додатковий варіант винаходу стосується ДНК-вакцини, що містить рекомбінантний KHV відповідно до винаходу.

ДНК-вакцини відповідно до винаходу по суті не відрізняються від вакцин, що містять рекомбінантний KHV відповідно до винаходу, в тому розумінні, що вони містять геном рекомбінантного KHV відповідно до винаходу.

Вони легко можуть бути введені за допомогою внутрішньошкірного введення, наприклад, із застосуванням безголкового впорскувача, такого як GeneGun®. Цей шлях введення доставляє ДНК напряму в клітини тварини, яка повинна бути вакцинована. Переважна кількість рекомбінантної ДНК KHV відповідно до винаходу в фармацевтичній композиції відповідно до винаходу (як наведено нижче) знаходиться в діапазоні між 10 пг і 1000 мкг. Переважно застосовуються кількості в діапазоні між 0,1 і 100 мкг. Альтернативно, риба може бути занурена в розчини, що містять наприклад, між 10 пг і 1000 мкг/мл ДНК, яка повинна бути введена. Всі ці технології і шляхи введення добре відомі в даній галузі.

Переважно, вакцину відповідно до винаходу складають у формі, придатній для вакцинації ін'єкцією або імерсією, такої як суспензія, розчин, дисперсія, емульсія і тому подібне.

Схема дозування для введення вакцини відповідно до винаходу в цільовий організм може бути внесенням одиничної або множинних доз, які можуть бути введені в один і той же час або послідовно чином, сумісним з дозуванням і рецептурою, і в такій кількості, яка буде імунологічно ефективною. У компетенції фахівця в даній галузі визначення того, чи є лікування "імунологічно ефективним", наприклад, введенням випробувальної стимулюючої інфекції вакцинованим тваринам і подальшим визначенням у цільових тварин клінічних ознак захворювання, серологічних параметрів або вимірюванням повторного виділення патогену.

Те, що складає "фармацевтично ефективну кількість" для вакцини відповідно до винаходу, яка основана на рекомбінантному KHV або рекомбінантній ДНК KHV відповідно до винаходу, залежить від необхідного ефекту і від цільового організму. Визначення ефективної кількості є базовою навичкою рядового фахівця. Переважна кількість рекомбінантної ДНК KHV відповідно до винаходу, що міститься в фармацевтичній композиції відповідно до винаходу, була описана вище.

Переважає кількість живої вакцини, що містить штам рекомбінантного KHV-вірусу відповідно до винаходу, виражена, наприклад, у вигляді бляшкоутворюючих одиниць (БУО). Наприклад, для живого вірусного вектора діапазон доз між  $1$  і  $10^{10}$  бляшкоутворюючих одиниць (БУО) з розрахунку на дозу на тварину може бути переважно застосований; переважно діапазон між  $10^2$  і  $10^6$  БУО/дозу. Багато які шляхи введення можуть бути застосовані, всі з яких відомі в даній галузі. Вакцини відповідно до винаходу переважно вводяться рибі за допомогою ін'єкції (внутрішньом'язовий або внутрішньоочеревинний шлях), імєрсії, занурення або перорально. Протокол для введення може бути оптимізований згідно зі стандартною практикою вакцинації.

Якщо вакцина містить нереплікативну форму рекомбінантного KHV відповідно до винаходу, доза буде виражена у вигляді кількості частинок нереплікативного вірусу, яка повинна бути введена. Тоді доза звичайно буде трохи вище, ніж при введенні частинок живого вірусу, через те, що частинки живого вірусу реплікуються до деякої міри в цільовій тварині, перед тим як вони видаляються імунною системою. Для вакцин на основі частинок нереплікативного вірусу кількість частинок вірусу в діапазоні приблизно від  $10^4$  до  $10^9$  частинок звичайно буде придатною.

Переважає, вакцина вводиться за допомогою імєрсії, особливо, коли застосовують живий рекомбінантний KHV відповідно до винаходу. Це є особливо ефективним у випадку застосування таких вакцин в установці для промислового вирощування у воді.

#### Опис креслень

Фіг. 1: схематичне представлення області геному CyHV-3, що охоплює ORF57. Вказані координати ATG і стоп-кодонів кожного ORF (відповідно до номера доступу в Genbank NC\_009127). Представлені координати передбачуваних промоторів (P), ідентифікованих аналізами комп'ютерної симуляції в або близько до ORF56 і ORF57. Число після букви P ідентифікує ORF під контролем ідентифікованої промоторної послідовності. Зверху представлені вибрані послідовності, які повинні бути делетовані для того, щоб зробити ORF56 і/або ORF57 недіючими. Вказані координати делецій.

Фіг. 2, 3: схема послідовності стадій, виконаних для продукування рекомбінантних плазмід FL BAC galK, делетованих по ORF57 (фіг. 2) або ORF56 (фіг. 3), і для демонстрації відтворення інфекційного вірусу з продукованих плазмід. Області ORF57 або ORF56, як ідентифіковано на фігурі 1, були заміщені експресійною касетою galK із застосуванням гомологічної рекомбінації в *E. coli*. Для відтворення інфекційного вірусу з локусом тимідинкінази (TK) дикого типу (ревертантні штами FL BAC), рекомбінантні плазмідні котрансфікували в пермісивні клітини CCB з плазмідною rGEMT-TK. Для відтворення інфекційного вірусу з укороченою формою TK (усічені штами FL BAC), рекомбінантні плазмідні трансфікували в клітини CCB, експресуючі рекомбіназу Cre.

Фіг. 4: схема послідовності стадій, виконаних для продукування рекомбінантних плазмід FL BAC, делетованих по ORF57 і ORF56 (ORF56-57), і для демонстрації відтворення інфекційного вірусу з продукованих плазмід. Область ORF56-57, як ідентифіковано на фіг. 1, заміняли експресійною касетою galK із застосуванням гомологічної рекомбінації в *E. coli*. Експресійну касету galK потім видаляли гомологічною рекомбінацією з синтетичною послідовністю ДНК, що відповідає областям геному KHV, фланкуючим експресійну касету galK (ORF56-57 касета Del). Для відтворення інфекційного вірусу з локусом тимідинкінази (TK) дикого типу (ревертантні штами FL BAC) рекомбінантну плазмідну котрансфікували в пермісивні клітини CCB з плазмідною rGEMT-TK. Для відтворення інфекційного вірусу з укороченою формою TK (усічені штами FL BAC), рекомбінантну плазмідну трансфікували в клітини CCB, експресуючі рекомбіназу Cre.

Фіг. 5: тести безпеки (A-D) і вакцинації/стимуляції (E-G) рекомбінантів ORF57 з однієї делецією. Безпеку FL BAC, усіченого по ORF57 Del1-galK (A), і FL BAC, усіченого по ORF57

Del2-galK (B), штамів тестували, як описано в прикладах (Тести безпеки), на звичайному коропі (віком 7 місяців, середня маса 3,74 г, n=20). Усічений штам FL BAC (C) і імітуючу інфекцію (D) застосовували як позитивний і негативний контролю, відповідно. Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем 0 як вихідною точкою. Через шість тижнів після інфекції рекомбінантами ORF57 з одиночною делецією (E і F), рибу стимулювали, як описано в прикладах (вакцинація/стимуляція). Імітовано інфікованих риб застосовували як контролю (G). Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем 42 як вихідною точкою.

Фіг. 6: безпека рекомбінантів ORF56 з одиночною делецією.

Безпеку FL BAC, усічених по ORF56 Del1-galK (A), і FL BAC, усічених по ORF56 Del2-galK (B), штамів тестували, як описано в прикладах (Тести безпеки), на звичайному коропі (вік 7 місяців, середня маса 3,74 г, n=20). Усічений штам FL BAC (C) і імітуючу інфекцію (D) застосовували як позитивний і негативний контролю, відповідно. Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем 0 як вихідною точкою.

Фіг. 7: тести безпеки (A-C) і вакцинації/стимуляції (D-G) штаму FL з усіченою BAC ORF56-57 Del. Безпеку штаму FL з усіченою BAC ORF56-57 Del (B) тестували, як описано в прикладах (Тести безпеки), на звичайному коропі (вік 7 місяців, середня маса 4,41 г, n=30). Штам FL з усіченою BAC (A) і імітуючу інфекцію (C) застосовували як позитивний і негативний контролю, відповідно. Імітуючу інфекцію виконували на дубльованих групах. Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем 0 як вихідною точкою.

Тести вакцинації/стимуляції (D-G). Риб (n=15), вакцинованих штамом FL з усіченою BAC ORF56-57 Del, стимулювали KHV FL-штамом через 3 тижні (D) або 6 тижнів (F) після вакцинації, як описано в прикладах (вакцинація/стимуляція). Дубльовані групи імітовано інфікованих риб застосовували як контролю (E і G). Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем стимуляції як вихідною точкою.

Фіг. 8: тести безпеки (A-C) і вакцинації/стимуляції (D-G) штаму FL з ревертантами BAC ORF56-57 Del. Безпеку штаму FL з ревертантами BAC ORF56-57 Del (B) тестували, як описано в прикладах (Тести безпеки), на звичайному коропі (вік 7 місяців, середня маса 3,74 г, n=30). FL BAC-ревертанти (A) і імітуючу інфекцію (C) застосовували як позитивний і негативний контролю, відповідно. Імітуючу інфекцію виконували на дубльованих групах. Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем 0 як вихідною точкою.

Тести вакцинації/стимуляції (D-G). Риб (n=15), вакцинованих штамом FL з ревертантами BAC ORF56-57 Del, стимулювали FL-штамом KHV через 3 тижні (D) або 6 тижнів (F) після вакцинації, як описано в прикладах (вакцинація/стимуляція). Дубльовані групи імітовано інфікованої риби застосовували як контролю (E і G). Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем стимуляції як вихідною точкою.

