HU 0002260360 B1

(19) HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: 226 036 (13) B1

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 00 02908
(22) A bejelentés napja: 2000. 07. 26.

(40) A közzététel napja: 2002. 09. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: 2008. 03. 28.

(51) Int. Cl.: *A61K 39/17* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

(30) Elsőbbségi adatok:
99202467.9 1999. 07. 27. EP
00201091.7 2000. 03. 27. EP

(72) Feltalálók:
Mebatsion, Teshome, Boxmeer (NL);
Schrier, Carla Christina, Boxmeer (NL)

(73) Jogosult:
Intervet International B. V. 100%, Boxmeer (NL)

(74) Képviselő:
Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Embrióvakcinázásra alkalmas rekombináns baromfipestis-vírus**

(57) Kivonat

A találmány tárgya V-proteinjét csökkent szinten expresszáló NDV-mutáns (NDV V$^-$), amely fenotípusosan V-protein-pozitív és amelynek P-génjéből származó mRNS a fertőzött sejtben ≤6%-ban kódol V nyitott leolvasási keretet. A találmány tárgya továbbá az NDV-mutánst tartalmazó, *in ovo* beadható élő vírusos és inaktivált vakcina madarak baromfipestise ellen, továbbá az NDV-mutáns alkalmazása madarak baromfipestise elleni védelme céljából *in ovo* beadásra alkalmas vakcina előállítására.

HU 226 036 B1

A találmány tárgya V-proteinjét csökkent szinten expresszáló mutáns NDV (Newcastle disease virus, baromfipestis-vírus) és a mutáns NDV-t tartalmazó vakcina.

A találmány szerinti NDV-mutáns előnyösen alkalmazható madarak baromfipestise elleni védelme céljából *in ovo* beadásra alkalmas vakcina előállítására.

A baromfit megbetegítő baromfipestis (Newcastle disease, ND) jelentős gazdasági veszteségeket okoz a baromfiágazatban. A betegség kórokozója a *Paramyxoviridae* családba tartozó NDV (baromfipestis-vírus). A baromfipestis változatos megjelenésű betegség, a vírus különböző izolátumai és törzsei eltérő súlyosságú megbetegedést idézhetnek elő. Általában minél fiatalabb a csirke, annál hevenyebb és súlyosabb betegség alakul ki benne. Az állatok a vírus belégzésével és lenyelésével egyaránt fertőződhetnek. A vírus fertőző formája madárról madárra terjed.

A baromfiágazatban a baromfipestis okozta gazdasági károk enyhítése céljából a – különösen az emberi fogyasztásra szánt – baromfikat világszerte rutinszerűen vakcinázzák. Általánosan használt élő (lentogén) NDV-vakcinatörzsek például a V4, a Hitchner B1, az F és a La Sota. Ezek a vakcinatörzsek azonban, különösen a fiatal állatok első vakcinázása során, a légzőszervrendszerben enyhe–közepes fokú oltási reakciót váltanak ki.

Gyenge virulenciájú, (légzőszervi) oltási reakciókat fiatal állatoknak történő beadás esetén sem okozó NDV-vakcinatörzsek kerültek kifejlesztésre. Az 5250298-as számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom (University of Delaware) egy CaTs-nek nevezett, Hitchner B1-törzs-eredetű élő, alacsony hőmérséklethez adaptált, hőérzékeny mutánst ír le. Az 5149530 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom (Duphar Int. Res. B. V.) az Ulster 2C törzsből nyert mutánst, az NDW-vel jelzett baromfipestisvírus-törzset ismerteti. Az 5750111 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom (Akzo Nobel N. V.) egy, nemkívánatos reakciót egynapos csibékben sem okozó, C2-vel jelölt, enyhe virulenciájú vakcinatörzset mutat be.

A jelenleg kapható baromfipestisvírus-vakcinák csak kikelt csibéknél, ivóvízben, aeroszol formájában, kötőhártyára cseppentve vagy parenteralis úton beadva alkalmazhatók. Az említett beadási módok hátrányai közül legjelentősebb a munkaerőigény miatti költségességük. Az utóbbi időben egyes, például a pulykaherpeszvírus és a fertőző bursitisvírus elleni vakcinák embrióvakcinázásra történő alkalmazása [Sharma és Burmester: Avian Diseases *26*, 134–149 (1982) és Sharma: Avian Diseases *29*, 1155–1169 (1985)] hatékonynak és gazdaságosnak bizonyult. Az embrióvakcinázás az egyes betegségekkel szemben már korán kialakuló ellenálló képesség és a több injektálófejjel ellátott félautomata műszerrel történő, tojásonként azonos dózisú vakcina beadásának lehetősége miatt is előnyösnek bizonyult.

Meg kell jegyezni, hogy sok, hagyományosan a madarak kelés utáni oltása során alkalmazott vakcina nem alkalmas *in ovo* vakcinázásra. A késői stádiumú embriók a legtöbb vizsgált vakcinavírus-fertőzéssel, többek között az egynapos korú csibékben biztonságosan használt vakcinavírusokkal szemben is nagyfokú érzékenységet mutatnak. Az *in ovo* vakcinázáshoz tehát a hagyományos vakcinák módosítására van szükség.

Jelenleg nincs kereskedelmi forgalomban *in ovo* alkalmazható baromfipestis-vakcina, mivel még a két legenyhébb, kereskedelmi forgalomban kapható baromfipestisvírus-vakcinatörzs, a NDW és a C2 alkalmazása is nagyfokú embrióelhalást idéz elő.

Az 5427791 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom (Regents of the University of Minnesota) egy, a késői stádiumú, embriókra nem patogén Hitchner B1 baromfipestisvírus-törzs mutánsainak előállítására alkalmas mutagén kémiai hatóanyagok alkalmazását ismerteti. A B1 törzs etil-metanin-szulfonáttal (EMS) végzett kémiai kezelésével NDV-B1-EMS vírusmutánst hoztak létre, amely az embrionálódás 18. napján biztonságosan alkalmazható tyúktojások kezelésére. Az ilyen mutagén eljárások azonban nem ellenőrizhető és nem reprodukálható módon a vírusgenom véletlenszerű mutációihoz vezetnek. Ezek a véletlenszerű mutációk a vírus *in ovo* alkalmazásának biztonságosságán kívüli egyéb tulajdonságokat, például az immunogenitást is befolyásolhatják. További hátrány, hogy minden tojáspasszázst a mutagén anyag (EMS) jelenlétében kell végezni, mert ennek hiányában a mutáns az embrióra nézve nem biztonságos, szülői B1 törzsre revertálódik.

Újabban a „reverz genetikának" nevezett eljárás kifejlesztésével nem szegmentált negatív szálú RNS-vírusok genetikai módosítására nyílt lehetőség [Conzelmann: J. Gen. Virology *77*, 381–389 (1996); Conzelmann: Annu. Rev. Genet. *32*, 123–162 (1998) és Palese és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. *93*, 11354–11358 (1996)]. A negatív szálú RNS-vírusok ellenőrzött genetikai módosítását lehetővé tevő reverz genetikai rendszer új vakcinatörzsek kifejlesztésére is alkalmas lehet.

A *Paramyxoviridae* családba tartozó NDV negatív szálú RNS vírusgenomja hat fő szerkezeti proteint kódoló hat gént tartalmaz (3'-NP-P-M-F-HN-L-5'). A paramyxovírusokra általánosan jellemző továbbá az alternatív leolvasási keretek és a P-génjüket szerkesztő RNS működésének eredményeként létrehozott szerkezeti vagy nem szerkezeti vírusproteinek jelenléte [Kolakofsky és munkatársai: J. Virology *72*, 891–899 (1998)]. Más paramyxovírusokhoz hasonlóan a NDV-ről is ismert, hogy P-génjének szerkesztése a szerkesztőhelyen („editing locus") (UUUUUCCC) egy vagy két G-nukleotid inzerciójával történik. A három mRNS a (nem szerkesztett) P-proteint a V (+1 kereteltolódású) és a W (+2 kereteltolódású) nyitott leolvasási keretet kódolja [Stewart és munkatársai: J. Gen. Virology *74*, 2539–2547 (1993)]. A P-, V- és W-specifikus mRNS-ek transzlációja három, azonos N-terminális, de – a szerkesztőhelytől 3' irányban elhelyezkedő különböző leolvasási keretek alkalmazása miatt – különböző C-terminális féllel rendelkező protein expresszióját eredményezi.

Peeters és munkatársai [J. Virology *73*, 5001–5009 (1999)] és Römer–Oberdörfer és munkatársai [J. Gen. Virol. *80*, 2987–2995 (1999)] – a kódolt cDNS-től kezdődően – teljesen leírták a fertőző NDV megalkotását reverz genetikai rendszer alkalmazásával. Peeters és munkatársai (1999) leírása szerint egy baromfipestisvírus-vakcinatörzs virulenciája drámai mértékben fokozható az aminosavszekvencia F_0protein-hasítási helyénél történő módosításával. Azt is felvetették, hogy az NDV V-protein-expressziójának kiküszöbölése madarakban attenuált fenotípust eredményez (Peeters és munkatársai 1999, lásd fent).

A találmány szerinti megoldással célunk egy olyan NDV-mutáns azonosítása volt, amely madarak ND-vel szembeni védettségének biztosítására alkalmas, nem csupán a kikelt, fiatal madaraknak, hanem *in ovo* is biztonságosan beadható vakcina előállítására használható.

