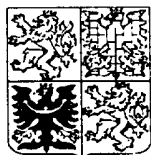


(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2646-93**

(22) Přihlášeno: **05. 06. 92**

(30) Právo přednosti:
07. 06. 91 NL 91/00989

(40) Zveřejněno: **18. 05. 94**
(Věstník č. 5/94)

(47) Uděleno: **09. 12. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(86) PCT číslo: **PCT/NL92/00097**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 92/21751**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/38

C 12 N 15/00

C 12 P 21/08

C 12 Q 1/70

A 61 K 39/265

A 61 K 39/395

C 12 N 7/00

(73) Majitel patentu:

Stichting Centraal Diergeneeskundig
Instituut, Lelystad, NL;

(72) Původce vynálezu:

Rijsewijk Franciscus Antonius Maria,
Amsterdam, NL;
Van Oirschot Johannes Theodorus,
Lelystad, NL;
Maes Roger Kamiel, Okemos, MI, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA, Jívenská 1/1273,
Praha 4, 14021;

(54) Název vynálezu:

**Mutant bovinního herpesového viru typu
1, způsob přípravy mutantu a vakcíny,
očkovací prostředek, diagnostická
souprava a způsob určení infekce**

(57) Anotace:

Mutant bovinního herpesového viru je uložený v Pasterově institutu ve Francii pod číslem I-1213. Při způsobu přípravy mutantu bovinního herpesového viru typu 1, BHV-1, se deletuje alespoň část glykoproteinového gE-genu, přičemž gE je protein, který, zejména v BHV-1 kmenu, má aminokyselino-vou sekvenci podle obrázku 3A. Způsob přípravy vakcíny spočívá v tom, že se smísí farmaceuticky přijatelný nosič s mutantem bovinního herpesového viru typu 1, získaným shora uvedeným způsobem. Očkovací prostředek k očkování zvířat, zejména savců, zvláště hovězího dobytka, k jejich ochraně proti BHV-1, je živou nebo inaktivovanou vakcínou, obsahující mutant BHV-1, získaný shora uvedeným způsobem, a vhodný nosič nebo pomocné činidlo. Diagnostická souprava pro detekci nukleové kyseliny BHV-1 ve vzorku, zejména v biologickém vzorku, obsahuje sondu nukleové kyseliny nebo primer s nukleotidovou sekvencí, odvozenou od gE-genu viru BHV-1, přičemž tento gE-gen je umístěn v genomu

BHV-1 podle obrázku 6, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušky nukleové kyseliny a protilátky. Při způsobu určení infekce BHV-1 zvířete se vyšetřuje vzorek na přítomnost nukleových kyselin, obsahujících gE-gen viru BHV-1, tento gE-gen je umístěn v genomu BHV-1 podle obrázku 6, na přítomnost viru BHV-1 nebo komplexu glykoproteinů gE a gI viru BHV-1, nebo na přítomnost protilátek, které jsou specifické pro gE viru BHV-1, nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1.

Mutant bovinního herpesového viru typu 1, způsob přípravy mutantu a vakcíny, očkovací prostředek, diagnostická souprava a způsob určení infekce

5 Oblast techniky

Vynález se týká mutantu bovinního herpesového viru typu 1, BHV-1, způsobu jeho přípravy a způsobu přípravy vakcíny, očkovacího prostředku pro zvířata, dále pak diagnostické soupravy pro detekci nukleové kyseliny BHV-1 ve vzorku, jakož i způsobu určení infekce BHV-1 zvířete.

10

Jedná se zde o vakcinaci a diagnostiku nemocí, způsobovaných patogeny, při čemž se používá jak klasických metod podání živé oslabené vakcíny nebo inaktivované vakcíny, tak i moderních metod, založených na DNA rekombinantní technologii.

15

Vynález se týká zvláště živé oslabené vakcíny a inaktivované vakcíny na ochranu zvířat, zejména skotu, proti bovinnímu herpesovému viru typu 1. Tyto vakcíny jsou navrženy tak, že nejsou pouze bezpečné a účinné, ale také vytvářejí možnost rozlišení infikovaných zvířat od neinfikovaných v očkované populaci.

20

Diagnostická souprava se používá při testech k rozlišení infikovaných a neinfikovaných zvířat v očkované populaci.

Dosavadní stav techniky

25

BHV-1, včetně infekčního bovinního viru rhinotracheitidy (IBRV) a infekčního viru pustulární vulvovaginitidy (IPVV), hraje důležitou roli v patogenezi nemocí dýchacího ústrojí a poruch plodnosti u skotu. Po akutní infekci BHV-1 často zůstává přítomný v hostiteli v latentní formě. Latentní virus může být reaktivován vlivem inter alia stresu, který může, ale nemusí být doprovázen klinickými příznaky, a následně vylučován. Následkem toho musí být infikovaný dobytek považován za celoživotního potenciálního přenašeče BHV-1. BHV-1 se objevuje endemicky v 75 % dánských dobytčích farem. Zejména starší dobytek je sérologicky pozitivní.

30

Existuje mnoho inaktivovaných (mrtvých) vakcín a mnoho atenuovaných (živých) vakcín, dostupných pro očkování proti infekci BHV-1. Inaktivované vakcíny jsou připraveny umrtvením viru BHV-1, např. teplem, zářením, ethanolem nebo formalinem. To ovšem poskytuje nedostatečnou ochranu. Atenuované vakcíny jsou připravovány četným pasážováním v homologních (bovinních) nebo heterologních buňkách, např. prasečích nebo psích, a někdy je navíc virus ještě fyzikálně nebo chemicky upraven. Tímto způsobem se ve virovém genomu vyvinou neznámé mutace/delece, které často redukuje patogenní vlastnosti viru. Atenuované živé vakcíny poskytují lepší ochranu než inaktivované vakcíny mimo jiné proto, že prezentují více virových antigenů imunitnímu systému hostitele. Další důležitou výhodou živých vakcín je to, že mohou být podávány intranazálně, to jest v místě, kde se poprvé pomnoží divoký virus po infekci. Živé vakcíny zatím nechávají dostatek prostoru pro zlepšení. Zdá se, že některé živé vakcíny mají stále schopnost způsobovat aborty, což je výrazné zejména po intramuskulární aplikaci. Nadto pravděpodobně všechny živé vakcíny zůstávají latentně přítomny v očkované krávi. Navíc jestliže se vakcína odlišuje jen velmi málo od divokého typu viru, může se objevit reverze virulence. Ale hlavní problém je to, že vakcíny BHV-1 nemohou zabránit infekci divokým typem viru. Výsledkem je to, že očkovaný dobytek může také šířit divoký typ viru BHV-1.

45

Pro vhodný program ke zvládnutí BHV-1 je nezbytné mít k dispozici účinnou a bezpečnou vakcínu, která může být odlišena od divokého typu viru, neboť aplikace účinné vakcíny může značně redukovat cirkulující BHV-1, a tudíž test, který může rozlišit mezi vakcínou a divokým typem viru, umožní detekovat (a pak odstranit) infikované jedince v očkované populaci.

50

Dosud byly vyvinuty BHV-1 vakcíny, které se zdají být bezpečnější než konvenční vakcíny a jsou odlišitelné od divokého typu viru. Byl izolován deleční mutant s defektem v genu pro thymidinkinázu, který způsobuje aborty v menším stupni, stává se méně často latentní a nemůže být reaktivován. Dále byla, užitím technik rekombinantní DNA, vytvořena BHV-1 vakcína, která má delecí v genu pro glykoprotein gIII, což umožní tuto vakcínu odlišit od divokého typu BHV-1 sérologickými technikami. Přesto existují určité námitky proti těmto vakcínám. Na jedné straně, gen pro thymidinkinázu je potřebný pro virovou replikaci a menší replikace snižuje ochrannou funkci vakcíny. Na druhé straně glykoprotein gIII je důležitý pro vznik ochranných protilátek, a proto vakcína s delecí gIII je méně účinná. Praktický problém je, že intranazální podání, které všeobecně poskytuje nejlepší ochranu, není v některých zemích pro rekombinantní vakcíny povoleno. Proto je vyžadována taková vakcína, která je bezpečná a také účinná a ještě může být odlišena od divokého typu BHV-1 a je dále žádoucí, aby přinejmenším jedna z takovýchto vakcín byla založena na viru, atenuovaném spíše konvenční cestou, než na viru, vytvořeném technikami rekombinantní DNA.

Pasážemi v tkáňových kulturách byl nyní získán kmen BHV-1, který postrádá gen pro glykoprotein gE. První výsledky našeho výzkumu naznačují, že tento gen je užitečný pro sérologické rozlišení s ohledem na divoký typ BHV-1 a že je zapojen v expresi virulence. Proto jeho delecí přispívá k bezpečnosti a může tak učinit delecí v genu pro thymidinkinázu přebytnou. Glykoprotein gE se zdá být méně důležitý pro indukci ochrany než glykoprotein gIII. Konvenčně atenuovaný kmen BHV-1, který může být sérologicky odlišen od divokého typu viru, je unikátní. Umístění a sekvence DNA genu gE, ani z ní odvozené oligonukleotidy, polypeptidy a oligopeptidy, nebyly dříve známy a jsou zde popsány poprvé. Test pro sérologické rozlišení na podkladě genu pro gE je také unikátní.

Důležitá výhoda tohoto "konvenčního" gE delečního mutantu ("konvenční" se vztahuje na užití konvenční metody pro izolaci atenuovaného viru) je to, že bude možné podávat jej intranazálně i v zemích, kde je toto pro rekombinantní vakcíny zakázáno.

Vzhledem k odlišným názorům na bezpečnost byly navíc k těmto konvenčním delečním vakcínám zkonstruovány také dobře definované rekombinantní vakcíny. Tyto rekombinantní vakcíny mají také gE delecí a mohou nebo nemusí mít také delecí v thymidinkinázovém genu a také mohou být užity jako vektory pro expresi heterologních genů. Všechny tyto rekombinantní vakcíny je možné rozlišit od divokého typu viru stejným testem, specifickým pro gE. Užití standardního testu pro soubor různých vakcín může být velká výhoda v mezinárodní boji proti BHV-1. Takovýto přístup, týkající se oboru BHV-1 vakcín, nebyl dosud popsán.

Sérologické analýzy odpovědi proti BHV-1 u dobytka ukázaly, že důležitý podíl protilátek anti-gE je namířen proti komplexu, tvořenému glykoproteinem gE a dalším BHV-1 glykoproteinem, a sice gI. Sérologické testy, které také dokazují přítomnost protilátek, specifických pro takový komplex, mohou být více citlivé než testy, které detekují pouze protilátky anti-gE. Dobytek, očkovaný jednoduchými gE delečními mutanty, může produkovat protilátky anti-gI, které mohou interferovat s detekcí protilátek anti-gI/gE. Proto tento vynález obsahuje také vakcínu s dvojitou gI/gE delecí.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je mutant bovinního herpesového viru, uložený v Pasterově institutu ve Francii pod číslem I-1213.

Dalším předmětem vynálezu je způsob přípravy mutantu bovinního herpesového viru typu 1, BHV-1, jehož podstata je v tom, že se deletuje alespoň část glykoproteinového gE-genu, přičemž

gE je protein, který, zejména v BHV-1 kmenu, má aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 3A.

Podle jednoho provedení způsobu se deletuje gE-gen.

5

Podle jiného provedení způsobu se deletuje gE-gen podle obrázku 3A z pozice asi 168 do asi 1895.

10

Podle dalšího provedení způsobu se deletuje gE-gen podle obrázku 3A z pozice asi 168 do asi 1427.

Dalším předmětem vynálezu je způsob přípravy vakcíny, jehož podstata je v tom, že se smísí farmaceuticky přijatelný nosič s mutantem bovinního herpesového viru typu 1, BHV-1, získaným shora uvedeným způsobem.

15

Při dalším provedení způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také delecii v genu thymidinkinázy.

20

Při jiném provedení způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 se zkonstruuje mutant, který má delecii v gI-genu glykoproteinu.

Jinou možností způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 je, že se BHV-1 kmen podrobí postupu, kterým se vytvoří kromě delece v jeho gE-genu glykoproteinu také delece v genu thymidinkinázy a delece v gI-genu.

25

Ještě při jiném provedení způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 se zkonstruuje mutant, který obsahuje heterogenní gen a má delecii v gE-genu glykoproteinu, který umožňuje sérologické odlišení mutantu od divokého typu BHV-1.

30

Další možností způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle vynálezu je, že se zkonstruuje mutant, který má heterologní gen vložen do místa gE-genu a který je pod kontrolou regulačních sekvencí, například gE-genu nebo heterologního genu, a popřípadě je připojen k té části gE-genu, která kóduje signální peptid.

35

Podle ještě jiného provedení způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také delecii v genu thymidinkinázy, delecii v gI-genu nebo obě, přičemž heterologní gen je vložen do místa alespoň jedné z těchto delecí.

40

Jinou možností způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 je, že se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také delecii v genu thymidinkinázy, delecii v gI-genu nebo obě, heterologní gen je vložen do alespoň jedné z těchto delecí, přičemž v případě, že mutant má dvojí delecii, kterou je delece v gE-genu a delece v genu thymidinkinázy, heterologní gen není vložen do genu thymidinkinázy.

45

Další postup při způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 je, že se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také delecii v genu thymidinkinázy, delecii v gI-genu nebo obě, heterologní gen vložený do alespoň jedné z těchto delecí má dvojitou delecii, kterou je delece v gE-genu a delece v genu thymidinkinázy, a heterologní gen neznamená gen bovinního respiračního syncyriálního viru F nebo N.

50

Ještě jiným provedením způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 je, že se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také delecii v genu thymidinkinázy, delecii v gI-genu nebo obě, heterologní gen je vložen do alespoň jedné z těchto delecí, přičemž v případě, že mutant má

dvojitou delecí, kterou je delece v gE-genu a delece v genu thymidinkinázy, jsou vloženy alespoň dva heterologní geny.

5 Konečně posledním možným provedením způsobu přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle tohoto vynálezu je, že se zkonstruuje mutant, v němž heterologní gen kóduje imunogenní protein nebo peptid jiného patogenu, nebo kóduje cytokin.

10 Jiným předmětem tohoto vynálezu je očkovací prostředek k očkování zvířat, zejména savců, zvláště hovězího dobytka, k jejich ochraně proti BHV-1, jehož podstata je v tom, že obsahuje živou, nebo inaktivovanou vakcínu obsahující mutant BHV-1, uložený v Pasterově institutu ve Francii pod číslem I-1213, získaný shora uvedeným způsobem, a vhodný nosič nebo pomocné činidlo.

15 Očkovací prostředek podle vynálezu k očkování zvířat, zejména savců, zvláště hovězího dobytka, k jejich ochraně proti patogenu, může obsahovat živou nebo inaktivovanou vakcínu obsahující mutant BHV-1, získatelný shora uvedeným způsobem, a vhodný nosič nebo pomocné činidlo, přičemž heterologní gen tohoto mutantu kóduje imunogenní protein nebo peptid patogenu.

20 Předmětem vynálezu je rovněž diagnostická souprava pro detekci nukleové kyseliny BHV-1 ve vzorku, zejména v biologickém vzorku, jako jsou krev nebo krevní sérum, krevní buňky, mléko, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, sperma, obzvláště semenná kapalina, sliny, sputum nebo tkáň, zejména nervová tkáň, pocházející ze zvířete, zvláště savce, zejména hovězího dobytka, jejíž podstata je v tom, že obsahuje sondu nukleové kyseliny nebo primer s nukleotidovou sekvencí, odvozenou od gE-genu viru BHV-1, přičemž tento
25 gE-gen je umístěn v genomu BHV-1 podle obrázku 6, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušky nukleové kyseliny.

30 Diagnostická souprava podle vynálezu pro detekci protilátek, které jsou specifické pro BHV-1, ve vzorku, zejména biologickém vzorku, jako jsou krev nebo krevní sérum, sliny, sputum, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, mléko nebo tkáň, pocházející ze zvířete, zvláště savce, zejména hovězího dobytka, je charakteristická tím, že obsahuje gE viru BHV-1, část gE, peptid, odvozený od gE, nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušku protilátky.

35 Diagnostická souprava podle vynálezu může dále obsahovat jednu nebo více protilátek, které jsou specifické pro gE viru BHV-1 nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1.

40 Tato diagnostická souprava pro detekci protilátek, které jsou specifické pro BHV-1, ve vzorku, zejména biologickém vzorku, jako jsou krev nebo krevní sérum, sliny, sputum, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, mléko nebo tkáň, zejména nervová tkáň, pocházející ze zvířat, zvláště savců, zejména hovězího dobytka, je vytvořena tak, že obsahuje protilátku, která je specifická pro gE viru BHV-1 nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušku protilátky.

45 Diagnostická souprava podle vynálezu pro detekci proteinu viru BHV-1 ve vzorku, zejména v biologickém vzorku, jako jsou krev nebo krevní sérum, krevní buňky, mléko, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, sperma, zvláště semenná kapalina, sliny, sputum nebo tkáň, zejména nervová tkáň, pocházející ze zvířete, zvláště savce, zejména hovězího dobytka, může s výhodou obsahovat protilátku, která je specifická pro gE viru BHV-1,
50 nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušku proteinu.

Posledním předmětem tohoto vynálezu je způsob určení infekce BHV-1 zvířete, zvláště savce, zejména hovězího dobytka, jehož podstata je v tom, že se vyšetřuje vzorek, pocházející ze

5 zvířete, zejména biologický vzorek, jako je krev nebo krevní sérum, krevní buňky, sperma, zvláště semenná kapalina, sliny, sputum, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, mléko nebo tkáň, zejména nervová tkáň, na přítomnost nukleových kyselin, obsahujících gE-gen viru BHV-1, tento gE-gen je umístěn v genomu BHV-1 podle
 5 obrázku 6, na přítomnost viru BHV-1 nebo komplexu glykoproteinů gE a gI viru BHV-1 nebo na přítomnost protilátek, které jsou specifické pro gE viru BHV-1 nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1.

10 Výhodný způsob určení infekce podle vynálezu spočívá v tom, že se zkoumá vzorek, pocházející ze zvířete, které je očkováno očkovacím prostředkem podle vynálezu.

Podstatou tohoto vynálezu je především deleční mutant BHV-1, který má delecii v genu pro glykoprotein gE. Výraz "delece v" znamená delecii genu jako celku.

15 Výhodným provedením vynálezu je deleční mutant BHV-1, který má delecii v genu pro glykoprotein gE a který byl získán atenuačním postupem, stejně jako deleční mutant Difivac-1, který bude popsána dále.

20 Dalším výhodným provedením vynálezu je deleční mutant BHV-1, obsahující delecii v genu pro glykoprotein gE, který se zkonstruuje technikou rekombinantní DNA, jako deleční mutanty 1B7 nebo 1B8, popsané dále.

25 Další výhodné provedení vynálezu spočívá v dvojitým delečním mutantu BHV-1, obsahujícím delecii v genu pro glykoprotein gE a delecii v genu pro glykoprotein gI, což je dále popsáno jako gI/gE dvojitý deleční mutant Difivac-IE.

30 Dále se podle vynálezu dává přednost, s ohledem na maximální bezpečnost, delečnímu mutantu BHV-1, který má delecii v genu pro glykoprotein gE a delecii v genu pro thymidinkinázu. Vynález také zahrnuje deleční mutant BHV-1, který má delecii v genu pro glykoprotein gE, genu pro glykoprotein gI a genu pro thymidinkinázu.

35 Vynález poskytuje též prostředek pro očkování zvířat, zvláště savců, speciálně hovězího dobytka, k ochraně proti BHV-1, přičemž vakcína obsahuje deleční mutant BHV-1, jak je definováno výše a vhodný nosič nebo adjuvans. Řečená směs může být živá nebo inaktivovaná očkovací směs.

40 Vynález je dále ztělesněn v mutantu BHV-1, který má delecii v genu pro glykoprotein gE a obsahuje heterologní gen, zavedený technikou rekombinantní DNA. Týká se to hlavně mutantu BHV-1, který obsahuje heterologní gen, zavedený technikou rekombinantní DNA v místě genu pro glykoprotein gE, přičemž heterologní gen je pod kontrolou regulačních sekvencí genu gE a je volitelně připojen k části genu gE, která kóduje signální peptid. Zmíněný heterologní gen může být také pod kontrolou jiného promotoru BHV-1, nebo pod kontrolou heterologního promotoru. Když mutant BHV-1 má další delecii navíc k delecii v genu pro glykoprotein gE, jako delecii v genu pro thymidinkinázu a/nebo delecii v genu pro glykoprotein gI, zmíněný heterologní gen může být také vložen do místa této dodatečné delece nebo delecí. Vícečetné inserce jsou další
 45 možnosti, buďto společně v místě jedné delece, nebo odděleně v místě několika delecí.

50 Je vhodné, aby zavedený heterologní gen kódoval imunogenní protein nebo peptid jiného patogenu nebo cytokin, který vyvolává imunitní odpověď. Příklady vhodných cytokinů jsou interleukin-2, interferon-alfa a interferon-gama.

Tento vynález také poskytuje očkovací směs (živou nebo inaktivovanou) pro očkování zvířat, zejména savců a zvláště hovězího dobytka, k jeho ochraně proti (různým) patogenům, přičemž směs obsahuje mutant BHV-1 s heterologním genem, kódujícím imunogenní protein nebo peptid

jiného patogenu, a vhodný nosič nebo adjuvans. Ochrana se samozřejmě může týkat více než jednoho patogenu, tj. multivalentní vakcíny, kde mutant obsahuje několik heterologních genů.

5 Vynález se dále týká směsi, obsahující rekombinantní nukleovou kyselinu genu pro glykoprotein gE viru BHV-1, část genu pro glykoprotein gE, nebo nukleotidovou sekvenci, odvozenou z genu pro glykoprotein gE. Tato směs může obsahovat klonovací nebo expresní vektor, který má v sobě vloženu rekombinantní nukleovou kyselinu genu pro glykoprotein gE z viru BHV-1, část genu pro tento glykoprotein gE, nebo nukleotidovou sekvenci, odvozenou z genu pro glykoprotein gE.

10 Vynález dále obsahuje směs, složenou z glykoproteinu gE z BHV-1, části tohoto glykoproteinu gE, peptidu, odvozeného z glykoproteinu gE, nebo komplexu glykoproteinů gE a gI, a směs, obsahující protilátku, specifickou pro glykoproteiny gE z viru BHV-1, část tohoto glykoproteinu gE, peptid, odvozený z tohoto glykoproteinu gE, nebo komplex glykoproteinů gE a gI. "Protilátkou" se rozumí jak polyklonální, tak monoklonální protilátka, které se dává ve většině
15 aplikací přednost. Termíny "část glykoproteinu gE" a "peptid odvozený z glykoproteinu gE" se rozumí sekvence aminokyselin, specifická pro gE, která bude dlouhá obecně přinejmenším asi 8 aminokyselin.