#### Приклади

а) Клітини і віруси. Клітини мозку *Cyprinus carpio* (CCB) (Neukirch et al., 1999) культивували в мінімальному підтримуючому середовищі (MEM, Invitrogen), що містить 4,5 г/л глюкози (моногідрат D-глюкози, Merck) і 10% фетальної телячої сироватки (FCS). Клітини культивували при 25°C у вологій атмосфері, що містить 5% CO<sub>2</sub>. Штам FL CyHV-3 виділяли з нирки риби, яка померла від KHV (CER Marloie, Belgium).

б) Плазміда BAC CyHV-3. Плазмиду BAC FL CyHV-3 застосовували як батьківську плазмиду для продукування рекомбінантів CyHV-3. Ця плазміда була детально описана в Costes et al. (2008) і в міжнародній заявці на патент WO 2009/027412. Плазміда BAC FL CyHV-3 являє собою клон інфекційної штучної бактеріальної хромосоми (BAC) геному штаму FL CyHV-3. У цій плазміді loxP-фланкована BAC-касета вбудована в ТК-локус CyHV-3 (ORF55).

с) Продукування рекомбінантних плазмід FL BAC ORF57 CyHV-3 із застосуванням galK-позитивної селекції в бактеріях. Дві рекомбінантні плаزمиди FL BAC CyHV-3 з делецією в локусі ORF57 (див. ORF57 Del1 і ORF57 Del2 на фіг. 1) продукували із застосуванням galK-позитивної селекції в бактеріях, як описано раніше (Warming et al., 2005) (фіг. 2). Рекомбінаційний фрагмент складався з гена галактокінази (galK) (1231 п.о.), фланкованого послідовностями з 50 п.о., гомологічними областям геному CyHV-3, фланкуючим послідовність, яка повинна бути делетована (фіг. 1).

Ці фрагменти продукували за допомогою ПЛР, застосовуючи вектор pgalK як матрицю. Для ампліфікації застосовували наступні праймери (див. таблицю 1, послідовність праймера): для продукування делеції ORF57 Del1: праймери ORF57 Del1fw і ORF57 Del1rev, що приводять до амплікона ORF57 Del1-galK; для продукування делеції ORF57 Del2: праймери ORF57 Del2fw і ORF57 Del2rev, що приводять до амплікона ORF57 Del2-galK. Продукт ампліфікації очищали (QIAquick Gel Extraction Kit). Потім електрокомпетентні клітини SW102, що містять плазмиду FL

- 5 ВАС СуHV-3, електропорували з 50 нг продуктів ПЛР, описаних вище. Електропоровані клітини висівали на чашки на тверде мінімальне середовище M63, доповнене 20% галактозою і хлорамфеніколом (17 мкг/мл), для відбору бактерій, в яких відбулася гомологічна рекомбінація. На закінчення, одержані колонії висівали штрихом на індикаторні планшети МакКонкі, як описано в іншому місці, для підтвердження продукування galK-позитивних клонів. Рекомбінантні молекули ВАС ампліфікували і очищали (QIAGEN Large-Construct Kit), і їх молекулярну структуру контролювали із застосуванням комбінованого підходу рестрикційна ендонуклеаза-саузерн-блотинг, ПЛР і секвенування.

Таблиця 1

## Олігонуклеотиди, застосовувані для ампліфікації ПЛР

Праймер	Послідовність	п.о.	Координати підкресленої послідовності відповідно до номера доступу в Genbank. NC_009127
ORF57 Del1fw	5'-CGTACAGGGTGGCGGTGCACCTGTCCC GAAGGCCTTCACCGCCTGGGAGCTCCCTGTT GACAATTAATCATCGGCA-3'	77 п.о.	99551-99599
ORF57 Del1rev	5'-CGGCTCATCATCTGCGGGTCCATCCAGG CGCCCTTGCCCCACAGCAGAGCTTCAGCACTGTCCTGCTCCTT-3'	71 п.о.	99743-99694
ORF57 Del2fw	5'-CTTTGTGCTGCACAAGGGCTTCAACCAC CACTACGCCTTCTGCGATCACCCCTGTTGACAATTAATCATCGGC A-3'	74 п.о.	99894-99943
ORF57 Del2rev	5-CTGAGCGTTGTTGAAGGCCTCCATCAGGT GCTGCCTGATCTGCTTGTGCAGAGCTCAGCACTGTCCTGCTCCTT -3'	74 п.о.	100161- 100112

\*Праймери представляють послідовності, гомологічні СуHV-3-геному (підкреслені послідовності) і експресійній касеті galK.

10

- d) Відтворення інфекційного вірусу з рекомбінантної плазмиди FL BAC ORF57 СуHV-3. Плазмиди BAC СуHV-3 трансфікували (Lipofectamine Plus, Invitrogen) в пермісивні ССВ. Для продукування плазмиди BAC одержані штами з локусом ТК дикого типу, плазмиди BAC СуHV-3 котрансфікували в клітини ССВ разом з вектором pGEMT-ТК (молекулярне співвідношення 1:75). Через сім днів після трансфекції вірусні бляшки, негативні відносно EGFP-експресії (BAC-касета кодує EGFP-експресійну касету), відбирали і збагачували трьома послідовними раундами очищення бляшок. Подібним чином для відтворення віріонів з усіченою BAC-касетою з вірусного геному, плазмиди BAC котрансфікували в клітини ССВ разом з вектором pEFIN3-NLS-Cre, що кодує рекомбіназу Cre, зливу з сигналом ядерної локалізації (Costes et al.; 2008 JVI) (молекулярне співвідношення: 1:70).

20

- е) Продукування рекомбінантних плазмід ORF56 СуHV-3 FL BAC із застосуванням galK-позитивної селекції в бактеріях. Дві рекомбінантні плазмиди FL BAC СуHV-3 з делецією в локусі ORF56 (див. ORF56 Del1 і ORF56 Del2 на фіг. 1) продукували із застосуванням galK-позитивної селекції в бактеріях, як описано раніше (Wanning et al., 2005) (фіг. 3). Рекомбінаційний фрагмент складався з гена галактокінази (galK) (1231 п.о.), фланкованого послідовностями з 50 п.о., гомологічними області, фланкуючій послідовність геному СуHV-3, яка повинна бути делетована (фіг. 1). Ці фрагменти продукували за допомогою ПЛР із застосуванням вектора pgalK як матриці. Застосовували наступні праймери для ампліфікації (див. таблицю 2 для послідовності праймера): для продукування делеції ORF56 Del1: праймери ORF56 Del1fw і ORF56 Del1rev, що приводять до амплікона ORF56 Del1-galK; для продукування делеції ORF56 Del2: праймери ORF56 Del2fw і ORF56 Del2rev, що приводять до амплікона ORF56 Del2-galK. Продукт ампліфікації очищали (QIAquick Gel Extraction Kit). Потім електрокомпетентні клітини SW102, що містять плазмиду СуHV-3 FL BAC, електропорували з 50 нг продуктів ПЛР, описаних вище.

25

30

- Електропоровані клітини висівали на чашки на тверде мінімальне середовище М63, доповнене 20% галактозою і хлорамфеніколом (17 нг/мл), для відбору бактерій, в яких відбулася гомологічна рекомбінація. На закінчення, одержані колонії висівали штрихом на індикаторні планшети МакКонкі, як описано в іншому місці, для підтвердження продукування galK-позитивних клонів. Рекомбінантні молекули ВАС ампліфікували і очищали (QIAGEN Large-Construct Kit), і їх молекулярну структуру контролювали із застосуванням комбінованого підходу рестрикційна ендонуклеаза-саузерн-блотинг, ПЛР і секвенування.

Таблиця 2

## Олігонуклеотиди, застосовувані для ампліфікації ПЛР

Праймер	Послідовність*	п.о.	Координати підкресленої послідовності відповідно до номера доступу в Genbank. NC_009127
ORF56 Del1fw	5'-TCAGGATCGAGGTCACCAGCTTGAGCTTCTCG GGCATGTACTCGCGCCACCCTGTTGACAATTAATCATCGG CA-3'	74 п.о.	97475-97524
ORF56 Del1rev	5'-CGGCGAGGTGATTTTCGGTCATGAGCAAATCGA TTGCGGCCGAACAGCAGCTCAGCACTGTCCTGCTCCTT-3'	70 п.о.	98361-98312
ORF56 Del2fw	5'-GATCGGGTACGTCGGCGTGCGCCACTTGACCTT CCTCAACGTCCCCGTCACCTGTTGACAATTAATCATCGGC A-3'	74 п.о.	97275-97324
ORF56 Del2rev	5'-GCGCACACCATCACCATCTGTCCCATGTCTCCCCA ACGCTACACCGTGA CT CAGCACTGTCCTGCTCCTT-3'	70 п.о.	98561-98512

\*Праймери представляють послідовності, гомологічні геному CyHV-3 (підкреслені послідовності) і експресійній касеті galK.