Egy új, a kereskedelemben kapható gyenge virulenciájú NDW- és C2 vakcinatörzsekhez hasonlóan gyenge virulenciájú, attenuált tulajdonságai miatt fiatal frissen kikelt csibék vakcinázására alkalmas, viszont azokkal ellentétben embrióvakcinázásra is biztonságosan alkalmazható baromfipestisvírus-mutánst azonosítottunk.

A találmány tárgyát egy, V-proteinjét csökkent mértékben expresszáló baromfipestisvírus-mutáns képezi (NDV V^-), amely fenotípusosan V-protein-pozitív, és a fertőzött sejtekben a P-gén által kódolt mRNS-einek ≤6%-a V nyitott leolvasási keretet kódol.

Tapasztalataink szerint a fenti baromfipestisvírus-mutáns – még 11 napos embriónak adva is – a mutáns kialakításához használt, az összes embriót kelés előtt elpusztító eredeti lentogén vakcinatörzshöz képest jelentősen kisebb mértékű embrióelhalást idéz elő.

Azt tapasztaltuk továbbá, hogy az NDV V^--mutáns nem befolyásolta a tojások – különösen az embrionált közönséges tyúktojások – keltethetőségét, és a vakcinázott tojásból kikelt csibék védetté váltak a virulens baromfipestisvírus-fertőzéssel szemben. Mindezek a nem várt összetett tulajdonságok különösen alkalmassá teszik az NDV V^--mutánst *in ovo* felhasználásra szánt vakcina gyártására.

Meglepő módon a reverz genetikai eljárással előállított, V-protein-expresszióra képtelen baromfipestisvírus-mutánsok nem nyerhetők vissza a transzfekciós felülúszók embrionált tyúktojásba történő passzálása után. Egy baromfipestisvírus-mutánsban a V-protein expressziójának teljes megszüntetése nem eredményez fertőző vírusrészecskéket, ezért kerülendő.

Ennélfogva a találmány szerinti baromfipestisvírus-mutáns fenotípusosan pozitív, de az immunológiai vizsgálatok szerint a mutáns által fertőzött sejtben termelt V-protein mennyisége az eredeti NDV-vel fertőzött sejthez képest alacsonyabb. Egy fertőzött gazdasejtben a V-protein-expresszió jelenléte vagy hiánya (a fenotípus), illetve relatív szintje immunfluoreszcenciás vizsgálattal (IFT) vagy immunbloteljárással, speciális, a V-protein C-terminális vége ellen termelt V-protein elleni savó alkalmazásával határozható meg, a leírtak szerint.

A találmány szerinti NDV V^--mutáns P-génjenek mRNS-szerkesztése egyértelműen alacsonyabb mértékű. Az eredeti NDV-vel fertőzött sejtekkel szemben, amelyekben a P-génről átíródott, V (és W) nyitott leolvasási keretet kódoló mRNS-ek általában körülbelül 30%-os (és 2%-os) gyakorisággal vannak jelen, a találmány szerinti NDV V^--mutáns csak ≤6%-os gyakorisággal szerkeszti P-génjét.

A P-génről átíródott mRNS-populációk relatív előfordulása az 1. példában leírt módon határozható meg. Ennek megfelelően, a P-gén mRNS-képző gyakoriságának meghatározásához használt klónok száma legalább 100, előnyösen 100–500. Egy fenotípusosan V-protein-pozitív NDV V^--mutáns esetében a V ORF-szerkesztés 0%-nál magasabb.

A fenotípusosan V-protein-pozitív NDV V^--mutáns P-génjéről átírt mRNS-ek előnyösen ≤3, előnyösebben ≤1%-a V ORF-et kódol a fertőzött sejtekben.

A találmány szerinti NDV V^--mutáns a V ORF szerkesztési gyakoriságával (editing frequency, e.f.) is meghatározható: a találmány szerinti NDV V^--mutáns V ORF szerkesztési gyakorisága 0%<e. f. ≤6%, előnyösen 0%<e. f. ≤3%, még előnyösebben 0%<e. f. ≤1%.

Az NDV V^--mutáns *in ovo* beadásra alkalmas, a hagyományos élő baromfipestis vakcinák esetében általánosan használt, standardeljárások szerint előállított baromfipestis-vakcina készítésére használható.

Röviden, NDV V^--mutánssal fogékony tenyésztőközeget oltunk be, és a vírust azon a kívánt titer eléréséig szaporítjuk, majd a NDV-t tartalmazó anyagot kinyerjük. A kinyert anyagból immunizáló tulajdonságokkal rendelkező gyógyászati készítményt állítunk elő.

A találmány szerinti megoldásban minden, az NDV-k szaporodását elősegítő tenyésztőközeg alkalmazható, többek között elsődleges (madár-) sejttenyészetek, például csirkeembrió-fibroblastsejtek (chicken embryo fibroblast, CEF) vagy csirkevesesejtek (chicken kidney, CK), illetve emlőssejtvonalak, például a VERO-sejtvonal vagy újszülött hörcsög vesesejtvonala (baby hamster kidney, BHK).

Az NDV V^--mutáns szaporítására az embrionált SPF tyúktojás különösen alkalmas tenyésztőközeg. Az embrionált tojások oltására például tojásonként 0,2 ml, legalább $10^{2,0}$ EID_{50} NDV-tartalmú allantois-folyadék használható. Előnyösen 9–12 napos embrionált tojásokat körülbelül $10^{5,0}$ EID_{50}-nel oltunk, majd 2–4 napon át 37 °C-on inkubálunk. 2–4 nap után a termelt NDV-k – előnyösen az allantois-folyadék összegyűjtésével – kinyerhetők. A folyadékot ezután 10 percig 2500 g-vel centrifugáljuk, majd a felülúszót filteren (100 μm) átszűrjük.

Az *in ovo* beadásra alkalmazható vakcina élő baromfipestisvírus-mutánst és gyógyászati szempontból elfogadható hordozót, vagy az ilyen jellegű készítményekben általánosan használt hígítót tartalmaz. A vakcina szuszpenzióként vagy liofilizált formában is előállítható és forgalomba hozható. A hordozók többek között stabilizátorok, tartósítószerek és pufferek lehetnek. Megfelelő stabilizátorok többek között az SPGA, a

szénhidrátok (például a szorbitol, a mannitol, a keményítő, a szacharóz, a dextrán, a glutamát vagy a glükóz), a proteinek (például a szárított tejsavó, az albumin vagy a kazein), vagy ezek bomlástermékei. Pufferként alkalmazhatók például az alkálifém-foszfátok. Megfelelő tartósítószerek a timerozál, a mertiolát és a gentamicin, hígítók lehetnek például a víz, a vizes pufferek (például a pufferolt sóoldat) és a többértékű alkoholok (például a glicerol).

Az NDV V⁻-mutánst tartalmazó vakcinával az embrionált tojás a hagyományos *in ovo* vakcinázási eljárások szerint oltható. A vakcinázást általában az embrionálódás késői szakaszában, az inkubációs idő utolsó negyedében (15–21. nap), előnyösen az inkubáció 18. napján végezzük.

Az embrionált tojás oltása nem túlságosan veszélyes, ha az embrió szöveteit vagy szerveit nem károsítjuk túlságosan. Például egy fecskendőhöz csatlakoztatott (2,54–3,81 cm hosszú, kb. 22 átmérőjű) tűvel a tojáshéj szélesebb végén kis lyukat készítünk, és a vakcinát a belső héjhártyán és a chorioallantois-hártyán keresztül befecskendezzük. Ezután a vakcinázott embrionált tojást keltetőbe helyezzük (4458630 és 5427791 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmak, 98/56413 és 95/35121 számú nemzetközi közzétételi iratok). Előnyösen, a teljes embrióvakcinázást automatizált vakcinázási rendszer, például a kereskedelmi forgalomban kapható Inovoject® alkalmazásával végezzük.

Az *in ovo* beadásra alkalmas baromfipestis-vakcina készítésére használt NDV V⁻-mutáns a szokásos, már több nem szegmentált, negatív irányítottságú RNS-vírus genetikai módosítása során alkalmazott reverz genetikai eljárással állítható elő (referenciákat lásd fent). Baromfipestisre vonatkozóan ilyen eljárást írtak le továbbá Peeters és munkatársai (1999, lásd fent) és Römer–Oberdörfer és munkatársai (1999, lásd fent).

Jellemzően, először (egymást átfedő cDNS-fragmensekből) a baromfipestisvírus-genom teljes hosszúságú cDNS-klónját állítjuk össze, amit egy transzkripciós plazmidba, a (T7) RNS-polimerázpromoter és egy autokatalitikus hepatitis delta-vírus ribozim közé klónozunk. A plazmid (T7) RNS-polimerázt expresszáló sejtekbe történő transzfekciója NDV-RNS antigenom szintézisét eredményezi. A vírusreplikációhoz és transzkripcióhoz szükséges (NP-, P- és L-) proteineknek megfelelő plazmidok egyidejű transzfekciója fertőző vírus képződését eredményezi a klónozott cDNS-ből.

A baromfipestisvírus-gének mindegyikének ismert a nukleotidszekvenciája. A P-gén nukleotidszekvenciáját Ishida és munkatársai [NAR *14*, 6551–6564 (1986)], McGinnes és munkatársai [Virology *164*, 256–264 (1988)], Daskalakis és munkatársai [NAR *20*, 616 (1992)] és Steward és munkatársai [J. Gen. Virology *74*, 2539–2547 (1993)] írták le. A teljes baromfipestisvírus-genom nukleotidszekvenciáját szintén több kutatócsoport leírta [de Leeuw és munkatársai: J. Gen. Virology *80*, 131–136 (1999), AF 77761 GenBank katalógusszám; Krishnamurthy és munkatársai: J. Gen. Virology *79*, 2419–2424 (1998); Phillips és munkatársai: Arch. Virol. *143*, 1993–2002 (1998), AJ225127, AJ225128 és AJ225129 EMBL katalógusszám, és Römer–Oberdörfer és munkatársai: J. Gen. Virol. *80*, 2987–2995 (1999), Y18898 EMBL katalógusszám]. A teljes NDV-genom hosszúsága a 3' és az 5' terminális végekkel együtt 15 186 nukleotid.