20 Vynález se dále týká diagnostické soupravy pro detekci nukleové kyseliny BHV-1 ve vzorku, zejména v biologickém vzorku, jako je krev nebo krevní sérum, krevní buňky, mléko, tělesné tekutiny, jako slzy, tekutina získaná výplachem plic, nosní sekrety, sperma, obzvláště semenná tekutina, sliny, sputum nebo tkáň, zejména nervová tkáň, pocházející ze zvířat, zvláště savců, zejména pak hovězího dobytka, obsahující sondu nukleové kyseliny nebo primer, jehož nukleotidová sekvence je odvozena z genu pro glykoprotein gE viru BHV-1, a detekčních
25 prostředků, vhodných pro detekční zkoušku na nukleové kyseliny.

Dále se vynález týká diagnostické soupravy pro detekci protilátek, které jsou specifické pro BHV-1 ve vzorku, zejména biologickém vzorku, jako je krev nebo krevní sérum, sliny, sputum, tělesné tekutiny, jako slzy, tekutina získaná výplachem plic, nosní sekrety, mléko, nebo tkáň,
30 pocházející ze zvířete, zejména savce a zvláště hovězího dobytka, obsahující glykoprotein gE viru BHV-1, část tohoto glykoproteinu gE, peptid, odvozený z tohoto glykoproteinu gE, nebo komplex glykoproteinů gE a gI, a detekčních prostředků, vhodných pro detekční zkoušku na protilátky. Taková diagnostická souprava může dále obsahovat jednu nebo více protilátek, které jsou specifické pro glykoprotein gE viru BHV-1, nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru
35 BHV-1.

Vynález se dále týká diagnostické soupravy pro detekci virového proteinu BHV-1 ve vzorku, zejména v biologickém vzorku, jako je krev nebo krevní sérum, krevní buňky, mléko, tělesné tekutiny, jako slzy, tekutina získaná výplachem plic, nosní sekrety, sperma, obzvláště semenná
40 tekutina, sliny, sputum nebo tkáň, zejména nervová tkáň, pocházející ze zvířat, zvláště savců, zejména pak hovězího dobytka, obsahující jednu nebo více protilátek, které jsou specifické pro glykoprotein gE viru BHV-1, nebo komplex glykoproteinů gE a gI, a detekčních prostředků, vhodných pro detekční zkoušku na protein.

45 Vynález dále poskytuje metodu pro určení infekce BHV-1 u zvířete, zejména savce a zvláště hovězího dobytka, která spočívá v prozkoumání vzorku, pocházejícího ze zvířete, zvláště biologického vzorku, jako je krev nebo krevní sérum, krevní buňky, sperma, obzvláště semenná tekutina, sliny, sputum, tělesné tekutiny, jako slzy, tekutina získaná výplachem plic, nosní sekrety, mléko, nebo tkáň, zejména nervová tkáň, na přítomnost nukleové kyseliny, obsahující
50 sekvence genu pro glykoprotein gE viru BHV-1, nebo na přítomnost glykoproteinu gE viru BHV-1, nebo komplexu glykoproteinů gE a gI viru BHV-1, nebo na přítomnost protilátek, které jsou specifické pro glykoprotein gE viru BHV-1, nebo specifické pro komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1. Vzorek pro zkoumání může pocházet ze zvířete, které nebylo dosud očkováno

očkovací směsí podle tohoto vynálezu, nebo ze zvířete, které bylo očkováno očkovacím přípravkem podle vynálezu.

5 Syntéza oligopeptidů, polypeptidů a glykoproteinů, odvozených z kódující sekvence genu pro glykoprotein gE a gI viru BHV-1.

Výsledky sekvenční analýzy DNA genu pro glykoprotein gE (obrázek 3A) a izolované fragmenty DNA, které kódují tento gen, popsané v příkladech, umožňují užitím standardních molekulárně biologických postupů jak syntetizovat peptidy proteinu gE (oligo- nebo polypeptidy), tak
10 exprimovat protein gE vcelku nebo ve velkých částech prostřednictvím prokaryot (v bakteriích) nebo eukaryot (např. v myších buňkách). Těmito způsoby může být získán specifický antigen, který může například sloužit pro vytvoření monoklonálních protilátek (Mabs), specifických pro gE. Antigen, specifický pro gE a monoklonální protilátky (Mabs), specifické pro gE, mohou být užity v sérologických testech k tomu, aby stanovily rozdíly mezi zvířaty, očkovanými vakcínou
15 s delečním gE mutantem BHV-1, a zvířaty, infikovanými divokým typem BHV-1.

Výsledky částečné sekvenční analýzy DNA genu pro glykoprotein gI, popsané v příkladech, a izolované fragmenty DNA, které kódují tento gen, společně s eukaryotickými buňkami, exprimujícími glykoprotein gE, dovolují expresi komplexu gI/gE v eukaryotických buňkách
20 (obrázky 13 a 14). Tento glykoproteinový komplex může být užit k vytvoření monoklonálních protilátek, specifických pro gI/gE. Komplex gI/gE může být také užit jako antigen v sérologických testech k rozlišení mezi dobyt看, očkovaným jednoduchým gE delečním mutantem BHV-1, nebo dvojitým gI/gE delečním mutantem BHV-1, a dobyt看, infikovaným divokým typem BHV-1.

25 gE specifické peptidy

Na základě znalosti sekvence, kódující protein, mohou být užitím automatického syntetizátoru vytvořeny polypeptidy, dlouhé nejméně 40 až 50 aminokyselin. Nyní, když proteinová sekvence
30 glykoproteinu gE viru BHV-1 kmene Lam byla objasněna (obr. 3A), polypeptidy tohoto gE viru BHV-1 mohou být syntetizovány. S takovými polypeptidy podle standardních metod mohou být imunizována experimentální zvířata, jako jsou myši nebo králci, pro vytvoření gE-specifických protilátek. Dále, užitím těchto gE-specifických peptidů mohou být dále specifikována místa, kde anti-gE protilátky reagují s gE proteinem (epitopy), např. metodou PEPSCAN (Geysen et al.,
35 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81, 3998-4002). gE-specifické oligopeptidy mohou být také užity v sérologických testech, které demonstrují anti-gE protilátky.

Prokaryotická exprese gE

40 Pro syntézu proteinu gE v bakteriích (tj. prokaryotická exprese gE) musí být DNA fragmenty, kódující glykoprotein gE, nebo jeho části klonovány v prokaryotických expresních vektorech. Prokaryotické expresní vektory jsou cirkulární DNA molekuly, které mohou udržovat samy sebe v bakterii jako separátně se replikující molekuly (plazmidy). Tyto expresní vektory obsahují jeden nebo více genových markerů, které kódují rezistenci na antibiotika a tak umožňují selekci
45 bakterií s expresním vektorem. Dále expresní vektory obsahují (často regulovatelný) úsek promotoru, za který mohou být připojeny DNA fragmenty, které jsou pak exprimovány pod vlivem promotoru. V mnoha obvyklých prokaryotických expresních vektorech je požadovaný protein exprimován ve spojení (fúzován) s takzvaným bílkovinným nosičem. Pro tento účel je ve vektoru za promotorem lokalizována kódující sekvence pro bílkovinný nosič, přímo přilehlá
50 k místu, kam může být připojen (ligován) požadovaný DNA fragment. Fúzované proteiny jsou často mnohem stabilnější a snáze se rozeznávají a/nebo izolují. Ustálený stav, kterého může dosáhnout konkrétní fúzovaný protein v určitém bakteriálním kmeni, se liší od fúze k fúzi a od kmene ke kmeni. Je obvyklé zkoušet různé kombinace.

Eukaryotická exprese glykoproteinu gE-genu

Ačkoliv prokaryotická exprese proteinů skýtá některé výhody, proteiny postrádají modifikace, jako např. glykosylace a pod., ke kterým dochází v eukaryotických buňkách. Výsledkem je, že protein, exprimovaný v eukaryotech, je často mnohem vhodnější antigen. Pro heterologní expresi proteinů v eukaryotických buňkách, jako např. myších, se používají eukaryotické expresní vektory. Tyto vektory jsou plasmidy, které nejsou množitelné jen v *E. coli*, ale udrží se naživu také v eukaryotických buňkách. Kromě prokaryotického selekčního markeru obsahují také eukaryotický selekční marker. Analogicky k prokaryotickým expresním vektorům eukaryotické expresní vektory obsahují úsek promotoru, za který mohou být vkládány (ligovány) požadované geny. Avšak sekvence promotoru v eukaryotických vektorech jsou specifické pro eukaryota. V eukaryotických vektorech se fúze s bílkovinnými nosiči používá jen zřídka. Tyto vektory jsou zavedeny do eukaryotických buněk pomocí standardní transfekční metody (F. L. Graham, A. J. van der Eb, 1973, *Virology* 52, 456-467). Kromě eukaryotických plasmidových vektorů jsou také virové vektory, kde heterologní gen je zaveden do genomu viru (např. retroviry, herpesviry a virus vakcinie). Eukaryotické buňky mohou potom být infikovány rekombinantními viry.

Obecně nemůžeme předpovědět, který vektor a buněčný typ jsou nejvhodnější pro konkrétní genový produkt. Většinou se zkouší několik kombinací.

Eukaryotická exprese obou glykoproteinů gE a gI

Konečná struktura, kterou získá Protein, závisí na jeho primární sekvenci aminokyselin, jeho svinutí či rozložení (folding), potranslačních modifikacích atd. Důležitý faktor, který přispívá ke struktuře proteinu, je jeho interakce s jedním nebo více jinými proteiny. Zjistili jsme, že také glykoprotein gE viru BHV-1 vytváří komplex s přinejmenším jedním jiným glykoproteinem, glykoproteinem gI viru BHV-1. První známka takového komplexu se objevila v našich výsledcích s testovanými anti-gE monoklonálními protilátkami (Mabs) 1, 51, 67, 75 a 78 (viz tabulka 2). Tyto Mabs nereagovaly s Difivacem-1 ani s Lam gE, ale také selhaly při rozeznání 3T3 buněk, exprimujících glykoprotein gE. Avšak tyto Mabs reagovaly s gE-exprimujícími 3T3 buňkami po infekci Difivacem-1, prokazující, že pro tyto Mabs jsou potřebné doplňující faktory, dodávající glykoproteinu gE vlastní antigenní konformaci. V některých našich radioimunoprecipitačních pokusech s Mab 81 jsme našli koprecipitaci proteinu s molekulovou hmotností 63 kD. Vzhledem k faktu, že glykoprotein gE viru herpes simplex tvoří komplex s proteinem se srovnatelnou molekulovou hmotností (HSV1 glykoprotein gI), jsme usuzovali, že glykoprotein gE viru BHV-1 tvoří komplex s homologem glykoproteinu gI viru BHV-1. Pro studium tohoto komplexu gE/gI viru BHV-1 a pro produkci antigenu gE s vhodnou antigenní strukturou jsme exprimovali oba glykoproteiny v jedné eukaryotické buňce. Použili jsme stejné procedury, jaké byly popsány pro eukaryotickou expresi glykoproteinu gE samotného. Jediný předpoklad navíc je užití expresních vektorů s odlišnými eukaryotickými selekčními markery.

Sérologické testy

Sérologické metody, vhodné pro rozlišování mezi dobyt看em, očkováným Difivacem-1, a dobyt看em, infikovaným divokým typem viru BHV-1, na bázi protilátek proti gE jsou založeny na užití monoklonálních protilátek, namířených proti gE. Tyto mohou být užity následujícími způsoby:

a) podle principu, který publikovali Van Oirschot et al. (*Journal of Virological methods* 22, 191-206, 1988). V této metodě ELISA pro detekci gI protilátek proti viru Aujeszkyho nemoci jsou protilátky demonstrovány blokujícím účinkem na reakci dvou monoklonálních protilátek (Mabs), které mají dva odlišné epitopy na gI. Test se provádí následovně. Mikrotitrační destičky jsou potaženy (coated) Mab 1, přes noc při 37 °C, a potom jsou uskladněny, např. při 4 °C nebo při -20 °C. Vyšetřované sérum je preinkubováno s antigenem v oddělených nepotažených

mikrotitračních destičkách, např. 2 hodiny při 37 °C. Destičky, potažené Mab 1 jsou promyty, např. 5krát, a poté je na tyto destičky přidána Mab 2, spojená s křenovou peroxidázou (HRPO). Pak je na destičky přenesena preinkubovaná směs sérum-protilátka, ve které jsou lokalizovány dvě Mabs, vše následováno inkubací, např. 1 hodinu při 37 °C. Destičky jsou pak odmyty a do každé jamky je přidán substrát. Po např. 2 hodinách při pokojové teplotě jsou destičky hodnoceny spektrofotometricky. 4 negativní kontrolní séra a 4 sériová ředění pozitivního séra jsou zahrnuta na každé destičce. Sérum, které má hodnotu optické denzity (OD) méně než 50 % průměrné hodnoty OD 4 negativních kontrolních sér, která byla vyšetřena na stejné destičce, se považuje za pozitivní.

b) Podle principu IDAS (Nepřímý sendvič dvojité protilátky. Indirect Double Antibody Sandwich). Zde jsou mikrotitrační destičky potaženy Mab nebo polyklonálním sérem, namířeným proti proteinu gE. Inkubace s gE-antigenem má za následek navázání gE na potažené jamky. Protilátky, specificky namířené proti gE, ve vyšetřovaném bovinním séru se potom vážou na gE. Tyto navázané protilátky jsou rozpoznány konjugátem anti-bovinního imunoglobulinu. Protilátky v tomto konjugátu jsou kovalentně vázány na enzym peroxidázu.

Nakonec je navázaný konjugát zviditelněn přidáním chromogenního substrátu. Specifita reakce je kontrolována prováděním stejné procedury s gE-negativní kontrolou místo přípravku s gE-antigenem. Na každé mikrotitrační destičce jsou také pozitivní a negativní kontrolní séra. Test je platný, jestli pozitivní sérum je pozitivní v určitém ředění. Sérum je pozitivní, jestliže zaznamenáme OD, která je o 0,2 vyšší, než standardní negativní kontrolní sérum.

c) Podle principu IDAS, který je popsán v b), ale po inkubaci vyšetřovaného séra, je použito anti-gE Mab/HRPO místo konjugátu anti-bovinního imunoglobulinu. Anti-gE peptidové sérum nebo anti-gE polyklonální sérum může být použito místo anti-gE Mab. Destičky jsou promyty a do každé jamky je přidán chromogenní substrát. Po např. 2 hodinách při pokojové teplotě jsou destičky odečteny spektrofotometricky. Každá destička obsahuje čtyři negativní kontrolní séra a čtyři řadová ředění pozitivního séra. Sérum, které má hodnotu OD menší než 50 % průměrné hodnoty OD 4 negativních kontrolních sér, vyšetřených na stejné destičce, je považováno za pozitivní.

d) Podle principu blokující ELISA, kdy je virovým antigenem, který může nebo nemusí být purifikován, přes noc potažena mikrotitrační destička. Na těchto destičkách je vyšetřované sérum inkubováno po např. 2 hodiny nebo déle při teplotě 37 °C. Po promývací proceduře je na destičky přidána anti-gE Mab a následuje inkubace např. 1 hodinu při 37 °C. Místo anti-gE Mab může být použito anti-gE peptidové sérum nebo anti-gE polyklonální sérum. Destičky jsou promyty a do každé jamky je přidán chromogenní substrát. Po např. 2 hodinách při pokojové teplotě jsou destičky spektrofotometricky hodnoceny. Každá destička obsahuje čtyři negativní kontrolní séra a čtyři řadová ředění pozitivního séra. Sérum, které má hodnotu OD menší než 50 % průměru hodnot OD čtyřech negativních kontrolních sér, vyšetřených na stejné destičce, je považováno za pozitivní.

Ve všech výše popsáných úpravách může být použit konvenčně vypěstovaný virový antigen, který obsahuje gE, ale stejně tak gE-antigen, který je exprimován prokaryoty nebo eukaryoty. Nebo by mohly být použity místo konvenčního antigenu ve výše popsáných diagnostických testech oligopeptidy, založené na sekvenci gE viru BHV-1. Navíc by takové polypeptidy mohly být použity pro vývoj takzvaných "cow-side" testů podle principu, který popsali Kemp et al., Science 241, 1352-1354, 1988. Takový test by pak byl založen na vazbě antigenní sekvence oligopeptidu s protilátkami, namířenými proti gE, přítomnými v infikovaných zvířatech. Pro takový test by měl být oligopeptid spojen s Mab, namířenou proti boviním erytrocytům.

Analýza nukleových kyselin užitím polymerázové řetězové reakce

Oligonukleotidy (sondy a primery) mohou být použity například v polymerázové řetězové reakci, abychom rozlišili očkováná a infikovaná zvířata. Polymerázová řetězová reakce (PCR) je
 5 technika, pomocí níž nukleové kyseliny patogenu mohou být v krátkém čase milionkrát
 namnoženy (De polymerase kettingreactie, P. F. Hilderink, J. A. Wagenaar, J. W. B. van der
 Giessen and B. A.M. van der Zeijst, 1990, Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 115,
 1111-1117). Oligonukleotidy gE mohou být vybrány tak, že v genomu pozitivním v gE se tvoří
 10 odlišný produkt než v genomu negativním v gE. Výhoda toho je, že také zvíře, které bylo
 očkováno gE deleční vakcínou, dává pozitivní signál v PCR testu. Avšak tento přístup závisí na
 přítomnosti virových nukleových kyselin ve vzorku, např. krvi, pocházející z testovaného zvířete.

Po akutní BHV-1 infekci je velká šance, že nukleové kyseliny, specifické pro BHV-1, mohou být
 15 prokázány v krvi, ale zatím ještě nebylo zjištěno, zda nukleové kyseliny BHV-1 mohou být
 prokázány v krvi také během latence.

Užití BHV-1 jako vektoru

Pro expresi heterologních genů v genomu BHV-1 je nezbytné mít k dispozici přesné informace
 20 o oblasti, kam má být vložen heterologní gen. Nemělo by dojít k žádnému porušení nezbytných
 sekvencí a také regulační sekvence musí být dostupné pro expresi heterologního genu. V zásadě
 je gen pro glykoprotein gE vhodný místem pro expresi heterologních genů, gE-gen není
 nezbytný, proto není námitek k jeho nahrazení heterologním genem. Tudíž heterologní gen může
 být umístěn tak, že bude pod vlivem regulačních sekvencí genu gE. Avšak není nezbytné použít
 25 regulační sekvence gE genu. Expres heterologních genů může být řízena eventuálně jinými,
 např. silnějšími regulačními sekvencemi odlišných genů. Je také možné připojit heterologní gen
 k exportnímu signálnímu peptidu genu gE, takže může být ovlivněna sekrece produktu
 heterologního genu. Je tedy jasné, že detailní znalost genu a proteinu gE poskytuje možnost
 30 využít BHV-1 jako vektoru. Vyvinuté vektory mohou navíc být sérologicky odlišeny od
 divokého typu. Konstrukce mutantů BHV-1, které exprimují heterologní geny, může být
 provedena stejným způsobem, jako konstrukce gE delečních mutantů, ukázaná v příkladech.
 Avšak deleční fragmenty by pak měly být nahrazeny fragmentem, na kterém je lokalizován
 heterologní gen v místě delece.

35

Příklady provedení vynálezu

1) Izolace a identifikace přírodního gE delečního mutantu

40 a) Izolace přírodního mutantu

Genomická DNA byla izolována z řady konvenčně atenuovaných vakcín podle standardních
 metod a analyzována užitím restrikčních enzymů. Konkrétně jsme pátrali po genomických
 odchylkách, které by byly vhodné pro rozlišení od divokého typu BHV-1.

45

Konkrétně byla pozornost namířena na oblast U_s genomu viru BHV-1, protože v této oblasti -
 analogicky s virem herpes simplex - je pravděpodobně lokalizována řada genů, kódujících
 neesenciální glykoproteiny (Identification of a herpes simplex virus 1 glycoprotein gene within
 a gene cluster dispensable for growth in cell culture, R. Longnecker, S. Chatterjee, R. J. Whitley
 50 a B. Roizman (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4303-4307).

Po velkém počtu pasáží na buňkách bovinní embryonální ledviny a buňkách bovinní embryonální
 trachey (Ebtr) bylo prokázáno, že soubor vakcín BHV-1, pocházející z Univerzity Záhřeb,
 Jugoslávie (Lugovic et al., Veterinarski Arhiv 55, 241-245, 1985), má kromě normální U_s oblasti

také odlišnou U_s oblast. Tato vakcína nadto vytvářela jak velké, tak i malé plaky na Ebtr buňkách. Z této smíšené populace byl třemi konečnými ředicemi kroky izolován virus s odchylnou U_s oblastí, když byly pokaždé vybrány malé plaky. Virus, izolovaný touto cestou, byl dále zkoumán a nazván Difivac-1. Byl uložen v Institut Pasteur, Paříž, Francie, 27. května 1992, pod číslem I-1213.

b) Identifikace delece v genu gE viru Difivac-1

K další analýze této odchylky v oblasti U_s byla izolována genomická DNA viru Difivac-1 podle standardních metod a podrobena analýze přenosem (blotem) dle Southerna (Obr. 1A). Hybridizace tohoto blotu s ³²P značeným HindIII K fragmentem divokého typu potvrdila, že tento fragment, lokalizovaný centrálně v U_s oblasti, je asi o 1.0 kilobáze (kb) kratší v Difivac-1. Navíc byla touto analýzou přibližně zjištěna pozice chybějící části (Obr. 18). K další analýze této delece byla izolována U_s oblast divokého typu BHV-1 kmene Lam a klonována v prokaryotických vektorech. Nakonec byla izolována podle standardních metod genomická DNA kmene Lam (Obr. 2A) a klonována ve vektorech pUC18, pACYC a pBR322 (Obr. 2B). Byla vytvořena fyzikální mapa oblastí okolo předpokládaného místa delece (Obr. 2C). Na základě této fyzikální mapy byly konstruovány ve vektorech pKUN19 a pUC18 subklony, vhodné pro určení nukleotidové sekvence této oblasti (Obr. 2D). Použitím těchto subklonů byla určena Sangerovou metodou nukleotidová sekvence obou řetězců celé oblasti (ukázáno na obr. 2C). Tato nukleotidová sekvence (SEQ ID NO:1) byla analyzována užitím programu PC/Gene. Na základě počítačové translace se ukázalo, že nukleotidy (nt) 168 až 1893 kódují otevřený čtecí rámec 575 aminokyselin (Obr. 3A). Další analýza ukázala, že tato sekvence aminokyselin má charakteristiku transmembránového glykoproteinu, jak je ukázáno na obr. 38. Faktem je, že oblast prvních 26 aminokyselin (aa) je rozpoznávána jako typický eukaryotický exportní signál a oblast mezi aa 423 a aa 450 je rozpoznávána jako transmembránová oblast. Navíc se v této sekvenci objevila tři potenciální N- glykosylační místa. Takto předpovězená sekvence aminokyselin vykazuje jasnou podobnost s genem pro glykoprotein gE viru herpes simplex (HSV); viz obr. 4A a 48. Tyto a jiné podobnosti opravňují závěr, že nalezený gen je gE homolog viru BHV-1. Z tohoto důvodu je gen nazýván gE. K určení toho, do jaké míry chybí tento gE-gen viru BHV-1 ve viru Difivac-1, byl izolován fragment p318. Fragment p318 začíná v AluI místě 55 nt před otevřeným čtecím rámcem předpokládaného gE a končí 133 nt za ním. S tímto p318 fragmentem byla analyzována užitím Southernovy hybridizace genomická DNA viru Difivac-1. Tak se zjistilo, že Difivac-1 neobsahuje žádnou p318 detekovatelnou sekvenci (Obr. 5). Tento experiment potvrdil, že Difivac-1 obsahuje deleci a jasně demonstruje, že tato delece zaujímá celý gen gE.