- 10 f) Відтворення інфекційного вірусу з рекомбінантної плазмиди ORF56 CyHV-3 FL BAC. Плазмиди CyHV-3 BAC трансфікували (Lipofectamine Plus, Invitrogen) в пермісивні ССВ. Для продукування одержаних з плазмиди BAC-штамів з локусом ТК дикого типу плазмиди BAC CyHV-3 котрансфікували в клітини ССВ разом з вектором рGEMT-ТК (молекулярне співвідношення 1:75). Через сім днів після трансфекції вірусні бляшки, негативні по EGFP-експресії (BAC-касета кодує EGFP-експресійну касету), відбирали і збагачували трьома послідовними раундами очищення бляшок. Подібним чином, для відтворення віріонів з усіченою BAC-касетою з вірусного геному, плазмиди BAC котрансфікували в клітини ССВ разом з вектором рEFIN3-NLS-Cre, що кодує рекомбіназу Cre, злизу з сигналом ядерної локалізації (Costes et al.; 2008 JVI) (молекулярне співвідношення: 1:70).
- 20 g) Продукування рекомбінантних плазмід ORF56-57 CyHV-3 FL BAC із застосуванням galK-позитивної і негативної селекції в бактеріях. Рекомбінантні плазмиди FL BAC CyHV-3 з делецією в локусах ORF56 і ORF57 (фіг. 1) продукували із застосуванням galK-позитивної і негативної селекції в бактеріях, як описано раніше (Warming et al., 2005) (фіг. 4). Перший рекомбінаційний процес (galK-позитивна селекція) здійснювали для заміщення ідентифікованої послідовності ORF56 і ORF57 геном галактокінази (galK) (1231 п.о.). Рекомбінаційний фрагмент складався з гена galK, фланкованого послідовностями з 50 п.о., гомологічними області геному CyHV-3, фланкуючій послідовність, яка повинна бути делетована (фіг. 1) (ORF56-57 Del-galK, фіг. 4). Цей фрагмент продукували за допомогою ПЛР із застосуванням праймерів ORF56-ORF57 Delfw і ORF56-ORF57 Delrev (Таблиця 3) і вектора pgalK як матриці. Продукт ампліфікації очищали (QIAquick Gel Extraction Kit). Потім електрокомпетентні клітини SW102, що містять плазмиду CyHV-3 FL BAC, електропорували з 50 нг продукту ПЛР, описаного вище. Електропоровані клітини висівали на чашки на тверде мінімальне середовище М63, доповнене 20% галактозою і хлорамфеніколом (17 мкг/мл), для відбору бактерій, в яких відбулася гомологічна рекомбінація. На закінчення, одержані колонії висівали штрихом на індикаторні планшети МакКонкі, як описано в іншому місці, для підтвердження продукування galK-позитивних клонів. Рекомбінантні молекули BAC ампліфікували і очищали (QIAGEN Large-Конструкція Kit), і їх молекулярну

- структуру контролювали із застосуванням комбінованого підходу рестрикційна ендонуклеаза-саузерн-блотинг, ПЛР і секвенування. Другий рекомбінаційний процес (galK-негативна селекція) виконували для видалення galK-касети з плазмиди FL BAC ORF56-57 Del-galK. Застосовували синтетичний фрагмент ДНК з 499 п.о. (ORF56-57 касета Del, див. нижче) для досягнення цієї мети. Він складається з послідовності, гомологічної області геному CyHV-3, фланкуючої послідовності, яка повинна бути делетована: 250 п.о. (координати з 96751 по 9700, номер доступу в Genbank NC\_009127) перед геном galK і 249 п.о. (координати з 99751 по 100000 з делецією основи 99760, номер доступу в Genbank NC\_009127) після гена galK. Електрокомпетентні клітини SW102, що містять плазмиду FL BAC ORF56-57 Del-galK, електропорували з 50 нг продукту ПЛР, описаного вище. Електропоровані клітини висівали на чашки на тверде мінімальне середовище, доповнене 2-деоксигалактозою, для відбору бактерій, в яких відбулася гомологічна рекомбінація (розщеплення 2-деоксигалактози galK продукує токсичні продукти). Рекомбінантні молекули BAC ампліфікували і очищали (QIAGEN Large-Construct Kit), і їх молекулярну структуру контролювали із застосуванням комбінованого підходу рестрикційна ендонуклеаза-саузерн-блотинг, ПЛР і секвенування.

Касета ORF56-57 Del:

5'-

ttgtcaaccagtcctccagggctcggttggtgctggcctccttgcccttggtcacggcgatggcagacgccacaatcctcgc  
gacgggttcctgcagagcagagttctaaacatttcgacgcctcctccgacggtgaaccactctgaccaattcaggtcgga  
gggccacgtctgctgtgcatcatcgtctgcacagcgtccctcgacagccccagcccgacagcagtcgccactcttcct  
gttgagtgcacgactcgtcaagatcaagctgcttgagcgcgtcgtgtacgggttcattgatggccctgcagaaggcgctgcg  
cattcagaagcagggctgcaggatggtggggctcgaggacccggagaagggtggaggatatgaagaactttgtgtgca  
caagggctcaaccaccactacgccttctgcgatcaccactggcagcactggggccctggggccgctccttcgagggcgagc  
tgcccgacgtggtg-3'

Таблиця 3

Олігонуклеотиди, застосовувані для ампліфікації ПЛР

Праймер	Послідовність	п.о.	Координати підкресленої послідовності відповідно до номера доступу в Genbank. NC_009127
ORF56-ORF57 Delfw	5'-GTCCCTCGACAGCCCCAGCCCGCACAGCAGT CGCCACTCTTCCCTGTTGATCAGCACTGTCCTGCTCCTT- 3'	70 п.о.	96951-97000
ORF56-ORF57 Delrev	5'-AACCCGTACACGACGCGCTCAAGCAGCTTGATC TTGACGACGTCGTGCACCCTGTTGACAATTAATC ATCGGCA-3'	74 п.о.	99800-99751

\*Праймери представляють послідовності, гомологічні геному CyHV-3 (підкреслені послідовності) і експресійній касеті galK.

- h) Відтворення інфекційного вірусу з рекомбінантної плазмиди ORF56-57 CyHV-3 FL BAC. Плазмиди BAC CyHV-3 трансфікували (Lipofectamine Plus, Invitrogen) в пермісивні ССВ. Для продукування плазмиди BAC, одержаної зі штаму з локусом ТК дикого типу, плазмиди BAC CyHV-3 котрансфікували в клітини ССВ разом з вектором рGEMT-ТК (молекулярне співвідношення 1:75). Через сім днів після трансфекції вірусні бляшки, негативні по EGFP-експресії (BAC-касета кодує EGFP-експресійну касету), відбирали і збагачували трьома послідовними раундами очищення бляшок. Подібним чином, для відтворення віріонів, з усіченою BAC-касетою з вірусного геному, плазмиди BAC котрансфікували в клітини ССВ разом з вектором рEFIN3-NLS-

Cre, що кодує рекомбіназу Cre, зливу з сигналом ядерної локалізації (Costes et al.; 2008 JVI) (молекулярне співвідношення: 1:70).

i) Тести безпеки

Звичайних коропів акліматизували в 60-літрових резервуарах при 24°C протягом 10 днів. Коропів (біомаса 50 г риби/л) занурювали на 2 год. у воду, що містить 4, 40 або 400 БУО/мл KHV-штаму, який повинен бути тестований. Контрольну групу (імітаційно інфіковану) занурювали у воду, в яку додавали рівний об'єм культурального середовища. Наприкінці інкубаційного періоду риб повертали в більший резервуар. Вірусні інокуляти титрували перед інокулюванням і зворотно титрували після інокулювання для забезпечення того, щоб дози були еквівалентними між групами. Риб перевіряли щодня на клінічні ознаки захворювання KHV і мертвих риб видаляли.

j) Вакцинація/стимуляція

Звичайних коропів акліматизували в 60-літрових резервуарах при 24°C протягом 10 днів. Для вакцинації коропів (біомаса 50 г риби/л) занурювали на 2 год. у воду, що містить 4, 40 або 400 БУО/мл KHV-штаму, який повинен бути тестований. Наприкінці інкубаційного періоду рибу повертали в більший резервуар. Через 3 тижні або 6 тижнів після вакцинації риб стимулювали вірулентним KHV витримуванням спільно з рибами, інфікованими безпосередньо перед їх випусканням в резервуар з вакцинованою рибою. Цих риб інокулювали імєрсією у воду, що містить 300 БУО/мл вірулентного батьківського штаму FL, протягом 2 год. Двох інфікованих риб випускали в кожний резервуар, що містить вакциновану рибу.

к) Результати безпеки і стимуляції

Безпеку штамів FL BAC, усіченого по ORF57 Del1-galK (фіг. 5 A), і FL BAC, усіченого по ORF57 Del2-galK (фіг. 5B), тестували, як описано в прикладах (Тести безпеки), на звичайному коропі (вік 7 місяців, середня маса 3,74 г, n=20). Усічений штам FL BAC (фіг. 5C) і імітуючу інфекцію (фіг. 5D) застосовували як позитивний і негативний контролю, відповідно. Кількості процентів коропів, що вижили, виражали відповідно до днів після інфекції з днем 0 як вихідною точкою. Через шість тижнів після інфекції рекомбінантами ORF57 з одиночною делецією (фіг. 5E і F) риб стимулювали, як описано в прикладах (вакцинація/стимуляція). Імітовано інфікованих риб застосовували як контролю (фіг. 5G). Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем 42 як вихідною точкою.

З фіг. 5A і B очевидно, що делеційний мутант ORF57 відповідно до винаходу є безпечним, навіть при застосуванні відносно маленьких риб.

Також очевидно з фіг. 5E і F, що делеційний мутант KHV ORF57 відповідно до винаходу є дуже придатним як ефективна вакцина, особливо при введенні в дозі 40 БУО/мл або вище.

Безпеку FL BAC, усіченого по ORF56 Del1-galK (фіг. 6A), і FL BAC, усіченого по ORF56 Del2-galK (фіг. 6B), штамів тестували, як описано в прикладах (Тести безпеки), на звичайному коропі (вік 7 місяців, середня маса 3,74 г, n=20). Штам FL з усіченою BAC (фіг. 6C) і імітуючу інфекцію (фіг. 6D) застосовували як позитивний і негативний контролю, відповідно. Кількості процентів коропів, що вижили, виражені відповідно до днів після інфекції з днем 0 як вихідною точкою. Як очевидно з фіг. 6A і B, делеційні мутанти ORF56 демонструють вірулентність, яка приблизно порівнянна з вірулентністю вірусу дикого типу (Порівняння панелей A і B з панеллю C).