A P-gén a baromfipestisvírus-genomon a 1804. és a 3254. nukleotidok között helyezkedik el (a Clone–30® baromfipestisvírus-törzs Römer–Oberdörfer és munkatársai által alkalmazott számozása, Y18898 EMBL katalógusszám; a leírásban ezt a számozást használjuk az NDV-genomon található elhelyezkedések azonosítására). A P-proteint kódoló nyitott leolvasási keret a 1887–3074. nukleotidok között található. Az NDV V⁻-mutáns létrehozásához a P-gén 2280–2287. helyén található (genomi RNS, szensz) mRNS-t szerkesztőlokusz (UUU UUC CC) mutációja szükséges. A P-, V- és W-proteint kódoló nyitott leolvasási keretek vége a 3074. (TAA), a 2605. (TAA), illetve a 2424. (TGA) helyzetben található.

A P-protein 395 aminosav hosszúságú, a V-protein (és a W-protein) N-terminálisával azonos N-terminális vége az 1–135. aminosavak között helyezkedik el. A P- és V-proteinek C-terminális része, azaz a szekvenciahomológiát nem mutató fragmensek, a 136–395., illetve a 136–239. aminosavak között találhatók. A transzkripció során a szerkesztőhelyen található (+1) kereteltolódás miatt a P- és a V-protein C-terminális része semmiféle hasonlóságot nem mutat.

Előnyösen, a találmány tárgyát az UUU UUU CC szerkesztőhelyen történt mutáció eredményeként V-proteinjét alacsonyabb szinten expresszáló NDV V⁻-mutáns képezi. A szerkesztőhelyen a nagymértékben specifikus szekvenciatranszkripció során történő megváltoztatása a nem templáteredetű G nukleotidok inzerciós gyakoriságának, és ezáltal a V- (és W-protein) expressziójának csökkenését eredményezi.

A mutáció egy, V-protein-expresszióra képes eredeti baromfipestisvírus-törzs P-génjének szerkesztőhelyén történő genetikai információváltozás miatt jön létre. A mutáció előnyösen nukleinsavszubsztitúció.

A nukleinsavszubsztitúció előnyösen a szerkesztőhely egy kodonján következik be, amely néma mutációhoz vezet, azaz a kodont igen, a kodon által kódolt aminosavat viszont nem változtatja meg. Ez a mutáció biztosítja, hogy a P-gén nyitott leolvasási kerete továbbra is működőképes P-proteint expresszál. A konzervált szerkesztőhelyen némamutáció történhet például a 3. (UUC UUC CC), a 6. helyen (UUU UUU CC), vagy mindkettő kombinációja (UUC UUU CCC) is bekövetkezhet; ezek mindegyike a találmány oltalmi körébe tartozik. Mint az 1. példában látható, 3 vagy több nukleotid helyettesítésével, illetve nukleotidok deléciójával létrejött NDV-mutánsok nem képesek V-protein termelésére, és nem nyerhetők ki a transzfekciós felülúszókból. Ezért a találmány szerinti baromfipestisvírus-mutáns szerkesztőhelye 1 vagy 2 nukleotidszubsztitúciót tartalmaz. Az 1. példában látható továbbá, hogy a szerkesztőhely egy vagy két nukleotidját érintő, az 1–5. helyzetben történt mutációval előnyös, a transzfekciós felülúszóból kinyerhető és az eredeti vírusokhoz ké-

pest körülbelül 20-szor kisebb V-protein-expressziót mutató NDV-mutáns jön létre. Mindegyik mutáns csirkeembrióra vonatkoztatott patogenitása jelentősen gyengül. Ezt figyelembe véve, a találmány tárgyát képezi a fentieknek megfelelő, a szerkesztőhely 1–5. helyén, előnyösen a 3. vagy 4. helyen, egy vagy két mutációt tartalmazó NDV-mutáns.

Egy, a találmány szerinti kifejezetten előnyös NDV V^--mutáns a szerkesztőlokusz 3. helyén tartalmaz mutációt, a szerkesztőlokusz nukleotidszekvenciája UUU UUC CC. Bár a mutáns szerkesztőlokuszának első kodonja megváltozott, a kodon által kódolt aminosav (lizin) azonos maradt. Ezen NDV V^--mutáns P-génjének mRNS-szerkesztése drámai mértékben csökken, amit a V (és W) nyitott leolvasási keret mRNS-ek mennyiségének csökkenése (≤6%, illetve kimutathatóság alatti szint) bizonyít. A V ORF-szerkesztés hasonló mértékű csökkenését mutató NDV V^--mutánsok a szerkesztőlokuszon történő egyéb egyszeres nukleotidszubsztitúcióval is létrehozhatók. Az ilyen NDV V^--mutánsokban a szerkesztőlokusz U-nukleotidja C-, G- vagy A-, előnyösen C-, vagy a szerkesztőlokusz C-nukleotidja U-, G- vagy A-, előnyösen U-nukleotiddal helyettesíthető.

Ilyen előnyös NDV V^--mutánsok például a szerkesztőlokuszon UCUUUCCC, UUUGUCCC és UUUUCCCC nukleotidszekvenciát tartalmazó mutánsok.

A szerkesztőlokuszon 2 mutációt tartalmazó, találmány szerinti NDV-mutánsok tipikus példája GCUUUCCC nukleotidszekvenciát tartalmaz.

Az NDV-genom kívánt mutációi szakember által általánosan ismert, e célra alkalmas eljárások segítségével alakíthatók ki. Előnyösen, a mutációk helyspecifikusan irányított mutagenezis segítségével alakíthatók ki. Ez a – szakemberek által szintén általánosan használt [Peeters és munkatársai (1999) lásd fent, Current Protocols in Molecular Biology, 8.5.1–8.5.9, szerk.: F. M. Ausubel és munkatársai, kiad.: Wiley N. Y., (1995), és Kunkel és munkatársai: Methods in Enzymology *154,* 376–382 (1987)] – eljárás a leírásban szerepel.

A találmány szerinti, különösen előnyös NDV V^--mutáns a fent leírt NDV-mutáns, amely további attenuáló mutációkat tartalmaz. Ilyen NDV-mutáns bármely baromfipestis-vakcinatörzsből előállítható. A kereskedelemben kapható baromfipestis-vakcinákban található, megfelelő NDV-vakcinatörzsek például a Clone–30®, a La Sota, a Hitchner B1, az NDW, a C2 és az AV4, előnyösen pedig a Clone–30®.

Más megközelítésben a találmány tárgyát madarak baromfipestis elleni védelme céljából, *in ovo* beadásra alkalmas élő vírusos, a fentiekben leírt NDV V^--mutánst gyógyászati szempontból elfogadható hordozóval együtt tartalmazó vakcina képezi.

Az ilyen típusú vakcina tojásonként jellemzően 100, előnyösen 50 µl dózist tartalmaz. Az *in ovo* vakcina ilyen kis térfogatban történő beadása javítja a vakcinázott embriók keltethetőségét.

A találmány további megvalósítási módját képezi egy, a leírt NDV V^--mutánson kívül egy másik madárkórokozó embrió szempontjából biztonságos vakcinatörzsét tartalmazó, kombinált élő vakcina. Az egynél több vakcinatörzs kombinált beadása gazdasági szempontból előnyös, mivel ezáltal kevesebb alkalommal van szükség a tojás oltására. Ezenkívül, minél ritkábban szúrunk tűt a tojásba, annál kisebb a fertőződésének a veszélye.

Az embrió szempontjából biztonságos vakcinatörzs olyan élő vakcinatörzset jelent, amely esetében az embrionálódás 18. napján oltott SPF tojások keltethetősége legalább 70, előnyösen 90%-os. A kombinált vakcinák előnyösen a Marek-féle betegség vírusának (MDV), a fertőző bronchitis vírusának (IBV), a fertőző bursitis vírusának (IBDV), a baromfi adenovírusának (FAV), a pulyka rhinotracheitisvírusának (TRTV), vagy a reovírusnak egy vagy több, embrió szempontjából biztonságos vakcinatörzsét tartalmazzák. Ilyenek például az Ovovac®-HVT és az Ovovac®-SB1 MDV-vakcinák, a Bursamune® és a Bursaplex® IBDV-vakcinák.

Egyértelmű, hogy az NDV V^--mutáns ismertetett előnyös attenuált tulajdonságai miatt a találmány szerinti élő vakcina a madaraknak – az árutermelő állományokban a baromfipestis megelőzésére rutinszerűen használt élő vírusos baromfipestis-vakcinákhoz hasonlóan alkalmazva – kelés után is beadható.