K určení velikosti a pozice deletované oblasti byly v prokaryotických vektorech klonovány genomické sekvence, pokrývající oblast U_s viru Difivac-1, viz obr. 11C. EcoRI fragment o velikosti 14,5 kb byl klonován ve vektoru pACYC a pojmenován p775. HindIII fragment o velikosti 7,4 kb byl nazávisle klonován ve vektoru pUC18 a nazván p728. Z klonu p728 byly izolovány dva subklony: PstI fragment velikosti 1,4 kb v klonu p737 a AluI-PstI fragment velikosti 350bp v klonu p754. Analýza těchto klonů restričními enzymy a bloty dle Southerna (data nejsou ukázána) dokázala, že delece gE v Difivac-1 je 2,7 kb dlouhá, začíná právě od 5'konce genu gE a končí na hranici U_s oblasti. Těchto 2, 7 kb je nahrazeno duplikací 1 kb segmentu, lokalizovaného v oblasti U_s opačně k genu gE, jako aberantní extenze opakované (repeat) oblasti, viz obr. 118. K potvrzení výsledků této analýzy a k určení přesného místa rekombinace byla určena nukleotidová sekvence větší části inzertu klonu p754 a srovnána se sekvencemi divokého typu, viz obr. 12. Tato analýza ukázala, že místo rekombinace je lokalizováno 77 bp protisměrně (upstream) od počátečního kodonu genu gE.

c) Hodnocení bezpečnosti a účinnosti viru Difivac-1

Difivac-1 byl testován v BHV-1 séronegativních telatech, starých 7 týdnů, neobsahujících specifický patogen. 8 telat bylo intranazálně očkováno 10^5 TCID₅₀ po 2 ml, každému byl rozprášen 1 ml do každé nozdry. 8 BHV-1 séronegativním telatům, starým 7 týdnů, bez průkazu specifického patogenu, která byla umístěna v oddělené izolační jednotce, byly intranazálně podány 2 ml média s kulturou a sloužila jako neočkované kontroly. 5 týdnů po vakcinaci vakcinovaná a kontrolní telata byla intranazálně testována 10^7 TCID₅₀ vysoce virulentního kmene BHV-1 Iowa. 6 týdnů po testu všechna telata byla ošetřena intramuskulárně Dexamethasonem po 5 dní za účelem reaktivovat předpokládaný latentní virus. Byly monitorovány klinické příznaky, rektální teploty a tělesný růst. Z nazálních výtěrů byly prováděny izolace viru, v séru byly určovány titry neutralizačních protilátek.

Chování, chuť k jídlu, rektální teploty a tempo růstu telat zůstalo po vakcinaci normální, ale vakcinovaná telata měla trochu serózní výtok z nosu a mírně zvýšené slinění. Nebyla pozorována poškození nazální sliznice. Po vakcinaci byl Difivac-1 vylučován z nazálních výtěrů (obr. 17). Všechna očkována telata produkovala neutralizační protilátky k BHV-1.

Po testu všechna neočkovaná kontrolní telata vykazovala apatii, ztrátu chutě k jídlu, oční a nosní výtok, zarudnutí dásně dolní čelisti, vážná poškození nosní sliznice až do 14 dnů po testu a zástavu růstu o 4 dny. Očkována telata měla malá, rychle se hojící poškození nosní sliznice a neměla zpomalený růst. Denní klinické výsledky, rektální teplota a růstový vývoj po testu jsou udány na obrázcích 18, 19 a 20. Po testu vylučovala virus nosem všechna telata, ale množství a doba exkrece viru byla u očkovaných telat znatelně snížena (obr. 21). U očkovaných telat se vyvinula sekundární protilátková odpověď a všechna neočkovaná telata produkovala protilátky po testu.

Po reaktivaci byl testující virus izolován z jednoho očkovaného telete a z 5 neočkovaných. Difivac-1 nemohl být reaktivován.

Výše uvedené výsledky demonstrují, že Difivac-1 stěžejně vyvolal jakýkoliv příznak nemoci u mladých telat a nebyl schopný reaktivace. Difivac-1 značně snížil vážnost onemocnění a intenzitu exkrece viru po testu.

Lze uzavřít, že Difivac-1 je bezpečná a účinná vakcína, která může být užita u dobytka proti infekcím BHV-1.

2) Konstrukce rekombinantních gE delečních mutantů viru BHV-1

Aby byly k dispozici odlišitelné vakcíny BHV-1, které jsou molekulárně lépe definovány než Difivac-1 a které, pokud by byl takový požadavek, obsahují delecí např. v genu pro thymidinkinázu kromě delecí v gE genu, byly kromě Difivac-1 vytvořeny rekombinantní gE deleční mutanty, gE deleční fragmenty mohly být vytvořeny za předpokladu určení polohy genu pro glykoprotein gE a použitím klonovaných fragmentů DNA, které ohraničují (flank) gE gen. Užitím standardní techniky (F. L. Graham a A. J. van der Eb, 1973, Virology 52, 456-467) mohl být tento deleční fragment vložen do genomu divokého typu viru BHV-1, což vedlo k vytvoření gE delečního mutantu.

a) Konstrukce gE delečního fragmentu

Ke konstrukci gE delečního fragmentu byl vybrán fragment, který na jedné straně postrádá celou sekvenci gE a na druhé straně obsahuje dostatečnou ohraničující (flanking) sekvenci, aby dovolila rekombinaci s genomem divokého typu. Na 5' (upstream) konci byl vybrán fragment PstI-AsuII, veliký 1,2 kb, který končí 18 nukleotidů před počátečním kodónem gE genu. Na 3'

(downstream) konci byl vybrán 1,2 kb EcoNI-DraI fragment, který začíná 2 nt před koncovým kodónem gE genu (obr. 6).

K vytvoření gE delečního fragmentu byl v SmaI a PstI místě plazmidu pUC18 subklonován 1,4 kb PstI-SmaI fragment, pocházející z 8,4 kb HindIII K fragmentu BHV-1 kmene Lam, lokalizovaný v 5' místě genu gE. Tento klon byl nazván p515. EcoNI-SmaI fragment, lokalizovaný ve 3' místě gE, pocházející ze 4,1 kb HindIII-EcoRI klonu, byl klonován v unikátním AsuII místě p515. Takto byla dovršena konstrukce delečního fragmentu gE a klon takto vytvořený byl nazván p519. Ačkoliv by v principu celý PstI-SmaI inzert p519 mohl být užit jako gE deleční fragment, nelze to doporučit. Fakt je, že PstI-SmaI zasahuje přibližně 100-150 bp do opakované sekvence, která ohraničuje oblast U_s. Tento úsek 100-150 bp by mohl rekombinovat s opakovanou sekvencí na jedné straně U_s oblasti, kde není lokalizován gen gE, a mohl by tak poskytovat nežádoucí rekombinační produkty. Z tohoto důvodu byl pro rekombinační pokus vybrán PstI-DraI fragment, takže 100 bp opakované sekvence bylo odstraněno.

b) rekombinace gE delečního fragmentu s genomem divokého typu viru BHV-1

Aby se uskutečnila rekombinace mezi vytvořeným gE delečním fragmentem a genomem divokého typu BHV-1, kotransfekce buněk embryonální bovinní trachey (Ebtr) mikrogramovým množstvím obou DNA molekul se provádí podle standardní metody, kterou popsali F. L. Graham a A. J. van der Eb (1973, Virology 52, 456-467). Buněčné mechanismy rekombinace vedou k rekombinaci malého procenta DNA molekul (2-4 %), které byly přijaty buňkami. K selekci rekombinovaných gE delečních mutantů je virová směs, která vznikne po transfekci, vyseta na tkáňovou kulturu Ebtr. Ve většině případů takto vzniknou oddělené virové populace (plaky), které pocházejí z jednoho viru. K izolaci gE delečních mutantů BHV-1 kmene Lam bylo 230 těchto plaků izolováno a vyšetřeno podle standardních imunologických metod s BHV-1 specifickými monoklonálními protilátkami (Mabs), které nereagují s buňkami infikovanými Difivac-1. Tyto Mabs jsou namířeny přímo proti glykoproteinu gE. 5 z 230 plaků nereagovalo s těmito Mabs. Dále byla vyšetřována také DNA těchto plaků.

c) DNA analýza vytvořených gE delečních mutantů viru BHV-1 kmene Lam

DNA, izolované ze 3 (1B7, 1B8 a 2H10) výše zmíněných 5 možných gE delečních mutantů, byly dále vyšetřovány použitím standardní techniky blotu dle Southerna (Sambrook et al., 1989). Dvojitě štěpení těchto DNA s PstI a DraI, následované gelovou elektroforézou a hybridizací Southernova blotu s 2,3 kb PstI-DraI delečním fragmentem jako sondou ukazuje, že gen gE genomu virové populace 1B7 a 1B8 byl požadovaným způsobem přesně odstraněn, viz obr. 7A a 7B. Populace 2H10 má odlišný PstI-DraI fragment. Hybridizace Southernových blotů s gE-specifickou sondou ukazují, že žádné gE sekvence nejsou lokalizovány v jakémkoliv ze tří DNA izolátů (výsledky nejsou ukázány). BHV-1 virové populace 1B7 a 1B8 jsou zamýšlené rekombinantní gE deleční mutanty. Populace 1B7 viru BHV-1 byla testována na vlastnosti vakcíny.

d) Vytvoření dvojitých delečních mutantů thymidinkináza/gE

Protože rekombinantní deleční mutanty BHV-1 s delecí pouze v jednom genu by nemusely mít dostatečně redukovanou virulenci, byly také zvažovány delecce v thymidinkinázovém (TK) genu BHV-1 kmene Lam a Harberink. Tyto mutanty byly vytvořeny analogním způsobem k výše zmíněnému způsobu, použitému pro gE deleční mutanty (výsledky nejsou ukázány). Tyto TK deleční mutanty byly použity k vytvoření TK/gE dvojitých delečních mutantů.

e) Vytvoření dvojitého glykoprotein gI/glykoprotein gE delečních mutantů

Protože dobytek, očkováný jednoduchým gE delečním mutantem, může produkovat anti-gI protilátky, které mohou interferovat s detekcí protilátek anti gI/gE (diskutováno níže), vynalezli jsme také vakcínu s gI/gE dvojitou delecí. Takový gI/gE dvojitý deleční mutant může být vytvořen použitím stejných procedur, použitých ke konstrukci gE jednoduchého delečního mutantu. Částečná nukleotidová sekvenční analýza protisměrného (upstream) konce 1,8 kb PstI fragmentu - který pokrývá 5' konec gE genu - odhalila otevřený čtecí rámec s významnou homologií ke gI homologům, nalezeným u jiných herpesvirů, viz obrázky 13 a 14. Užitím 350 bp Smal-PstI fragmentu, který zahrnuje předpokládaný konec gI genu, a EcoNI-SmaI fragmentu, lokalizovaného po směru (downstream) od genu gE, může být vytvořen gI/gE deleční fragment. Tento fragment může rekombinovat s genomem divokého typu za vzniku gI/gE delečního mutantu BHV-1, viz obrázek 16. 80-90 aminokyselin, které - teoreticky - mohou ještě vznikat, nebude schopno vytvořit protilátky, které mohou interferovat s detekcí anti-gI/gE protilátek. Další sekvenční analýza genu gI umožní vytvoření gI delece, která pokryje kompletní kódující oblast gI. Tento gI/gE dvojitý deleční mutant byl pojmenován Difivac-IE.

f) Hodnocení bezpečnosti a účinnosti mutantů Lam gE⁻ a Lam gE⁻,TK⁻

Vlastnosti vakcíny Lam gE⁻ a Lam gE⁻,TK⁻ mutantních kmenů BHV-1 byly testovány na telatech, starých 7 týdnů. BHV-1 séronegativních, neobsahujících specifický patogen. Každý mutantní kmen byl intranazálně rozprášen 6 telatům. Každému teleti byla dána celková dávka 10^5 TCID₅₀ ve 2 ml média s kulturou, do každé nozdry byl rozprášen 1 ml. Jiným 6 telatům bylo intranazálně vstříknuto tkáňové médium bez viru a sloužila jako neočkované kontroly. 5 týdnů po vakcinaci všechna telata, vakcinovaná a kontrolní, byla intranazálně testována s 10^7 TCID₅₀ vysoce virulentního kmene BHV-1 Iowa. Po očkování a po testu byly monitorovány klinické příznaky, rektální teploty a tělesná váha.

Chování, chuť k jídlu, rektální teploty a tempo růstu u telat po vakcinaci zůstaly normální. Sérózní nazální výtok a malá poškození nazální sliznice byly pozorovány u všech očkovaných telat. Virus mohl být izolován z nosů očkovaných telat po přibližně 7 dnů (tabulka 1).

Po testu všechna neočkovaná kontrolní telata vykazovala apatii, ztrátu chuti k jídlu, oční a nosní výtok, zarudnutí dásně dolní čelisti, vážná poškození nosní sliznice a byl zpomalen růst. Všechna telata očkovaná Lam gE⁻,TK⁻ měla nějaký nosní výtok a menší poškození nosní sliznice. Ne všechna telata očkovaná Lam gE⁻ měla nosní výtok nebo poškození nosní sliznice. Apatie, ztráta chuti k jídlu nebo jiné klinické příznaky onemocnění u očkovaných telat nebyly pozorovány. Rektální teplota, růst a klinické výsledky po testu jsou ukázány na obr. 22, 23 a 24. Neočkovaná telata vylučovala virus nosem dvakrát déle než očkovaná telata (tabulka 1).

Výše uvedené výsledky prokazují, že mutantní kmeny Lam gE⁻ a Lam gE⁻,TK⁻ viru BHV-1 sotva vyvolaly jakýkoliv příznak nemoci u mladých telat. Oba mutantní kmeny zamezily nemoci po testu a snížily období nazálního vylučování viru o 50 %.

Mutantní kmeny Lam gE⁻ a Lam gE⁻,TK⁻ viru BHV-1 jsou bezpečné a účinné pro užití jako vakcína u dobytka proti BHV-1 infekcím.

3) Prokaryotická exprese gE

K prokaryotické expresi genu pro glykoprotein gE viru BHV-1 byly vytvořeny vektory, založené na dosud užívaných expresních vektorech pGEX (D. B. Smith a K. S. Johnson, Gene 67 (1988) 31-40). Vektory pGEX kódují bílkovinný nosič glutathion S-transferázu (GST) ze *Schistosoma japonicum*, který je pod vlivem promotoru tac, který může být indukován k expresi isopropylthiogalaktosidem (IPTG). Příklad GST-gE fúzaného proteinu je produkt konstruktů

pGEX-2T600s3 (obr. 8A). V tomto konstruktu byl použitím standardních molekulárně-biologických technik (Sambrook et al. 1989) 600 bp velký SmaI fragment, který kóduje N-terminální oblast 200 aminokyselin gE proteinu, připojen za gen GST. Tento konstrukt byl navržen ve třech variantách, pokaždé s odlišným čtecím rámcem 600 bp fragmentu, který byl
 5 připojen k GST. Všechny 3 konstrukty byly zavedeny do *Escherichia coli*, kmene DH5 α , indukovány s IPTG a vytvořené proteiny byly přeneseny na nitrocelulózu po elektroforéze na polyakrylamidovém gelu pomocí Western blottingu. Imunologická detekce s anti-GST protilátkami prokázala, že pouze vlastní čtecí rámec (č. 3), který kóduje proteinovou oblast gE, vede k expresi fúzaného proteinu předpokládané velikosti 27k (GST) + 20k (gE) = 47 k. Tři
 10 z Mabs námi izolovaných, které nereagují s Difivac-1, rozeznávají 47 kD GST-gE fúzaný protein ve Western blotu; viz obrázek 8B.

4) Eukaryotická exprese genu pro glykoprotein gE

Pro eukaryotickou expresi genu pro glykoprotein gE byl již dříve inter alia vybrán vektor pEVHis. Vektor pEVHis má jako eukaryotický marker gen HisD, kódující histidinol dehydrogenázu [EC 1.1.1.23] (C. Hartmann a R. Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8047-8051), který umožňuje buňkám přežít toxickou koncentraci 2,5 mM histidinolu. Vektor navíc obsahuje promotorovou oblast bezprostředního časného genu lidského cytomegaloviru (HCMV) s unikátními restrikčními místy, lokalizovanými za ním. K vytvoření pEVHis/gE
 20 expresního vektoru byl použit fragment, zahrnující celou kódující oblast genu pro glykoprotein gE. Začíná v AluI místě 55 bp před předpokládaným otevřeným čtecím rámcem gE a končí 133 bp za ním. Tato oblast byla klonována za HCMV promotor vektoru pEVHis, pomocí něhož byl vytvořen konstrukt pEVHis/gE (obr. 9). pEVHis/gE byl pomnožen v buňkách DH5 α *E. coli* a přečištěn pomocí cesiumchloridového gradientu (Sambrook et al., 1989). Tato purifikovaná DNA byla transfekována do Balb/C-3T3 buněk podle metody Grahama a van der Eba. Transformované buňky byly selektovány histidinolem, po jehož aplikaci bylo izolováno 20 histidinolrezistentních kolonií. Tyto kolonie byly vyšetřeny s Mab 81 pomocí imunologického testu s peroxidázou na monovrstvě (Immuno Peroxidase Monolayer Assay - IPMA). Ve čtyřech
 30 koloniích byla prokázána exprese proteinu gE. Z těchto čtyř kolonií byly použity buňky 3T3 gE klon 9 k izolaci subklonu, který měl vysokou expresi gE. Klon, izolovaný touto metodou (nazvaný 3T3gE 9, 5), byl použit k bližšímu určení možných anti-gE monoklonálních protilátek.

5) Eukaryotická exprese obou glykoproteinů gE a gI viru BHV-1 ve stejné buňce

35 K expresi glykoproteinu gI viru BHV-1 ve stejné buňce společně s glykoproteinem gE viru BHV-1 jsme nejdříve určili předpokládanou pozici genu gI ve viru BHV-1. Protože gen pro glykoprotein gI viru herpes simplex je lokalizován právě protisměrně od genu pro glykoprotein gE, dalo se předpokládat, že gen gI BHV-1 by mohl být lokalizován v odpovídající pozici. Aby se toto prokázalo, byla určena sekvence oblasti 283 nukleotidů, lokalizovaná přibližně 1 kb protisměrně od začátku genu gE viru BHV-1. Teoretická translace této oblasti ukázala, že druhý
 40 čtecí rámec kóduje 94 aminokyselin a jejich sekvence je homologní s glykoproteinem gI viru herpes simplex (obrázky 13 a 14). Protože homologní segment je asi 80 aminokyselin od počátečního kodónu, předpokládaný začátek otevřeného čtecího rámce genu gI viru BHV-1 může být asi 250 nt protisměrně od sekvenované oblasti. Z tohoto bylo odvozeno, že 1,7 kb SmaI fragment, který začíná 400 nt protisměrně od sekvenované oblasti a končí v genu gE, by mohl obsahovat kompletní kódující oblast genu gI viru BHV-1. Tento 1,7 kb SmaI fragment byl klonován v eukaryotickém vektoru MSV-neo (viz obr. 15). Tento vektor obsahuje silný promotor viru myšího sarkomu a selekční gen neo, který kóduje rezistenci proti antibiotiku G-418 sulfátu Geneticin. Výsledný konstrukt MSVneoGI byl množen v buňkách *E. coli* DH5 α a byl
 50 transfekován do 3T3gE 9, 5 buněk použitím metod Grahama a van der Eba. Transfekované buňky byly selektovány v tkáňovém médiu s 400 μ g Geneticinu/ml a rezistentní kolonie byly izolovány a testovány s možnými anti-gE Mabs, které selhaly v reakci s 3T3gE 9,5 buňkami.

Z toho jsme vybrali 3T3gE/gI R20 klon, který reagoval např. s Mab 66 a také s divokým typem BHV-1.

6) Charakterizace možných anti-gE monoklonálních protilátek (Mabs)

5

Mabs byly produkovány proti divokému typu viru BHV-1 a selektovány pro jejich neschopnost reagovat s buňkami embryonální bovinní trachey (Ebtr), infikovanými virem Difivac-1. Tyto Mabs byly vyšetřeny na reaktivitu s

10

a) Lam gE⁻ delečním mutantem;

b) s výše popsaným prokaryotickým expresním produktem ve Western blotu;

c) s výše popsanými gE-expresními buňkami Balb/c-3T3;

15

d) buňkami, zmíněnými za c) a infikovanými Difivac-1, a

e) Balb/c-3T3 buňkami, exprimujícími gE/gI komplex.

20

Pro reaktivitu, testovanou v a), c), d) a e), byl použit test imunoperoxidázové monovrstvy (IPMA). Výsledky v tabulce 2 ukazují, že se vytvářely Mabs, které byly namířené proti gE (čísla 2, 3, 4, 52, 66, 68, 72 a 81) a Mabs (čísla 1, 51, 53, 67, 75 a 78), které mohou být mířeny proti strukturálním antigenním doménám na gE/gI komplexu. Antigenní domény, rozeznávané různými Mabs při kompetitivní IPMA, indikovaly, že přinejmenším 4 antigenní domény jsou přítomny na glykoproteinu gE a že jedna doména je pravděpodobně tvořena komplexem gE/gI (tabulka 2).

25

Detekce protilátek anti-gE u dobytka, infikovaného BHV-1 K vyšetření toho, zda jsou v séru infikovaného dobytka přítomny protilátky proti gE, byl použit nepřímý blokující test IPMA se 16 možnými gE-Mabs a následujícími 8 vybranými séry:

30

- 2 séra hovězího dobytka, očkovaného Difivac-1 a testovaného virulentním kmenem Iowa, která byla sbírána 14 dnů po testu;

35

- 2 séra hovězího dobytka, experimentálně infikovaného virem BHV-1 subtypem 1, která byla sbírána 20 měsíců po infekci.