Як видно з фіг. 7 і 8, KHV, що несе делецію в обох ORF57 і ORF56, демонструє безпеку і профіль ефективності, порівнянні з KHV, що несе одиночну делецію ORF57.

Посилання

1. Aoki T., Hirono I., Kurokawa K., Fukuda H., Nahary R., Eldar A., Davison A. J., Waltzek T. B., Bercovier H. & Hedrick R. P. (2007). Genome sequences of three Koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening Koi and common carp worldwide. J. Virol. 81, 5058-65.

2. Babic N., Klupp B.G., Makoschey B., Karger A., Flamand A., Mettenleiter T. C., 1996. Glycoprotein gH of pseudorabies virus is essential for penetration and propagation in cell culture and in the nervous system of mice. The Journal of general virology 77 (Pt 9), 2277-2285.

3. Borst E. M., Hahn G., Koszinowski U. H. & Messerle M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants. J. Virol. 73, 8320-9.

4. Costes B., Fournier G., Michel B., Delforge C., Raj V.S., Dewals B., Gillet L., Drion P., Body A., Schynts F., Loeffrig F., Vanderplasschen A., 2008. Cloning of the Koi herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome demonstrates that disruption of the thymidine kinase locus induces partial attenuation in Cyprinus carpio koi. J. Virol. 82, 4955-4964.



5. Dewals B., Boudry C., Gillet L., Markine-Goriaynoff N., de Leval L., Haig D. M. & Vanderplasschen A. (2006). Cloning of the genome of Alcelaphine herpesvirus 1 as an infectious and pathogenic bacterial artificial chromosome. *J. Gen. Virol.* 87, 509-17.
6. Gillet L., Daix V., Donofrio G., Wagner M., Koszinowski U. H., China B., Ackermann M., Markine-Goriaynoff N. & Vanderplasschen A. (2005). Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J. Gen. Virol.* 86, 907-17.
7. Hedrick R. P., Gilad O., Yun S. C., McDowell T. S., Waltzek T. B., Kelley G. O., Adkison M. A. (2005). Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from Koi and common carp. *Bull. Fish. Res. Agen. Supplement* 2, 1-7.
8. Ilouze M., Dishon A. & Kotler M. (2006). Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and Koi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 147-56.
9. Markine-Goriaynoff N., Gillet L., Karlsen O. A., Haarr L., Minner F., Pastoret P. P., Fukuda M. & Vanderplasschen, A. (2004). The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-M encoded by bovine herpesvirus 4 is not essential for virus replication despite contributing to post-translational modifications of structural proteins. *J. Gen. Virol.* 85, 355-67.
10. Messerle M., Crnkovic I., Hammerschmidt W., Ziegler H. & Koszinowski U. H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14759-63.
11. Morgan R. W., Cantello J. L. & McDermott C. H. (1990). Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian. Dis.* 34, 345-51.
12. Neukirch M., Böttcher K., Bunnajrakul S. (1999). Isolation of a virus from Koi with altered gills. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 19, 221-224.
13. Ronen A., Perelberg A., Abramowitz J., Hutoran M., Tinman S., Bejerano I., Steinitz M. & Kotler M. (2003). Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*, 21, 4677-84.
14. Schroder C., Keil G. M., 1999. Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH(W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *The Journal of general virology* 80 (Pt 1), 57-61.
15. Wagner M., Ruzsics Z. & Koszinowski U. H. (2002). Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* 10, 318-24.
16. Warden C., Tang Q., Zhu H., 2011. Herpesvirus BACs: past, present, and future. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 124595.
17. Warming S., Costantino N., Court D. L., Jenkins N. A. & Copeland N. G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic. Acids. Res.* 33, e36.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Universite de Liege

<120> РЕКОМБІНАНТНИЙ ГЕРПЕСВІРУС КОЇ (KNV) І ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ЗАХВОРЮВАННЯ, ЩО ВИКЛИКАЄТЬСЯ KHV

<130> 23186 FF

<160> 12

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 77

<212> ДНК

<213> Герпесвірус кої

<400> 1

cgtaacagggg ggcggtgcac ctgtcccaga aggccttcac cgctgggag ctccctgttg 60

acaattaatc atcgga 77

<210> 2

<211> 71

<212> ДНК

<213> Герпесвірус кої

<400> 2

cggtcatca tctgcgggtc catccaggcg cccttgcccc acagcagagc ttcagcactg 60

tcctgctcct t 71

<210> 3

<211> 74

<212> ДНК

<213> Герпесвірус кої

<400> 3

ctttgtgctg cacaaggggt tcaaccacca ctacgccttc tgcgatcacc cctgttgaca 60

attaatcatc ggca 74

<210> 4

<211> 74

<212> ДНК

<213> Герпесвірус кої

<400> 4

ctgagcggtt ttgaaggcct ccatcagggtg ctgcctgac tgcttggtgca gagctcagca 60

ctgtcctgct cctt 74

<210> 5

<211> 74

<212> ДНК

<213> Герпесвірус кої

<400> 5

tcaggatcga ggtcaccagc ttgagcttct cgggcatgta ctgcgccac cctgttgaca 60

attaatcatc ggca	74
<210> 6	
<211> 70	
<212> ДНК	
<213> Герпесвірус кої	
<400> 6	
cggcgagggtg atttcggtca tgagcaaadc gattgcggcc gaacagcagc tcagcactgt	60
cctgctcctt	70
<210> 7	
<211> 74	
<212> ДНК	
<213> Герпесвірус кої	
<400> 7	
gatcgggtac gtcggcgtgc gccacttgac ctctctcaac gtccccgtca cctgttgaca	60
attaatcatc ggca	74
<210> 8	
<211> 70	
<212> ДНК	
<213> Герпесвірус кої	
<400> 8	
gcgcacacca tcaccatctg tcccatgtct ccccaacgct acaccgtgac tcagcactgt	60
cctgctcctt	70
<210> 9	
<211> 70	
<212> ДНК	
<213> Герпесвірус кої	
<400> 9	
gtccctcgac agccccagcc cgcacagcag tcgccactct tccctgttga tcagcactgt	60
cctgctcctt	70
<210> 10	
<211> 74	
<212> ДНК	
<213> Герпесвірус кої	
<400> 10	
aaccggtaca cgacgcgctc aagcagcttg atcttgacga cgtcgtgcac cctgttgaca	60
attaatcatc ggca	74
<210> 11	
<211> 499	
<212> ДНК	
<213> Герпесвірус кої	

<400> 11  
 tttgtcaacc agtctctccag ggtcgggttg gcgctggcct ccttgccctt ggtcacggcg 60  
 atggcagacg ccacaatcct cgcgacgggt tccgtcagag cagagttctt aaacatttcg 120  
 acgcctcctc cgacggtgaa ccactctgac caattcaggt cggagggcca cgtctgcctg 180  
 tgcacatcgc tctgcacagc gtccctcgac agccccagcc cgcacagcag tcgccactct 240  
 tccctgttga gtgcacgact cgtcaagatc aagctgcttg agcgcgctcg gtacgggttc 300  
 atgatggccc tgcagaaggc gctgcgcatt cagaagcagg gctgcaggat ggtggggctc 360  
 gaggacccgg agaaggtgga ggatatgaag aactttgtgc tgcacaaggc cttcaaccac 420  
 cactacgcct tctgcgatca ccactggcag cactggggcc tgggcccgtc cttcgagggc 480  
 gagctgcccg acgtggtgg 499

<210> 12  
 <211> 4929  
 <212> ДНК  
 <213> Герпесвірус кої

<400> 12  
 ccaatacttt aaaaaaaca ggagatatta aatatagttc aaacgtttat tgggatacac 60  
 acatcataca caaaatcatg tgctcaacag ttcgacgggg atggagcccg tgtgtccgta 120  
 cttttgcaac cagtctctca gggtcgggtt ggcgctggcc tccttgccct tggtcacggc 180  
 gatggcagac gccacaatcc tcgcgacggg ttccgtcaga gcagagttct taaacatttc 240  
 gacgcctcct ccgacggtga accactctga ccaattcagg tcggagggcc acgtctgcct 300  
 gtgcacatc gtctgcacag cgtccctcga cagccccagc ccgcacagca gtcgccactc 360  
 ttccctgttg agcggcacga acgccaacgc gtgcacccc accgtcgagg ccagcatctc 420  
 cgagtacatt agcgacgtct ggtcctcctg ggtaaaagg cgggtgggca cgtctctcggc 480  
 gaagcacctc atcagcacgg tccccacggc gtgcctaaag ttttggtagg gctgcttcat 540  
 gtacatcttg aaaacggcgt aggcctcgtc gattgtcaca tgctgggtcca ggcgcgtgtt 600  
 gatggcaaag atggcctggt acaagacggc ctgctgcggg tcctcgatcg ggtacgtcgg 660  
 cgtgcgccac ttgaccttcc tcaacgtccc cgtcatggaa gcctcgcagg gcatgtagtc 720  
 gacggcgcac ttgggcacga tgctcttgat ctgttcacac ctcaggcccc tgatgggtgcc 780  
 caggttgggc agcgcggtga tgaccctggc gaagcccgtc gccgccttca gcttgggggt 840  
 gacgctcagg atcgaggtca ccagcttgag cttctcgggc atgtactcgc gccacagaaa 900  
 gagctgcgag cagctcgcgc cgttcagaaa gctcagcatg ttcttgggggt agtcgagcct 960  
 gaggtccacc acgttccagc tgctgtgcga cccgttcgtc accacctgct ccagagtcgt 1020  
 accgctcatc atgtagtgca ggatgctcgc gtgggtacttg ttggcgtaca tggcaatgtc 1080  
 cagcaggcag gccttggcac tcaccgtgca agaatcgagc aggcaccgag acatcctctg 1140