A találmány további megvalósítási módja egy, nemcsak specifikus NDV-fertőzés, hanem egyéb fertőző baromfibetegségek elleni vakcina készítésére is használható vektorvakcina. A leírt NDV V^--mutánson alapuló vektorvakcina például – azok antigénjeinek az immunizált gazdaállat fertőzött sejtjeiben történő expresszióján keresztül – egyéb madárpatogén kórokozók elleni immunizálásra is lehetőséget nyújt. Ilyen NDV-vektor egy heterológ polipeptidet kódoló heterológ nukleinsavszekvencia az NDV V^--mutáns egy nem lefordított régiójába történő inzerciójával állítható elő. Erre a célra alkalmas, nem lefordított régiók találhatók a genomi promoter és az NP-gén kezdete között, és az NP/P, P/M, M/F, F/HN és a HN/L gének kapcsolódásánál. A heterológ nukleinsavszekvencia egy madárpatogén kórokozó, például a fertőző bursitisvírus, a fertőző bronchitisvírus, a Marek-féle betegség vírusa, a madárencephalomyelitis vírusa, a madárreovírus, a madárinfluenza-vírus, a csirkeanémia-vírus, *Salmonella*-fajok, *E. coli* és *Eimeria*-fajok antigénjét kódolhatja.

A leírt NDV V^--mutáns előnyös tulajdonságokkal rendelkező, kelés utáni beadásra alkalmas inaktivált vakcina készítésére szintén lehetőséget nyújt. Az ilyen inaktivált vakcina fontos előnye a védő antigének hosszan tartó magas szintje, amely az NDV V^--mutáns embrionált tojásban vagy sejtkultúrán történő szaporítása során termelődött, nagy tömegű antigén eredménye.

A szaporítás után kinyert NDV-k inaktiválásának célja a vírus szaporodásának megakadályozása. Ez általában kémiai vagy fizikai eszközökkel lehetséges. Kémiailag a vírusok például enzimekkel, formaldehiddel, β-propiolaktonnal, etilén-iminnel vagy ezek származékaival inaktiválhatók. Az inaktiválásra használt vegyület szükség esetén a későbbiekben semlegesíthető. Formaldehiddel inaktivált anyag semlegesítésére például tioszulfát vagy nátrium-metabiszulfit használható. Előnyösen, fizikai inaktiválást végezhetünk nagy energiájú, például ultraibolya, röntgen- vagy gamma-

sugárzással. Ha kívánatos, a kezelés után a pH 7 körüli értékre állítható vissza.

Az inaktivált NDV-t tartalmazó vakcina egyet vagy többet tartalmazhat például a fent említett, a célnak megfelelő, gyógyászati szempontból elfogadható hordozók vagy hígítók közül.

A találmány szerinti inaktivált vakcina előnyösen egy vagy több, adjuvánshatású vegyületet tartalmaz. Erre a célra alkalmas vegyületek vagy készítmények többek között az alumínium-hidroxid, -foszfát vagy -oxid, és a – például ásványi (mint Bayol F® vagy Marcol 52®) vagy növényi olaj (például E-vitamin-acetát) alapú – „olaj a vízben" vagy „víz az olajban" típusú emulziók, valamint a szaponinok.

A találmány szerinti vakcina aktív összetevőként az NDV V⁻-mutáns hatékony dózisát, azaz immunizáló NDV olyan mennyiségét tartalmazza, amely a vakcinázott madarakban virulens NDV-fertőzéssel szemben immunitást idéz elő. A leírásban szereplő immunitás egy vakcinázott madárállományban kialakuló, a nem vakcinázott csoportban megfigyelthez képest jelentősen magasabb fokú védelmet jelent.

Jellemzően, a találmány szerinti élő vírusos vakcina tojásonként vagy madaranként $10^{3,0}$–$10^{8,0}$, előnyösen $10^{4,0}$–$10^{7,0}$, még előnyösebben $10^{5,0}$–$10^{7,0}$ embrió fertőző dózis$_{50}$ (EID_{50})-ban adható be.

Az inaktivált vakcina állatonként $10^{4,0}$–$10^{9,0}$, előnyösen $10^{6,0}$–$10^{8,0}$ EID_{50}-nel egyenértékű antigént tartalmazhat.

Az inaktivált vakcina beadási módja parenteralis, előnyösen intramuszkuláris vagy szubkután.

Bár a találmány szerinti vakcina hatékonyan csirkében használható, más baromfi, például pulyka, gyöngytyúk és fogoly oltására is eredményesen alkalmazható.

A NDV-k rák kezelése során kifejtett terápiás hatását emberben is leírták, [Lorence és munkatársai: J. Natl. Cancer Inst. *80,* 1305–1312 (1988); Murray és munkatársai: Cancer *52,* 856–862 (1983); Reichard és munkatársai: J. Surg. Res. *52,* 448–453 (1992)]. Mivel az NDV emberben konjunktivitist idéz elő, terápiás célokra nagymértékben attenuált vírusokra van szükség. A leírt NDV V⁻-mutáns előnyös tulajdonságai miatt (szükség szerint terápiás vagy profilaktikus proteint kódoló idegen génnel kiegészítve) emberekben, például emberi vagy állati rák vagy AIDS elleni védekezésben terápiás hatóanyagként használható.

Példák

1. példa

NDV V-mutáns előállítása

Anyag és módszer

cDNS-szintézis és teljes hosszúságú klón összeállítása

Ezen kísérletek részleteit Römer–Oberdörfer és munkatársai (1999, lásd fent) írták le. 50 ml, milliliterenként 10^{10} EID_{50} titerértékű allantois-folyadékból Clone–30® (Intervet International B. V., Hollandia) baromfipestisvírus-törzset tisztítottunk. A vírus-RNS-t guanidinium-izotiocianátos kivonással, majd ezt követően CsCl-párnán („cushion") történő centrifugálással izoláltunk. A genomi RNS-nek megfelelő cDNS-t *Super-Script™ II Rnase H* reverz transzkriptáz (Gibco) alkalmazásával készítettük. Az első DNS-szál 1 µl-ével polimeráz-láncreakciót végeztünk az *Expand High Fidelity* (HF) polimerázláncreakció-rendszer (Boehringer Mannheim, Germany) alkalmazásával. A genomi RNS terminális szekvenciáit a Mundt és Mueller áll leírt (Virology *209,* 209–219 (1995)] eljárással határoztuk meg. Ezután a polimeráz-láncreakcióban leader és trailer amplifikálása céljából specifikus oligonukleotidokat terveztünk, következtetéssel. Ezen fragmensek polimerázláncreakcióval előállított termékei öt nukleotid (16., 79., 15 039., 15 041. és 15 042.) mutációjával mesterségesen létrehozott *Mlu*I-helyet tartalmaztak (a 76. nukleotid az NP, és az 15 039. nukleotid az L nemkódoló régiójában). Teljes baromfipestisvírus-antigenomot expresszáló plazmid létrehozásához a fenti PCR-fragmenseket több lépésben az X8dT plazmid *Sma*I-helyére a T7 polimerázpromoter és az autokatalitikus hepatitis delta-vírus ribozim szekvencia közé klónoztuk [Schnell és munkatársai: EMBO J. *13,* 4195–4203 (1994)]. A kapott teljes hosszúságú klónt pflNDV-nek neveztük el.

Expressziós plazmidok szerkesztése

NP, P és L expressziós plazmidok szerkesztéséhez pCite 2a-ba (Novagen) NP (122–1791. nukleotid), P (1887–3254. nukleotid) és L (8381–15051. nukleotid) nyitott leolvasási kereteket klónoztunk. Erre a célra *Nco*I vagy *Afl*III adapterben található megfelelő transzlációs kezdőkodonnal HF-PCR fragmenseket állítottunk elő. A fragmenseket pCite 2a-vektorba, a megfelelő nyitott leolvasási keretbe [Römer–Oberdörfer és munkatársai (1999), lásd fent] vittük.

Mutációk létrehozása a NDV teljes hosszúságú cDNS-ében

A NDV genomjában attenuáló hatású mutáció létrehozása céljából alapként a lentogén Clone–30 NDV-vakcinatörzs teljes hosszúságú RNS-antigenomját expresszáló pflNDV plazmidot használtuk. Mivel az NDV a P-gén mRNS-ét szerkeszti, a szerkesztőhelyet (UUUUUCCC) nem templáteredetű G-nukleotidok inzerciójával, 1, 2, 3 vagy 6 nukleotid szubsztitúciójával vagy 6, illetve 12 nukleotid deléciójával, az 1. ábrán látható módon módosítottuk. A polimeráz-láncreakciót a templátként használt pflNDV-vel, az 1. táblázatban felsorolt megfelelő láncindítók alkalmazásával hajtottuk végre. A polimeráz-láncreakció termékeit azután *Aat*II-vel/*Apa*I-gyel emésztettük és a pflNDV azonos helyére klónoztuk. A V-protein egyedi C-terminális része expressziójának szelektív blokkolásához a P-keret változatlanul hagyásával a transz-V-keretbe egy végkodont vittünk be. Polimeráz-láncreakció végrehajtása után a terméket *Apa*I-gyel és *Rsr*II-vel emésztettük, és pflNDV azonos helyére ligáltuk. A polimeráz-láncreakció során esetlegesen fellépő hibák kizárása céljából meghatároztuk a klónokba újonnan bevitt régió szekvenciáját. A kapott, a szerkesztőhelyen nukleotidszubsztitúciókat vagy -deléciókat, vagy a V nyitott leolvasási keretben végkodoninzerteket tartalmazó, teljes hosszúságú klónokat az 1. ábrán látható módon neveztük el.

1. táblázat

A pflNDV teljes hosszúságú cDNS-klónban mutációk létrehozásához használt láncindítók. A nukleotidváltozásokat vastagon szedve kiemeltük. A nukleotidszekvenciák és nukleotidelhelyezkedések a Römer–Oberdörfer és munkatársai által leírtaknak [J. Gen. Virol. *80,* 2987–2995 (1999); Y18898 EMBL katalógusszám] felelnek meg.