Jedno zvíře bylo infikováno kontaktní expozicí;

40

- 2 séra hovězího dobytka, experimentálně infikovaného virem BHV-1 subtypem 2b, která byla sbírána 20 měsíců po infekci. Jedno zvíře bylo infikováno kontaktní expozicí;

- sérum telete bez specifického patogenu, očkovaného ts mutantní vakcínou a testovaného 3 týdny později virem BHV-1 subtypem 2b, které bylo sbíráno 7 týdnů po testu;

45

- sérum gnotobiotického telete, očkovaného ts mutantní vakcínou a testovaného 3 týdny později virem BHV-1 subtypem 2b, které bylo sbíráno 7 týdnů po testu.

50

Tabulka 2 ukazuje, že všechna tato séra obsahovala protilátky proti antigenním doménám III a IV na gE a proti antigenní doméně 1, která je pravděpodobně lokalizována na komplexu gE/gI. Můžeme uzavřít, že gE se jeví být vhodným sérologickým markerem pro rozlišení mezi dobyt看m, infikovaným BHV-1, a dobyt看m očkovaným.

7) Detekce BHV-1 nukleových kyselin pomocí procedury PCR a primerů, specifických pro gE viru BHV-1

Na základě určené nukleotidové sekvence genu gE viru BHV-1 byl vybrán pár primerů, vhodný pro PCR užitím programu na výběr primerů od Loweho et al. (T. Lowe, J. Sharefkin, S. Oi Yang a C. W. Dieffenbach, 1990, *Nucleic Acids Res.* 18, 1757-1761). Tyto primery byly nazvány P₃ a P₄ a jsou ukázány na obr. 10. Primery jsou lokalizovány 159 nt od sebe a vedou k amplifikaci fragmentu 200 nt. Použitím primerů P₃ a P₄ a izolované DNA viru BHV-1 byly optimalizovány podmínky pro metodu PCR. To znamená obzvláště variace v koncentraci MgCl₂, koncentraci glycerolu a v podmínkách pro cyklování. Byl nalezen optimální pufr pro užití P₃ a P₄ k amplifikaci DNA BHV-1, jeho složení je 10 mM Tris pH 8,0, 50 mM KCl, 0,01% želatina, 2,6 mM MgCl₂ a 20% glycerol. Optimální podmínky pro cyklování (Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler) jsou pro cykly 1-5:1 min. 98 °C, 30 sec. 55 °C a 45 sec. 72 °C a pro cykly 6-35:30 sec. 96 °C, 30 sec. 55 °C a 45 sec. 72 °C. Po amplifikaci PCR byl získaný DNA fragment, dlouhý 200 nt, podroben elektroforéze ve 2% agarózovém gelu, přenesen blotováním na nitrocelulózu a následně podroben analýze Southernovou hybridizací. Značená sonda ³²P dCTP, použitá k Southernově analýze, je 137 bp TaqI fragment, který je lokalizován mezi místy, kam se vážou primery (obr. 10). Po autoradiografii hybridizovaného filtru může být pozorován proužek, odpovídající délce 200 bp. Tato amplifikace pouhých 10 BHV-1 genomů (přibl. 1,5 x 10⁻¹⁵ µg DNA) vede k dostatečně detekovatelnému signálu (výsledek není ukázán). Srovnatelným způsobem byla vyvinuta metoda PCR, používající primery, které jsou založeny na kódující sekvenci glykoproteinu gIII viru BHV-1 (D. R. Fitzpatrick, L. A. Babiuk a T. Zamb, 1989, *Virology* 173, 46-57). Aby bylo možné rozlišit mezi DNA divokého typu BHV-1 a gE deleční mutantní vakcínou, oba DNA vzorky byly podrobeny oběma PCR analýzám - specifické pro gE a specifické pro gIII. V takovém testu byl nalezen izolát DNA Difivac-1 gIII pozitivní a gE negativní.

Protože detekce DNA viru BHV-1 v býčím semenu bude důležitým využitím BHV-1 specifické PCR procedury, byla pokusně provedena PCR, specifická pro gE, na býčím semenu, infikovaném BHV-1. Avšak neznámé komponenty v semenu mají silný inhibiční účinek na polymerázovou řetězovou reakci. Proto byl vyvinut protokol k izolaci DNA BHV-1 z býčího semene. K izolaci DNA z býčího semene je 30 µl semene inkubováno s 1 mg/ml proteinázy K (pK) v celkovém objemu 300 µl 0,15M NaCl, 0,5% Na-Sarkosylu a 40 mM DTT při 60 °C. Po 1 hodině je vzorek ochlazen na pokojovou teplotu a je přidáno 300 µl 6M NaI a inkubuje se 5 min. Z této směsi je DNA izolována standardní chloroform/isoamylalkoholovou extrakcí a precipitována jedním objemem isopropanolu. Precipitát je omyt 2,5 M NH₄Ac/70% ethanolem a resuspendován v 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 80 a 0,1 mg/ml pK pro druhou inkubaci jednu hodinu při 60 °C. Tento izolát DNA může být přímo podroben polymerázové řetězové reakci.

Průmyslová využitelnost

Vynález se týká souboru vakcín BHV-1, buď živých nebo inaktivovaných, kterým je společné to, že postrádají buď celý nebo část genu pro glykoprotein gE. Tento soubor obsahuje jak přirozerý gE deleční mutant, tak vytvořené gE deleční mutanty, které mohou ale nemusejí obsahovat delecii v genu pro thymidinkinázu a/nebo genu pro glykoprotein gI, a vytvořené gE deleční mutanty, které jsou užity jako vektory pro heterologní geny. Vynález se dále týká nukleotidových sekvencí, kódujících gen pro glykoprotein gE viru BHV-1, oligonukleotidů, odvozených z těchto sekvencí, samotného glykoproteinu gE, peptidů, které jsou z něho odvozeny a (monoklonálních nebo polyklonálních) protilátek, které jsou namířeny proti glykoproteinu gE a z něho odvozeným peptidům. Vynález se dále týká komplexů glykoproteinů gE a gI viru BHV-1 a protilátek, namířených proti takovým komplexům.

Tyto materiály mohou být podle vynálezu použity pro:

1) očkování dobytka proti nemocem, způsobeným BHV-1, a to tak, že mohou být odlišena zvířata; infikovaná BHV-1 od očkovaných zvířat, konvenční a zkonstruovaná vakcína mohou být
5 užity vedle sebe;

2) očkování dobytka jak proti nemocem, způsobeným BHV-1, tak nemocem, způsobeným jinými patogeny, jejichž sekvence, kódující ochranné antigeny, mohou být vloženy do delečních mutantů BHV-1;

3) testování krve, séra, mléka, nebo jiných tělesných tekutin z dobytka sérologicky nebo technikami detekce nukleových kyselin (např. PCR), zda jsou infikovány divokým typem BHV-1, nebo jsou očkovány gE delečním mutantem.

Popis výkresů

Obrázek 1

Analýza dle Southerna (Southern blot) virových BHV-1 kmenů Difivac-1 a Iowa

A. Kresba autoradiogramu Southernova blotu genomické DNA viru Difivac-1 a Iowa. V řadách 1 a 3 byla použita DNA Difivac-1 po štěpení restrikčním enzymem HindIII a PstI. V řadách 2 a 4
25 byla použita DNA Iowa po štěpení restrikčním enzymem HindIII a PstI. Velikost fragmentů je udána v kilobázích (kb).

Virová DNA byla izolována centrifugací tkáňového média (70 ml/kultivační láhev přibl. 450 cm²) s virem infikovanými Ebtr buňkami po 2 hodiny na 25% (w/w) sacharózovém gradientu, v 10mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl a 1mM EDTA v 20 krpm v rotoru Beckman SW27 ultracentrifugy L5-65. Z takto získané virové pelety byla izolována DNA dle standardních metod (J. Sambrook, E. F. Fritsch a T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Tato DNA byla štěpena restrikčními enzymy od Boehringer Mannheim v SuRE/cut pufrech, dodanými výrobcem.

Po separaci v 0,7% agarózovém gelu při horizontální elektroforéze a přenesení na nitrocelulózový filtr (Schleicher & Schuell, Inc.) byl filtr prehybridizován 6 hodin při 42 °C v 50% formamidu, 3x SSC (1x SSC = 0,15 M NaCl a 0,015 M Na citrát, pH 7,4) , 50 µl denaturované salmon sperm DNA (Sigma)/ml a 0,02% bovinní sérový albumin, 0,02% polyvinyl pyrrolidon a 0,02% ficoll a 0,1% Na dodecylsulfát (SDS). Potom byla provedena hybridizace přidáním ³²P dCTP (Amersham) značeným HindIII K fragmentem do téhož roztoku. (Výběr HindIII K fragmentu je založen na: Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain), John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. Vanort, Alphonso R. Campbell and David A Reed, Journal of Virology (1983) 259-264). Po 12-14 hodinách hybridizace byl filtr
45 promyt po 2 hodiny v 0,1% SDS a 0,1 x SSC při 60 °C. HindIII K fragment byl klonován ve vektoru pUC18 podle standardních klonovacích procedur (J. Sambrook, E. F. Fritsch a T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Po HindIII štěpení pUC/8, 4 HindIII K klonu byl separován vektor pUC18 od 8,4 kb HindIII K fragmentu znovu elektroforeticky v 0,7% agarózovém gelu s nízkým (low melting) bodem tání (BRL, Life Technologies. Inc.) a izolován z agarózy standardní fenolovou extrakcí a ethanolovou precipitací. Izolovaný HindIII K fragment byl naznačen pomocí kitu Random Primed DNA Labelling Kit 1004.760 od Boehringer Mannheim. Autoradiografie

hybridizovaných filtrů byla prováděna během 36-hodinové expozice Kodak XAR filmu v -70 °C, s použitím odrážející clony.

- 5 B. Fyzikální mapa 8,4 kb velkého HindIII K fragmentu z Iowa a 7,4 kb Hind III fragmentu z Difivac-1. Vzhledem ke komigraci 6 kb PstI fragmentů a nepřítomnosti 1,8 kb PstI fragmentu v Difivac-1 lze předpokládat delecii ve šrafované oblasti.

Obrázek 2

10

Subklonování fragmentů BHV-1 divokého v oblasti chybějící v Difivac-1

- 15 V A jsou ukázány části genomu BHV-1: unikátní dlouhá (U_L) oblast; unikátní krátká (U_S) oblast a dvě opakované oblasti (repeats Ir a Tr). Tato mapa je založena na publikované analýze kmene Cooper (John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. Vanoort, Alphonso R. Campbell a David A. Reed, Journal of Virology (1983) 259-264).

- 20 V B jsou ukázány fragmenty z U_S oblasti, které byly klonovány v prokaryotických vektorech: A 15,2 kb EcoRI fragment v pACYC, 8,4 kb Hind III fragment v pUC18 a 2,7 kb a 4,1 kb EcoRI-HindIII fragment v pBR322. Izolace fragmentů virové DNA byla provedena postupy, které jsou zmiňovány v legendách obrázku 1A. Klonování těchto fragmentů v různých vektorech bylo provedeno podle standardních procedur (J. Sambrook, E. F. Fritsch a T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York).

25

V C je ukázána fyzikální mapa oblasti, kde je lokalizována předpokládaná delece v Difivac-1.

- 30 V D jsou vyznačeny některé subklony této oblasti, které byly použity pro další analýzy. Dva PstI fragmenty byly klonovány v pKUN19 a zbývající fragmenty v pUC18.

Obrázek 3

- 35 A: Nukleotidová sekvence 2027 nukleotidů z U_S oblasti BHV-1 kmene Lam v okolí předpokládaného místa, které bylo deletováno v Difivac-1, jak je vyznačeno na obr. 2C (z AluI místa extrémně nalevo k HincII místu extrémně napravo). Nukleotidová sekvence inzertů subklonů, zobrazená na obr. 2D, byla určena analýzou obou vláken dideoxy-sekvenační metodou Sangera et al. (F. Sanger, S. Nicklen a A. R. Coulson, 1977, proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). K tomu byl použit sekvenační kit T7 od Pharmacia a postup podle výrobce. K radioaktivnímu značení byl použit [35 S] dATP (Amersham). Sekvenční analýza oblastí bohatých na GC s kompresními artefakty byla opakována s 7-deaza-dGTP variantou sekvenačního kitu Pharmacia. Pod nukleotidovou sekvencí je vyznačena v třípísmenném kódu sekvence aminokyselin (aa) otevřeného čtecího rámce 575 aa reziduí, která byla nalezena po teoretické translaci nukleotidové sekvence. Tato translace je založena na univerzálním kódu a byla
- 45 provedena počítačovým programem PC/gene (PC/gene verze 1.03, listopad 1987). Tento otevřený čtecí rámec 575 aa začíná methioninem v nt 168 a končí stopkodónem v nukleotidu 1983.

- 50 Strukturální analýza otevřeného čtecího rámce 575 aa reziduí byla také provedena počítačovým programem PC/gene. Prvních 26 aa tvoří eukaryotický exportní signál, označený na obrázku jako "signální peptid". Se skórem 6,2 lze předpovědět štěpění této signální sekvence mezi aa 26 a aa27. Sekvence 575 aa má 3 možná N-glykosylační místa (NXT/S), vyznačená linií pod aminokyselinovými reziduy. Podle metody dle Raa a Argose je mezi aa 423 a aa 450 transmembránová oblast, označená na obrázku "transmembránová šroubovice". Rozpoznávací sekvence pro

restrikční enzymy *AsuII*, *Sma* I, *HindIII* a *EcoNI* jsou podtrženy. Vypočtená molekulární hmotnost tohoto polypeptidu je 61212.

5 B: Schématické znázornění strukturálních charakteristik výše zmíněného otevřeného čtecího rámce dlouhého, 575 aa.

Obrázek 4

10 Srovnání sekvence aminokyselin genu gE viru BHV-1 se sekvencí aminokyselin genu gE viru herpes simplex (HSV) a s ostatními homologními geny gE [gI viru pseudorabies (PRV) a gPI viru varicella-zoster (VZV)]

15 Sekvence, použité k tomuto srovnání, pocházejí z následujících publikací: HSV: Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplexvirus type 1. D. J. McGeoch, A. Dolan, S. Donald a F. J. Rixon (1985) *Journal Mol. Biol.* 181, 1-13. VZV: DNA sequence of the Us component of the varicella-zoster virus genome. A. J. Davidson (1983), *EMBO Journal* 2, 2203-2209. PRV: Use of lambda-gt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simplex virus and varicella-zoster virus glycoproteins. E. A. Petrovskis, J. G. Timmins a L. E. Post (1986) *Journal of Virology* 60, 185-193. Tyto sekvence byly srovnány použitím programu Multalin pro sekvenční analýzu (F. Corpet, 1988, *Nucl. Acids Res.* 16, 10881-10890).

25 V diagramu A jsou schématicky znázorněny všechny čtyři sekvence aminokyselin. Zde jsou pod každou sekvencí vyznačeny předpokládané transmembránové části (TM). Kromě předpokládaných exportních signálních sekvencí (SP) s možnými N-glykosylačními místy (I) jsou ukázány dvě konzervativní oblasti, ve kterých je často stabilní relativní pozice cysteinových reziduí (C C C).

30 V B jsou ukázány výsledky srovnání oblastí, bohatých na centrálně lokalizovaný cystein, čtyř verzí gE, získané programem Multalin. Hvězdičky označují identické aminokyseliny a dvojtečky analogní aminokyseliny.

35 Obrázek 5

Kresba fotografií, získaných analýzou kmenů Difivac-1 a Iowa dle Southerna

40 Panel A: Genomická DNA z viru Difivac-1 a Iowa, štěpená restrikčními enzymy *BstI* (1, 2), *EcoRI* (3, 4) a *HindIII* (5, 6) separovaná na 0,7% agarózovém gelu, přenesená na nitrocelulózu a hybridizovaná s ³²P značeným *HindIII*

K fragmentem BHV-1 kmene Lam podle postupů, specifikovaných v legendách obrázku 1A.

45 Panel B: Nitrocelulóзовý blot téhož gelu jako v A, hybridizovaný s BHV-1 gE-specifickou sondou p318. Tato sonda obsahuje celou *AluI-HincII* oblast, vyznačenou na obr. 2C.

Obrázek 6

50 Konstrukce gE delečního fragmentu BHV-1

V A jsou ukázány pozice genu gE a použitých klonů. Součástí genomu BHV-1 jsou: unikátní dlouhá (*U_L*) oblast; unikátní krátká (*U_S*) oblast a dva repeaty (*IR* a *TR*). Aby se získala oblast,

lokalizovaná na 5' straně genu gE, byl v místech SmaI a PstI plazmidu pUC18 subklonován 1,4 kb PstI-SmaI fragment z 8,4 kb HindIII K fragmentu z BHV-1 kmene Lam. Tento klon byl nazván p515 a je ukázán v B. V unikátním AsuII místě p515 byl klonován EcoNI-SmaI fragment, lokalizovaný na 3' straně gE, pocházející z 4,1 kb HindIII-EcoRI klonu. Aby bylo možné připojit zbytek EcoNI ke zbytku AsuII, byl klon p515 štěpen s AsuII, ošetřen Klenow enzymem (Boehringer Mannheim) a dCTP za účelem získání jednoho cytosinového rezidua v AsuII zbytku podle standardních metod (Sambrook et al., 1989). Tento přídatný cytosin je označen hvězdičkou v D. Pak byl také štěpen p515 enzymem SmaI, aby mohl být vnesen EcoNI fragment do tohoto vektoru. Takto vytvořený klon byl nazván p519.

Obrázek 7

A. Kresba fotografie, získané analýzou Southernova blotu izolátů DNA z 1B7, 1B8 a 2H10. DNA izolace, štěpení restrikčními enzymy, blotování a hybridizace byly provedeny podle procedur, popsanych v legendách obr. 1A. Po PstI-DraI dvojitým štěpením izolátů DNA 1B7, 1B8 a 2H10 byly fragmenty separovány na 0,7% agarózovém gelu a následně přeneseny na nitrocelulózový filtr. Tento filtr byl hybridizován s ³²P dCTP značeným 2,3 kb PstI-DraI delečním fragmentem jako sondou. V liniích 1 až 3 byly separovány vzorky 1B7, 1B8 a 2H10. V linii 4 byla použita DNA divokého typu BHV-1 kmene Lam a v linii 5 deleční fragment 2,3 kb.

B. Fyzická mapa 15,2 kb EcoRI fragmentu BHV-1 kmene Lam. Mapa ukazuje pozici PstI, DraI a HindIII rozpoznávacích míst a pozici hybridizační sondy, zmíněné v 7A.

Obrázek 8

Prokaryotická exprese gE viru BHV-1

K prokaryotické expresi gE viru BHV-1 byl fúzován 600 bp SmaI fragment genu gE ve třech čtecích rámcích ke kódující oblasti genu pro glutathion-S-transferázu ze Schistosoma japonicum ve vektoru pGEX-2T (D. B. Smith a K. S. Johnson, Gene 67 (1988) 31-40). Rekombinantní molekuly s vhodnou (syn) orientací SmaI fragmentu byly identifikovány pomocí restrikční analýzy užitím standardních metod. E. coli DH5α klony s tímto fúzovaným konstruktem byly nazvány pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 a pGEX-2T600s3.

A. Diagram jednoho z pGEX-2T600s konstruktů. Na NH₂ straně oblasti, která kóduje GST-gE fúzovaný produkt, je lokalizovaná oblast pro tac promotor, indukovatelný isopropylthio-galaktosidem (IPTG).

B. Kresba fotografií, získaných analýzou Western blotu celkových proteinových izolátů buněk DH5α transformovaných pGEX-2T600s. Celonoční kultury buněk DH5α transfekovaných pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 a pGEX-2T600s3 pokračovaly v 1/10 Luria-Bertani (LB) médiu s 50 µg/ml ampicilinem a po 1 hodině byl růst indukován IPTG po 5 hodin. Tyto indukované kultury byly centrifugovány 5 min, v 6 000xg a sloučeny s 1x vrstvicí směsí (2% SDS, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol a 0,01% bromophenol blue) [1,5 ml kultury se sloučí s 500 µl směsí] a zahřáty při 95 °C 5 minut. Pak bylo separováno 50 µl na jednu dráhu na vertikálním 12,5% polyakrylamidovém gelu podle standardních procedur a následně přeneseno (Semi-dry blotted) na nitrocelulózový filtr za použití systému LKB-multiphor II Nova Blot dle podmínek, stanovených výrobcem.

V dráhách M byl použit předem nabarvený markerový protein (BRL Life Technologies, Inc. 236k, 112k, 71k, 44k, 28k, 18k a 15k) a v dráhách 1, 2 a 3 celkové proteinové izoláty z buněk

DH5 α transfekovaných konstrukty se třemi odpovídajícími rámci: pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 a pGEX-2T600s3.

Na panelu A je vidět výsledek analýzy Western blotu s anti-GST sérem. K tomu byl filtr inkubován podle standardních procedur (E. Harlow a D. Lane, 1988, Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) v blokujícím pufru (PBS + 2% sušené mléko a 0,05% Tween 20) a následně s polyklonálním anti-GST králičím sérem. Pak byl filtr promyt a inkubován se sérem obsahujícím kozí protikráličí imunoglobulin, konjugovaný s křenovou peroxidázou (HRPO). Potom byly chromogenem (diaminobenzidin, chloronaphtol a H₂O₂) imunochemicky detekovány navázané kozí protilátky. GST fúzovaný produkt, který je označen šipkou, má předpokládanou velikost přibližně 47 k pouze v rámci 3.

Na panelu B je vidět výsledek analýzy Western blotování s monoklonální protilátkou Mab 4, která rozeznává gE protein. K tomu byl blokován dvojitý filtr jako v panelu A, inkubován s Mab, promyt a inkubován s HRPO konjugovaným králičím protimýším sérem. Pak byly navázané králičí protilátky imunochemicky detekovány chromogenem. Pruhy, který je viditelný v řadě 3 (rámec 3), je 47k veliký a je označen šipkou.

Obrázek 9

Konstrukce plazmidu pEVHisG pro eukaryotickou expresi genu gE viru BHV-1

Pro eukaryotickou expresi genu gE byla klonována celá gE kódující oblast ve správné orientaci za HCMV promotorovou oblast expresního vektoru pEVHis použitím standardních procedur (Sambrook et al. 1989). K tomu byl klonován 394 bp AluI fragment, začínající 55 bp před otevřeným čtecím rámcem gE v pUC18, a nazván p201. Pak po naštěpení p201 enzymem HincII byl do p201 klonován 1740 bp HincII fragment, který zahrnuje větší část genu gE. To vedlo k plazmidu p318, který v polylinkeru pUC18 obsahuje celou gE kódující oblast od AluI místa 55 bp před počátečním kodónem gE do HincII místa 133 bp za stop-kodónem gE. Užitím restričních míst v polylinkeru vektoru byl tento fragment vyštěpnut z p318 enzymy BamHI a SphI. Nejdříve byl p318 štěpen SphI a pak bylo SphI místo vyplněno za použití Klenowovy polymerázy a dNTP. Po štěpení BamHI byl 1,9 kb inzert separován z vektoru pUC18 v agaróze s nízkým bodem tání a ligován do vektoru pEVHis, který byl k tomu naštěpen BamHI a EcoRV. Takto vytvořený plazmid byl nazván pEVHis/gE.