gcacatcatg tcaactcgact ctagcacccgt tctcacgtag atgtacgagc ggcaggtcat	1200
gggcccgactc atcaccgtcg cgacggccac caccgttctgc tgcaccatct tcatcagctc	1260
catcacgcct ttggtcttgt ggtagtcgtc ccacacgtag tggcagacca cgtcctgcag	1320
aaactcgag tccgatagca gtcacctgaa gtgggaccgg agcaccgcg tcctgaacct	1380
ggccgcgcac gtcgcgcagt tcagcagcgc gatgtgctcc tcgctctggt cgcacttgcg	1440
gtgggtcgga ttccgcttgg gtgccgtctc tgcgcgcgc ttcaacgcgg gtaccttgag	1500
gtgctgctga caaccgggtg gcctgacctg agtctgagga gtctgagtct tctgcggagg	1560
gtactgcgcc ttgggaacgt agatgtgagg gtgtgagagg tgaggggtgcg ggtacggcgg	1620
cgggtggcagc accagcgtct tgccctccctc gatggtgatg gtcagcttct tgggctgctg	1680
ctgctgctgt tcggccgcaa tcgatttctc catgaccgaa atcacctcgc cgtcgtcctc	1740
atcagcctcg tcgtccgcat cgacttccat cctctcattc tcggccctca ccttctcccc	1800
cctctctacg acccccagag cggaggaggt ggtagtggtg gtgcctgagg aggacgcggt	1860
ggaggtgatc agcggagtct ccgtcacggt gtagcgcttg ggagacatgg gacagatggt	1920
gatggtgtgc gccgtcgtgt gaggcggcag caccggcagg agcttggggag gctgaggttt	1980
ggccgcctcc ggccggggccc tcctgaagac gcccgctcga aagttgacgg gcggcggtgc	2040
caccatcacg ttacagatgg ggttctcttt ggccaaggac agaggcgccg gcctctgcgc	2100
cgcgatggtc cacaccggcg gcaacatcct attgttgacg acgggtgtccg agggcgatga	2160
cacggacatg cactgctca ggttcaggc cctgagcatg gccctggacc cctcgtgctt	2220
gctggtgctg gtggtgccgc cgtgcctga caccgtcaga ttctcgggct cgtcaaccgt	2280
ctccacatca atctcgtcct cctcatccgc caggggccgag acggcgggccg agacggcggc	2340
ggctgtagcc gaccggctgt tgctgcgcgt gtaggggtga tgccctctgcg tcttcttgtt	2400
gaagatgtgc tccgagacgt gtttgttcga gatctcgatc tgctcctcga tctccttgta	2460
cgagatcggc tttcggcgac ggccggccct gccgaggcga gtcggcaccg gactcgtgtc	2520
gatgaccagg ttctcgtgat catcttcttc ctccggtccgt ttaccgtcgt cggggacggg	2580
tacggggttg ggtacggggt tggcgacctc gccatcattt tcggtggcgt ttgcgttggt	2640
agacatgata ttggcaaatt ttccgtctct ctgcgctaac ggagttgtgt gtgacgaggg	2700
gtgaccccca aggttcatat tccccctcga ctgggtgcga ccgcagcgcc tgatggcagc	2760
cagggaacatt gcgatgaatc agcggggtgc tgcgggtgat ggccggcagg acgaggaatc	2820
gaccttcgac aacagctgcg aggatctgcc cgactttgta gaggcctgcc tgacggagga	2880
gaaccgcaag cggtaacaaca tccaggacgg cgactttcct ccgtacaggg tggcggtgca	2940
cctgtcccag aaggccttca ccgcctggga cgaggctgac tacgcggccc tggccgactg	3000
cctgtgcgag ggtaccacc tgcaggccgt gcacactcac aagctctacg tgctggcgtg	3060

```

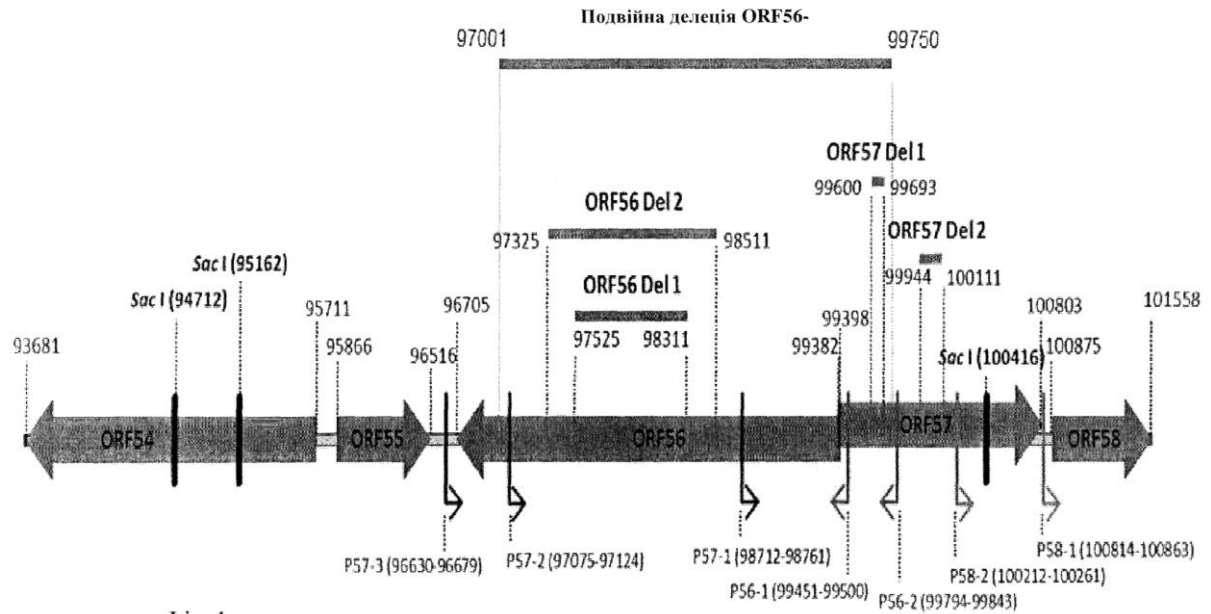
cggcgctctg ctgtggggca agggcgcttg gatggacccg cagatgatga gccgtctcta 3120
cgtgcacgac gtcgtcaaga tcaagctgct tgagcgcttc gtgtacgggt tcatgatggc 3180
cctgcagaag gcgctgcgca ttcagaagca gggctgcagg atggtggggc tcgaggaccc 3240
ggagaagggt gaggatatga agaactttgt gctgcacaag ggcttcaacc accactacgc 3300
cttctcgat caccactggc agcactgggc cctgggccgc tccttcgagg gcgagctgcc 3360
cgacgtgggt gtcaaggaga tgattagcga cggcctagcc tgcaccctgg agcgcgccgg 3420
tcccttctcg acgctggccg actggctcga gtccttcagt ctccgcgcct acccgagcc 3480
catgcacaag cagatcaggc agcacctgat ggaggccttc aacaacgctc aggacgtcga 3540
ctttccgatg ttcaagagca gcctcaagtt cctggcctcg atgcactgcc tctacaagac 3600
gccgcgtgg agcttcatgc ccagcgccgt caataccacc ctcgacacct tcgacgactg 3660
cgctgcgac gtgcacgtcc tgcgccacgt cgagggccaa aacagctgcg actgtctgtg 3720
ctgccgtcgc cagggtgttc acgacgagga ctgccgtccc acccgggccc tggacgcggc 3780
cgagctccgc ggcgagggca tgtcggacga cgacgacatc gagagcgagg aggaggccct 3840
cggcgccgctc aagctggacg tgggcccgat gaagcagaag cgcattgcga aggccatgcg 3900
ctacgcctcg gcagctgcgg cagccgacgc cgcggacggt cagaagatgt actccgtcaa 3960
agagcccaag gtggtggccg tcaaggctca gctggtgggt gtcggcgata ccgacgtccc 4020
ctcatcctcc acggcgccaa aggactgcgc ggacggcaag tgtcaggagc cctgcaactg 4080
cgagcgtcct cccggccctc cgaccgacta cgacaagagg gttaaggcca agaagatcag 4140
gaagcccaag aacctacca aaaccaaata ctaacatctc gctcactcac tcaccaataa 4200
aaaaagtcag agtctagtat tgttagtgtg tgtttttatt gtttcatgtt tcaacaagt 4260
acgacagtga aagagttaac aaaatgtgat cggagggttcg ttggtgatct gaaccgtccc 4320
ccacaacgtg aggatgtgtg tggacgagcc gtcgcggggc tcgccgctca tcacgtccca 4380
cacgagtcgc cggctcctagt cccgcttctg agcccaggcg agccgtctgg tcgaacggtt 4440
cccaacggcg acgtctaccg gtctgaggga ccagggtccg cggccgggtg cgtcgcgccg 4500
ctctgcgggt caggcggtca ccagaggac gtctggagcg ggttttcggc gacgggtccg 4560
ggtcgaccgt ctctgcacga tccgcgagtg ggtaggcagc gctggcccga gccgtccgtc 4620
tcgacgtgcc cgcaggtacc tccaagccga gacggcgacg gcgagcaacc tcggtcgacg 4680
ccgacctacc ccgttgccgg ggtgcaggtc agaggggctc tcacctccct ccttcccacg 4740
cggccgacgg cgtccgaagc cgtctcatca tcaaccgttc atcggacgaa ggcgtcccgc 4800
ggaacgctgc cgagcgtgga ccgccggga taccaacgcc gtgaccctgc cgactcgca 4860
accgtcagag gccggtgggg attcccgctc cgagcgccct ccttccctcc ggacgcctgt 4920
ctctggtag 4929