Szekvencia (5'–3' irány)	Nukleotidelhelyezkedés
P1:CCA TGG GCC CTT CTT AGC ATT GGA CG	2269–2294
PCG12:CCA TGG GCC CTT **TCG** AGC ATT GGA CG	2269–2294
PG2:CCA TGG GCC CTT **TCT** AGC ATT GGA CG	2269–2294
PC4:CCA TGG GCC CT**G** TTT AGC ATT GGA CG	2269–2294
PG5:CCA TGG GCC **CCT** TTT AGC ATT GGA CG	2269–2294
PA: CCA TGG GCC CTT **CGC** AGC ATT GGA CG	2269–2294
PD: CCA TGG GCC CTT **GTC** AGC ATT GGA CG	2269–2294
PR: CCA TGG GCC CTT **GCG** AGC ATT GGA CG	2269–2294
PRR: CCA TGG GCC **CCG GCG** AGC ATT GGA CG	2269–2294
Δ6:CCA TGG GCC – – AGC ATT GGA CG	2269–2294
Δ12:CCA TGG GCC – – – – GGA CGA TTT ATT GCT GAG	2256–2294
Vstop: AAG GGC CCA TGG TCT AGC CCC CAA GAG	2283–2309
FWP#4:GCT CCT CGC GGC TCA GAC TCG	151–171
RP#20:CCC GGG AAT CTT CTC TGG CGC	3764–3784

Rekombináns vírusok létrehozása

Körülbelül $1,5 \times 10^6$, T7-fág RNS-polimerázt stabilan expresszáló BSR T7/5 sejtet [Buchholz és munkatársai: J. Virology *73,* 251–259 (1999)] egy éjszakán át 90%-os konfluens állapot eléréséig tenyésztettünk. A sejteket 5 μg pCite-NP-t, 2,5 μg pCite-P-t, 2,5 μg pCite-L-et és 10 μg, a teljes hosszúságú klónok egyikét tartalmazó plazmidkeverékkel emlős transzfekciós reagenskészlet ($CaPO_4$ transzfekciós protokoll; *Stratagene)* alkalmazásával transzfektáltuk. A transzfekció után 3–5 nappal a felülúszót kinyertük és – tojásonként 200 μl-t – 9–11 napos embrionált tyúktojások allantois-üregébe fecskendeztük. Az allantois-folyadékban a vírus jelenlétét 3-4 napos inkubáció után haemagglutinációs próbával (HA) határoztuk meg. A vírustörzseket embrionált tojásban történő 2–6 passzázzsal állítottuk elő.

Reverz transzkripciós polimeráz-láncreakció (RT-PCR)

Fertőzött BSR T7/5 sejtekből a fertőzés után 36 órával *Rneasy* reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával teljes RNS-t állítottunk elő. Madármyeloblastosis-vírus reverz transzkriptázzal P#13 NDV-P-génre specifikus oligonukleotiddal (5'–CCACC-CAGGCCACAGACGAAG-3', 2676–2196. nukleotidok) 1 μg teljes RNS felhasználásával reverz transzkripciót végeztünk. P#13 és P#17 (5'-ATGAATT-CAGCTGTTGGA-3', 2680–2696. nukleotid) láncindítóval DNS-amplifikációt hajtottunk végre. A polimeráz-láncreakció termékeit 1%-os agarózgélen vizsgáltuk, és közvetlenül használtuk fel szekvenciameghatározásra.

Vírusok sorozatos passzálása embrionált SPF tojásokban

A rekombináns NDV V^--vírusokat 9–11 napos embrionált SPF tojásokban 2–9 alkalommal sorozatosan passzáltuk. A beoltott tojásokat 2–5 napon át 37 °C-on inkubáltuk. Minden tojás allantois-folyadékát standard haemagglutinációs próbával vizsgáltuk, és csak a pozitívnak bizonyult allantois-folyadékot nyertük ki és használtuk fel további passzázsra. A vírustörzseket minden passzázsban 9–11 napos embrionált SPF tojásokban titráltuk.

V-peptid elleni ellenanyag-termelés

Mivel a P-, V- és W-proteinek N-terminális végei azonosak, a V-protein fertőzött sejtekben történő expressziójának kimutatásához annak C-terminálisát specifikusan felismerő savóra van szükség. Erre a célra a V-protein egyedi C-terminálisában egy lehetséges antigénszekvenciát kiválasztva egy, a V-protein C-terminálisában található 16 aminosavat tartalmazó peptidet szintetizáltunk (224–239. aminosav). A peptid 5 mg-ját hordozó protein – kürtőscsiga-hemocianinhoz („keyhole limpet hemocianin", KLH) konjugáltuk. A KLH-val konjugált peptiddel két nyulat immunizáltunk, amit két alkalommal, 2 és 4 hét múlva végzett megerősítő immunizálás követett. Az első injekció beadása (az immunizálás) előtt, és 2, illetve 3 hónappal később az állatoktól vért vettünk.

Immunblotolás

A vírustisztításhoz 9–11 napos embrionált SPF tyúktojásokat fertőztünk és 3-4 nap múlva belőlük allantois-folyadékot gyűjtöttünk. Az allantois-folyadékban található vírust *Beckman SW28* rotorban, 21 000 rpm-

nél, 90 percig, 20%-os szacharózpárnán („sucrose cushion") keresztül történő centrifugálással tisztítottuk és koncentráltuk. A pelletet reszuszpendáltuk, és a virionok szétdarabolása céljából protein mintapufferrel kevertük. A tisztított virionokból származó vírusproteineket ezután nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) vizsgáltuk, PVDF-membránokra (Millipore) vittük, és a Clone–30 NDV-törzs V-proteinjének 16 C-terminális aminosavaira specifikus V-peptid elleni szérummal vagy NDV NP-proteinjére specifikus monoklonális ellenanyaggal (MAb) inkubáltuk. A membránokat ezután peroxidázzal konjugált nyúl vagy egér elleni kecskeimmunglobulin G-vel inkubáltuk. A proteineket az inkubáció után peroxidáz-szubsztráttal (Vector) tettük láthatóvá.

V-protein-expresszió immunfluoreszcenciás analízise

A vírusprotein-expresszió vizsgálata céljából BSR-T7 sejteket ~10 fertőzési multiplicitással (multiplicity of infection, moi) különböző mértékben passzált NDV V$^-$-vel vagy az eredeti vírussal fertőztünk, majd 1-2 napig inkubáltunk. A fertőzött sejteket hideg (96%-os) etanollal 1 órán keresztül szobahőmérsékleten fixáltuk. PBS-sel végzett háromszori mosás után a sejteket V-peptid elleni (az első immunizálás után 3 hónappal gyűjtött) nyúlszérummal 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Ezzel párhuzamosan fertőzött sejteket NDV F- vagy NP-proteinnel reagáló monoklonális ellenanyagokkal vagy különböző NDV-proteineket felismerő poliklonális csirkesavóval inkubáltunk. A sejteket mosás után fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC-vel) konjugált nyúl, csirke vagy egér elleni ellenanyaggal jelöltük és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

P-gén-mRNS-szerkesztő frekvencia meghatározása

FlNDV-vel fertőzött sejtekből és NDV V-P1-mutáns sorozatpasszázsokból izolált teljes RNS-t oligo(dT) láncindító alkalmazásával csak mRNS-ek amplifikációja céljából reverz transzkripciónak tettük ki. Ezt követően P#17 (NDV V-EcoRI 2680 5'-ATG AAT TCA GCT GTT GGA-3') és P#13 (NDV P+2176 5'-CCA CCC AGG CCA CAG ACG AAG-3') láncindítók felhasználásával polimeráz-láncreakciót végeztünk. A PCR-fragmenst *EcoR*V-tel és *Sal*I-gyel emésztettük és a pSKT7T vektor azonos helyére kötöttük. Különálló telepekből származó klónozott plazmidok szekvenciáit határoztuk meg, és a szerkesztőhelyen nem templátredetű G-nukleotid-inzert(ek) jelenléte vagy hiánya szempontjából vizsgáltuk (2. táblázat).

Eredmények

P-gén-mRNS-t csökkent mértékben szerkesztő NDV visszanyerése cDNS-klónokból

A konzervált P-gén-mRNS-szerkesztés megszakítása vagy a V-protein egyedi C-terminális része expressziójának szelektív blokkolása céljából a Clone–30 NDV-törzs teljes hosszúságú cDNS-klónján (pflNDV) az 1. ábrán látható módosításokat végeztük. Mindegyik módosított teljes hosszúságú cDNS-klónt három, NDV-, NP-, P- és L-proteint expresszáló segédplazmiddal BSR-T7/5 sejtekbe transzfektáltuk. A kinyerési hatékonyság összehasonlítása céljából nem módosított teljes hosszúságú cDNS-sel (pflNDV-vel) szintén transzfekciós kísérleteket végeztünk. A felülúszókat 3–5 napos inkubáció után kinyertük, és a transzfektált sejtekkel F elleni monoklonális ellenanyag alkalmazásával immunfluoreszcenciás (IF) festést végeztünk. Az összes, pflNDV-vel vagy módosított teljes hosszúságú klónokkal végzett transzfekciós vizsgálat során legalább 20–50 IF-pozitív sejtet sikerült kimutatni, ami a sejtkultúrában végbement genomreplikációra és vírusprotein-expresszióra utal.