Obrázek 10

Poloha gE-specifických primerů a sondy pro metodu PCR pro detekci DNA viru BHV-1

Na obrázku je ukázána sekvence nukleové kyseliny glykoproteinu gE viru BHV-1 od nukleotidu 1272 do 2027 (sekvence byla převzata z Obr. 3). Použité primery pro gE-specifickou techniku PCR byly nazvány P₃ a P₄. Místa, vázající primery P₃ a P₄, jsou podtržena. Nukleotidová sekvence P₃ je 5'-ACG-TGG-TGG-TGC-CAG-TTA-GC-3' (SEQ ID NO:2). Nukleotidová sekvence P₄ je (komplementární k sekvenci vázající primer určené výše) 5'-ACC-AAA-CTT-TGA-ACC-CAG-AGC-G-3' (SEQ ID NO:3). Sonda, která byla použita k hybridizaci Southernova blotu pro detekci DNA amplifikované v PCR, je 137 bp TaqI fragment, lokalizovaný mezi místy, vázajícími primery, konce tohoto fragmentu jsou označeny. Ke srovnání s obr. 3 jsou také označena místa HindIII a EcoNI.

Obrázek 11

Mapování gE delece ve viru Difivac-1

- 5 A ukazuje fyzikální mapu 15,5 kb EcoRI fragmentu divokého typu BHV-1 kmene Lam. B ukazuje fyzikální mapu 14,5 kb EcoRI fragmentu Difivac-1. Oba EcoRI fragmenty pokrývají kompletně unikátní krátké oblasti genomů příslušných virů. Pozice genu gE a předpokládaná pozice genu gI byly označeny otevřenými rámečky. Mapy A a B jsou umístěny tak, že 6 kb PstI fragmenty v každé mapě se překrývají. V obou mapách vnitřní (internal repeat) a koncové opakované sekvence (terminal repeat) byly označeny šrafovanými rámečky. Šipky pod opakovanými sekvencemi označují orientaci těchto sekvencí.

V A je označena část U_s oblasti, která chybí v kmeni Difivac-1.

- 15 C ukazuje pozici klonovaných fragmentů Difivac-1, použitých k mapování delece gE a k získání fyzikální mapy, ukázané v B. Šipky pod inzerty klonů p728, p737 a p754 označují oblasti, které byly sekvenovány k určení rekombinačního místa.

Zkratky:

- 20 A = AluI, E = EcoRI, P = PstI, H = HindIII, r = místo rekombinace, IR = vnitřní opakované sekvence, TR = koncové opakované sekvence.

25 Obrázek 12

Určení přesného místa rekombinace v oblasti U_s viru Difivac-1

- 30 K určení přesných hranic gE delece, nalezené v kmeni Difivac-1, byly sekvenovány klon p754 a konce klonů p728 a p737. Inzerty těchto klonů byly označeny na obrázku 11. Použité sekvenační procedury byly popsány v legendách obrázku 3.

- 35 V A je ukázána sekvence většiny AluI-PstI fragmentu. Tato sekvence začíná v oblasti promotoru genu gE. Předpokládaný TATA rámeček je potvrzen. V bodu r (=místo rekombinace) je tato promotorová oblast fúzovaná se sekvencí také nalezenou na protějším místě oblasti U_s, nazvanou invertovaná opakovaná sekvence (repetice). Přesné místo rekombinace bylo určeno srovnáním opakované sekvence, nalezené v gE promotorové oblasti, s kopií opakované sekvence, nalezené na protějším místě oblasti U_s. Bod, kde se tyto sekvence rozcházejí, je označen v B (pod 1) 'r'. Podobné srovnání bylo provedeno s gE promotorovou sekvencí, nalezenou v Difivac-1, a gE promotorem, nalezeným v divokém typu kmene Lam. Bod, kde se tyto sekvence rozcházejí, je ukázán v B (pod II) a také označen 'r'. Nalezená rekombinační místa jsou totožná.

Obrázek 13

- 45 Částečná sekvenční analýza genu gI BHV-1

- 50 Použitím 1,8 kb PstI klonu BHV-1 kmene Lam, který zasahuje do obou genů gE a gI viru BHV-1 (viz obr. 11), byla určena sekvence 284 nukleotidů v kódující oblasti BHV-1 gI. Použité sekvenační procedury byly popsány v legendách obrázku 3. Sekvence byla přeložena univerzálním kódem počítačovým programem PC/gene, verze 1.03 (listopad 1987). Sekvence aminokyselin, zakódovaná druhým čtecím rámcem, je uvedena v jednopísmenném kódu pod nukleotidovou sekvencí. Tato aminokyselinová sekvence je homologní ke kódující oblasti jiných

homologů gI virů herpes (viz obr. 14).

Obrázek 14

5

Srovnání částečné aminokyselinové sekvence předpokládaného genu gI viru BHV-1 s odpovídajícími částmi kódujících oblastí genu gI viru herpes simplex (HSV1), genu gp63 viru pseudorabie (PRV) a genu gpIV viru varicella-zoster (VZV).

10

Sekvence PRV začíná v aminokyselině 82, HSV1 sekvence začíná v aa 80 a sekvence VZV začíná v aa 76 příslušných kódujících oblastí. Užití sekvence byly publikovány v člancích, zmíněných v legendách obrázku 4. Srovnání bylo provedeno použitím počítačového programu Multalin. Hvězdičky označují identické aminokyseliny a dvojtečky označují analogické aminokyseliny.

15

Obrázek 15

Konstrukce plazmidu MSVneoGI pro eukaryotickou expresi genu gI viru BHV-1

20

Na základě srovnání aminokyselin částečné sekvence genu gI BHV-1, byla určena předpokládaná poloha genu gI. Z tohoto určení lze usuzovat, že 1,7 kb SmaI fragment by mohl obsahovat kompletní kódující oblast genu gE BHV-1. Pozice tohoto 1,7 kb SmaI fragmentu je označena v A. K tupým koncům tohoto 1,7 kb SmaI fragmentu byly užitím standardních procedur ligovány BamHI linkery. Výsledný produkt byl štěpen BamHI a ligován do eukaryotického expresního vektoru MSV-neo. MSV-neo vektor má unikátní BamHI místo za MSV-LTR, které má silnou promotorovou aktivitu. Tento vektor byl popsán v práci Rijsewijk et al., 1987 EMBO J. 6, 127-131.

30

Obrázek 16

Konstrukce gI/gE dvojitého delečního fragmentu BHV-1

35

Poloha glykoproteinového genu gE a předpokládaná poloha glykoproteinového genu gI v U_s oblasti BHV-1 jsou zobrazeny v diagramu A. Šrafované bloky označují opakované sekvence, které ohraničují U_s oblast. B ukazuje fyzikální mapu míst některých hlavních restričních enzymů se zřetelem na pozici obou genů. Ke konstrukci gI/gE delečního fragmentu je klon p1,7-SmaI/o, obsahující 1,7 kb SmaI fragment, který zahrnuje gen gI, štěpen PstI. PstI místo zbývajícího 350 bp SmaI-PstI inzertu bude vytvořeno s tupými konci užitím standardních molekulárně biologických procedur. EcoNI-SmaI fragment (viz obr. 6B), izolovaný z 4,1 kb HindIII-EcoRI fragmentu, popsaného, na obrázku 6A, je také vytvořen s tupými konci a ligován k modifikovanému PstI místu. Toto je znázorněno v C a D. Z výsledného klonu p-delta-IE může být izolován 1,4 kb SmaI-DraI fragment k rekombinaci s DNA divokého typu BHV-1.

45

Zkratky:

E = EcoRI, H = HindIII, S = SmaI, P = PstI, ENI = EcoNI, D = DraI, kb = kilobáze, U_s = unikátní krátká sekvence.

50

Obrázek 17

Průměrné nazální vylučování viru telaty po očkování: • = očkovaná Difivac-1, 0 = neočkovaná kontrola.

5

Obrázek 18

Průměrný denní klinický stav telat po testu (challenge) virulentním kmenem BHV-1, klíč jako na obr. 17.

10

Obrázek 19

Průměrná rektální teplota telat, testovaných virulentním kmenem BHV-1, klíč jako na obr. 17.

15

Obrázek 20

Průměrný růst telat po testu virulentním kmenem BHV-1, klíč jako na obr. 17.

20

Obrázek 21

Průměrné nazální vylučování viru telaty po testu virulentním kmenem BHV-1, klíč jako na obr. 17.

25

Obrázek 22

Průměrná rektální teplota telat po testu virulentním kmenem BHV-1,

30

• = očkovaný Lam gE⁻, o = očkovaný Lam gE⁻/TK⁻, x = neočkovaná kontrola.

35

Obrázek 23

Průměrný růst telat po testu virulentním kmenem BHV-1, klíč jako na obr. 22.

40

Obrázek 24

Průměrný denní klinický stav telat po testu virulentním kmenem BHV-1, klíč jako na obr. 22.

45

Tabulka 1

Nazální vylučování viru telaty po očkování Lam gE⁻ nebo Lam gE⁻/TK⁻a po testu virulentním BHV-1 kmenem těchto očkovaných a kontrolních telat

Skupina	Průměrný počet dní nazálního vylučování viru	
	Po očkování	Po testu
Kontrola	0	10,33 ± 1,51
Lam gE ⁻	7,00 ± 0,89	4,83 ± 1,17
Lam gE ⁻ /TK ⁻	7,17 ± 1,33	5,17 ± 0,98

Tabulka 2

5

Charakteristika gE-Mabs

Mab	REAKTIVITA MOŽNÉ gE-Mab S:							
	Difivac-1 3T3/ EBTR	Lam gE ⁻	Prok.	3T3 gE	3T3 gE Difivac-1	3T3 gE/gI	Ag skupina	Ab dobytek
1	-	-	nd	-	+	?	I	+
2	-	-	-	+	+	+	II	-
3	-	-	+	+	+	+	?	-
4	-	-	+	+	+	+	?	-
42	-	-	nd	-	-	?	V?	±
51	-	-	nd	-	+	+	III	+
52	-	-	+	+	+	+	?	-
53	-	-	nd	-	+	+	III	+
59	-	-	nd	-	-	+	III	+
66	-	-	nd	+	+	+	III	+
67	-	-	nd	-	+	+	III	+
68	-	-	-	+	+	+	IV	+
72	-	-	-	+	+	+	V	±
75	-	-	nd	-	+	?	I	+
78	-	-	nd	-	+	?	nd	-
81	-	-	-	+	+	+	II?	-

+: Všechny 8 testovaných sér dosahuje v nepřímé blokující IPMA víc jak 50 % účinku.

10 ±: Séra dosahují blokující procento ± 50 %.

-: Séra dosahují blokující procento < 50 %.

Výpis sekvence

15

Číslo sekvence (SEQ ID NO:1)

DÉLKA : 2027 nukleotidů, 575 aminokyselin

TYP: nukleotidy a aminokyseliny

TYP VLÁKNA: jednoduché

20

AGGGCGGAGC GTTGAGCGGC CCGACCGCCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGCGGCTC 60

GTGGTTCCAC ACCGCCGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG 120
|----> deletováno v Difivac-1

AsuII																		167	
TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGGTTC <u>GAAAAGGGCA</u> TTTGGCA																			
ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CGG CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG																		215	
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu																			
1 5 10 15																			
5	-----SIGNÁLNÍ PEPTID -----																		
CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC																		263	
Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr																			
20 25 30																			

10	SmaI																		
GAA ACC <u>CCG</u> <u>GGC</u> TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG CGC GCT																		311	
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala																			
35 40 45																			
GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG CGC CCG GAC GTG CGC																		359	
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg																			
50 55 60																			
GCC GTT CGC GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG																		407	
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val																			
15	65 70 75 80																		
CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC																		455	
Pro Glu Pro Val Cys Leu Asp Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala																			
85 90 95																			
CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CCG CTG GCC ATC																		503	
Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile																			
100 105 110																			
20	GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT																		551
Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val																			
115 120 125																			
PvuII																			
CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG <u>CAG</u> <u>CTG</u> GGT CGC AAC GCG ACC GGG																		599	
Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg <u>Asn</u> <u>Ala</u> <u>Thr</u> Gly																			
130 135 140																			
25	GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GGC GTG TAC TTC CTG																		647
Val Leu Ile Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Gly Val Tyr Phe Leu																			
145 150 155 160																			
TAC GAC CGG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAC GAG GAG ACG CAG TTG GCG																		695	
Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Glu Glu Thr Gln Leu Ala																			
165 170 175																			
CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GGC GCG CAG GGC GCC GCG CGG GAC																		743	
Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp																			
30	180 185 190																		

	GAG	GAG	AGG	GAA	CCA	GCG	ACC	GGG	CCC	ACC	CCC	GGC	CCG	CCC	CAC	CAC	791
	Glu	Glu	Arg	Glu	Pro	Ala	Thr	Gly	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	His	
			195					200				205					
	CGC	ACG	ACG	ACA	CGC	GCG	CCC	CCG	CGG	CGG	CAC	GGC	GCG	CGC	TTC	CGC	839
	Arg	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	His	Gly	Ala	Arg	Phe	Arg	
		210					215					220					
5																	
	GTG	CTG	CCG	TAC	CAC	TCC	CAC	GTA	TAC	ACC	CCG	GGC	GAT	TCC	TTT	CTG	887
	Val	Leu	Pro	Tyr	His	Ser	His	Val	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
	CTA	TCG	GTG	CGT	CTG	CAG	TCT	GAG	TTT	TTC	GAC	GAG	GCT	CCC	TTC	TCG	935
	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gln	Ser	Glu	Phe	Phe	Asp	Glu	Ala	Pro	Phe	Ser	
					245					250					255		
10																	
	GCC	AGC	ATC	GAC	TGG	TAC	TTC	CTG	CGG	ACG	GCC	GGC	GAC	TGC	GCG	CTC	983
	Ala	Ser	Ile	Asp	Trp	Tyr	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Cys	Ala	Leu	
				260					265					270			
	ATC	CGC	ATA	TAC	GAG	ACG	TGC	ATC	TTC	CAC	CCC	GAG	GCA	CCG	GCC	TGC	1031
	Ile	Arg	Ile	Tyr	Glu	Thr	Cys	Ile	Phe	His	Pro	Glu	Ala	Pro	Ala	Cys	
			275					280					285				
	CTG	CAC	CCC	GCC	GAC	GCG	CAG	TGC	AGC	TTC	GCG	TCG	CCG	TAC	CGC	TCC	1079
	Leu	His	Pro	Ala	Asp	Ala	Gln	Cys	Ser	Phe	Ala	Ser	Pro	Tyr	Arg	Ser	
		290					295					300					
15																	
	GAG	ACC	GTG	TAC	AGC	CGG	CTG	TAC	GAG	CAG	TGC	CGC	CCG	GAC	CCT	GCC	1127
	Glu	Thr	Val	Tyr	Ser	Arg	Leu	Tyr	Glu	Gln	Cys	Arg	Pro	Asp	Pro	Ala	
	305					310					315					320	
	GGT	CGC	TGG	CCG	CAC	GAG	TGC	GAG	GGC	GCC	GCG	TAC	GCG	GCG	CCC	GTT	1175
	Gly	Arg	Trp	Pro	His	Glu	Cys	Glu	Gly	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Pro	Val	
					325					330					335		
	GCG	CAC	CTG	CGT	CCC	GCC	AAT	AAC	AGC	GTA	GAC	CTG	GTC	TTT	GAC	GAC	1223
	Ala	His	Leu	Arg	Pro	Ala	Asn	Asn	Ser	Val	Asp	Leu	Val	Phe	Asp	Asp	
				340					345					350			
	GCG	CCG	GCT	GCG	GCC	TCC	GG										

	CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG CTG GTG GGC GCG CTT GGA	1463
	Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly	
	420 425 430	
	-----TRANSMEMBRÁNOVÝ HELIX -----	
5	CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG	1511
	Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala	
	435 440 445	

	CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG	1559
	Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly	
	450 455 460	
10	CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG	1607
	Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val	
	465 470 475 480	
	CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT	1655
	Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp	
	485 490 495	
	GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC	1703
	Asp Asp Ser Asp Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala	
	500 505 510	
15	TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC	1751
	Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala	
	515 520 525	
	CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT	1799
	Pro Ala <u>Asn</u> <u>Gly</u> <u>Thr</u> Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe	
	530 535 540	
20	AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA	1847
	Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala	
	545 550 555 560	
	EcoNI	
	CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC <u>CTC</u> <u>CGC</u> <u>TAG</u>	1895
	Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *	
	565 570 575	
25	<u>GCG</u> <u>CCCCCCCC</u> <u>CCCCCCGCGC</u> GCTGTGCCGT CTGACGGAAA GCACCCGCGT GTAGGGCTGC	1955
	ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TGCGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA	2015
	CGCAGCGTCG TC	2027
30	ČÍSLO SEKVENCE (SEQ ID NO: 2)	
	DÉLKA: 20 nukleotidů	
	TYP: nukleotid	
	TYP VLÁKNA: jednoduché	
	ACGTGGTGGT GCCAGTTAGC	20

ČÍSLO SEKVENCE (SEQ ID NO: 3)

DÉLKA: 22 nukleotidů

TYP: nukleotid

TYP VLÁKNA: jednoduché

5

ACCAAAC TTT GAACCCAGAG CG

22

10

PATENTOVÉ NÁROKY

15

1. Mutant bovinního herpesového viru typu 1, BHV-1, uložený v Pasterově institutu ve Francii pod číslem I-1213.

20

2. Způsob přípravy mutantu bovinního herpesového viru typu 1, BHV-1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se deletuje alespoň část glykoproteinového gE-genu, přičemž gE je protein, který, zejména v BHV-1 kmenu, má aminokyselinovou sekvenci podle obrázku 3A.

25

3. Způsob podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že se deletuje gE-gen.

4. Způsob podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že se deletuje gE-gen podle obrázku 3A z pozice asi 168 do asi 1895.

5. Způsob podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že se deletuje gE-gen podle obrázku 3A z pozice asi 168 do asi 1427.

30

6. Způsob přípravy vakcíny, **v y z n a ě n ý t í m**, že se smísí farmaceuticky přijatelný nosič s mutantem bovinního herpesového viru typu 1, BHV-1, získaným způsobem podle některého z nároků 2 až 4.

35

7. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také delecí v genu thymidinkinázy.

8. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 5, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, který má delecí v gI-genu glykoproteinu.

40

9. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že se BHV-1 kmen podrobí postupu, kterým se vytvoří kromě delece v jeho gE-genu glykoproteinu také delece v genu thymidinkinázy a delece v gI-genu.

45

10. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 5, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, který obsahuje heterogenní gen a má delecí v gE-genu glykoproteinu, která umožňuje sérologické odlišení mutantu od divokého typu BHV-1.

50

11. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 10, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, který má heterologní gen vložený do místa gE-genu a který je pod kontrolou regulačních sekvencí, například gE-genu nebo heterologního genu, a popřípadě je připojen k té části gE-genu, která kóduje signální peptid.

12. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 11, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také deleci v genu thymidinkinázy, deleci v gI-genu nebo obě, přičemž heterologní gen je vložen do místa alespoň jedné z těchto delecí.
- 5 13. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 9, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také deleci v genu thymidinkinázy, deleci v gI-genu nebo obě, heterologní gen je vložen do alespoň jedné z těchto delecí, přičemž v případě, že mutant má dvojí deleci, kterou je delece v gE-genu a delece v genu thymidinkinázy, heterologní gen není vložen do genu thymidinkinázy.
- 10 14. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 9, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také deleci v genu thymidinkinázy, deleci v gI-genu nebo obě, heterologní gen je vložen do alespoň jedné z těchto delecí, má dvojitou deleci, kterou je delece v gE-genu a delece v genu thymidinkinázy, heterologní gen neznamená gen bovinního respiračního syncyaliálního viru F nebo N.
- 15 15. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle nároku 10, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, který má kromě delece v gE-genu také deleci v genu thymidinkinázy, deleci v gI-genu nebo obě, heterologní gen je vložen do alespoň jedné z těchto delecí, přičemž
- 20 v případě, že mutant má dvojitou deleci, kterou je delece v gE-genu a delece v genu thymidinkinázy, jsou vloženy alespoň dva heterologní geny.
- 25 16. Způsob přípravy mutantu kmenu BHV-1 podle kteréhokoliv z nároků 10 až 15, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkonstruuje mutant, v němž heterologní gen kóduje imunogenní protein nebo peptid jiného patogenu, nebo kóduje cytokin.
- 30 17. Očkovací prostředek k očkování zvířat, zejména savců, zvláště hovězího dobytka, k jejich ochraně proti BHV-1, **v y z n a ě n ý t í m**, že je živou nebo inaktivovanou vakcínou, obsahující mutant BHV-1, uložený v Pasterově institutu ve Francii pod číslem I-1213, získaný způsobem podle kteréhokoliv z nároků 2 až 16, a vhodný nosič nebo pomocné činidlo.
- 35 18. Očkovací prostředek podle nároku 17 k očkování zvířat, zejména savců, zvláště hovězího dobytka, k jejich ochraně proti patogenu, **v y z n a ě n ý t í m**, že je živou nebo inaktivovanou vakcínou, obsahující mutant BHV-1, získatelný způsobem podle nároku 10, a vhodný nosič nebo pomocné činidlo, přičemž heterologní gen tohoto mutantu kóduje imunogenní protein nebo peptid patogenu.
- 40 19. Diagnostická souprava pro detekci nukleové kyseliny BHV-1 ve vzorku, zejména v biologickém vzorku, jako jsou krev nebo krevní sérum, krevní buňky, mléko, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, sperma, obzvláště semenná kapalina, sliny, sputum nebo tkáň, zejména nervová tkáň, pocházející ze zvířete, zvláště savce, zejména hovězího dobytka, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje sondu nukleové kyseliny nebo primer s nukleotidovou sekvencí, odvozenou od gE-genu viru BHV-1, přičemž tento gE-gen je umístěn v genomu BHV-1 podle obrázku 6, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušky
- 45 nukleové kyseliny.
- 50 20. Diagnostická souprava podle nároku 19 pro detekci protilátek, které jsou specifické pro BHV-1, ve vzorku, zejména biologickém vzorku, jako jsou krev nebo krevní sérum, sliny, sputum, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, mléko nebo tkáň, pocházející ze zvířete, zvláště savce, zejména hovězího dobytka, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje gE viru BHV-1, část gE, peptid odvozený od gE nebo komplex glykoproteinu gE a gI viru BHV-1, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušku protilátky.

21. Diagnostická souprava podle nároku 20, **v y z n a ě n á t í m**, že dále obsahuje jednu nebo více protilátek, které jsou specifické pro gE viru BHV-1 nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1.
- 5 22. Diagnostická souprava podle nároku 20 pro detekci protilátek, které jsou specifické pro BHV-1, ve vzorku, zejména biologickém vzorku, jako jsou krev nebo krevní sérum, sliny, sputum, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, mléko nebo tkáň, zejména nervová tkáň, pocházející ze zvířat, zvláště savců, zejména hovězího dobytka, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje protilátku, která je specifická pro gE viru BHV-1 nebo
10 komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušku protilátky.
23. Diagnostická souprava podle nároku 20 pro detekci proteinu viru BHV-1 ve vzorku, zejména v biologickém vzorku, jako jsou krev nebo krevní sérum, krevní buňky, mléko, tělní
15 kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, sperma, zvláště semenná kapalina, sliny, sputum nebo tkáň, zejména nervová tkáň, pocházející ze zvířete, zvláště savce, zejména hovězího dobytka, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje protilátku, která je specifická pro gE viru BHV-1, nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1, a detekční prostředky, vhodné pro detekční zkoušku proteinu.
20
24. Způsob určení infekce BHV-1 zvířete, zvláště savce, zejména hovězího dobytka, **v y z n a ě n ý t í m**, že se vyšetřuje vzorek, pocházející ze zvířete, zejména biologický vzorek, jako je krev nebo krevní sérum, krevní buňky, sperma, zvláště semenná kapalina, sliny, sputum, tělní kapaliny, jako jsou slzy, kapalina získaná výplachem plic, nosní sekret, mléko nebo
25 tkáň, zejména nervová tkáň, na přítomnost nukleových kyselin, obsahujících gE-gen viru BHV-1, tento gE-gen je umístěn v genomu BHV-1 podle obrázku 6, na přítomnost viru BHV-1 nebo komplexu glykoproteinů gE a gI viru BHV-1, nebo na přítomnost protilátek, které jsou specifické pro gE viru BHV-1, nebo komplex glykoproteinů gE a gI viru BHV-1.
- 30 25. Způsob podle nároku 24, **v y z n a ě n ý t í m**, že se zkoumá vzorek, pocházející ze zvířete, které je očkováno očkovacím prostředkem podle nároku 17.

35

30 výkresů

H P
D I D I

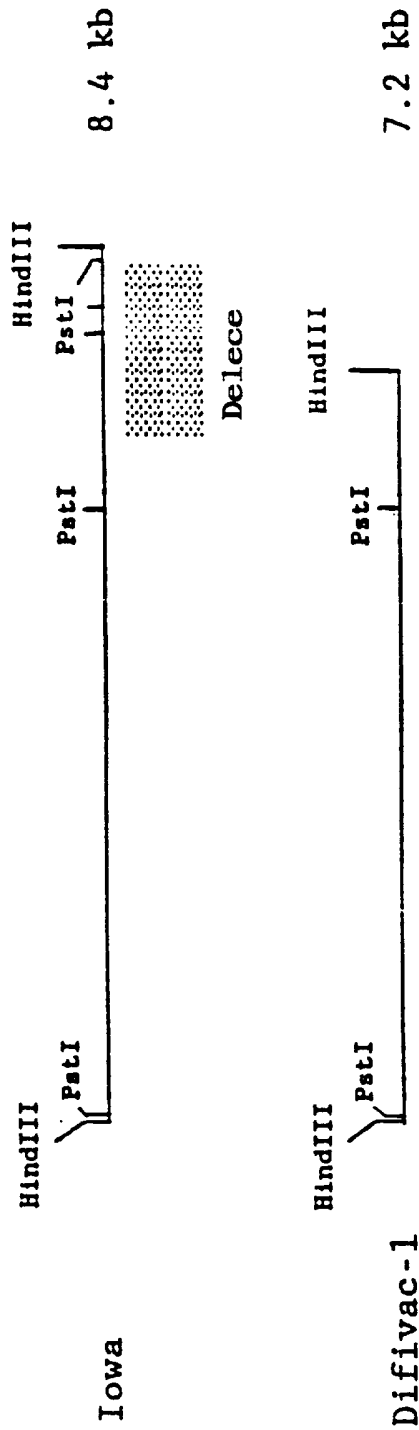
8,4 kb = — — — — 6 kb
7,2 kb = — — — —

—
—

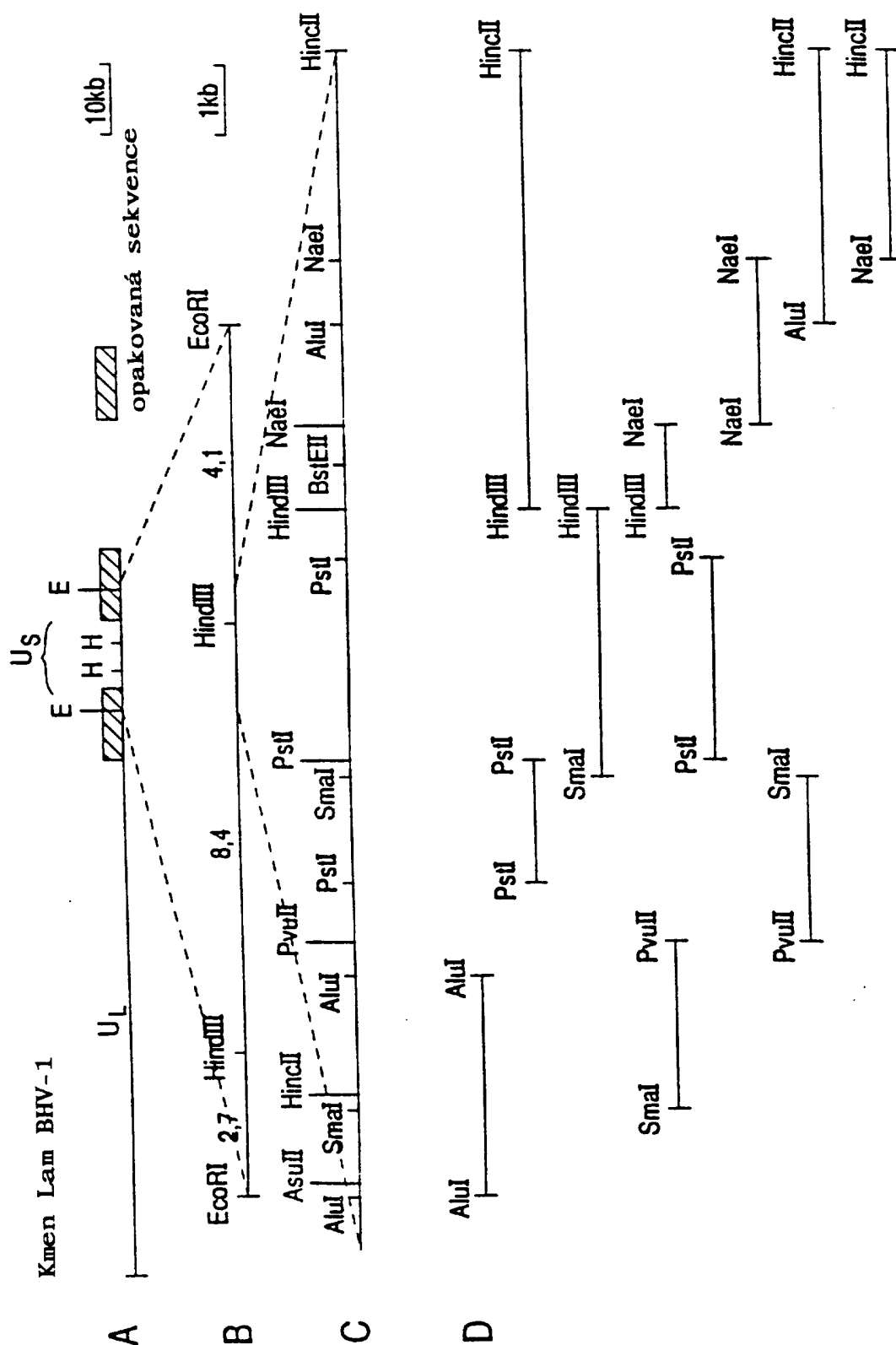
1 2 3 4

OBR. 1A

HindIII K fragment



OBR. 1B



OBR. 2

```

AGGGCGGAGC GTTGAGCGGC CCGACCGCCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGCGGCTC 60
      |-----> deletováno v Difivac-1
GTGGTTCCAC ACCGCCGGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG 120

TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGGTTC GAAAAGGGCA TTTGGCA 167
      AsuII

ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CGG CCG TTG CTG CCG CTG CTG CTG 215
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu
      1      5      10      15
===== SIGNALNÍ PEPTID =====
CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC 263
Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr
      20      25
=====
      SmaI
GAA ACC CCGGGC TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG GCG GCT 311
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala
      35      40      45

GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG CGC CCG GAC GTG CGC 359
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg
      50      55      60

GCC GTT CGC GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG 407
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val
      65      70      75      80

```

OBR. 3A

455 CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC
 Pro Glu Pro Val Cys 85 Leu Asp Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala
 95

503 CTG GAC GCG GCC TGC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CCG CTG GCC ATC
 Leu Asp Ala Ala Cys 100 Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile
 110

551 GCG GAG CTC GCC GAG GCG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT
 Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val
 115 120

599 CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG
 Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asn Ala Thr Gly
 130 135 140

PvuII

647 GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAG GGC GGC GTG TAC TTC CTG
 Val Leu Ile Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Val Tyr Phe Leu
 145 150 155 160

695 TAC GAC CCG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAG GAG GAG ACG CAG TTG GCG
 Tyr Asp Arg Leu Ile 165 Gly Asp Ala Gly Asp Glu Thr Gln Leu Ala
 170 175

743 CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GGC CAG GGC GCC GCG CGG GAC
 Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp
 180 185 190

OBR. 3A

791
 GAG GAG AGG GAA CCA GCG ACC GGG CCC ACC CCC GGC CCG CCG CCC CAC
 Glu Glu Arg Glu Glu Pro Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro Pro His
 195 200 205

 839
 CGC ACG ACG ACA CGC GCG CCC CCG CGG CCG CAC GGC GGC CCG TTC CGC
 Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg
 210 215 220

 887
 GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC ^{SmaI} CCG GGC GAT TCC TTT CTG
 Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu
 225 230 235 240

 935
 CTA TCG GTG CGT CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GCT CCC TTC TCG
 Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser
 245 250 255

 983
 GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CCG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC
 Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu
 260 265 270

 1031
 ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC
 Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys
 275 280 285

 1079
 CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CGC TCC
 Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser
 290 295 300

OBR. 3A

1127
 GAG ACC GTG TAC AGC CGG CTG TAC GAG CAG TGC CGC CCG GAC CCT GCC
 Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala
 305 310 315 320

1175
 GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT
 Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Tyr Ala Pro Val
 325 330 335

1223
 GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC
 Ala His Leu Arg Pro Ala Asn Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp
 340 345 350

1271
 GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC
 Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn
 355 360 365

1319
 HindIII
 GGC CAC GTG GAA GCT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT
 Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Thr Ser Asp Arg
 370 375 380

1367
 TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CGC CCC GAG GCC GCA GCC GCC
 Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala
 385 390 395 400

1415
 GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GGC GCG
 Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala
 405 410 415

OBR. 3A

1463
 CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG GCG GCG CTT GGA
 Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly
 420 425
 ===== TRANSMEMBRÁNOVÝ HELIX =====

1511
 CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCG GTT CGG GTG TGC GCG
 Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala
 435 440 445

1559
 CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG
 Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly
 450 455 460

1607
 CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG
 Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val
 465 470 475 480

1655
 CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT
 Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp
 485 490 495

1703
 GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC
 Asp Asp Ser Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala
 500 505 510

OBR. 3A

TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC 1751
 Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro 520
 515
 CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT 1799
 Pro Ala Asn Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe
 530
 535
 AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA 1847
 Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala
 545
 550
 CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC CGC TAG 1895
 Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *
 565
 570
 GCGCCCCCCC CCCCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGGAA GCACCCGCGT GTAGGGCTGC 1955
 ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TCGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA 2015
 CGCAGCGTCG TC 2027

OBR. 3A

BHV-1 gE



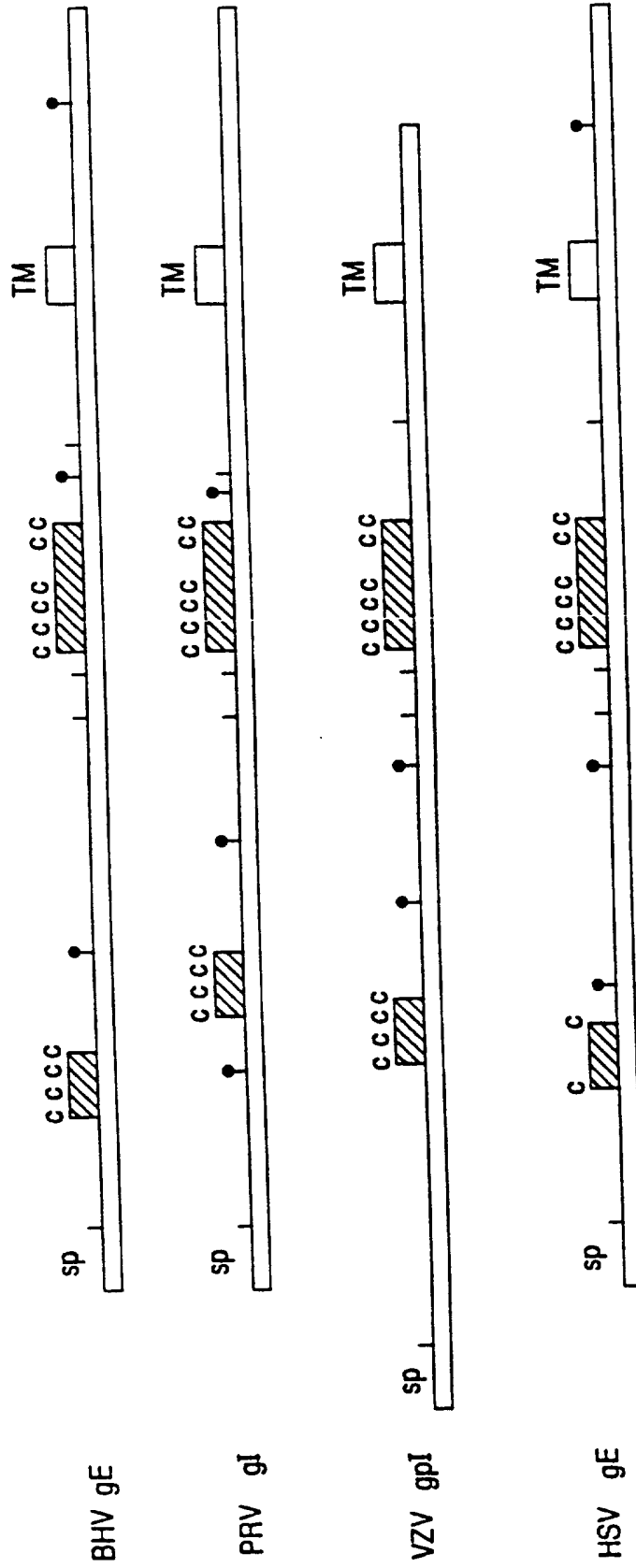
575 aminokyselin

sp - signální peptid 26 zbytků

• - předpokládané N-glykosylační místo

tm - transmembránový helix, zbytky 423-450

OBR. 3B

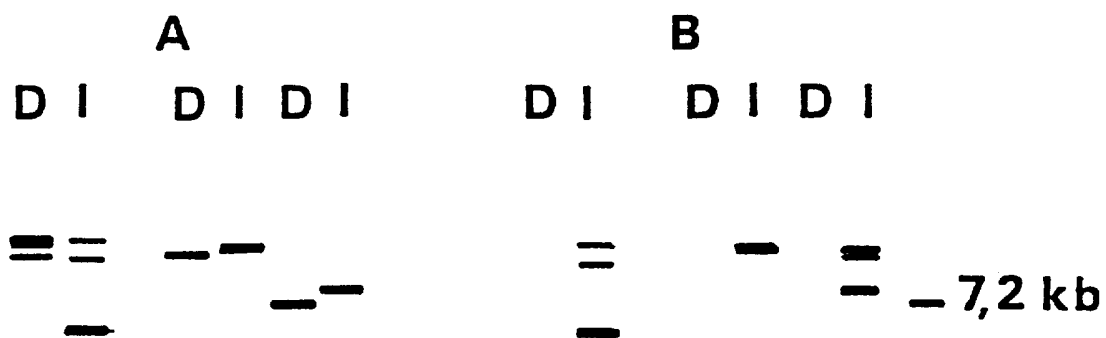


OBR. 4A

symbol comparison table : DAYHOFF.DAT; gap penalty : 8

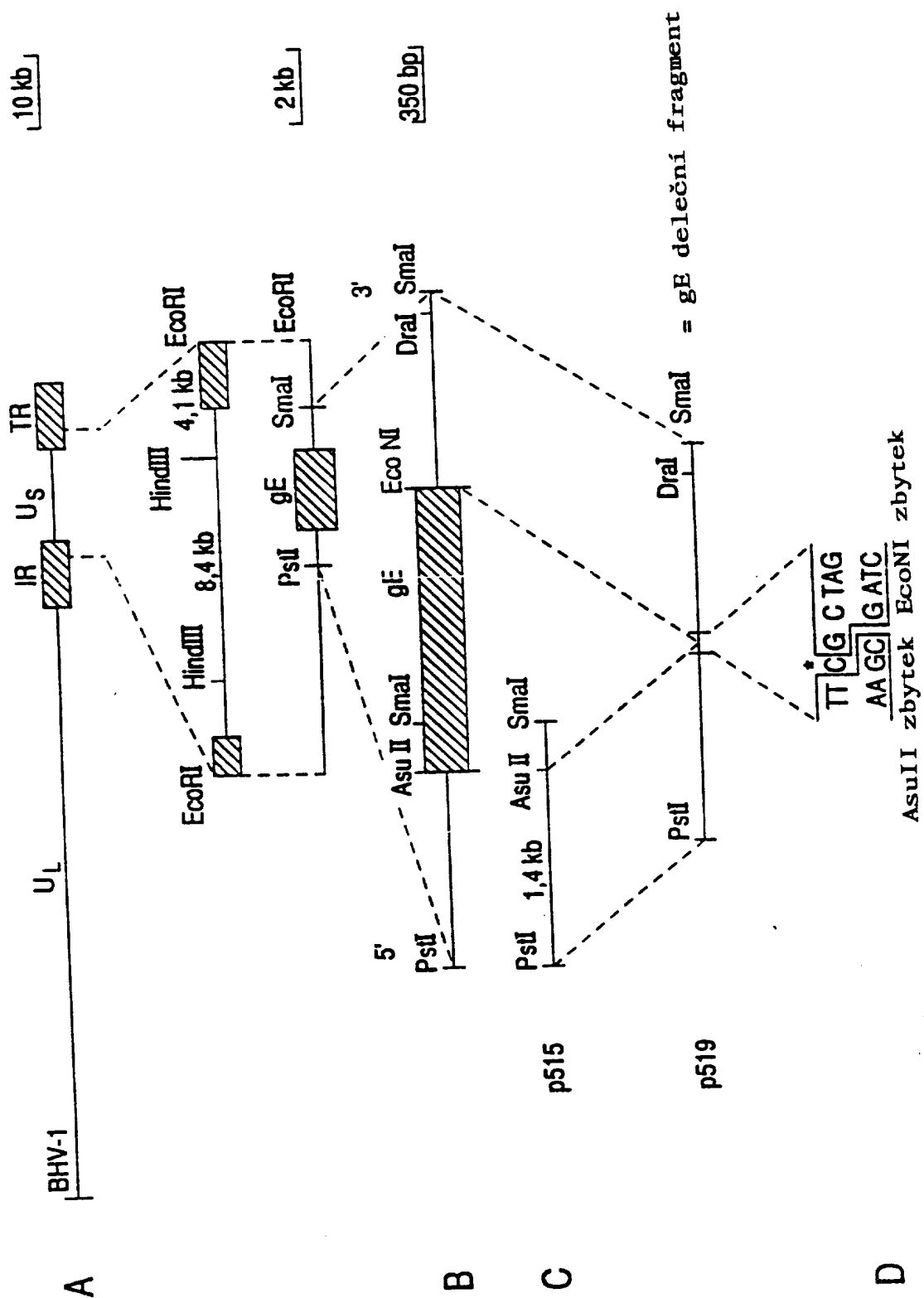
	1	10	20	30	40	50	60
PRV	1	HSQLFSPGDTFDLMPRVVSDMGDSRENTFATLDWYYARAPPRCLLYVVEPCIIYHPRAP					
		:: ** ** :	** ** ** :	** ** ** :	** ** ** :	** ** ** :	** ** ** :
VZV	1	HSVFSVGDTFSLAMHLQYKI.H.EAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAP					
		****: ** * * : **	****: ** * * : **	****: ** * * : **	****: ** * * : **	****: ** * * : **	****: ** * * : **
BHV	1	HSVYTPGDSFLLSVRLQSEFFD.EAPESASIDWYFLRTAGDCALIRIYETCIEFHPEAP					
		:: ** : * * :	:: ** : * * :	:: ** : * * :	:: ** : * * :	:: ** : * * :	:: ** : * * :
HSV	1	EAILFSPGETFSTNVSIHAIAND..DQYSDMDVVWLRFEDVPTSCAEMRIYESCLYHPQLP					
		1 10 20 30 40 50					
		70 80 90 100 110					
PRV	1	ECLRPVDPACSETSPARAALVARRAYASCSPLLGDRWLTACPFDAFGEVH.....					
		:: ** : * **** * ** * *	:: ** : * **** * ** * *	:: ** : * **** * ** * *	:: ** : * **** * ** * *	:: ** : * **** * ** * *	:: ** : * **** * ** * *
VZV	1	QCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVQNC..EHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGT					
		** : **** ** : * * : * * :	** : **** ** : * * : * * :	** : **** ** : * * : * * :	** : **** ** : * * : * * :	** : **** ** : * * : * * :	** : **** ** : * * : * * :
BHV	1	ACLHPADAQCTFASPYSRSETVYSRLYEQCRRDPAGRWPHCEGGAAYAAPVAHLRPANNSV					
		** **** * * :	** **** * * :	** **** * * :	** **** * * :	** **** * * :	** **** * * :
HSV	1	ECLSPADAPC..AASTWTSRLAVRSYAGCSRTNP...PPRCSAEAHMEPVPGLAWQAASV					
		60 70 80 90 100 110					
		120 130 140					
PRV	1	TNATADESGLYVLVMTNHNGHVATWDYTLVAT					
		:	****: * **** ** : *	****: * **** ** : *	****: * **** ** : *	****: * **** ** : *	****: * **** ** : *
VZV	1	TLKEVDTPESLSGLYVFVYFNGHVEAVAYTVVST					
		* * * * ****: * **** * : *	* * * * ****: * **** * : *	* * * * ****: * **** * : *	* * * * ****: * **** * : *	* * * * ****: * **** * : *	* * * * ****: * **** * : *
BHV	1	DLVEDDAPAAASGLYVFLQYNGHVEAWDYSLVVT					
		: * * * ****: * * : *	: * * * ****: * * : *	: * * * ****: * * : *	: * * * ****: * * : *	: * * * ****: * * : *	: * * * ****: * * : *
HSV	1	NLEFRDASPQHSGLYLCVVYVNDHIHAWGHITIST					
		120 130 140 148					