```

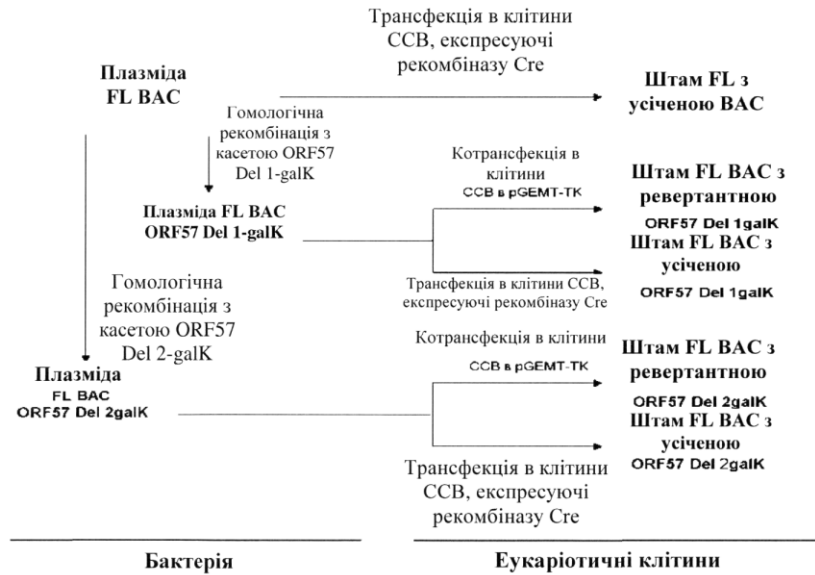
## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Живий рекомбінантний герпесвірус кої (KHN), в якому відкрита рамка зчитування 57 (ORF57) є неповноцінною, з одержанням в результаті живого рекомбінантного KHN, який є атенуованим.
2. Живий рекомбінантний герпесвірус кої за п. 1, який **відрізняється** тим, що він є неповноцінним щонайменше по одному додатковому гену, який сприяє вірулентності, але не є
- 10 необхідним для реплікації.

3. Живий рекомбінантний герпесвірус кої за п. 2, який **відрізняється** тим, що вказаний щонайменше один додатковий ген, вибраний з групи, що складається з гена тимідинкінази, ORF12: передбачуваного гена рецептора фактора некрозу пухлин (TNF), ORF16: передбачуваного гена зв'язаного з G-білком рецептора (GPCR), ORF134: передбачуваного гена
- 5 гомолога інтерлейкіну-10, і ORF140: передбачуваного гена тимідилаткінази.
4. Живий рекомбінантний герпесвірус кої за будь-яким з пп. 1-3, який містить послідовність вектора ВАС (бактеріальна штучна хромосома).
5. Живий рекомбінантний герпесвірус кої за п. 4, який **відрізняється** тим, що послідовність вектора ВАС вирізана з геному герпесвірусу, внаслідок чого збережений гетерологічний
- 10 фрагмент ДНК в сайті вирізання або в колишньому сайті вставки, відповідно в геномі герпесвірусу.
6. Живий рекомбінантний герпесвірус кої за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що він додатково містить гетерологічний ДНК-фрагмент.
7. Живий рекомбінантний герпесвірус кої за п. 6, який **відрізняється** тим, що гетерологічний ген
- 15 являє собою ген, що кодує G глікопротеїн рабдовирусу, що викликає весняну віремію коропів.
8. Живий рекомбінантний герпесвірус кої за будь-яким з пп. 1-7 для застосування як вектора для гетерологічного фрагмента ДНК.
9. Клітина, яка містить рекомбінантний герпесвірус кої за будь-яким з пп. 1-8.
10. Спосіб продукування інфекційних частинок рекомбінантного герпесвірусу кої (KHSV), який
- 20 включає стадії:  
(а) введення живого рекомбінантного KHSV за будь-яким з пп. 1-7 або рекомбінантної ДНК KHSV, що містить геном рекомбінантного герпесвірусу кої за будь-яким з пп. 1-7, в пермісивні еукаріотичні клітини; і  
(б) культивування вказаної клітини для продукування рекомбінантного герпесвірусу кої (KHSV).
- 25 11. Живий рекомбінантний герпесвірус кої за будь-яким з пп. 1-7 і/або рекомбінантна ДНК KHSV, що містять геном рекомбінантного герпесвірусу кої за будь-яким з пп. 1-7, для застосування у вакцині для профілактики і/або терапевтичного лікування у риби захворювання, що викликається герпесвірусом кої (KHSV).
- 30 12. Вакцина для профілактики і/або терапевтичного лікування у риби захворювання, що викликається герпесвірусом кої (KHSV), яка **відрізняється** тим, що вказана вакцина містить живий рекомбінантний герпесвірус кої за будь-яким з пп. 1-7 і/або рекомбінантну ДНК KHSV, що містять геном рекомбінантного герпесвірусу кої за будь-яким з пп. 1-7, і фармацевтично прийнятний носій.
- 35 13. Вакцина для профілактики і/або терапевтичного лікування у риби захворювання, що викликається рабдовирусом, що викликає весняну віремію коропів, яка **відрізняється** тим, що вказана вакцина містить живий рекомбінантний герпесвірус кої за п. 7 і/або рекомбінантну ДНК KHSV, що містять геном рекомбінантного герпесвірусу кої за п. 7, і фармацевтично прийнятний носій.

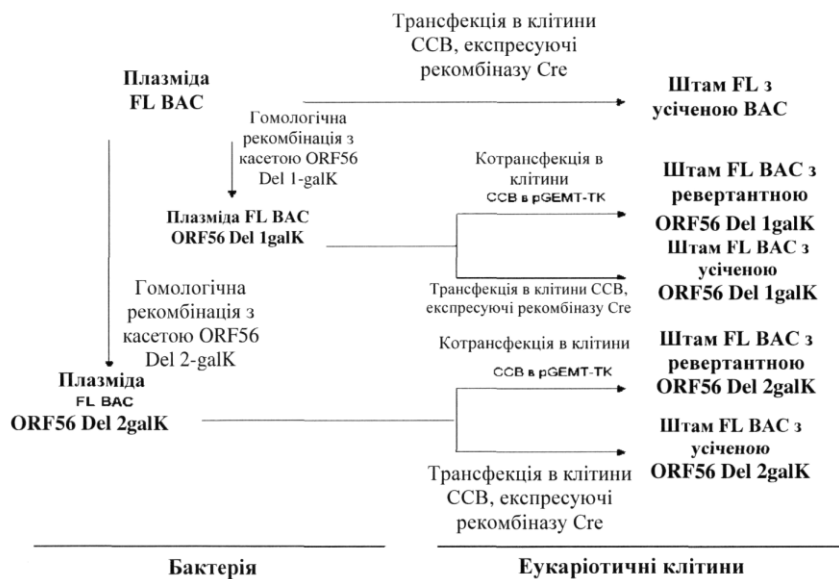


Фіг. 1

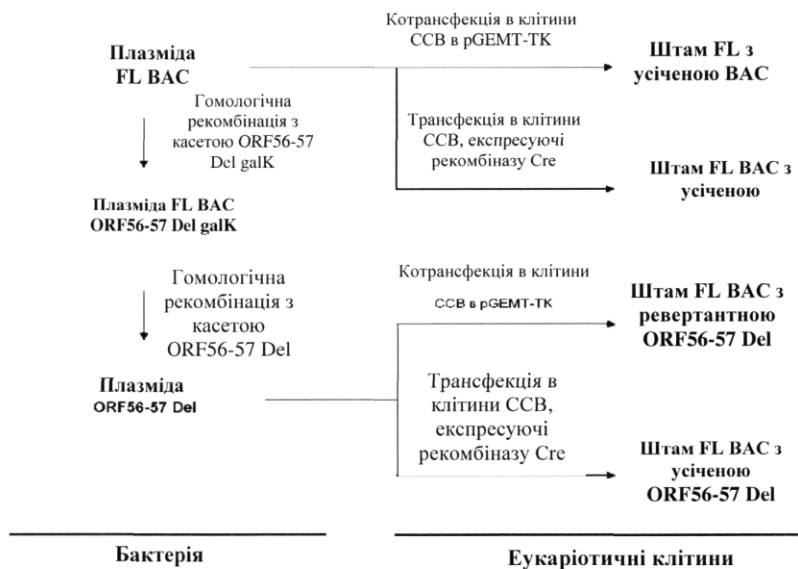


Фіг. 2



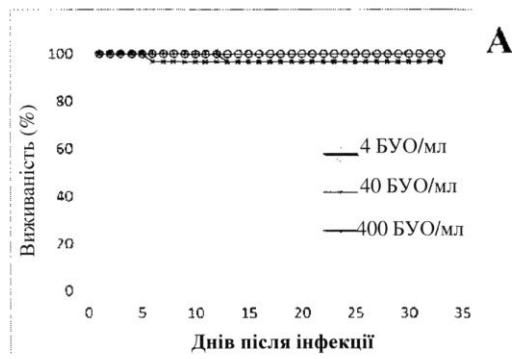


Фіг. 3

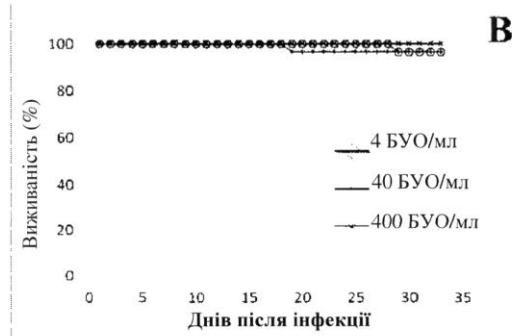


Фіг. 4

Штам FL BAC з усіченою ORF57 Del1-galK

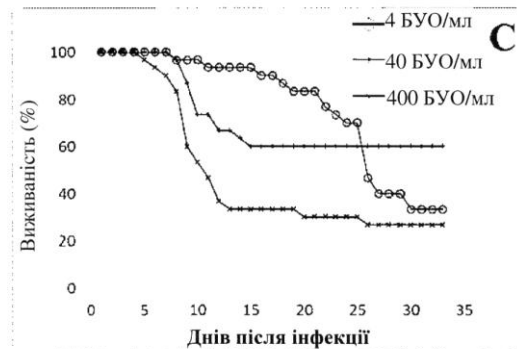


Штам FL BAC з усіченою ORF57 Del2-galK

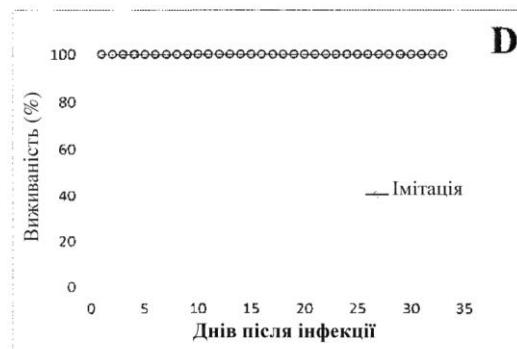


Фіг. 5A, 5B

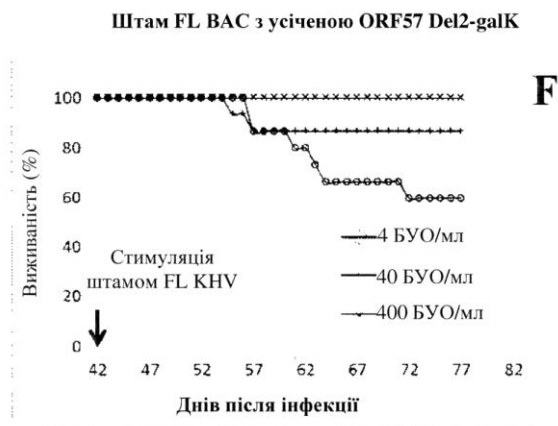
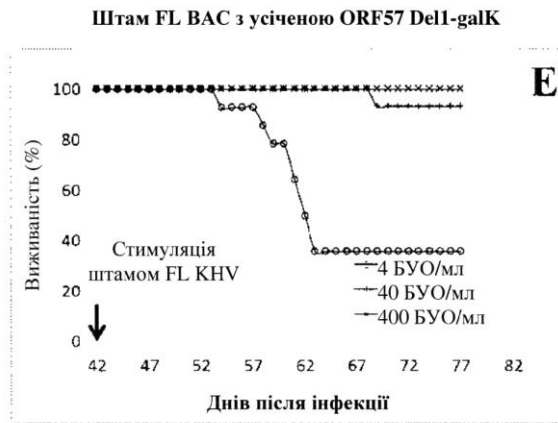
Штам з усіченою FL BAC



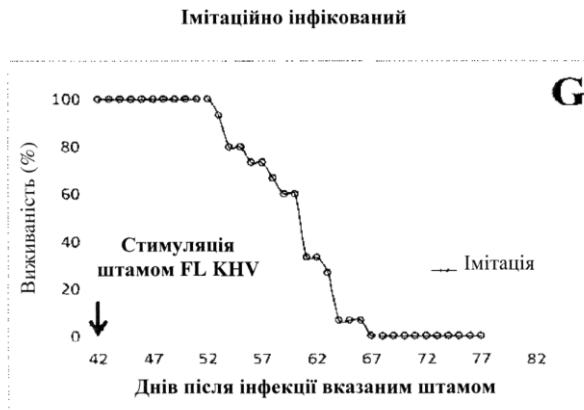
Імітаційно інфікований



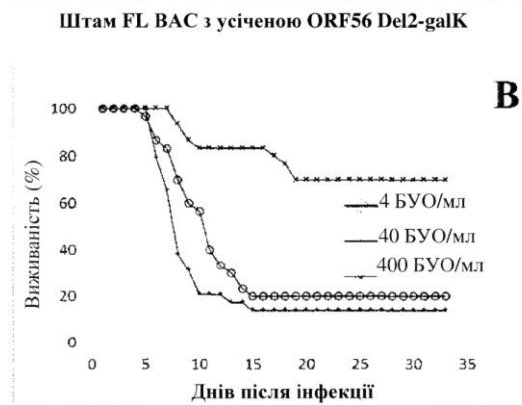
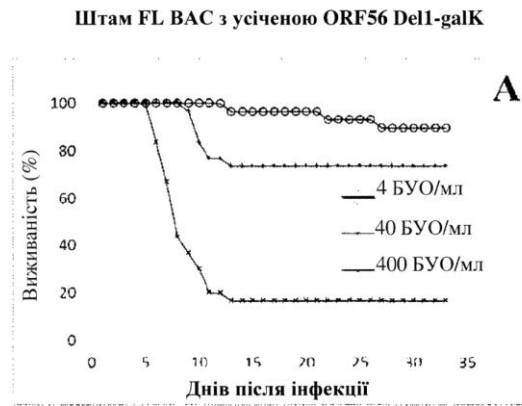
Фіг. 5C, 5D



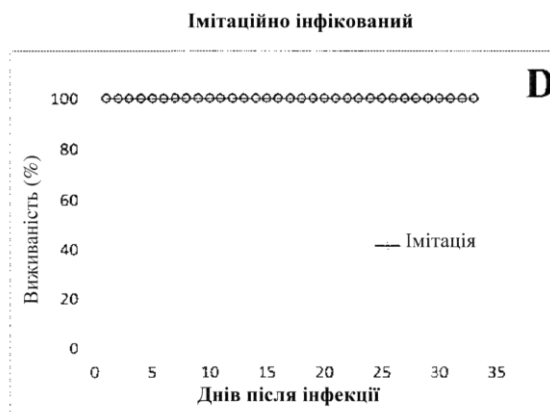
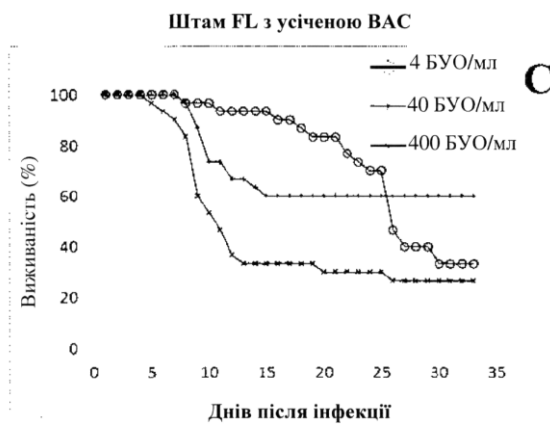
Фіг. 5E, 5F



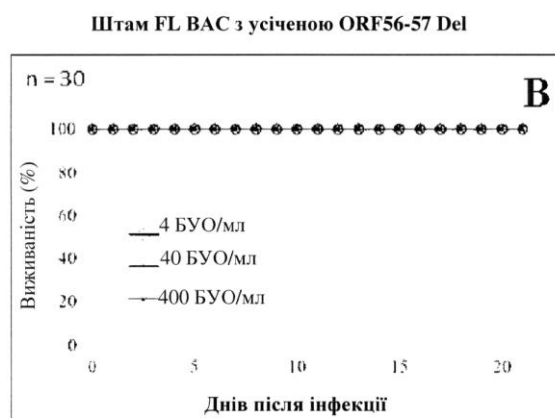
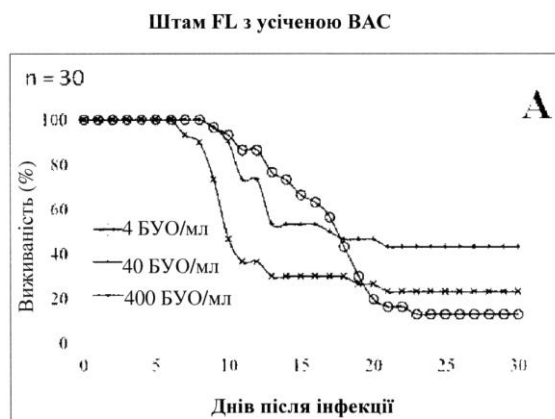
Фіг. 5G



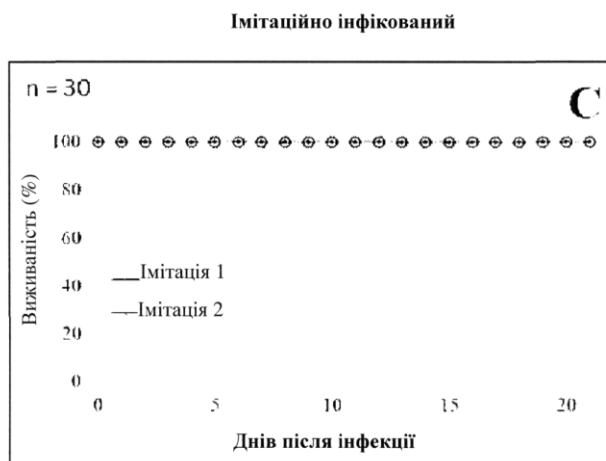
Фіг. 6А, 6В



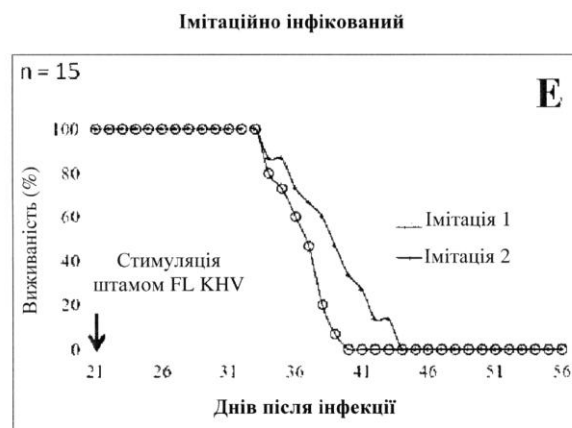
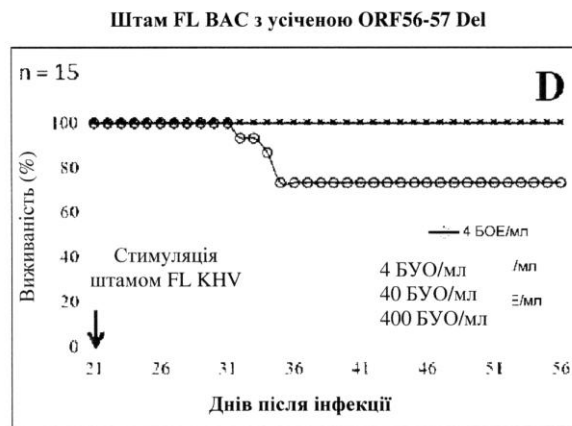
Фіг. 6С, 6D



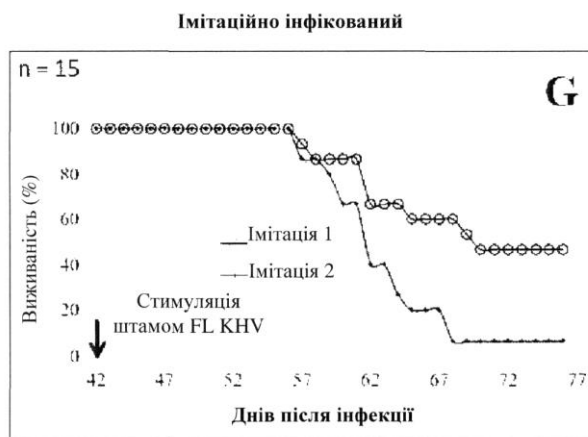
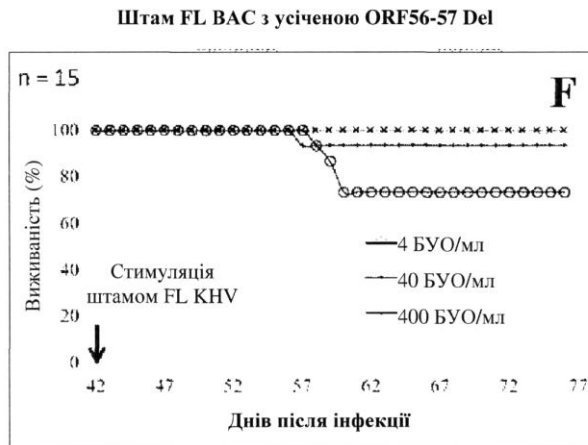
Фіг. 7А, В



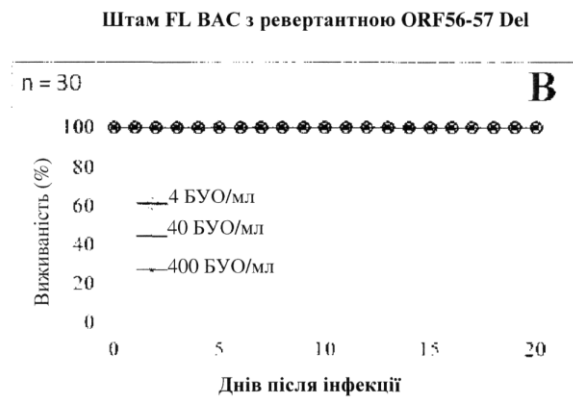
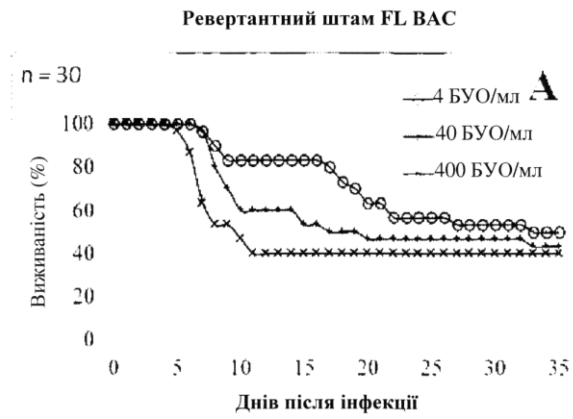
Фіг. 7С



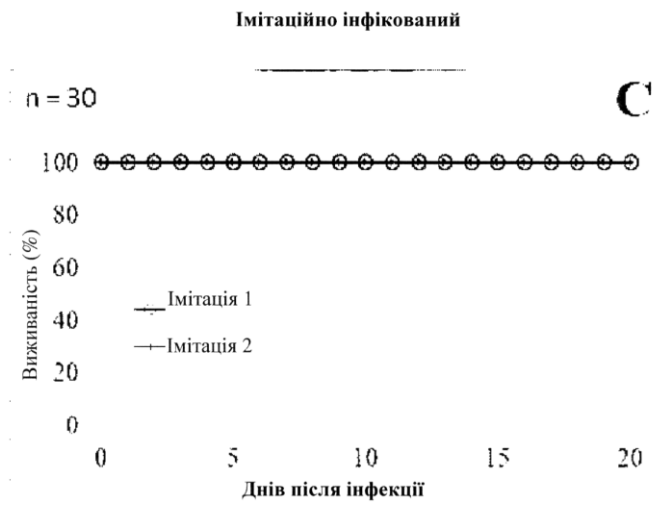
Фіг. 7D, E



Фіг. 7F, G



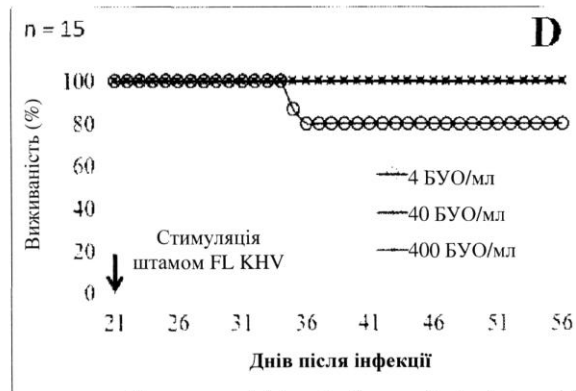
Фіг. 8А, В



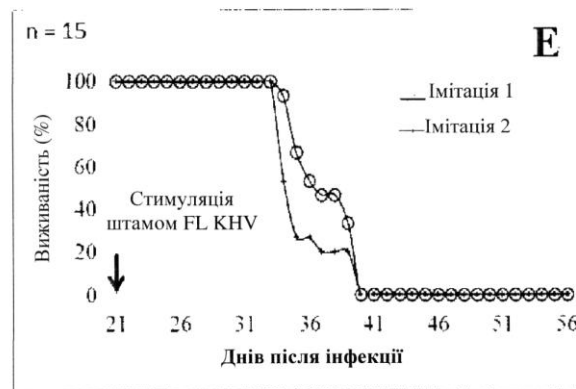
Фіг. 8С



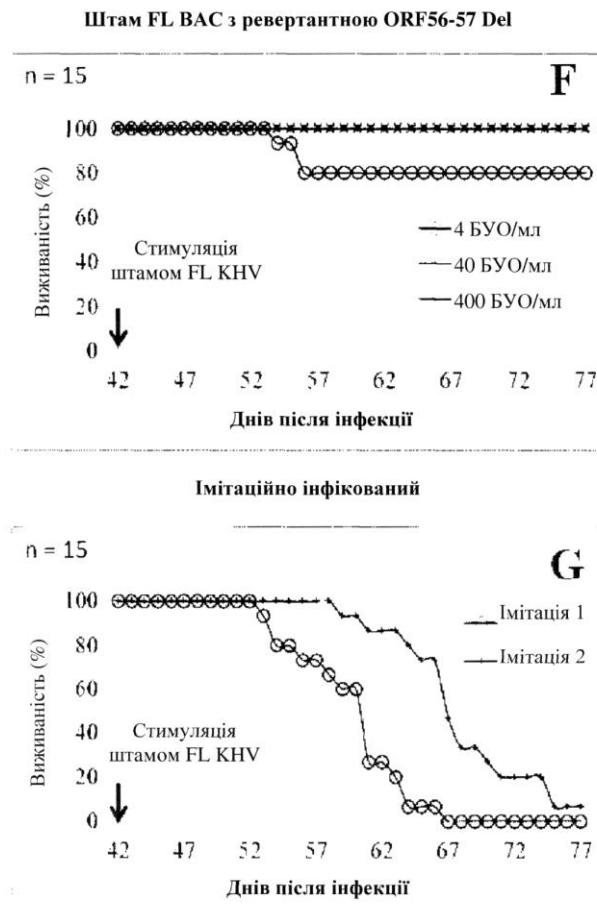
Штам FL BAC з ревертantlyю ORF56-57 Del



Імітаційно інфікований



Фіг. 8D, E



Фіг. 8F, G