Ezt követően a lentogén NDV-k szaporításnak régóta legjobb tenyésztőközegeként ismert [Nagai és munkatársai: Virology 72, 494–508 (1976)] embrionált SPF csirketojásokat transzfekciós felülúszókkal oltottunk. 3-4 napig tartó inkubáció után allantois-folyadékmintákat gyűjtöttünk, és azokat HA-vizsgálatnak vetettük alá. Néhány, pflNDV-vel transzfektált sejtekből származó felülúszóval oltott tojásban haemagglutináció volt megfigyelhető. A szerkesztőhelyükön egy vagy két nukleotidszubsztitúciót (NDV-P1, NDV-PG2, NDV-PC4, NDV-PG5 és NDV-PCG12) tartalmazó módosított vírusok HA-vizsgálatban történő azonosításához azonban további 1-2 tojáspasszázsra volt szükség.

Meglepő módon, a deléciós mutánsokból (NDV-Δ6 és NDV-Δ12), a három vagy több nukleotidszubsztitúciót tartalmazó mutánsokból (NDV-PA, NDV-PD, NDV-PR, NDV-PRR) vagy a V-protein egyedülálló C-terminális részét nem tartalmazó mutánsból (NDV-Vstop) nyert transzfekciós felülúszóval oltott embrionált tojások allantois-folyadékában nem sikerült fertőző vírust kimutatni. Három megismételt kinyerési kísérlet és négy egymást követő tojáspasszázs ellenére nem sikerült az embrionált tojások allantois-folyadékában fertőző vírust kimutatni.

A kinyerhető mutánsokat 9–11 napos embrionált tojásban 2–6 alkalommal sorozatosan passzáltuk.

A V-protein expresszió

A V-protein-expresszió jelenlétének vagy hiányának meghatározása céljából BSR-T7 sejteket különböző mutánsokkal (NDV-P1, NDV-PG2, NDV-C4, NDV-PG5 és NDV-PCG12) vagy az eredeti vírussal fertőztünk, majd immunfluoreszcenciás eljárás vagy RNS-izolálás segítségével vizsgáltunk. Az egy vagy több mutánssal, vagy az eredeti vírussal fertőzött sejtekben csirke-NDV elleni savó vagy NDV F-fel vagy NP-vel reagáló monoklonális ellenanyagok alkalmazásával a fluoreszcencia mértéke és mintázata nem volt megkülönböztethető. Ezzel szemben a V-peptid elleni savó csak a FlNDV-vel fertőzött sejtekkel reagált nagy fluoreszcenciás intenzitással. A savó hasonló koncentrációjánál hasonló mértékű specifikus, de nagyon gyenge fluoreszcenciás reakció mutatkozott a mutánsok és az NDV-P1 magasabb (5–9) számú passzázsainak vizsgálata során, ami az összes vizsgált mutánsban azonos mértékben alacsony szintű V-expresszióra utal. Eszerint a mutáns vírusokban a szerkesztőlokusz U-sorozatának megszakítása ellenére az RNS-szerkesztés és ennélfogva a V-protein-expresszió nem

szűnt meg, többek között a P1 6. passzálásánál sem, amely előzetesen nem mutatott V nyitott leolvasási keretet a 39 vizsgált mRNS-klón között. További vizsgálatok céljára az NDV-P1-mutánst választottuk ki.

A V-protein az NDV strukturális összetevője, ezért érdekes volt meghatározni, hogy a fertőzött sejtekben az alacsony V-expresszió a virionokban alacsony szintű V-inkorporáláshoz vezet-e. Ennek meghatározásához 20%-os szacharózon keresztül tisztított és koncentrált NDV-P1-virionokkal immunblot-kísérleteket végeztünk. Mindkét vírus NP-proteinjével azonos érzékenységgel reagáló, NP-specifikus monoklonális ellenanyagok alkalmazásával a gélre felvitt protein mennyisége standardizálható volt (2. ábra). Bár a „western blot"-analízist az eredeti vírus és az NDV V$^-$-mutáns P1-proteinjeinek hasonló mennyiségével végeztük, az NDV V$^-$-mutáns V-protein-mennyisége számottevően kevesebb volt az eredeti vírusénál, ami a V-protein NDV V$^-$-virionokba történő alacsony mértékű beépülésére utal. A hígított minták „western blot"-analízise kimutatta, hogy az NDV V$^-$-virionok V-protein-tartalma körülbelül 20-szor kevesebb volt az eredeti vírusokénál.

Az NDV V$^-$ P-gén-mRNS-szerkesztő lokusza körüli szekvenciákat összesen 319 különálló, 5–9. passzázsból származó plazmidtelep vizsgálatával határoztuk meg (2. táblázat). Az összehasonlítás során összesen 41 különálló telep szekvenciáját határoztuk meg FINDV-re, és a 41 plazmid közül 28 (68,3%) kódolta a P-protein nem szerkesztett változatát. A V-proteint egy nem templáteredetű G-nukleotiddal kódoló plazmidok száma 12 volt (29,3%). A 41 közül csak egy plazmid rendelkezett két nem templáteredetű G-nukleotid inzertjével (2. táblázat). Ezzel szemben az összes, 319 különálló P1 NDV V$^-$-mutáns telep szekvenciájának meghatározásakor csak négy plazmid tartalmazta a V nyitott leolvasási kerethez vezető nem templáteredetű G-nukleotidok inzertjét. A V-t kódoló plazmidok 6., 8. és 9. passzázsai egyszeres G-inzertet tartalmaztak, míg a 7. passzázsa négy G-nukleotid inzertjét tartalmazta, amely szintén V-protein-expressziót eredményezhet. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy az RNS-szerkesztő helyen végrehajtott szubsztitúció nem teljesen blokkolta a P-gén-mRNS-szerkesztést, de jelentősen csökkentette az RNS-szerkesztés gyakoriságát. Az NDV V$^-$-vírus az eredeti vírushoz képest a P-gén mRNS-ét 10–20-szor alacsonyabb gyakorisággal szerkeszti, és ennek megfelelően alacsonyabb szinten szintetizálja a V-proteint.

2. táblázat

P1 NDV V$^-$-mutáns P-gén-mRNS-szerkesztési gyakoriságának meghatározása

Vírus	Passzázs	Teljes telepszám	Expresszált proteinek		
			P	V	W
F1-NDV	3	41	28 (68,3%)	12 (29,3%)	1 (2,4%)
NDV V$^-$	5	56	56 (100%)	0	0
"	6	72	71 (98,6%)	1 (1,4%)	0
"	7	42	41 (97,6%)	1 (2,4%)	0
"	8	105	104 (99%)	1 (~1%)	0
"	9	44	43 (97,7%)	1 (2,3%)	0

2. példa

NDV V$^-$-mutánssal végzett in vivo *kísérletek: SPF csirkeembriók vakcinázása*

Anyag és módszer

Vírustitrálás embrionált tojásban

A rekombináns vírusból 10-szeres sorozathígítást készítettünk és a hígítási sorozattal 11 napos embrionált tojások két csoportját oltottuk. Az oltott tojások egy csoportjával 4 nap inkubáció után haemagglutinációs próbát végeztünk, és a titert Reed és Muench [Am. J. Hyg. 27, 493–497 (1938)] által leírt eljárással számított 50%-os embriófertőzési dózisban (EID_{50}) fejeztük ki. Az oltott tojások másik csoportjánál naponta vizsgáltuk az embrióelhalást, és ugyanezen eljárással meghatároztuk az 50%-os embrióelhalási dózist (ELD_{50}).

In ovo *vakcinázás és fertőzés*

18 napos termékenyített SPF tyúktojásokat a szélesebb végükön készített lyukon keresztül fertőztünk. 23G-S tűvel közvetlenül a léghártya alá 0,1 ml hígított vírust vagy negatív allantois-folyadékot fecskendeztünk. A kelési arányt feljegyeztük, és a csibék általános egészségi állapotát naponta vizsgáltuk. 14 napos korukban a csibéket megmértünk, és vért vettünk tőlük. Standard NDV haemagglutinációgátlási próbával NDV elleni ellenanyagok jelenléte/hiánya szempontjából savómintákat vizsgáltunk. Az állatokat 14 napos korukban (kb. 17 nappal a vakcinázás után) NDV virulens Herst-törzsével intramuszkulárisan fertőztük. A csirkéket a betegség klinikai tüneteinek jelentkezése vagy elhullás szempontjából 10 napon keresztül megfigyeltük.

Eredmények

NDV V$^-$ patogenitás

Az NDV-izolátumok embrionált tojások és csirkék esetében mutatott virulenciája egyaránt változó. Egy NDV-izolátum virulenciájának mértéke a vírus *in vivo* patogenitásának megállapításával határozható meg. Egy ilyen eljárás 10–12 napos, a vírus egy minimális

letális dózisával fertőzött csirkeembriók átlagos elhullási idejét állapítja meg („mean death time", MDT). Az MDT egyes, jól ismert velogén és bizonyos mezogén NDV-törzseknél mért 48 órától a lentogén törzsek (a legtöbb vakcinatörzs) esetén megállapított 160 óráig terjed. Az NDV V⁻-mutánsok átlagos embrióletalitási dózisának meghatározása céljából 11 napos embrionált tojásokat 10-szeres vírushígítási sorral oltottunk, majd 7 napig inkubáltunk. Meglepő módon, a megfigyelés ideje alatt az NDV-P1-gyel és az NDV-PC4-gyel oltott csoportokban nem tapasztaltunk specifikus embrióelhalást (3. táblázat), ami arra utal, hogy ezek a NDV V⁻-mutánsok még 11 napos korban és magasabb dózisban adva sem veszélyeztetik a csirkeembriót (3. táblázat). Tudomásunk szerint ezek az első olyan baromfipestisvírus-törzsek, amelyek nem okoznak embrióelhalást.