OBR. 4B

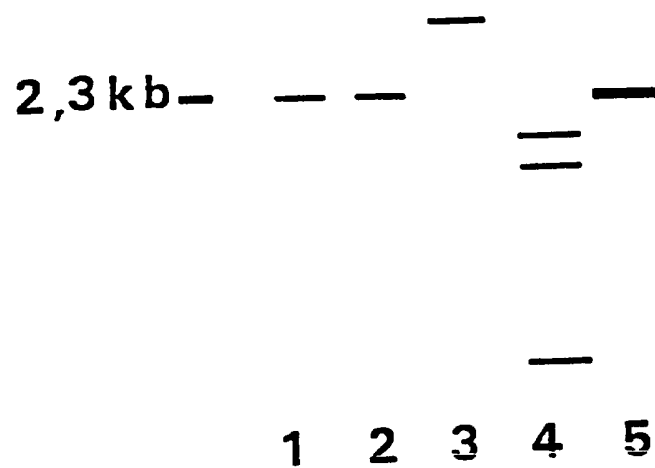


1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6

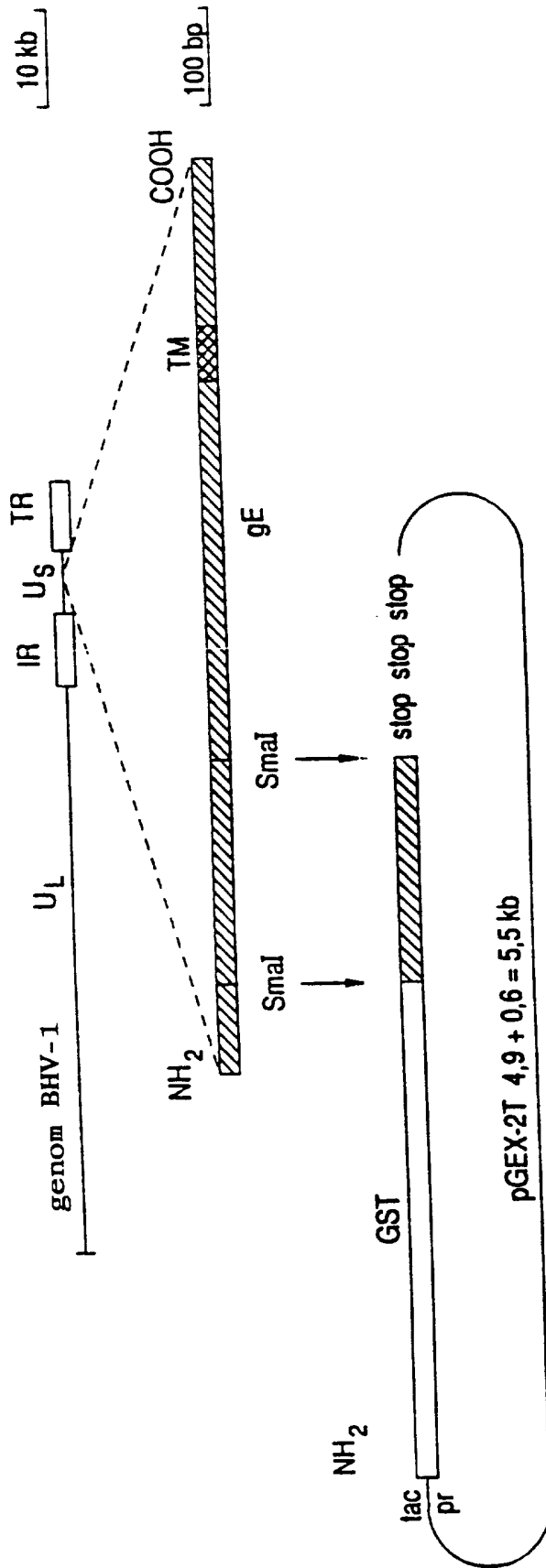
OBR. 5



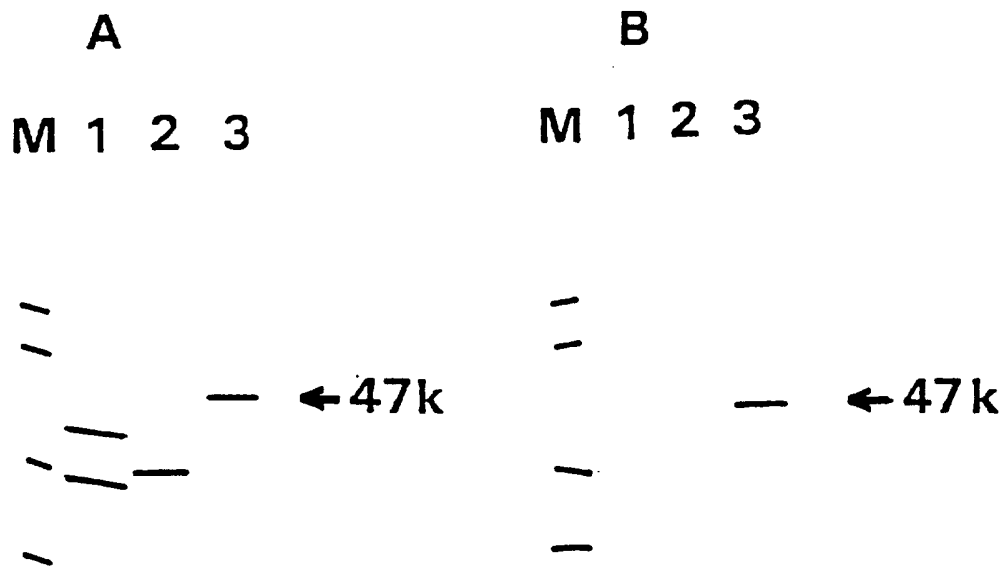
OBR. 6



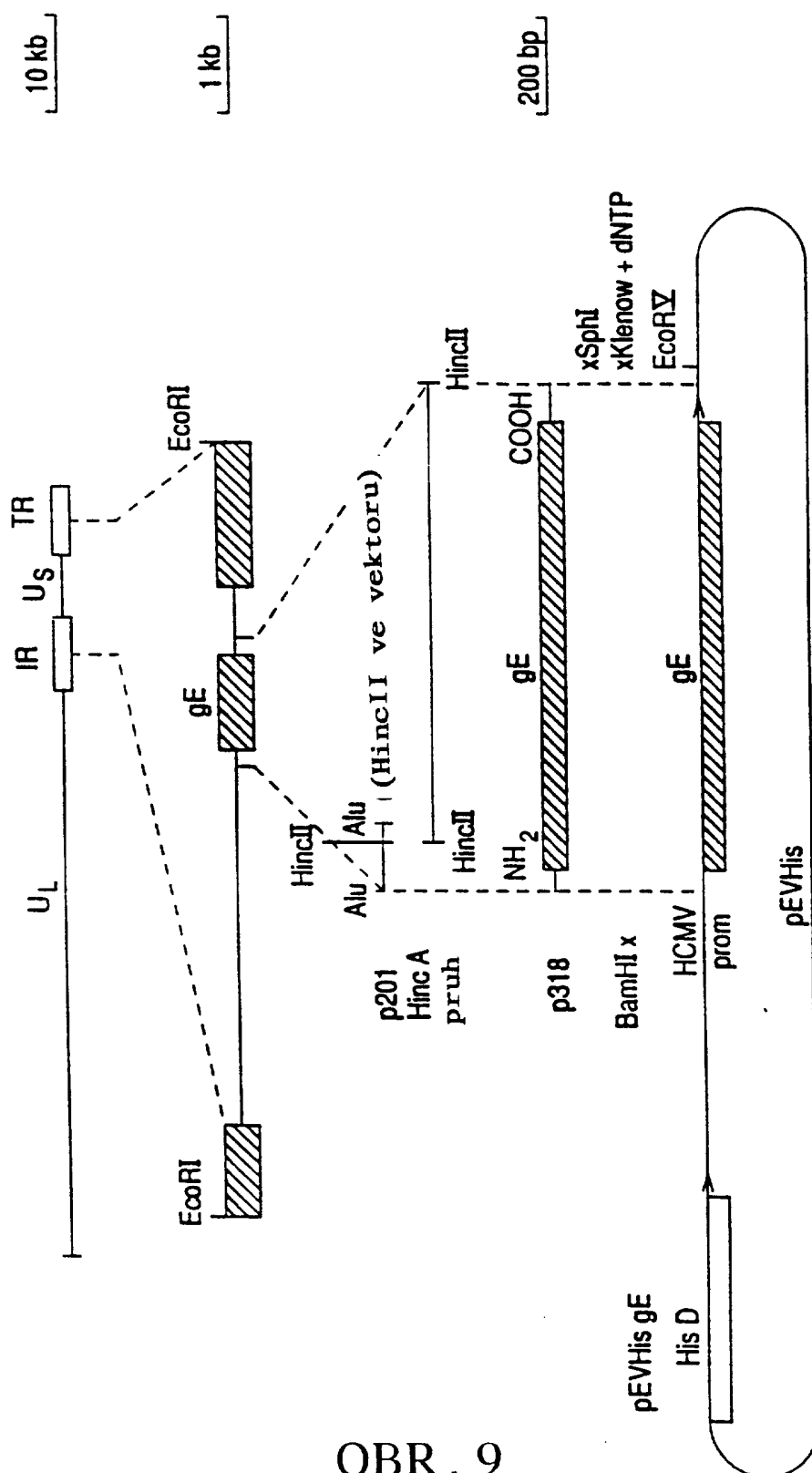
OBR. 7A



OBR. 8A

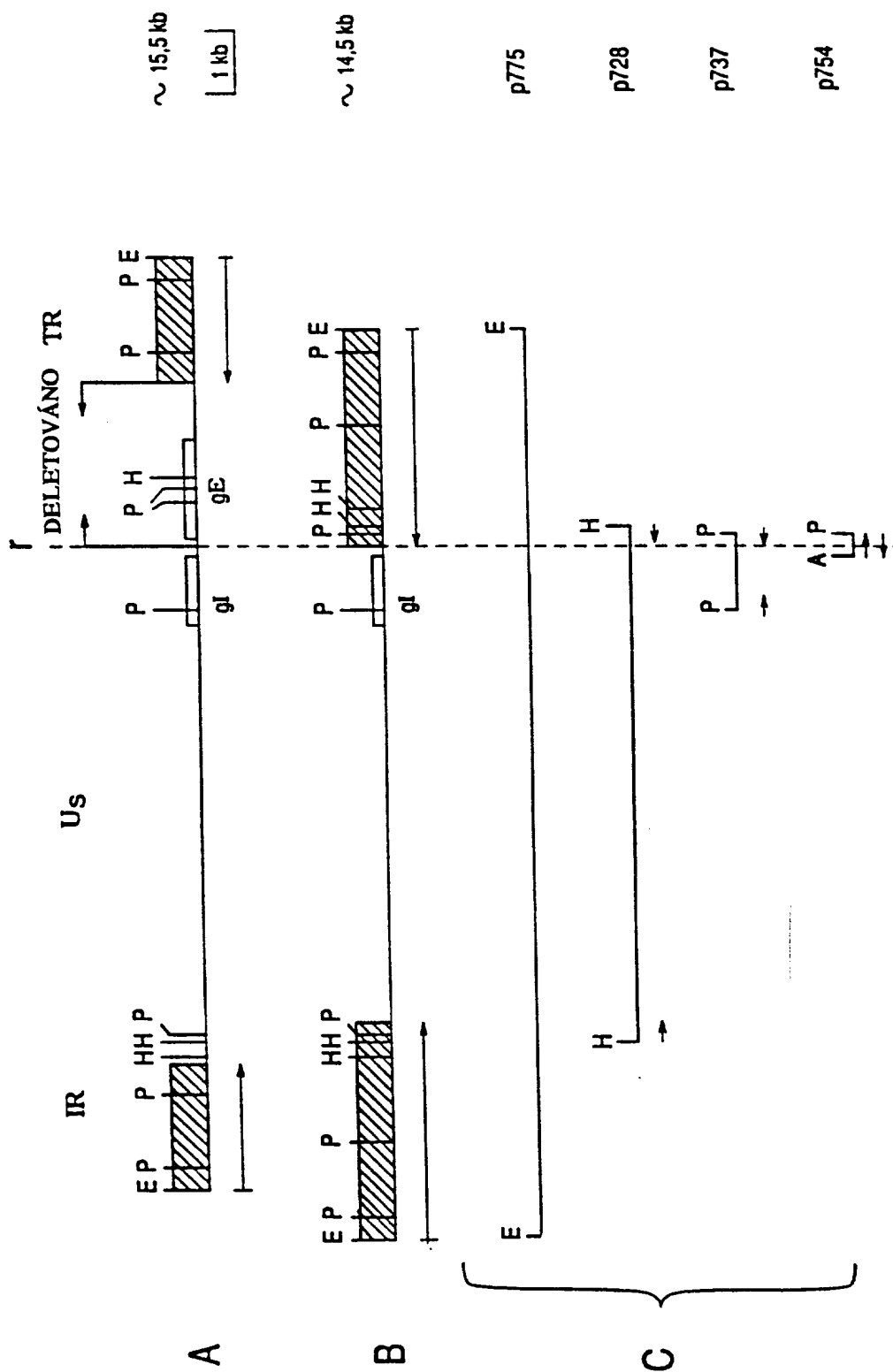


OBR. 8B



OBR. 9

-52-



OBR. 11

A

```

-----> OBLAST PROMOTORU gE ----->
5' GAGCGGCCCCGACCGCCGCGGGTGTTAAATGGGTCTCGCGCGGCTCGTGGTTCACACCGCCGGAGAA
      ↑
----->|<----- INVERTOVANÁ OPAKOVANÁ SEKVENCE -----
CCAGCGC|TGCGAGGGGGGGCTTGGTGGCTGGCGACTCTTTAAGGCGTGCCGCCACGAGCAAGAAGACGGC
<. INVERTOVANÁ OPAKOVANÁ SEKVENCE <-----
CTGTATGCTATGCTCCCGCCGGACTATTTTCCGGTGGTGGCCTCGTCCAAGCCCCCTGCTGGTGAAAGTT 3'

```

B(I)

```

Unikátní krátká ↑ opakovaná sekvence
Protějšší hranice opakované sekvence: GGCA•CCGGTCCCGGA|TGCGAGGGGGGGCTTGG
(inversní sekvence)                * * |*****
Rekombinovaná oblast:              CCGGAGAACCAGCGC|TGCGAGGGGGGGCTTGG

```

B(II)

```

Rekombinovaná oblast:      CCGGAGAACCAGCGC|TGCGAGGGGGGGCTTGG
                          *****|* * * *
Oblast gE divokého typu:  CCGGAGAACCAGCGC|GAGCTTCGCTGCGTGTG
                                  |
                                  --->
                                  gE zaváděcí sekvence

```

OBR. 12

10 20 30 40 50 60
CTACCACGCCGCGGGCGACTGCTTCGTTATGCTGCAGACGACCGCGTTTCGCCTCCTGCCC
Y H A A G A C F V M L Q T T A F A S C P
70 80 90 100 110 120
GCGCGTCGCGAACGACGCCTTTTCGCTCCTGCCTGCACGCCGACACGCGCCCCGCTCGCAG
R V A N D A F R S C L H A D T R P A R S
130 140 150 160 170 180
CGAGCGGCGCGCGAGCGCCGCGGTCGAAAACCACGTGCTCTTCTCCATCGCCCATCCGCG
E R R A S A A V E N H V L F S I A H P R
190 200 210 220 230 240
CCCAATAGACTCAGGGCTCTACTTTCTGCGCGTCGGCATCTACGGCGGCACCGCGGGCAG
P I D S G L Y F L R V G I Y G G T A G S
250 260 270 280
CGAGCGCCGCGCGAGACGTCTTTCCCTTGGCCGCGTTTGTACACA
E R R R D V F P L A A F V H

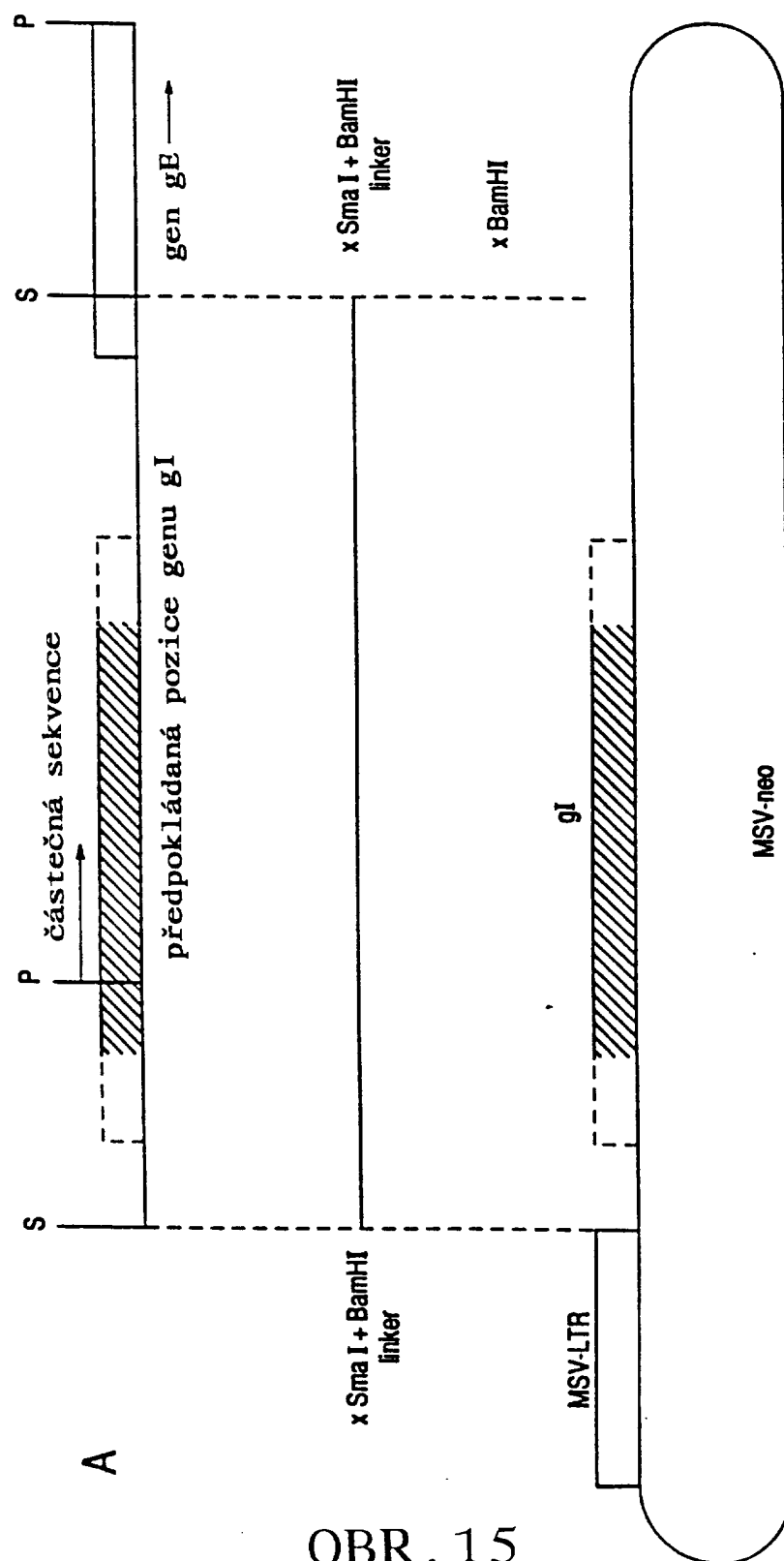
OBR. 13

symbol comparison table : DAYHOFF.DAT; gap penalty : 8

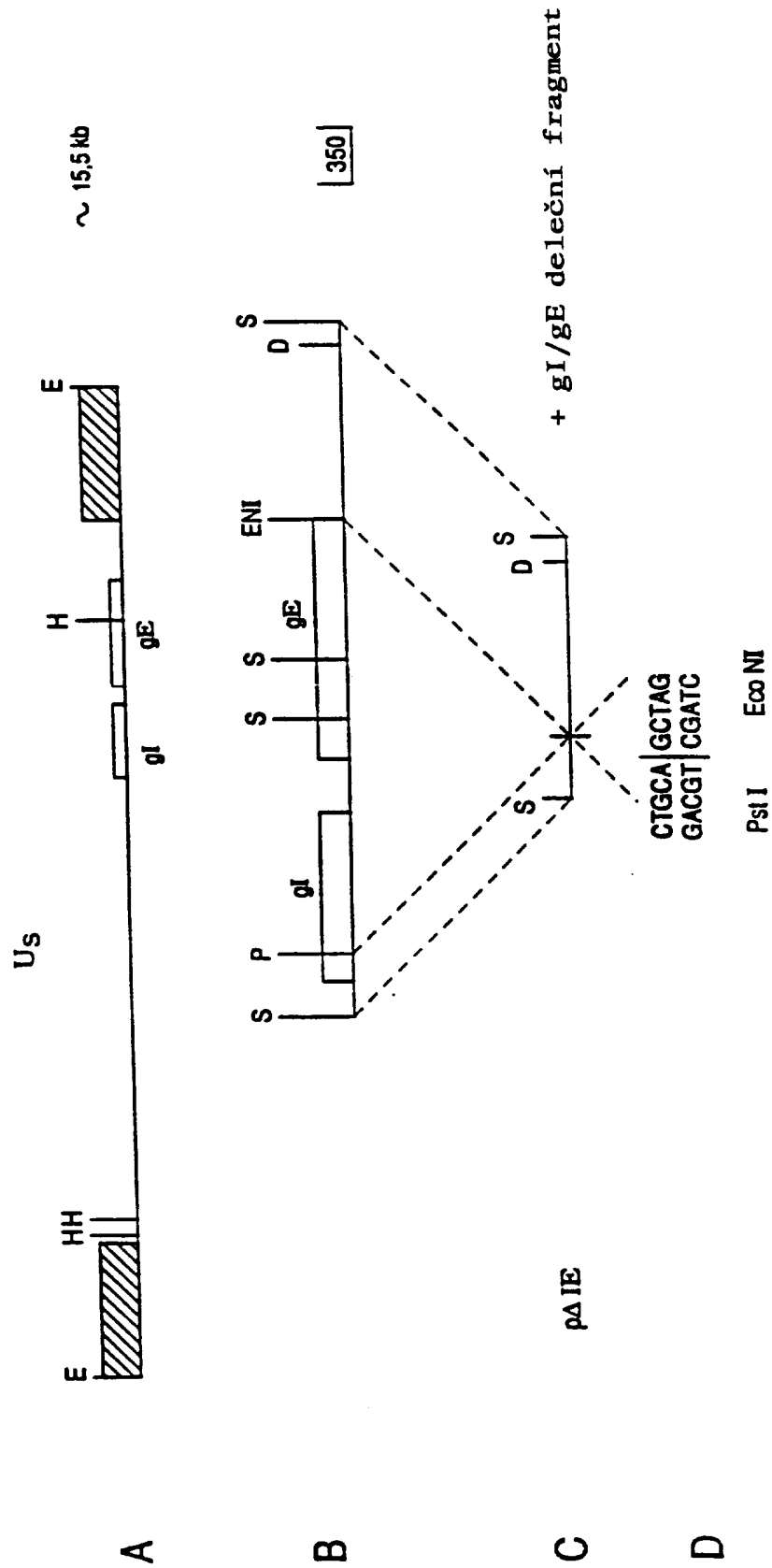
	1	10	20	30	40	50
BHV1	YHAAGD.CFVMLQTTAFASCPRVAN.AFRSCLHADTRP.ARSERRASA AVENHVLFSIA					
	*	:	****	: *** **:	:	***** : *:
PRV	RLDPKRA.CYTREYAAEYDLCPRVHHEAFRGCLR...KR.EPLARRASA AVEARRLLFVS					
	:	*	***	** *	:	*
HSV1	YPMGHK.CPRVHVVTVTACPRRPAVAFALCRATDSTH.SPAYPTLELNLAQQPLL RVQ					
	*	* * * *:	***	** ** *	:	: *:
VZV	YADTVAFCFRSVQVIRYDGCPRIRTSAFISCRYKHSWHYGNSTDRISTEPDAGV MLKIT					
	1	10	20	30	40	50

	60	70	80	90	93
BHV1	HPRPIDSGLYFLRVGIYGG.TACSERRRDVFFLA AFVH				
	: * * * * *	***	*	:	*
PRV	RPAPPDAGSYVLRVR..NG.TTDLFVLTALVPPRGRPHU				
	*	** *****:	:	****	:
HSV1	RATRDYAGVYVLRVWVGDA PNASLFVLGMAIAAEG				
	:	: ***** *	:	: *:	:
VZV	KPGINDAGVYVLLVRLDHSRSTDGFILGVNVYTAG				
		70	80	90	94

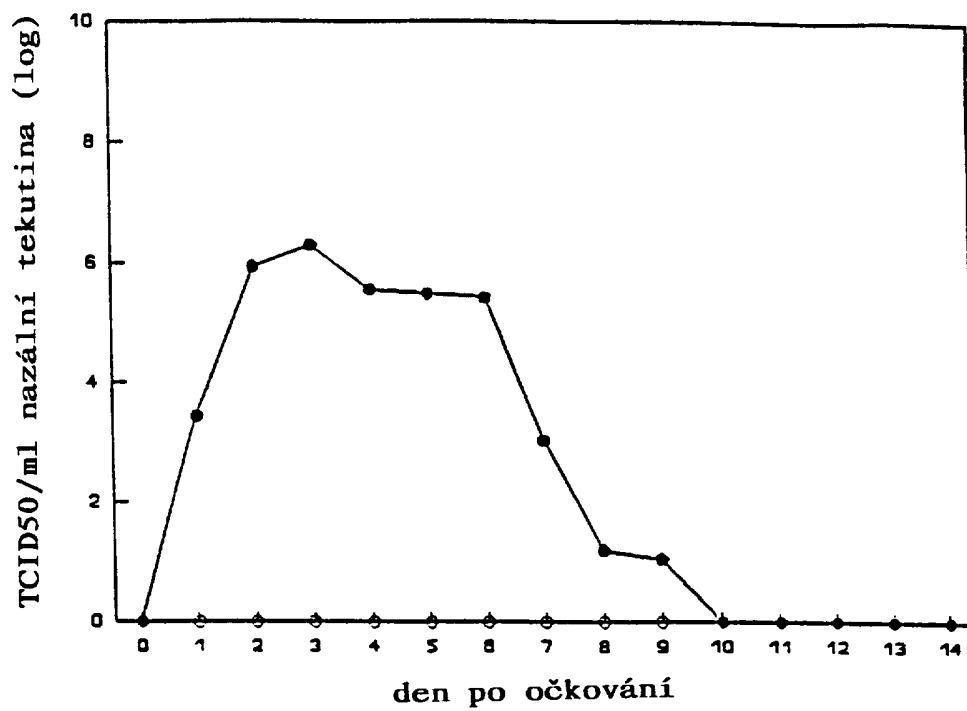
OBR. 14



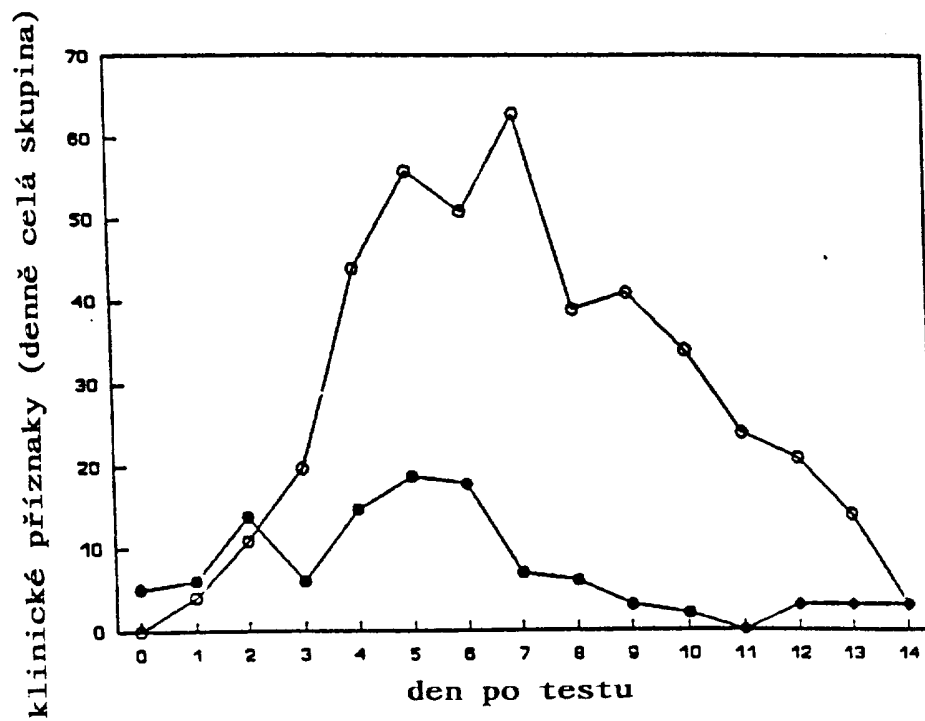
OBR. 15



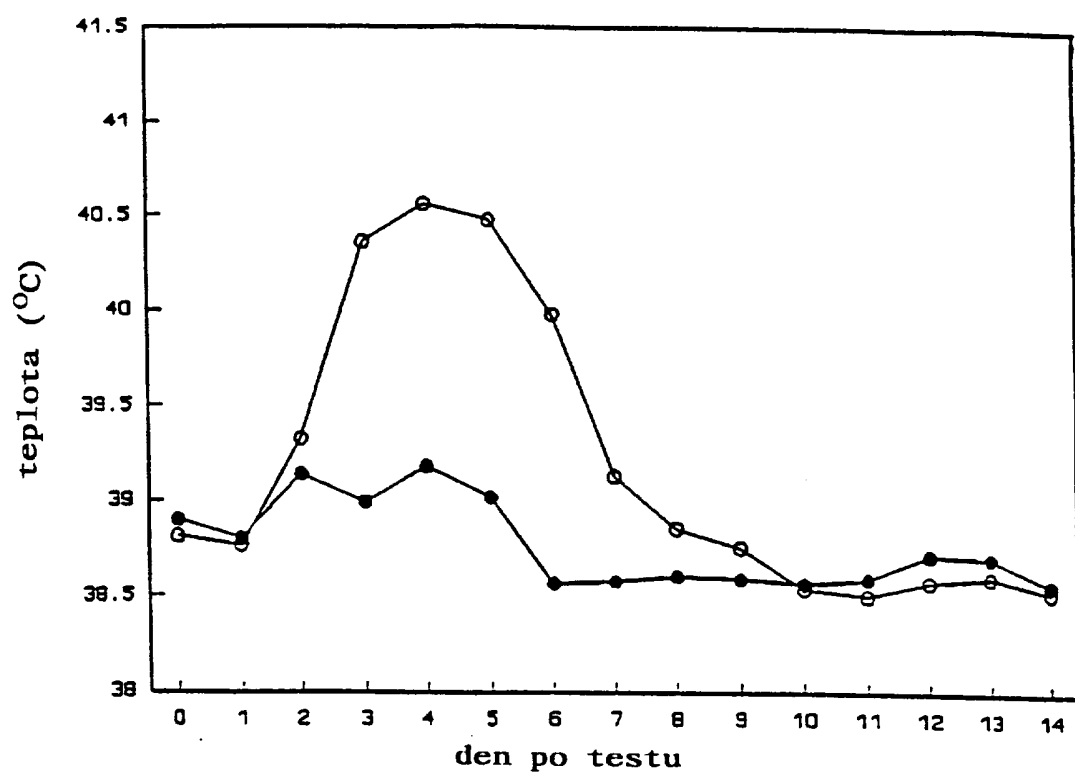
OBR. 16



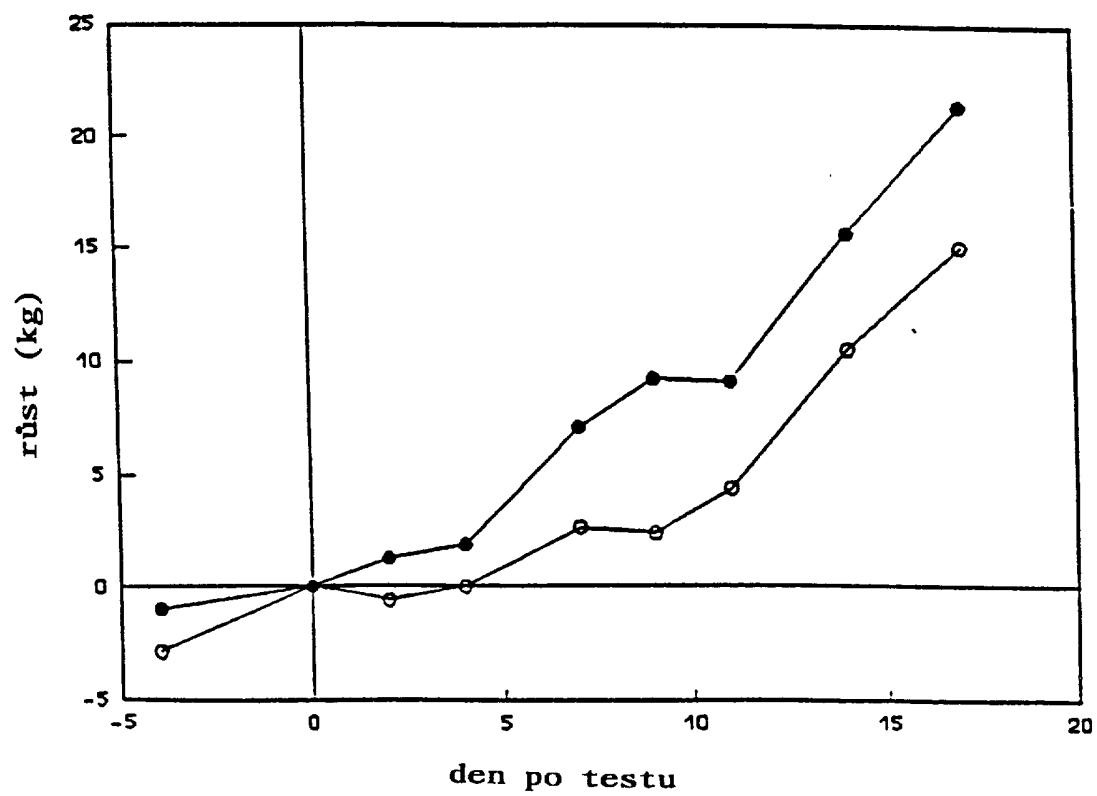
OBR. 17



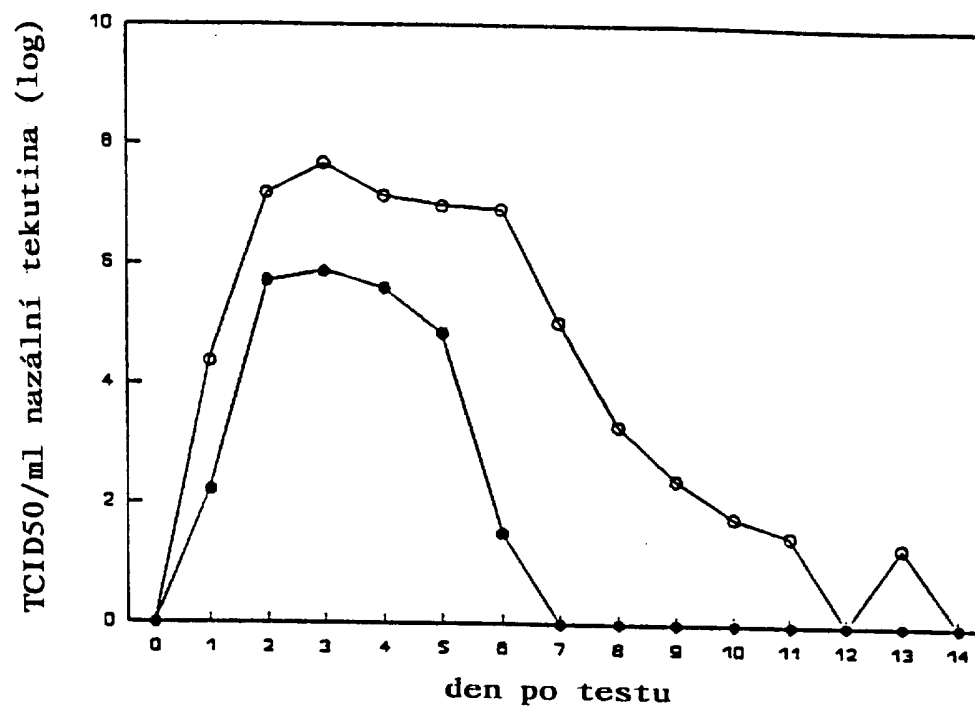
OBR. 18



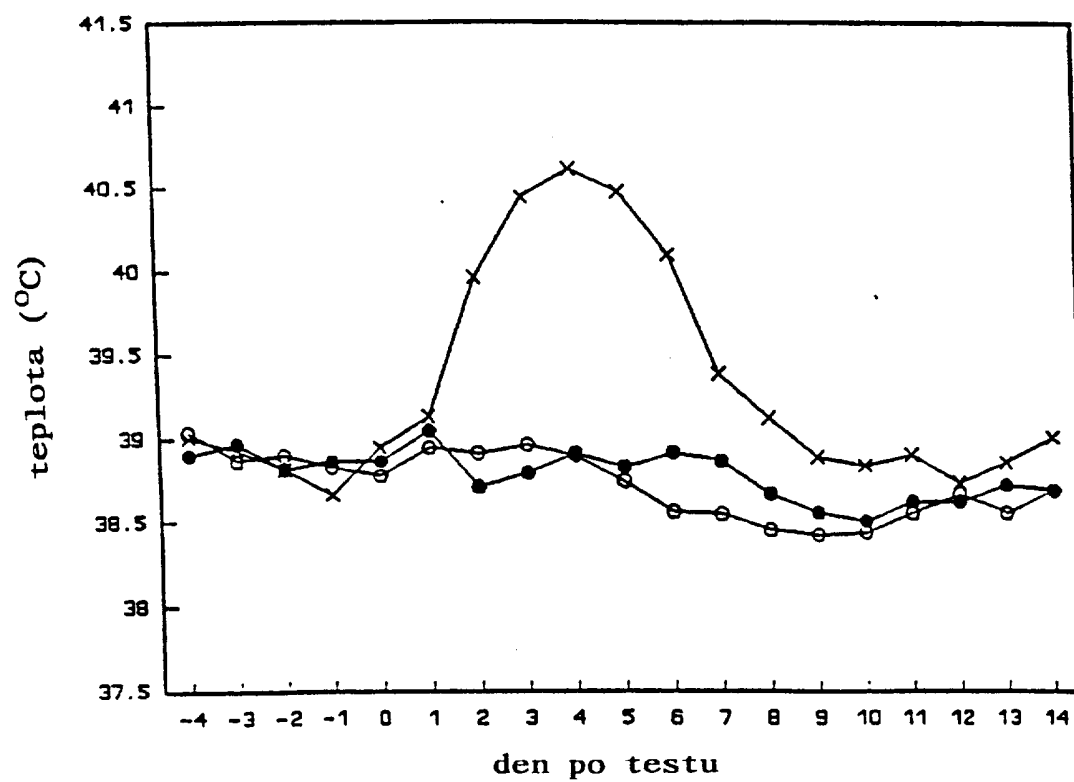
OBR. 19



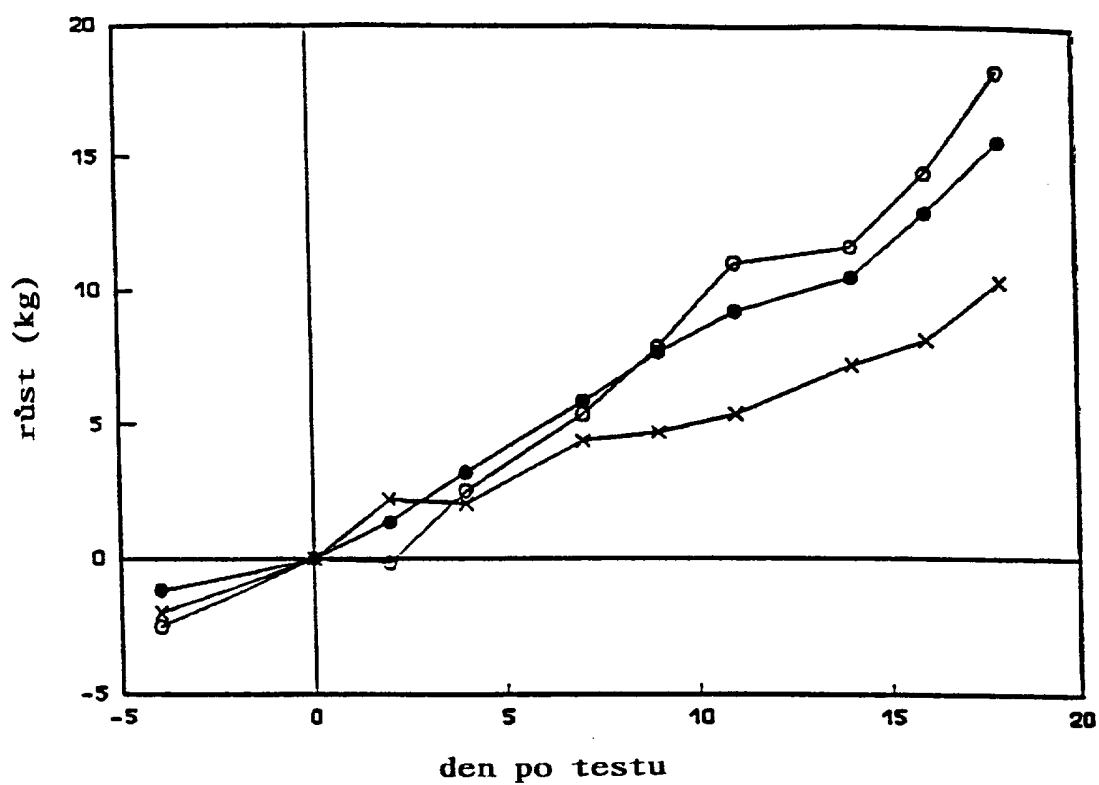
OBR. 20



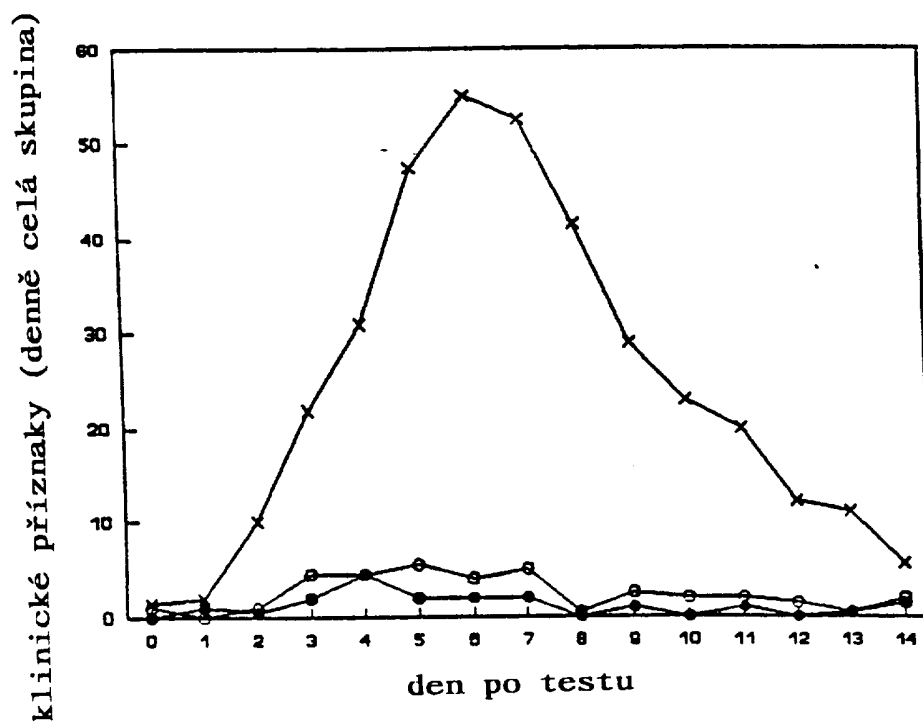
OBR. 21



OBR. 22



OBR. 23



OBR. 24