A PG2, PG5 és PCG12 mutánsok csoportja hasonló körülmények között kismértékű embrióelhalást okoz, de csirkeembrióra vonatkoztatott patogenitásuk még így is lényegesen gyengébb. Az EID_{50}- és ELD_{50}-értékek közötti, legalább 4,8 log_{10}, különbség az eredeti vírus 0,3 log_{10} értékével összehasonlítva arra utal, hogy a mutánsok az eredeti vírusokhoz képest legalább 30 000-szer gyengébbek (4. táblázat).

3. táblázat

Embriómortalitás meghatározása 11 napos embrionált SPF tyúktojásokban, NDV-P1- vagy NDV-PC4-mutánssal történt oltást követő 7 napos inkubáció során

Vírushígítás (log_{10})	Embriómortalitás (elhullottak száma/oltottak száma)		
	Eredeti NDV	NDV-P1-mutáns	NDV-PC4-mutáns
1	8/8	0/8	0/8
2	8/8	0/8	0/8
3	8/8	0/8	0/7
4	8/8	0/7	0/8
5	8/8	0/8	0/8
6	8/8	0/8	0/8
7	3/6	0/7	0/8
8	2/6	0/8	0/8
9	0/6	0/5	–
10	0/6	–	–

4. táblázat

NDV-mutánsok EID_{50}- és ELD_{50}-értékei közötti különbség

Mutáns	EID_{50}	ELD_{50}	Különbség
NDV-P1	6,7	0	6,7
NDV-PC4	7,4	0	7,4
NDV-PG2	8,4	3,4	5,0
NDV-PG5	9,1	3,5	5,6
NDV-PCG12	8,2	3,4	4,8
Eredeti NDV	9,2	8,9	0,3

A keltethetőség alakulása NDV V⁻-mutáns in ovo *beadása esetén*

Főként a még a nagymértékben attenuált NDV-törzseknél is tapasztalható magas embriómortalitás és nagyon alacsony keltethetőség miatt jelenleg nem áll rendelkezésre *in ovo* beadásra alkalmas, élő NDV-t tartalmazó vakcina. Mivel az embrionálódás 11. napján beadott P1 és PC4 NDV V⁻-mutánsok az embrióra nézve nem bizonyultak patogénnek, 18 napos embrionált tojással P1 NDV V⁻-mutáns és NDW (Poulvac NDW®, kereskedelmi forgalomban kapható, kelés után adható vakcina, Fort Dodge, USA) alkalmazásával embrióvakcinázási kísérletet végeztünk. A keltethetőség az NDV V⁻-vel oltott csoportban – a kontrollcsoportban mért 96%-hoz (30-ból 29) képest – elérte a 93%-ot (30-ból 28) (5. táblázat). A legalacsonyabb keltethetőséget (23%) az NDW-vel, az egyik legnagyobb mértékben attenuált élő vírusos vakcinával oltott csoportban tapasztaltuk. A kísérlet eredménye szerint az NDV V⁻-mutáns nem befolyásolja jelentősen a keltethetőséget.

A NDV V⁻ védelmet nyújt a letális fertőzéssel szemben

Kéthetes korban az *in ovo* oltott tojásokból kelt csirkékből vért vettünk, majd az állatokat megmértük, és Herts baromfipestisvírus-törzzsel intramuszkulárisan oltottuk (5. táblázat). Az embriókorban NDV V⁻-vel vakcinázott csirkékben magas ellenanyagszint alakult ki, és testtömeg-gyarapodásuk átlagosan 131 g volt, az NDW-vel oltott állatok 85, és a kontrollállatok 141 grammos testtömeg-gyarapodásával szemben. Az NDV V⁻-vel vakcinázott állatok több mint 95%-a védetté vált a fertőzéssel szemben, míg az összes nem vakcinázott csirke elhullott. A kapott eredmények alapján az NDV V⁻-mutáns biztonságosan és hatékonyan alkalmazható 18 napos embrionált SPF tojások oltására.

5. táblázat

Az embrionálódás 18. napján rekombináns P1 NDV V⁻-mutánssal oltott tojások keltethetősége, és a csibék védettsége letális NDV-fertőzéssel szemben

Vírus	Adag log_{10} EID_{50}/tojás	Keltethetőség	Átlagos testtömeg a 2. héten (g)	Átl. HAG-titer a 2. héten[A]	Túlélés a fertőzés után[B]
NDV V⁻ (a)	3,5	22/30 (73%)	133	4,0±1,1	19/20 (95%)
NDV V⁻ (b)	4,3	28/30 (93%)	135	4,8±1,0	20/20 (100%)

5. táblázat (folytatás)

Vírus	Adag log_{10} EID_{50}/tojás	Keltethetőség	Átlagos testtömeg a 2. héten (g)	Átl. HAG-titer a 2. héten[A]	Túlélés a fertőzés után[B]
NDV V⁻ (c)	5,4	21/30 (70%)	125	5,4±1,2	19/19 (100%)
NDW	5,1	7/30 (23%)	85	7,5±0,9	Nd
Kontroll	0	29/30 (96%)	141	0,7±0,5	0/20 (0%)

A: haemagglutinációgátlási (HAG) titer (2log) kéthetes korban;

B: a csirkéket Herts baromfipestisvírus-törzzsel, intramuszkulárisan $10^{5,5}$ ELD_{50}/csirke értékkel fertőztük.

Nd: nem végeztük el.

3. példa

P1 NDV V⁻-mutánssal végzett in vivo *kísérlet: közönséges csirkeembriók vakcinázása*

Anyag és módszer

In ovo *vakcinázás és fertőzés*

A következő kísérletet közönséges, maternális eredetű ellenanyagokat tartalmazó csirkeembriókkal, lényegében az SPF csirkeembriókkal végzett *in ovo* kísérleteknél leírt módon végeztük. Röviden, összesen 120, 18 napja termékenyített közönséges tyúktojást négy, egyenként 30 tojásból álló csoportba osztottunk. Három csoportnak három különböző adagban *in ovo* NDV V⁻-mutánst adtunk be. A negyedik csoportot negatív allantois-folyadékkal oltottuk. Az állatokat 14 napos korban (kb. 17 nappal a vakcinázás után) NDV virulens Herts-törzsével intramuszkulárisan fertőztünk. A csirkéket 10 napon keresztül a betegség klinikai tüneteinek jelentkezése vagy elhullás szempontjából naponta megfigyeltük. Közvetlenül a fertőzés előtt az összes vakcinázott és kontrollállatból egyenként vérmintákat vettünk. A savókban az NDV elleni ellenanyag jelenlétét haemagglutinációgátlási próbával vizsgáltuk.

Eredmények

NDV V-mutánssal vakcinázott csirkék keltethetősége és testtömeg-gyarapodása

Az SPF tyúktojásokkal végzett vizsgálatok eredményéhez hasonlóan, az embrionált közönséges tyúktojások keltethetőségét az *in ovo* NDV V⁻-beadás nem befolyásolta (6. táblázat). A fertőzés előtt a kikelt csibék minden csoportban egészségesek voltak. Az NDV V⁻-vel vakcinázott csibék mindegyik csoportjában a testtömeggyarapodás a negatív kontrollcsoporthoz hasonlóan alakult, ami a 18 napos embrionált közönséges tyúktojásba történő *in ovo* NDV V⁻-beadás biztonságosságára utal.

Szerológiai áthangolódás és védelem letális fertőzéssel szemben

Az embrióként NDV V⁻-vel vakcinázott csirkék ellenanyag-termelése és védettsége a 6. táblázatban látható. A legnagyobb dózissal oltott csoportban mért HAG-titer átlagosan 1,8 volt, és a csirkék 85%-a védetté vált a fertőzéssel szemben. Figyelemre méltó, hogy az NDV V⁻ képes volt áttörni a beadás idején valószínűleg magas maternális ellenanyagszintet, és a csirkék 85%-át megvédte a fertőzéssel szemben. Mivel a védettség szintje dózisfüggő, kissé magasabb dózissal várhatóan a vakcinázott csirkék 90%-nál magasabb arányban védhetők meg.

6. táblázat

Rekombináns P1 NDV V⁻-mutánssal az embrionálódás 18. napján oltott csirkék keltethetősége és védettsége letális NDV-fertőzéssel szemben

Csoport	*In ovo* vakcinázás		Keltethetőség kikelt/összes	HAG-titer (2log) NDV ellen (a)	Átl. testtömeg 2 hetes korban (g)	Fertőzés utáni túlélés (b)
	Vakcina	log_{10} EID_{50}/tojás				
1.	NDV V⁻ (a)	3,7	29/30 (96%)	1,4±1,0	439	7/20 (35%)
2.	NDV V⁻ (b)	4,5	29/30 (96%)	1,5±0,9	413	15/20 (75%)
3.	NDV V⁻ (c)	5,7	27/30 (90%)	1,8±1,1	438	17/20 (85%)
4.	Kontroll	–	29/30 (96%)	1,2±0,9	440	4/20 (20%)

(a): haemagglutinációgátlási titer (HAG) kéthetes korban,

(b): a csirkéket Herts baromfipestisvírus-törzzsel, $10^{5,5}$ ELD_{50}/csirke dózissal intramuszkulárisan fertőztük.

A következőkben az ábrák rövid leírását közöljük.

1. ábra: Mutációk létrehozása NDV P-génjének szerkesztőhelyén. Az NDV-gén-sorrend vázlatos ábrázolása a negatív irányítottságú genomi RNS-ben látható. A szerkesztőhely körüli szekvenciák (2274–2300. helyzet) pozitív szenszben találhatók. A módosításokat bekeretezve, a különbö-

ző módosítások következtében kialakult aminosavváltozásokat vastagon szedve jelöltük. A nukleotidszekvenciákat és -elhelyezkedéseket Römer–Oberdörfer és munkatársai [J. Gen. Virol. *80,* 2987–2995 (1999); Y18898 EMBL leltári szám] által leírtaknak megfelelően ábrázoltuk.

2. ábra: Szacharózzal tisztított rekombináns vírusok NP- és P-proteinjei. A fertőzött embrionált tojások allantois-folyadékában található vírusokat 20%-os szacharózoldaton átcentrifugálva tisztítottuk, és a vírusproteineket immunblot-analízissel vizsgáltuk. A gélre felvitt térfogatokat NP-tartalmuknak megfelelően normalizáltuk. A mintákat két példányban vizsgáltuk, és a blotokat NP elleni monoklonális ellenanyaggal (1–3. sáv) vagy V-peptid elleni savóval inkubáltuk (4–6. sáv). AF: nem fertőzött tojásokból származó allantois-folyadék; P1:P1 NDV V^--mutáns; rNDV: eredeti FINDV-vírus.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. V-proteinjét csökkent szinten expresszáló NDV-mutáns (NDV V^-), amely fenotípusosan V-protein-pozitív, és amelynek P-génjéből származó mRNS a fertőzött sejtben ≤6%-ban kódol V nyitott leolvasási keretet.

2. Az 1. igénypont szerinti NDV-mutáns, amelynek P-génjéből származó mRNS a fertőzött sejtben ≤3%-ban, előnyösen ≤1%-ban kódol V nyitott leolvasási keretet.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti NDV-mutáns, amelynek P-génjében található UUU UUC CC szekvenciája mRNS-szerkesztőlokusz (genomi RNS, szensz) szerkesztést csökkentő mutációt tartalmaz.

4. Az 1–3. igénypontok szerinti NDV-mutáns, amelyben a szerkesztőlokusz-mutáció nukleotid-szubsztitúció.

5. A 4. igénypont szerinti NDV-mutáns, amelynek mutációja némamutáció.

6. A 3–5. igénypontok szerinti NDV-mutáns, amelyben a mutáció 1 vagy 2, előnyösen 1 nukleotidot érint.

7. A 4. igénypont szerinti NDV-mutáns, amelyben a mutáció a szerkesztőlokusz 1–5. helyén található.

8. A 7. igénypont szerinti NDV-mutáns, amelyben a mutáció a szerkesztőlokusz 3. vagy 4., előnyösen a 3. vagy 4. helyén található.

9. A 8. igénypont szerinti NDV-mutáns, amely szerkesztőlokuszának nukleotidszekvenciája UUC UUC CC vagy UUU GUC CC.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti NDV-mutáns, amely további attenuáló hatású mutációkat tartalmaz.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti NDV-mutáns, amely egy további madárpatogén kórokozó antigénjét kódoló heterológ gént tartalmaz.

12. Élő vírusos vakcina madarak baromfipestis elleni védelmére, amely az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti NDV-mutánst és gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmaz.

13. *In ovo* beadásra alkalmas élő vírusos vakcina madarak baromfipestis elleni védelmére, amely az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti NDV-mutánst és gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmaz.

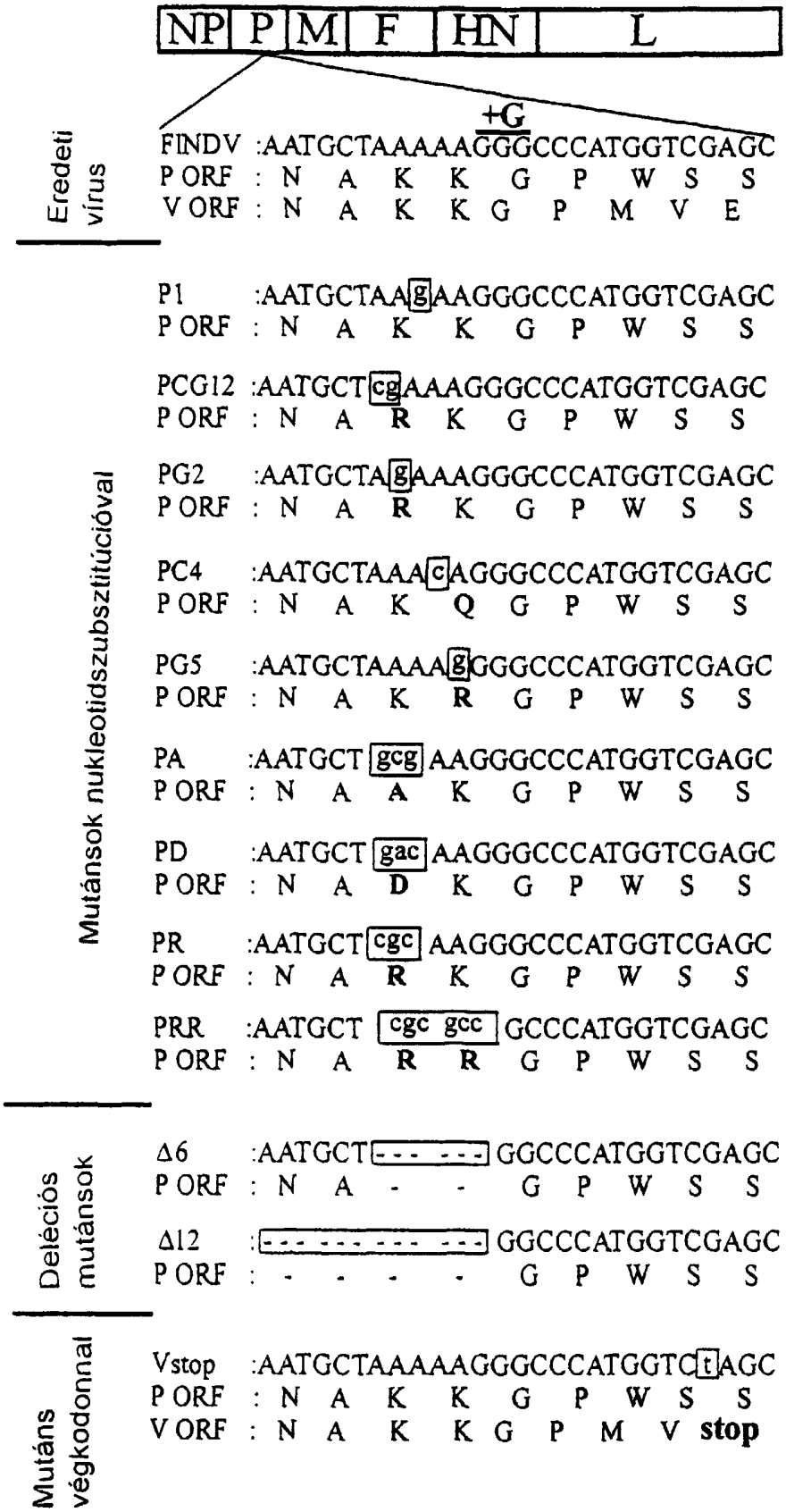
14. A 12. vagy 13. igénypont szerinti élő vírusos vakcina, amelynek dózisa tojásonként 100 µl vagy kevesebb, előnyösen 50 µl.

15. A 12–14. igénypontok szerinti élő vírusos vakcina, amely egy további madárpatogén kórokozó embrióra biztonságos vakcinatörzsét tartalmazza.

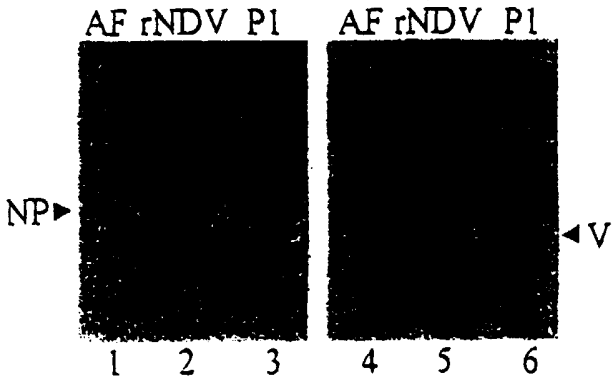
16. Inaktivált vakcina madarak baromfipestise ellen, amely az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti inaktivált NDV-mutánst, gyógyászati szempontból elfogadható hordozót és adjuvánst tartalmaz.

17. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti NDV-mutáns alkalmazása madarak baromfipestise elleni védelme céljából *in ovo* beadásra alkalmas vakcina előállítására.

1. ábra


NP P M F HN L
+G
Eredeti vírus
FINDV :AATGCTAAAAAGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A K K G P W S S
V ORF : N A K K G P M V E
Mutánsok nukleotidszubsztitúcióval
P1 :AATGCTAAgAAGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A K K G P W S S
PCG12 :AATGCTcgAAAGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A R K G P W S S
PG2 :AATGCTAgAAAGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A R K G P W S S
PC4 :AATGCTAAAcAGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A K Q G P W S S
PG5 :AATGCTAAAAgGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A K R G P W S S
PA :AATGCT gcg AAGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A A K G P W S S
PD :AATGCT gac AAGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A D K G P W S S
PR :AATGCT cgc AAGGGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A R K G P W S S
PRR :AATGCT cgc gcc GCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A R R G P W S S
Deléciós mutánsok
Δ6 :AATGCT - - - - - - GGCCCATGGTCGAGC
P ORF : N A - - G P W S S
Δ12 : - - - - - - - - - - - - GGCCCATGGTCGAGC
P ORF : - - - - G P W S S
Mutáns végkodonnal
Vstop :AATGCTAAAAAGGGCCCATGGTCtAGC
P ORF : N A K K G P W S S
V ORF : N A K K G P M V stop

2. ábra



Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest