



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/12 (2006.01); A61K 39/245 (2006.01); C12N 7/00 (2006.01); A61K 2039/5254 (2006.01); A61K 2039/5256 (2006.01); A61K 2039/552 (2006.01); C12N 2710/16021 (2006.01); C12N 2710/16022 (2006.01); C12N 2710/16034 (2006.01); C12N 2710/16043 (2006.01); C12N 2710/16051 (2006.01); C12N 2710/16062 (2006.01); C12N 2800/204 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014131474, 20.12.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.12.2012

Дата регистрации:
31.07.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.12.2011 EP 11196171.0

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2016 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 31.07.2018 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 30.07.2014

(86) Заявка РСТ:
EP 2012/076496 (20.12.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/098214 (04.07.2013)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ВАНДЕРПЛАССХЕН Ален Франсис Клод
(BE)

(73) Патентообладатель(и):

Гесвал с.а. (BE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2009027412 A1, 05.03.2009. RU
2369635 C2, 10.10.2009.

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГЕРПЕСВИРУС КОИ (КНУ) И ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ
ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМОГО КНУ

(57) Реферат:

Изобретения относятся к области биотехнологии и касаются живого аттенуированного рекомбинантного герпесвируса кои (КНУ), вектора экспрессии, включающего геном такого вируса, выделенной клетки, вакцины, способа профилактики у рыбы заболевания, вызываемого КНУ, и иммуногенной композиции. Представленный живой

аттенуированный рекомбинантный герпесвирус кои включает геном, в котором открытая рамка считывания 56 (ORF 56) и открытая рамка считывания 57 (ORF 57) подвергнуты делеции, для применения в вакцине для профилактики у рыбы заболевания, вызываемого герпесвирусом кои (КНУ). Изобретения позволяют получать безопасные и эффективные аттенуированные

R U 2 6 6 2 2 7 6 8 C 2

R U 2 6 6 2 2 7 6 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 7/04 (2006.01)*C12N 7/01* (2006.01)*A61K 39/245* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/12 (2006.01); *A61K 39/245* (2006.01); *C12N 7/00* (2006.01); *A61K 2039/5254* (2006.01); *A61K 2039/5256* (2006.01); *A61K 2039/552* (2006.01); *C12N 2710/16021* (2006.01); *C12N 2710/16022* (2006.01); *C12N 2710/16034* (2006.01); *C12N 2710/16043* (2006.01); *C12N 2710/16051* (2006.01); *C12N 2710/16062* (2006.01); *C12N 2800/204* (2006.01)

(21)(22) Application: **2014131474, 20.12.2012**(24) Effective date for property rights:
20.12.2012Registration date:
31.07.2018

Priority:

(30) Convention priority:
30.12.2011 EP 11196171.0(43) Application published: **20.02.2016** Bull. № **5**(45) Date of publication: **31.07.2018** Bull. № **22**(85) Commencement of national phase: **30.07.2014**(86) PCT application:
EP 2012/076496 (20.12.2012)(87) PCT publication:
WO 2013/098214 (04.07.2013)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

VANDERPLASSKHEN Alen Fransis Klod (BE)

(73) Proprietor(s):

Gesval s.a. (BE)(54) **RECOMBINANT Koi HERPESVIRUS (KHV) AND VACCINE FOR PREVENTION OF DISEASE CAUSED BY KHV**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: inventions relate to the field of biotechnology and a live attenuated recombinant Koi herpesvirus (KHV), an expression vector comprising the genome of such a virus, an isolated cell, a vaccine, a method for preventing fish disease caused by KHV, and an immunogenic composition. Present live attenuated recombinant Koi herpesvirus includes a

genome in which the open reading frame 56 (ORF 56) and the open reading frame 57 (ORF 57) are deleted, for use in a vaccine for the prevention of a disease caused by Koi herpesvirus (KHV) in fish.

EFFECT: inventions make it possible to obtain safe and effective attenuated vaccines for controlling KHV infection.

16 cl, 29 dwg, 3 tbl

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному герпесвирусу кои (KHV), способу продуцирования такого KHV, клеткам, содержащим такой KHV, и применению такого KHV в качестве вектора и в вакцинах для профилактики и/или терапевтического лечения заболевания у рыбы, вызванного герпесвирусом кои у карпа, такого как *Cyprinus carpio carpio* или *Cyprinus carpio koi*.

Обычный карп (*Cyprinus carpio carpio*) является наиболее широко культивируемой для потребления человеком рыбой, в основном в Азии, Европе и Среднем Востоке. В отличие от этого, подвиды кои (*Cyprinus carpio koi*) культивируются в качестве домашней рыбы для эстетического удовольствия или для соревновательных выставок, особенно в Японии, но также и по всему миру. Вирус, вызывающий летальное заболевание как у обычного, так и у карпа кои, изначально названный герпесвирусное заболевание кои (KHVD), был детектирован в 1996 в Великобритании. Затем вирус был быстро идентифицирован в качестве причины массовой смертности кои и обычного карпа в Израиле, США и Германии. Интенсивное выращивание обычного карпа, выставки кои и международная торговля привели к быстрому глобальному распространению этого высокозаразного и чрезвычайно вирулентного заболевания. После возникновения KHVD вызвал серьезные финансовые и экономические потери для предприятий, выращивающих как кои, так и обычного карпа по всему миру.

Первоначальная характеристика вируса продемонстрировала подобную герпесу структуру с оболочкой и икосаэдральной электроноплотной сердцевиной 100-110 нм, окруженной подобной тегументу структурой. Геном вируса содержит линейную двухцепочечную ДНК (дцДНК) из ~295 т.п.о., подобную ДНК герпесвируса 1 семейства карповых 1 (CyHV-1), но больше чем ДНК членов *Herpesviridae*, обычно варьирующуюся от 125 до 240 т.п.о. по размеру. Последовательность генома KHV была совсем недавно опубликована (Aoki et al., *J Virol*, 81, pages 5058-5065 (2007)). Геном KHV содержит значительное количество последовательности ДНК без гомологии с любой другой известной вирусной последовательностью. Кроме того, она содержит чрезвычайно дивергентные последовательности ДНК, кодирующие полипептиды, которые имеют сходство с некоторыми дцДНК вирусов, таких как герпесвирус, поксвирус, иридовирус и другие крупные ДНК вирусы.

Уникальные характеристики этого вируса привели к трем различным номенклатурам: во-первых, герпесвирус кои (KHV) в соответствии с его морфологическим проявлением; во-вторых, интерстициальный нефрит карпа и вирус некроза жабер (CNGV) в соответствии с его патогенетическими эффектами у рыбы; и в заключение, герпесвирус 3 семейства карповых (CyHV-3) в соответствии со сходством содержания генов с CyHV-1 и с CyHV-2. Последняя номенклатура была дополнительно подтверждена недавним секвенированием полной длины вирусного генома. Однако в дальнейшем будет использовано название KHV.

KHV имеет геном приблизительно 295 т.п.о., что представляет самый большой геном, когда-либо идентифицированный среди членов *Herpesvirales*. Хотя первое выделение KHV было осуществлено в 1996 г., лишь небольшое количество информации доступно о роли отдельных генов в патогенезе KHV и в биологии инфицирования природного хозяина.

Аттенуированный KHV и его потенциальное применение в качестве вакцины-кандидата было описано в международной заявке на патент WO 2004/061093 A1. Однако эта вакцина-кандидат несет потенциальную опасность. Аттенуация представляет собой последовательность случайных мутаций, которые произошли во время вирусной репликации *in vitro*. Следовательно, характер аттенуации неизвестен и не может быть

исключен возврат к полностью патогенному фенотипу.

Для использования и фундаментального исследования KHV требуется продуцирование рекомбинантного вируса. В последнее время манипулирование большими герпесвирусными геномами стало осуществимым посредством использования векторов на основе искусственной бактериальной хромосомы (BAC) (Messerle et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94, 14759-14763 (1997); Wagner et al., Trends Microbiol, 10, 318-324 (2002) см. ниже). Эти векторы позволяют поддержание и эффективный мутагенез вирусного генома в *Escherichia coli* (*E. coli*) с последующим воссозданием вирионов потомства трансфекцией плазмиды BAC в пермиссивные эукариотические клетки. До настоящего времени геномы некоторых герпесвирусов были успешно размножены в виде инфекционных BAC клонов, включая человеческий цитомегаловирус (HCMV), который представляет собой второй по величине герпесвирусный геном, клонированный в виде BAC до настоящего времени (230 т.п.о.) (Borst et al., J Virol, 73, 8320-8329(1999)).

В последнее время несколько рекомбинантных KHV были впервые сконструированы с применением технологии BAC; эти рекомбинанты описаны в заявке на патент согласно PCT W02009/027412. В этой заявке раскрыт способ получения рекомбинантных KHV, имеющих недостаток одного в одном или более генов, выбранных из группы, состоящей из ORF55: гена тимидинкиназы; ORF12: предполагаемого гена рецептора фактора некроза опухолей (TNF); ORF16: гена предполагаемого сопряженного с G-белком рецептора (GPCR); ORF134: предполагаемого гена гомолога интерлейкина 10; ORF140: предполагаемого гена тимидилаткиназы или их комбинации. Такие мутанты применяли в виде живого аттенуированного вакцинного вируса.

Было продемонстрировано, что некоторые из таких мутантов являлись безопасными, при применении по отношению к конкретной SPF рыбе определенного размера и возраста. Однако в данной области производители рыбы заинтересованы в ранней вакцинации, т.е. когда рыба является относительно молодой/маленькой, и имеет место относительно большой разброс рыбы по размеру. Оказалось, что в таких условиях вакцины на основе делеционных мутантных вирусов, как раскрыто в международной заявке на патент WO 2009/027412, могут в некоторых ситуациях не являться достаточно безопасными: такие рекомбинантные KHV являются слишком вирулентными для применения по отношению к молодой/маленькой рыбе. Это означает, что в настоящее время все еще имеет место недостаток безопасных и эффективных аттенуированных рекомбинантных вакцин для контроля заболевания в такой области, как выращивание рыбы.

Целью настоящего изобретения является получение новых рекомбинантных KHV вирусов, которые могут быть использованы для разработки безопасных и эффективных аттенуированных вакцин для контроля инфекции KHV в данной области.

Неожиданно было обнаружено, что рекомбинантный KHV, в котором открытая рамка считывания 57 (ORF57) является неполноценной, демонстрирует сильно сниженную смертность или отсутствие смертности вообще, даже у очень молодого/маленького карпа, инфицированного этим герпесвирусным рекомбинантом, и предоставляет иммунитет к герпесвирусу кои дикого типа. Такой рекомбинантный KHV, таким образом, предоставляет безопасный и эффективный аттенуированный вакцинный вирус, который может быть соответственно использован по отношению к молодому и/или маленькому карпу.

Это открытие является даже более неожиданным с точки зрения того факта, что ORF57 до настоящего времени считался обязательным, без которого не была бы возможна жизнь вируса.

Следовательно, первый вариант осуществления данного изобретения относится к рекомбинантному герпесвирусу кои, в котором ORF57 является неполноценным, что приводит в результате к KHV, который является аттенуированным и индуцирует уровень смертности 40% или менее у карпа, предпочтительно *Cyprinus carpio carpio* или *Cyprinus carpio koï*, при инфицировании указанным герпесвирусом.

В используемом в настоящем описании значении "неполноценный" ORF57 означает ORF57, который больше не является функциональным, т.е. больше не способен к кодированию функционального белка. Неполноценный ORF57 в используемом в настоящем описании значении в результате приводит к KHV, который является аттенуированным до уровня, который индуцирует уровень смертности 40% или менее у карпа. Такая неполноценность может, например, быть получена мутацией, такой как вставка или делеция одного или более нуклеотидов в гене, кодирующем ORF57, или в его промоторной области. Такая мутация может, например, являться мутацией со сдвигом рамки в 5'-сайте гена или делецией (части) промоторной области или (части) самого гена.

Примером последовательности ДНК ORF57 является последовательность ДНК ORF57, как приведено в Genbank под номером доступа NC_009127, где стартовый кодон и стоп-кодон ORF57 расположены в положении 99382 и 100803. Совершенно очевидно, что расположение ORF57 может отличаться в других KHV штаммах из-за природной изменчивости. Также из-за природной изменчивости могут иметь место небольшие различия в последовательности ORF57 в одном KHV штамме при сравнении с другим KHV штаммом. Следовательно, ORF57, как описано в настоящем описании, является открытой рамкой считывания, имеющей идентичность последовательности более чем 80% с последовательностью ДНК ORF57, приведенной в Genbank под номером доступа NC_009127.

Нуклеотидная последовательность области, содержащей ORF56, 57 и 58, охватывающая нуклеотиды 96630-101558 представлена в SEQ ID NO: 12. См. также фиг. 1.

Очевидно, что наиболее экстенсивный путь создания неполноценного гена, т.е. делеция всего ORF57, приведет в результате к полному отсутствию выработки белка ORF57.

С практической точки зрения и с точки зрения безопасности логично было бы осуществить стадию такой полной делеции. Однако, как следует из фиг. 1, предполагаемая промоторная область расположена в положении 100212-100261, которая, возможно, задействована в экспрессии соседнего ORF58. По этой причине мутация в ORF57 предпочтительно не должна распространяться на эту область. Таким образом, предпочтительно вводить мутации в ORF57 в область слева от положения 100212 или справа от положения 100261.

Также на фиг. 1 видно, что две предполагаемые промоторные области расположены соответственно в положении 99451-99500 и положении 99794-99843, которые, возможно, могут быть задействованы в экспрессии соседнего ORF56. Следовательно, теоретически возможно, что делеция в области в ORF57 препятствует экспрессии ORF56. В этом случае возможно, что рекомбинантный KHV, в котором ORF57 является неполноценным в соответствии с изобретением, просто проявляет себя аттенуированным в результате более низкой экспрессии ORF56. Однако в разделе примеры показано, что 1) ORF56 не является необходимым геном, и 2) неполноценный ORF56 не вносит вклад в аттенуированный характер рекомбинантного KHV в соответствии с изобретением. В этих примерах показано, что большие делеции могут быть внесены в ORF56 без влияния

на жизнеспособность рекомбинантного KHV и без значительного изменения аттенуированного характера рекомбинантного KHV. Это в числе прочего подразумевает, что предполагаемые промоторные сайты ORF56, расположенные в ORF57, могут без проблем быть удалены.

5 Также из фиг. 1 следует, что два предполагаемых промоторных сайта для ORF57 расположены в ORF56 в положениях 97075-97124 и 98712-98761. Следовательно, нельзя исключать то, что делеция маленькой части ORF57, такой как ORF57 Del1, обеспечивает укороченный, но все еще функциональный ORF57-кодируемый белок. Для того чтобы
10 исключить эту возможность, вносили большую двойную делецию ORF56-ORF57, как описано в разделе примеры, которая охватывает область положений 97001-99750. Эта делеция проявляется по существу одинаково с одиночными ORF57 мутантами, как можно увидеть на фиг. 5 при сравнении с фиг. 7. Следовательно, можно сделать вывод, что кодируемый ORF57 белок не является необходимым для вируса.

Делеция только маленькой части ORF57 является возможной, она даже может являться
15 предпочтительной возможностью, в силу причин, приведенных выше, но необходимо осуществить некоторую обработку, чтобы полученный в результате укороченный белок не являлся нефункциональным. Если специалист в данной области по какой-либо причине решит удалить меньше чем полный ORF57, он легко может быть способен проверить неполноценность ORF57: ORF57, не являющийся неполноценным, приведет
20 к вирусу, имеющему слишком высокий уровень вирулентности, т.е. слишком низкий уровень аттенуации.

Предпочтительно, рекомбинантный KHV является дополнительно неполноценным по одному или более вирусным генам, которые вносят вклад в вирулентность, но не являются необходимыми для репликации вируса. Таким образом, предпочтительная
25 форма этого варианта осуществления относится к рекомбинантному герпесвирусу кои в соответствии с изобретением, который является неполноценным по меньшей мере по одному дополнительному гену, который вносит вклад в вирулентность, но не является необходимым для репликации вируса.

Более предпочтительная форма этого варианта осуществления относится к
30 рекомбинантному герпесвирусу кои в соответствии с изобретением, который является неполноценным по меньшей мере по одному дополнительному гену, который вносит вклад в вирулентность, где указанный ген выбран из группы, состоящей из гена тимидинкиназы; ORF12: предполагаемого гена рецептора фактора некроза опухолей (TNF); ORF16: предполагаемого гена сопряженного с G-белком рецептора (GPCR);
35 ORF134: предполагаемого гена гомолога интерлейкина 10; ORF140: предполагаемого гена тимидилаткиназы или любой их комбинации.

В еще более предпочтительной форме этого варианта осуществления рекомбинантный KHV является дополнительно неполноценным по меньшей мере по гену тимидинкиназы или предполагаемому гену тимидилаткиназы.

40 В другой еще более предпочтительной форме этого варианта осуществления рекомбинантный KHV в соответствии с данным изобретением является дополнительно неполноценным по гену тимидинкиназы и по меньшей мере по одному дополнительному гену, который вносит вклад в вирулентность, выбранному из группы, состоящей из ORF12: предполагаемого гена рецептора фактора некроза опухолей (TNF); ORF16:
45 предполагаемого гена сопряженного с G-белком рецептора (GPCR); ORF134: предполагаемого гена гомолога интерлейкина 10; или ORF140: предполагаемого гена тимидилаткиназы.

В еще более предпочтительной форме этого варианта осуществления рекомбинантный

КНВ является дополнительно неполноценным по меньшей мере по гену тимидинкиназы и предполагаемому гену тимидилаткиназы.

В другой предпочтительной форме этого варианта осуществления рекомбинантный герпесвирус кои в соответствии с изобретением представлен в живой форме.

5 Предпочтительно, рекомбинантный герпесвирус кои обладает способностью воссоздавать инфекционные частицы, т.е. реплицироваться при введении в перmissive эукариотические клетки или индивидуумам рыбы, предпочтительно карпу, более предпочтительно *Cyprinus carpio*, еще более предпочтительно *Cyprinus carpio carpio* и/или *Cyprinus carpio koi*.

10 В альтернативном варианте осуществления рекомбинантный КНВ в соответствии с изобретением является дополнительно неполноценным по одному или более вирусным генам, которые являются необходимыми для репликации (и необязательно неполноценным по одному или более вирусным генам, которые вносят вклад в вирулентность, но не являются необходимыми для репликации вируса), таким образом
15 обеспечивая рекомбинантный герпесвирус кои в соответствии с изобретением в нерепликативной форме.

Таким образом, альтернативный вариант осуществления относится к рекомбинантному КНВ в соответствии с изобретением, где указанный герпесвирус представлен в нерепликативной форме.

20 "Нерепликативная форма" означает, что рекомбинантный герпесвирус кои все еще имеет способность инфицировать клетки или индивидуумов рыбы (например, *Cyprinus carpio*, *Cyprinus carpio carpio* или *Cyprinus carpio koi*), но не способен реплицироваться для распространения вирусного потомства. Нерепликативный рекомбинантный штамм вырабатывается инактивацией (посредством известных технологий, таких как вставка,
25 делеция или мутация, например, с применением клонирования ВАС) гена КНВ, который необходим для репликации.

Такой делетированный вирус культивируется в перmissive клеточной линии, стабильно экспрессирующей делетированный ген (транскомплементация).

Этот подход является хорошо известным в данной области подходом. Помимо
30 прочего он был успешно использован для различных герпесвирусов, таких как *Suid herpesvirus 1* (вирус Аujeszky) с делетированным gH (Babic et al., 1996) и *Bovine herpesvirus 1* (Schroder and Keil, 1999).

Любой ген, который участвует в репликации, может быть сделан неполноценным для того, чтобы получить не реплицирующийся рекомбинантный герпесвирус кои.

35 Другими словами, любой ген, инактивация которого ведет к нерепликативному рекомбинантному герпесвирусу кои, может быть делетирован. Предпочтительно, ген рекомбинантного КНВ в соответствии с изобретением, который является делетированным для того, чтобы обеспечить нереплекативную форму вируса, выбран из группы, состоящей из: ORF25, ORF31, ORF32, ORF34, ORF35, ORF42, ORF43, ORF45,
40 ORF51, ORF59, ORF60, ORF62, ORF65, ORF66, ORF68, ORF70, ORF72, ORF78, ORF81, ORF84, ORF89, ORF90, ORF92, ORF95, ORF97, ORF99, ORF108, ORF115, ORF131, ORF132, ORF136, ORF137, ORF148 и ORF149.

Рекомбинантный герпесвирус кои в соответствии с изобретением предпочтительно содержит последовательность вектора искусственной бактериальной хромосомы (ВАС).

45 Примерно полтора десятка лет назад манипулирование большими герпесвирусными геномами было значительно облегчено с помощью применения таких бактериальных искусственных хромосом. Эти векторы позволяют поддержание и мутагенез вирусного генома *Escherichia coli* с последующим воссозданием вирионов потомства трансфекцией

плазмиды ВАС в пермиссивные эукариотические клетки. На первой стадии последовательности для вектора ВАС вводят в герпесвирусный геном общепринятой гомологичной рекомбинацией в инфицированных клетках. Линейная двухцепочечная ДНК генома герпесвирусов циклизуется во время репликации. Этого достаточно для выделения репликационного интермедиата ВАС мутанта и переноса его посредством ДНК трансформации в *E. coli*. Этот челночный перенос нужен только один раз для стабилизации системы. Герпесвирус ВАС затем репродуцируют и мутируют в *E. coli*. Гомогенную ДНК клонированного герпесвируса ВАС челночно переносят обратно в эукариотические пермиссивные клетки только для воссоздания вируса. Так как вирусные функции не являются необходимыми, вирусный геном остается спящим в *E. coli*, при этом сохраняя вирусные функции представленными во время клонирования. Это является важным для вирусов, когда процедуры *in vitro* культивирования меняют аутентичные свойства изолятов.

В используемом в настоящем описании значении термин "гомологичная рекомбинация" означает, что когда две различные гомологичные молекулы нуклеиновой кислоты встречаются друг друга, происходит кроссовер, и генерируется новая комбинация нуклеиновой кислоты. В используемом в настоящем описании значении термин "последовательность, опосредующая гомологичную рекомбинацию" относится к последовательности, которая вызывает гомологичную рекомбинацию, которая зависит от специфического рекомбинационного белка, который является катализирующим, осуществляющим и содействующим гомологичной рекомбинации. Такой рекомбинационный белок предпочтительно действует специфически на "последовательность, опосредующую гомологичную рекомбинацию" и не воздействует на другие последовательности.

Последовательности вектора ВАС хорошо известны в данной области и их использование в конструировании рекомбинантных вирусов, таких как герпесвирусы, часто описывалось в данной области (Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H. & Messerle, M. (1999), *J Virol* 73, 8320-9. Costes, B., Fournier, G., Michel, B., Delforge, C., Raj, V.S., Dewals, B., Gillet, L., Drion, P., Body, A., Schynts, F., Liefbrig, F., Vanderplasschen, A., 2008. *J Virol* 82, 4955-4964. Dewals, B., Boudry, C., Gillet, L., Markine-Goriaynoff, N., de Leval, L., Haig, D.M. & Vanderplasschen, A. (2006), *J Gen Virol* 87, 509-17. Gillet, L., Daix, V., Donofrio, G., Wagner, M., Koszinowski, U.H., China, B., Ackermann, M., Markine-Goriaynoff, N. & Vanderplasschen, A. (2005), *J Gen Virol* 86, 907-17. Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. & Koszinowski, U.H. (1997), *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14759-63. Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. (2005), *Nucleic Acids Res* 33, e36. Wagner, M., Ruzsics, Z. & Koszinowski, U.H. (2002), *Trends Microbiol* 10, 318-24).

Последовательность вектора ВАС не обязательно должна быть вставлена в ORF57. Альтернативно, она может быть вставлена в другой вирусный ген, который вносит вклад в вирулентность, и/или любой другой вирусный ген, который является или не является необходимым для вирусной репликации, и/или любую межгенную область.

Однако, в более предпочтительной форме, рекомбинантный герпесвирус кои содержит последовательность ВАС вектора, которая встроена в ORF57. Такая вставка имеет то преимущество, что, посредством встраивания вектора ВАС в ORF57, ORF57 при этом становится неполноценным, таким образом, непосредственно обеспечивая рекомбинантный КНВ в соответствии с изобретением.

Пример рекомбинантного КНВ в соответствии с изобретением был выполнен посредством клонирования генома КНВ инсерцией модифицированной loxP-фланкированной кассеты ВАС в ORF55 (см. ниже). Эта вставка привела к ВАС

рекомбинантному вирусу, геном которого стабильно сохранялся в бактериях и был способен генерировать вирионы при трансфекции в перmissive клетки. (См.: Costes, B., Fournier, G., Michel, B., Delforge, C., Raj, V.S., Dewals, B., Gillet, L., Drion, P., Body, A., Schynts, F., Liefvrig, F., Vanderplasschen, A., 2008, J Virol 82, 4955-4964 для подробностей о ВАС-векторе, и см. ниже технические подробности). Этот вектор использовали для введения делеции в ORF57.

Термин "вектор ВАС" относится к плазмиде, продуцируемой с использованием F плазмиды E. coli, и вектору, который может стабильно сохраняться и выращивать фрагмент ДНК большого размера приблизительно 300 т.п.о. или более в бактериях, таких как E. coli и им подобные. Вектор ВАС содержит по меньшей мере одну последовательность ВАС вектора, необходимую для репликации ВАС вектора. Примеры такой области, необходимой для репликации, содержат, но не ограничены ими, точку начала репликации F плазмиды и ее варианты.

В используемом в настоящем описании значении термин "последовательность вектора ВАС" относится к последовательности, содержащей последовательность, необходимую для функции вектора ВАС. Необязательно, последовательность вектора ВАС может дополнительно содержать "зависимую от рекомбинационного белка рекомбинантную последовательность" и/или "селектируемый маркер".

Подробности "зависимой от рекомбинационного белка рекомбинантной последовательности" и/или "селектируемого маркера" приведены, например, в приведенной выше литературе и в WO 22009/027412.

Независимо от места, где вектор ВАС встроен в геном, предпочтительно, чтобы последовательность вектора ВАС была фланкирована последовательностями, опосредующими гомологичную рекомбинацию, предпочтительно loxP. Также предпочтительно последовательность вектора ВАС содержит селектируемый маркер (см. ниже). В более предпочтительной форме селектируемый маркер является лекарственным маркером (см. ниже). В другом предпочтительном варианте осуществления геном указанного рекомбинантного герпесвируса представлен в форме плазмиды. Это достигается выделением циклических форм вышеупомянутого рекомбинантного герпесвируса кои, содержащего последовательность вектора ВАС, и введением в бактериальные клетки. Как упомянуто выше, для изобретения не является необходимым, чтобы последовательность вектора ВАС (бактериальная искусственная хромосома) была встроена в один или более вирусных генов, которые вносят вклад в вирулентность или являются необходимыми для репликации, при условии, что один или более из упомянутых генов, которые способствуют вирулентности или являются необходимыми для репликации, сделаны неполноценными посредством технологий генетической инженерии.

Следовательно, последовательность вектора ВАС может быть встроена в любую область вирусного генома при условии, что ORF57 и предпочтительно один или более других вирусных генов, которые способствуют вирулентности, также являются неполноценными.

Без сомнения, опосредованные векторами ВАС технологии клонирования, как описано выше, могут быть применены многократно: например, первый раз для того, чтобы сделать ORF57 неполноценным, и второй раз для того, чтобы сделать неполноценным дополнительный ген.

Последовательность вектора ВАС может в принципе без проблем оставаться представленной в рекомбинантном KHV в соответствии с изобретением в последующих применениях. Однако, для применения герпесвируса кои в соответствии с изобретением,

например, в вакцине, предпочтительно, чтобы большая часть последовательности ВАС была удалена. Это имеет место, например, для ВАС последовательностей, которые содержат гены, кодирующие селективируемые маркеры и даже в большей степени для генов устойчивости. Наличие таких генов в вакцине считается не только необязательным, но даже нежелательным.

Таким образом, предпочтительно по меньшей мере одну часть (например, часть, которая содержит ген устойчивости или селективируемый маркер) или более предпочтительно большую часть последовательности вектора ВАС вырезают из генома герпесвируса, тем самым предпочтительно оставляя гетерологичную последовательность в сайте вырезания или в бывшем сайте вставки в геноме герпесвируса. Более предпочтительно, гетерологичная последовательность имеет размер менее чем 200 нуклеотидов. Вырезание выполняется введением рекомбинантного KHV в пермиссивную эукариотическую клетку, экспрессирующую рекомбиназу Cre, которая является вырезающей loxP-фланкированную последовательность ВАС вектора.

Следовательно, предпочтительная форма этого варианта осуществления относится к рекомбинантному герпесвирусу кои в соответствии с изобретением, характеризующему тем, что часть последовательности вектора ВАС вырезается из генома герпесвируса, тем самым оставляя гетерологичную последовательность в сайте вырезания или в бывшем сайте вставки, соответственно, в геноме герпесвируса.

И в более предпочтительной форме этого варианта осуществления часть последовательности ВАС вектора, которую вырезают из генома герпесвируса, содержит по меньшей мере один ген, кодирующий селективируемый маркер и/или ген устойчивости.

Также возможно удалять полностью последовательность кассеты ВАС гомологичной рекомбинацией в эукариотических клетках с применением фрагмента ДНК дикого типа вирусного генома, охватывающего сайт вставки кассеты ВАС (например, ORF55, кодирующие ТК). Селекция вирусных бляшек, которые больше не экспрессируют EGFP (кодируемый ВАС кассетой), позволяет селекцию рекомбинантов, которые имеют обращенный сайт ВАС вставки по отношению к последовательности дикого типа.

Рекомбинантный герпесвирус кои в соответствии с настоящим изобретением в любой форме, клон ВАС KHV и вышеупомянутая конструкция KHV, где по меньшей мере часть последовательности вектора ВАС вырезана из генома герпесвируса, могут быть применены для дополнительного манипулирования, включая, например, технологии генетической инженерии для того, чтобы сделать геном неполноценным в дополнительных специфических генах. Неполноценность таких дополнительных генов может быть аналогично получена с применением технологии ВАС, как уже указано выше.

Хотя рекомбинантный KHV в соответствии с изобретением может быть использован в качестве вакцины сам по себе (см. ниже), просто для того, чтобы предохранить рыбу, более конкретно карпа, еще более конкретно *Cyprinus carpio carpio* или *Cyprinus carpio* *koï*, от заболевания KHV, он также может быть эффективно использован в качестве вируса-носителя для гетерологичного (т.е. не из KHV) фрагмента ДНК. В этом случае преимущественные характеристики рекомбинантного KHV в соответствии с изобретением будут полностью использованы, и в дополнение вирус, например, получит дополнительные свойства, такие как маркерные свойства, дополнительные иммунизирующие свойства или свойства адъюванта.

"Маркерные свойства" в этом смысле означает, что фрагмент гетерологичной ДНК позволяет напрямую или не напрямую устанавливать различия между инфекцией полевым вирусом или инфекцией вакцинным вирусом. Прямой путь для установления

различия между инфекцией полевым вирусом и инфекцией вакцинным вирусом, например, содержит ПЦР с применением праймеров, которые специфически реагируют с гетерологичным (т.е. не из КНВ) фрагментом ДНК в рекомбинантном КНВ в соответствии с изобретением, и не реагируют с ДНК полевого вируса КНВ.

5 Непрямой путь установления различия между инфекцией полевым вирусом и инфекцией вакцинным вирусом будет, например, содержать иммунологическую реакцию с применением антитела, которое специфически реагирует с иммуногенным белком, кодируемым гетерологичным (т.е. не из КНВ) фрагментом ДНК в рекомбинантном КНВ в соответствии с изобретением, и не реагирует ни с каким белком полевого вируса КНВ.

10 Таким образом, другой вариант осуществления данного изобретения относится к рекомбинантному КНВ в соответствии с изобретением, который содержит гетерологичный ДНК фрагмент, например гетерологичный ген.

Предпочтительно, такой гетерологичный фрагмент ДНК является гетерологичным геном, который кодирует иммуногенный белок другого вируса или микроорганизма, 15 который является патогенным для рыбы, более конкретно карпа, еще более конкретно *Cyprinus carpio carpio* или *Cyprinus carpio koi*. Более предпочтительно, гетерологичный ген является G гликопротеином рабдовируса, вызывающим весеннюю виремию карпа. Такие конструкции при применении в вакцине будут не только защищать карпа от КНВ, 20 но также от весенней виремии карпа.

Подходящие промоторы для экспрессии гетерологичных генов в эукариотических клетках широко известны в данной области. Примером подходящего промотора для экспрессии гетерологичного гена, например, G гликопротеина рабдовируса, вызывающего весеннюю виремию карпа, является промотор HCMV IE.

25 Настоящее изобретение дополнительно относится к способу продуцирования инфекционных частиц рекомбинантного герпесвируса кои (КНВ), включающему стадии:

(а) введения рекомбинантного КНВ в соответствии с изобретением или рекомбинантной ДНК КНВ, содержащих геном рекомбинантного КНВ в соответствии с изобретением, в пермиссивные эукариотические клетки и

30 (b) культивирования клетки-хозяина для продуцирования рекомбинантного герпесвируса кои (КНВ).

Из-за их аттенуированного характера вышеупомянутые рекомбинантные герпесвирусы кои в соответствии с изобретением и их ДНК являются весьма подходящими для иммунизации рыбы, предпочтительно индивидуумов *Cyprinus carpio carpio* или *Cyprinus carpio coi*, инъекцией, или бальнеотерапией, или перорально. 35

Следовательно, еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к рекомбинантному герпесвирусу кои в соответствии с изобретением и/или ДНК КНВ, содержащим геном рекомбинантного герпесвируса кои в соответствии с изобретением, для применения в профилактике и/или терапевтическом лечении заболевания у рыбы, 40 вызванного герпесвирусом кои (КНВ).

Профилактическое применение представляет собой применение, которое направлено на предотвращение инфекции или по меньшей мере клинических проявлений заболеваний.

Терапевтическое применение представляет собой применение указанного КНВ или ДНК КНВ по отношению к рыбе, которая уже страдает заболеванием, вызываемым КНВ. 45

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к рекомбинантному герпесвирусу кои в соответствии с изобретением и/или ДНК КНВ,

содержащим геном рекомбинантного герпесвируса кои в соответствии с изобретением, для применения в вакцине для профилактики и/или терапевтического лечения у рыбы заболевания, вызываемого герпесвирусом кои (KHV).

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к вакцине для профилактики и/или терапевтического лечения у рыбы заболевания, вызываемого герпесвирусом кои (KHV), отличающейся тем, что указанная вакцина содержит рекомбинантный герпесвирус кои в соответствии с изобретением и/или ДНК KHV, содержащие геном рекомбинантного герпесвируса кои в соответствии с изобретением, и фармацевтически приемлемый носитель.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к вакцине для профилактики и/или терапевтического лечения у рыбы заболевания, вызываемого рабдовирусом, вызывающим весеннюю виремию карпов, причем эта вакцина содержит рекомбинантный KHV в соответствии с изобретением, несущий ген, кодирующий G гликопротеин указанного рабдовируса, вызывающего весеннюю виремию карпов, или последовательность ДНК, содержащую геном указанного рекомбинантного KHV, и фармацевтически приемлемый носитель.

В используемом в настоящем описании значении термин "вакцина" относится к композиции, способной к профилактике и/или терапевтическому лечению хозяина от конкретного заболевания. Такая вакцина может продуцировать профилактическую или терапевтическую устойчивость.

Фармацевтически приемлемый носитель может являться простой водой или буфером. Фармацевтически приемлемый носитель может также содержать стабилизаторы. Он может также содержать адъювант, или может сам являться адъювантом.

Обычно вакцины готовят в виде жидких растворов, эмульсий или суспензий для инъекции или доставки посредством погружения рыбы в воду. К примеру, жидкая эмульсия или эмульгируемый концентрат могут быть приготовлены для того, чтобы добавить их в резервуар с водой или ванну, где содержится рыба. Твердые (например, порошок) формы, подходящие для растворения, или суспензии в жидких основах или для смешивания с твердой едой перед введением, также могут быть приготовлены.

Вакцина может являться лиофилизированной культурой в готовой к использованию форме для воссоздания со стерильным разбавителем. К примеру, лиофилизированные клетки могут быть воссозданы в 0,9% солевом растворе (необязательно предоставленном в виде части упакованного вакцинного продукта). Предпочтительной рецептурой инъектируемой вакцины является эмульсия. Жидкие или воссозданные формы вакцины могут быть разбавлены в маленьком объеме воды (например, от 1 до 100 объемов) перед введением в шприц, резервуар или ванну.

В одной предпочтительной форме этого варианта осуществления препарат вакцины, содержащий рекомбинантный KHV штамм, представлен в сухой форме, например в порошкообразной форме, лиофилизованной форме, в форме прессованной пластинки или в форме таблетки и т.д.

В другой форме этого варианта осуществления указанный вирус может быть в форме культуральной тканевой текучей среды. Указанная текучая среда может храниться в окружающих условиях, предпочтительно при -70°C , наиболее предпочтительно в виде раствора, содержащего глицерин. В одном конкретном примере тканевая культуральная текучая среда содержит 20% глицерина.

Рекомбинантный KHV штамм, раскрытый в изобретении, может быть преобразован в сухую форму рядом способов. Особенно предпочтительной формой высушивания является лиофилизация. Перед высушиванием, например, процедурой лиофилизации,

разнообразные ингредиенты могут быть добавлены в среду, такие как консерванты, антиоксиданты или восстанавливающие агенты, разнообразные вспомогательные вещества и т.д. Такие вспомогательные вещества также могут быть добавлены к сухому, например, лиофилизированному вирусу с аттенуированной активностью также после

5 стадии высушивания.

Когда рекомбинантный KHV в соответствии с изобретением используют в качестве компонента вакцины для перорального введения (например, посредством погружения или бальнеотерапии), обычно не будет необходимости введения адъюванта.

Если, однако, препарат вакцины инъецируют напрямую в организм рыбы, применение адъюванта является необязательным. Если рекомбинантный KHV в соответствии с изобретением имеет нереплицирующуюся форму, то добавление иммуностимуляторов может быть предпочтительным.

В целом, для того, чтобы усилить иммунный ответ, препарат может содержать разнообразные адъюванты, цитокины или другие иммуностимуляторы, в особенности в случае, если препараты предназначены для инъекции.

Адъювант представляет собой иммуностимулирующее вещество, усиливающее иммунный ответ хозяина неспецифическим образом. Адъювант может являться гидрофильным адъювантом, например гидроксидом алюминия или ортофосфатом алюминия, или гидрофобным адъювантом, например адъювантами на основе минерального масла. Адъюванты, такие как мурамилдипептид, авидин, гидроксид алюминия, ортофосфат алюминия, масла, масляные эмульсии, сапонины, декстрансульфат, глюкозаны, цитокины, блок-сополимеры, иммуностимулирующие олигонуклеотиды и другие известные в данной области, могут быть смешаны с рекомбинантным KHV в соответствии с изобретением. Примерами адъювантов, часто применяемых в выращивании рыбы, являются мурамилдипептиды, липополисахариды, некоторые глюкозаны и гликаны и Карбопол® (гомополимер). Подходящими адъювантами являются, например, вода в масляных (в/м) эмульсиях, м/в эмульсии и в/м/в двойные эмульсии. Масляными адъювантами, подходящими для применения в в/м эмульсии, являются например, минеральные масла или метаболизируемые масла. Минеральные масла представляют собой, например, Bayol®, Marcol® и Drakeol®; метаболизируемые масла представляют собой, например, растительные масла, такие как арахисовое масло и соевое масло, или животные масла, такие как рыбы масла, сквалан и сквален. Альтернативно, солюбилизованный витамин Е (токоферол), как описано в EP 382271, может быть преимущественно применен. Особенно подходящие м/в эмульсии, например, могут быть получены, начиная от 5-50% мас./мас. водной фазы и 95-50% мас./мас. масляного адъюванта, более предпочтительно применяется 20-50% мас./мас. водной фазы и 80-50% мас./мас. масляного адъюванта. Количество добавленного адъюванта зависит от природы самого адъюванта и информации относительно таких количеств, предоставленной производителем.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением дополнительно содержит стабилизатор. Стабилизатор может быть добавлен к вакцине в соответствии с изобретением, например, для защиты от разрушения, для увеличения срока хранения или для улучшения эффективности замораживанием-высушиванием. Пригодными стабилизаторами являются в числе прочих SPGA (Bovarnik et al., 1950, J. Bacteriology, vol. 59, p. 509), сепарированное молоко, желатин, бычий сывороточный альбумин, углеводы, например сорбит, маннит, трегалоза, крахмал, сахароза, декстран или глюкоза, лактозы, белки, такие как альбумин, или казеин, или продукты их разрушения, и буферы, такие как фосфаты щелочных металлов.

Антибиотики, такие как неомицин и стрептомицин, могут быть добавлены для предотвращения потенциального роста микроорганизмов.

В добавление, вакцина может содержать одно или более подходящих поверхностно-активных соединений или эмульгаторов, например Span® или Tween®. Вакцина может также содержать так называемый "носитель". Носитель представляет собой соединение, к которому KHV вирус (или в форме вирусной частицы, или в форме ДНК) в соответствии с изобретением присоединяется, не связываясь с ним ковалентно. Такими основами в числе прочего являются биомикрокапсулы, микроальгинаты, липосомы и макрозоли, известные в данной области. Специальной формой такого носителя является Иском. Совершенно очевидно, что примешивание других стабилизаторов, носителей, разбавителей, эмульсий и подобного к вакцинам в соответствии с изобретением также попадает в объем данного изобретения. Такие добавки, к примеру, описаны в хорошо известных руководствах, таких как: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), and: "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN: 0444819681).

Рекомбинантный KHV при применении в его сухой форме в вакцине может дополнительно содержать текучую среду воссоздания, предпочтительно стерильную воду, солевой раствор или физиологический раствор. Он также может включать небольшие количества остаточных материалов из процесса производства, таких как клеточные белки, ДНК, РНК и т.д. Хотя эти материалы не являются добавками сами по себе, они могут, тем не менее, быть представлены в составе вакцины.

Вакцина может быть введена рыбе индивидуально перорально, например, с кормом или посредством принудительного перорального введения, или посредством инъекции (например, через внутримышечный или внутрибрюшинный путь).

Альтернативно, вакцина может быть введена одновременно всей популяции рыбы, содержащейся в водном объеме распылением, растворением и/или иммерсией вакцины. Эти способы применимы для вакцинации всех типов рыбы, например пищевая и декоративная рыбы, и в разнообразных условиях окружающей среды, таких как пруды, аквариумы, естественная среда обитания и резервуары со свежей водой.

Дополнительный вариант изобретения относится к ДНК-вакцине, содержащей рекомбинантный KHV в соответствии с изобретением.

ДНК-вакцины в соответствии с изобретением по существу не отличаются от вакцин, содержащих рекомбинантный KHV в соответствии с изобретением, в том смысле, что они содержат геном рекомбинантного KHV в соответствии с изобретением.

Они легко могут быть введены посредством внутрикожного введения, например, с применением безыгольного впрыскивателя, такого как GeneGun®. Этот путь введения доставляет ДНК напрямую в клетки животного, которое должно быть вакцинировано. Предпочтительное количество рекомбинантной ДНК KHV в соответствии с изобретением в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением (как приведено ниже) находится в диапазоне между 10 пг и 1000 мкг. Предпочтительно применяются количества в диапазоне между 0,1 и 100 мкг. Альтернативно, рыба может быть погружена в растворы, содержащие например, между 10 пг и 1000 мкг/мл ДНК, которая должна быть введена. Все эти технологии и пути введения хорошо известны в данной области.

Предпочтительно, вакцину в соответствии с изобретением составляют в форме, подходящей для вакцинации инъекцией или иммерсией, такой как суспензия, раствор, дисперсия, эмульсия и тому подобное.

Схема дозирования для введения вакцины в соответствии с изобретением в целевой

организм может являться внесением единичной или множественных доз, которые могут быть введены в одно и то же время или последовательно образом, совместимым с дозировкой и рецептурой, и в таком количестве, которое будет иммунологически эффективно. В компетенции специалиста в данной области определение того, является ли лечение "иммунологически эффективным", к примеру, введением испытательной стимулирующей инфекции вакцинированным животным, и последующим определением у целевых животных клинических признаков заболевания, серологических параметров или измерением повторного выделения патогена.

То, что составляет "фармацевтически эффективное количество" для вакцины в соответствии с изобретением, которая основана на рекомбинантном КНВ или рекомбинантной ДНК КНВ в соответствии с изобретением, зависит от требуемого эффекта и от целевого организма. Определение эффективного количества является базовым навыком рядового специалиста. Предпочтительное количество рекомбинантной ДНК КНВ в соответствии с изобретением, содержащееся в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением, было описано выше.

Предпочтительное количество живой вакцины, содержащей штамм рекомбинантного КНВ вируса в соответствии с изобретением, выражено, к примеру, в виде бляшкообразующих единиц (БОЕ). К примеру, для живого вирусного вектора диапазон доз между 1 и 10^{10} бляшкообразующих единиц (БОЕ) в расчете на дозу на животное может быть преимущественно применен; предпочтительно диапазон между 10^2 и 10^6 БОЕ/доза. Многие пути введения могут быть применены, все из которых известны в данной области. Вакцины в соответствии с изобретением предпочтительно вводятся рыбе посредством инъекции (внутримышечный или внутрибрюшинный путь), иммерсии, погружения или перорально. Протокол для введения может быть оптимизирован в соответствии со стандартной практикой вакцинации.

Если вакцина содержит нерепликативную форму рекомбинантного КНВ в соответствии с изобретением, доза будет выражена в виде количества частиц нерепликативного вируса, которое должно быть введено. Тогда доза обычно будет немного выше, чем при введении частиц живого вируса, из-за того, что частицы живого вируса реплицируются до некоторой степени в целевом животном, перед тем как они удаляются иммунной системой. Для вакцин на основе частиц нерепликативного вируса количество частиц вируса в диапазоне приблизительно от 10^4 до 10^9 частиц обычно будет являться подходящим.

Предпочтительно, вакцина вводится посредством иммерсии, особенно, когда применяют живой рекомбинантный КНВ в соответствии с изобретением. Это является особенно эффективным в случае применения таких вакцин в установке для промышленного выращивания в воде.

Описание фигур

Фиг. 1: схематическое представление области генома СуНВ-3, охватывающей ORF57. Указаны координаты ATG и стоп-кодона каждого ORF (в соответствии с номером доступа в Genbank NC_009127). Представлены координаты предполагаемых промоторов (P), идентифицированных анализами компьютерной симуляции в или близко к ORF56 и ORF57. Число после буквы P идентифицирует ORF под контролем идентифицированной промоторной последовательности. Наверху представлены выбранные последовательности, которые должны быть делетированы для того, чтобы сделать ORF56 и/или ORF57 недействующими. Указаны координаты делеций.

Фиг. 2, 3: схема последовательности стадий, выполненных для продуцирования

рекомбинантных плазмид FL BAC galK, делетированных по ORF57 (фиг. 2) или ORF56 (фиг. 3), и для демонстрации воссоздания инфекционного вируса из продуцированных плазмид. Области ORF57 или ORF56, как идентифицировано на фиг. 1, были замещены экспрессионной кассетой galK с применением гомологичной рекомбинации в *E. coli*.

5 Для воссоздания инфекционного вируса с локусом тимидинкиназы (ТК) дикого типа (ревертантные штаммы FL BAC) рекомбинантные плазмиды котрансфицировали в перmissive клетки ССВ с рGEMT-ТК плазмидой. Для воссоздания инфекционного вируса с укороченной формой ТК (усеченные штаммы FL BAC) рекомбинантные плазмиды трансфицировали в клетки ССВ, экспрессирующие рекомбиназу Cre.

10 Фиг. 4: схема последовательности стадий, выполненных для продуцирования рекомбинантных плазмид FL BAC, делетированных по ORF57 и ORF56 (ORF56-57), и для демонстрации воссоздания инфекционного вируса из продуцированных плазмид. Область ORF56-57, как идентифицировано на фиг. 1, замещали экспрессионной кассетой galK с применением гомологичной рекомбинации в *E. coli*. Экспрессионную кассету galK затем удаляли гомологичной рекомбинацией с синтетической последовательностью ДНК, соответствующей областям генома KHV, фланкирующим экспрессионную кассету galK (ORF56-57 кассета Del). Для воссоздания инфекционного вируса с локусом тимидинкиназы (ТК) дикого типа (ревертантные штаммы FL BAC) рекомбинантную плазмиду котрансфицировали в перmissive клетки ССВ с плазмидой рGEMT-ТК.

15 Для воссоздания инфекционного вируса с укороченной формой ТК (усеченные штаммы FL BAC) рекомбинантную плазмиду трансфицировали в клетки ССВ, экспрессирующие рекомбиназу Cre.

Фиг. 5: тесты безопасности (A-D) и вакцинации/стимуляции (E-G) рекомбинантов ORF57 с одной делецией. Безопасность FL BAC, усеченного по ORF57 Del 1 galK (A), и FL BAC, усеченного по ORF57 Del 2 galK (B), штаммов тестировали, как описано в примерах (Тесты безопасности) на обычном карпе (возрастом 7 месяцев, средняя масса 3,74 г, n=20). Усеченный штамм FL BAC (C) и имитирующую инфекцию (D) применяли в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем 0 в качестве исходного. Через шесть недель после инфекции рекомбинантами ORF57 с одиночной делецией (E и F) рыбу стимулировали, как описано в примерах (вакцинация/стимуляция). Имитированно инфицированных рыб применяли в качестве контролей (G). Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем 42 в качестве исходного.

35 Фиг. 6: безопасность рекомбинантов ORF56 с одиночной делецией.

Безопасность FL BAC, усеченных по ORF56 Del 1 galK (A), и FL BAC, усеченных по ORF56 Del 2 galK (B), штаммов тестировали, как описано в примерах (Тесты безопасности) на обычном карпе (возраст 7 месяцев, средняя масса 3,74 г, n=20). FL BAC усеченный штамм (C) и имитирующую инфекцию (D) применяли в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем 0 в качестве исходной точки.

Фиг. 7: тесты безопасности (A-C) и вакцинации/стимуляции (D-G) штамма FL с усеченной BAC ORF56-57 Del. Безопасность штамма FL с усеченной BAC ORF56-57 De (B) тестировали, как описано в примерах (Тесты безопасности) на обычном карпе (возраст 7 месяцев, средняя масса 4,41 г, n=30). Штамм FL с усеченной BAC (A) и имитирующую инфекцию (C) применяли в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Имитирующую инфекцию выполняли на дублированных

группах. Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем 0 в качестве исходного.

Тесты вакцинации/стимуляции (D-G). Рыб (n=15), вакцинированных штаммом FL с усеченной BAC ORF56-57 Del стимулировали KHV FL штаммом через 3 недели (D) или 6 недель (F) после вакцинации, как описано в примерах (вакцинация/стимуляция). Дублированные группы имитированно инфицированных рыб применяли в качестве контролей (E и G). Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем стимуляции в качестве исходного.

Фиг. 8: тесты безопасности (A-C) и вакцинации/стимуляции (D-G) штамма FL с ревертантной BAC ORF56-57 Del. Безопасность штамма FL с ревертантной BAC ORF56-57 Del (B) тестировали, как описано в примерах (Тесты безопасности) на обычном карпе (возраст 7 месяцев, средняя масса 3,74 г, n=30). FL BAC ревертантный штамм (A) и имитирующую инфекцию (C) применяли в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Имитирующую инфекцию выполняли на дублированных группах. Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем 0 в качестве исходной точки.

Тесты вакцинации/стимуляции (D-G). Рыб (n=15), вакцинированных штаммом FL с ревертантной BAC ORF56-57 Del, стимулировали FL штаммом KHV через 3 недели (D) или 6 недель (F) после вакцинации, как описано в примерах (вакцинация/стимуляция). Дублированные группы имитированно инфицированной рыбы применяли в качестве контролей (E и G). Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем стимуляции в качестве исходной точки.

Примеры:

а) Клетки и вирусы. Клетки мозга *Cyprinus carpio* (CCB) (Neukirch et al., 1999) культивировали в минимальной поддерживающей среде (MEM, Invitrogen), содержащей 4,5 г/л глюкозы (моногидрат D-глюкозы, Merck) и 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS). Клетки культивировали при 25°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Штамм FL CyHV-3 выделяли из почки рыбы, которая умерла от KHV (CER Marloie, Belgium).

б) Плазмида BAC CyHV-3. Плазмиду BAC FL CyHV-3 применяли в качестве родительской плазмиды для продуцирования рекомбинантов CyHV-3. Эта плазида была подробно описана в Costes et al. (2008) и в международной заявке на патент WO 2009/027412. Плазида BAC FL CyHV-3 представляет собой клон инфекционной искусственной бактериальной хромосомы (BAC) генома штамма FL CyHV-3. В этой плазмиде loxP-фланкированная BAC кассета встроена в ТК locus CyHV-3 (ORF55).

с) Продуцирование рекомбинантных плазмид FL BAC ORF 57 CyHV-3 с применением galK положительной селекции в бактериях. Две рекомбинантные плазмиды FL BAC CyHV-3 с делецией в локусе ORF57 (см. ORF57 Del 1 и ORF57 Del 2 на фиг. 1) продуцировали с применением galK положительной селекции в бактериях, как описано ранее (Warming et al., 2005) (фиг. 2). Рекомбинационный фрагмент состоял из гена галактокиназы (galK) (1231 п.о.), фланкированного последовательностями из 50 п.о., гомологичными областям генома CyHV-3, фланкирующим последовательность, которая должна быть делетирована (фиг. 1).

Эти фрагменты продуцировали посредством ПЦР, применяя вектор pgalK в качестве матрицы. Для амплификации применяли следующие праймеры (см. таблицу 1, последовательность праймера): для продуцирования делеции ORF57 Del 1: праймеры ORF57 Dell fw и ORF57 Dell rev, приводящие к ампликону ORF57 Del 1-galK; для продуцирования делеции ORF57 Del 2: праймеры ORF57 Del2 fw и ORF57 Del2 rev,

приводящие к ампликону ORF57 Del 2-galK. Продукт амплификации очищали (QIAquick Gel Extraction Kit). Затем электрокомпетентные клетки SW102, содержащие плазмиду FL BAC CyHV-3, электропорировали с 50 нг продуктов ПЦР, описанных выше.

Электропорированные клетки высевали на чашки на твердую минимальную среду М63, дополненную 20% галактозой и хлорамфениколом 17 мкг/мл, для отбора бактерий, в которых произошла гомологичная рекомбинация. В заключение, полученные колонии высевали штрихом на индикаторные планшеты МакКонки, как описано в другом месте, для подтверждения продуцирования galK положительных клонов.

Рекомбинантные молекулы BAC амплифицировали и очищали (QIAGEN Large-Construct Kit), и их молекулярную структуру контролировали с применением комбинированного подхода рестрикция эндонуклеаза - Саузерн-Блоттинг, ПЦР и секвенирования.

Таблица 1

Олигонуклеотиды, применяемые для амплификации ПЦР

Праймер	Последовательность	п.о.	Координаты подчеркнутой последовательности в соответствии с номером доступа в Genbank. NC_009127
---------	--------------------	------	---

ORF57 Del1 fw	5'- <u>CGTACAGGGTGGCGGTGCACCT</u> <u>GTCCCGAAGGCCTTCACCGCCT</u> <u>GGGAGCTCCCTGTTGACAATTA</u> ATCATCGGCA-3'	77 п.о.	99551-99599
ORF57 Del1 rev	5'- <u>CGGCTCATCATCTGCGGGTCCA</u> <u>TCCAGGCGCCCTTGCCCCACAG</u> <u>CAGAGCTTCAGCACTGTCCTGC</u> TCCTT-3'	71 п.о.	99743-99694
ORF57 Del2 fw	5'- <u>CTTTGTGCTGCACAAGGGCTTC</u> <u>AACCACCACTACGCCTTCTGCG</u> <u>ATCACCCCTGTTGACAATTAAT</u> CATCGGCA-3'	74 п.о.	99894-99943
ORF57 Del2 rev	5'- <u>CTGAGCGTTGTTGAAGGCCTCC</u> <u>ATCAGGTGCTGCCTGATCTGCT</u> <u>TGTGCAGAGCTCAGCACTGTCC</u> TGCTCCTT-3'	74 п.о.	100161-100112

*Праймеры представляют последовательности, гомологичные СуНВ-3 геному (подчеркнутые последовательности) и экспрессионной кассете galk.

d) Воссоздание инфекционного вируса из рекомбинантной плазмиды FL BAC ORF 57 СуНВ-3. Плазмиды BAC СуНВ-3 трансфицировали (Lipofectamine Plus, Invitrogen) в пермиссивные ССВ. Для продуцирования плазмиды BAC полученные штаммы с локусом ТК дикого типа, плазмиды BAC СуНВ-3 котрансфицировали в клетки ССВ вместе с вектором pGEMT-ТК (молекулярное соотношение 1:75). Через семь дней после трансфекции вирусные бляшки, негативные в отношении EGFP экспрессии (BAC кассета кодирует EGFP экспрессионную кассету), отбирали и обогащали тремя последовательными раундами очистки бляшек. Подобным образом для воссоздания вирионов с усеченной BAC кассетой из вирусного генома плазмиды BAC котрансфицировали в клетки ССВ вместе с вектором pEFIN3-NLS-Cre, кодирующим рекомбиназу Cre, слитую с сигналом ядерной локализации (Costes et al.; 2008 JVI) (молекулярное соотношение: 1:70).

е) Продуцирование рекомбинантных плазмид ORF 56 СуНВ-3 FL BAC с применением galk положительной селекции в бактериях. Две рекомбинантные плазмиды FL BAC СуНВ-3 с делецией в локусе ORF56 (см. ORF56 Del 1 и ORF56 Del 2 на фиг. 1) продуцировали с применением galk положительной селекции в бактериях, как описано

ранее (Wanning et al., 2005) (фиг. 3). Рекомбинационный фрагмент состоял из гена галактокиназы (galK) (1231 п.о.), фланкированного последовательностями из 50 п.о., гомологичными области фланкирующей последовательности генома СуHV-3, которая должна быть делетирована (фиг. 1). Эти фрагменты продуцировали посредством ПЦР с применением вектора pgalK в качестве матрицы. Применяли следующие праймеры для амплификации (см. таблицу 2 для последовательности праймера): для продуцирования делеции ORF56 Del 1: праймеры ORF56 Del1 fw и ORF56 Del1 rev, приводящие к ампликону ORF56 Del 1-galK; для продуцирования делеции ORF56 Del 2: праймеры ORF56 Del2 fw и ORF56 Del2 rev, приводящие к ампликону ORF56 Del 2-galK. Продукт амплификации очищали (QIAquick Gel Extraction Kit). Затем электрокомпетентные клетки SW102, содержащие плазмиду СуHV-3 FL BAC, электропорировали с 50 нг продуктов ПЦР, описанных выше. Электропорированные клетки высевали на чашки на твердую минимальную среду M63, дополненную 20% галактозой и хлорамфениколом (17 нг/мл), для отбора бактерий, в которых произошла гомологичная рекомбинация. В заключение, полученные колонии высевали штрихом на индикаторные планшеты МакКонки, как описано в другом месте, для подтверждения продуцирования galK положительных клонов. Рекомбинантные молекулы BAC амплифицировали и очищали (QIAGEN Large-Construct Kit), и их молекулярную структуру контролировали с применением комбинированного подхода рестрикция эндонуклеаза-Саузерн-Блоттинг, ПЦР и секвенирования.

Таблица 2

Олигонуклеотиды, применяемые для амплификации ПЦР

Праймер	Последовательность *	п.о.	Координаты подчеркнутой последовательности в соответствии с номером доступа в Genbank. NC_009127
ORF56 Del1 fw	5'- TCAGGATCGAGGTCACCAGCTTG AGCTTCTCGGGCATGTACTCGCG CCACCCTGTTGACAATTAATCAT CGGCA-3'	74 п.о.	97475-97524
ORF56 Del1 rev	5'- CGGCGAGGTGATTTTCGGTCATGA GCAAATCGATTGCGGCCGAACAG CAGCTCAGCACTGTCCTGCTCCT T-3'	70 п.о.	98361-98312

5	ORF56 Del12 fw	5' -	74 п.о.	97275-97324
		<u>GATCGGGTACGT</u> CGGCGTGCGCC		
		<u>ACTTGACCTTCCTCAACGTCCCC</u>		
		<u>GTCACCTGTTGACAATTAATCAT</u>		
		CGGCA-3'		
10	ORF56 Del12 rev	5' -	70 п.о.	98561-98512
		<u>GCGCACACCATCACCATCTGTCC</u>		
		<u>CATGTCTCCCCAACGCTACACCG</u>		
		<u>TGACTCAGCACTGTCCTGCTCCT</u>		
		T-3'		

15 *Праймеры представляют последовательности, гомологичные геному
 CyHV-3 (подчеркнутые последовательности) и экспрессионной
 кассете galK.

20 f) Воссоздание инфекционного вируса из рекомбинантной плазмиды ORF 56 CyHV-3
 FL BAC.

25 Плазмиды CyHV-3 BAC трансфицировали (Lipofectamine Plus, Invitrogen) в
 пермиссивные ССВ. Для продуцирования полученных из плазмиды BAC штаммов с
 локусом ТК дикого типа плазмиды BAC CyHV-3 котрансфицировали в клетки ССВ
 вместе с вектором pGEMT-ТК (молекулярное соотношение 1:75). Через семь дней после
 трансфекции вирусные бляшки, негативные по EGFP экспрессии (BAC кассета кодирует
 30 EGFP экспрессионную кассету), отбирали и обогащали тремя последовательными
 раундами очистки бляшек. Подобным образом, для воссоздания вирионов с усеченной
 BAC кассетой из вирусного генома, плазмиды BAC котрансфицировали в клетки ССВ
 вместе с вектором pEFIN3-NLS-Cre, кодирующим рекомбиназу Cre, слитую с сигналом
 35 ядерной локализации (Costes et al.; 2008 JVI) (молекулярное соотношение: 1:70).

g) Продуцирование рекомбинантных плазмид ORF56-57 CyHV-3 FL BAC с
 применением galK положительной и отрицательной селекции в бактериях.
 Рекомбинантные плазмиды FL BAC CyHV-3 с делецией в локусах ORF56 и ORF57 (фиг.
 1) продуцировали с применением galK положительной и отрицательной селекции в
 35 бактериях, как описано ранее (Warming et al., 2005) (фиг. 4). Первый рекомбинационный
 процесс (galK положительная селекция) осуществляли для замещения
 идентифицированной последовательности ORF56 и ORF57 геном галактокиназы (galK)
 (1231 п.о.). Рекомбинационный фрагмент состоял из гена galK, фланкированного
 последовательностями из 50 п.о., гомологичными области генома CyHV-3,
 40 фланкирующей последовательность, которая должна быть делетирована (фиг. 1) (ORF56-
 57 Del galK, фиг. 4). Этот фрагмент продуцировали посредством ПЦР с применением
 праймеров ORF56-ORF57 Del fw и ORF56-ORF57 Del rev (Таблица 3) и вектора pgalK в
 качестве матрицы. Продукт амплификации очищали (QIAquick Gel Extraction Kit). Затем
 электрокомпетентные клетки SW102, содержащие плазмиду CyHV-3 FL BAC,
 45 электропорировали с 50 нг продукта ПЦР, описанного выше. Электропорированные
 клетки высевали на чашки на твердую минимальную среду M63, дополненную 20%
 галактозой и хлорамфениколом (17 мкг/мл), для отбора бактерий, в которых произошла
 гомологичная рекомбинация. В заключение, полученные колонии высевали штрихом

на индикаторные планшеты МакКонки, как описано в другом месте, для подтверждения продуцирования galK положительных клонов. Рекомбинантные молекулы ВАС амплифицировали и очищали (QIAGEN Large-Конструкция Kit), и их молекулярную структуру контролировали с применением комбинированного подхода рестрикционная эндонуклеаза-Саузерн-Блоттинг, ПЦР и секвенирования. Второй рекомбинационный процесс (galK отрицательная селекция) выполняли для удаления galK кассеты из плазмиды FL ВАС ORF56-57 Del galK. Применяли синтетический фрагмент ДНК из 499 п.о. (ORF56-57 кассета Del, см. ниже) для достижения этой цели. Он состоит из последовательности, гомологичной области генома СуНВ-3, фланкирующей последовательность, которая должна быть делетирована: 250 п.о. (координаты с 96751 по 9700, номер доступа в Genbank NC_009127) перед геном galK и 249 п.о. (координаты с 99751 по 100000 с делецией основания 99760, номер доступа в Genbank NC_009127) после гена galK. Электрокомпетентные клетки SW102, содержащие плазмиду FL ВАС ORF56-57 Del galK, электропорировали с 50 нг продукта ПЦР, описанного выше. Электропорированные клетки высевали на чашки на твердую минимальную среду, дополненную 2-деоксигалактозой, для отбора бактерий, в которых произошла гомологичная рекомбинация (расщепление 2-деоксигалактозы galK продуцирует токсичные продукты). Рекомбинантные молекулы ВАС амплифицировали и очищали (QIAGEN Large-Construct Kit), и их молекулярную структуру контролировали с применением комбинированного подхода рестрикционная эндонуклеаза-Саузерн-Блоттинг, ПЦР и секвенирования.

Кассета ORF56-57 Del:

5'-

tttgtcaaccagtcctccagggctcggttggcgctggcctccttgcccttggtcacggcgatggcagacgccacaatcctcgc
gacgggttccgtcagagcagagttcttaaacatttcgacgcctcctccgacgggtgaaccactctgaccaattcaggtcggg
gggccacgtctgcctgtgcatcatcgtctgcacagcgtccctcgacagccccagcccgacagcagtcgccactcttcct
gttgagtgcacgactcgtaagatcaagctgcttgagcgcgtcgtgtacgggttcagatggccctgcagaaggcgctgcg
cattcagaagcagggctgcaggatggtggggctcgaggacccggagaaggtggaggatatgaagaactttgtgtgca
caagggcttcaaccaccactacgccttctgcgatcaccactggcagcactgggccctgggcccgtccttcgagggcgagc
tgccccgacgtggtgg-3'

Олигонуклеотиды, применяемые для амплификации ПЦР

Праймер	Последовательность	п.о.	Координаты подчеркнутой последовательности в соответствии с номером доступа в Genbank. NC_009127
ORF56-ORF57 Del fw	5' - <u>GTCCCTCGACAGCCCCAGCCCGCAC</u> <u>AGCAGTCGCCACTCTTCCCTGTTGA</u> TCAGCACTGTCCTGCTCCTT-3'	70 п.о.	96951-97000
ORF56-ORF57 Del rev	5' - <u>AACCCGTACACGACGCGCTCAAGCA</u> <u>GCTTGATCTTGACGACGTCGTGCAC</u> CCTGTTGACAATTAATC ATCGGCA-3'	74 п.о.	99800-99751

*Праймеры представляют последовательности, гомологичные геному СуНВ-3 (подчеркнутые последовательности) и экспрессионной cassette galk.

h) Воссоздание инфекционного вируса из рекомбинантной плазмиды ORF56-57 СуНВ-3 FL ВАС. Плазмиды ВАС СуНВ-3 трансфицировали (Lipofectamine Plus, Invitrogen) в пермиссивные ССВ. Для продуцирования плазмиды ВАС, полученной из штамма с локусом ТК дикого типа, плазмиды ВАС СуНВ-3 котрансфицировали в клетки ССВ вместе с вектором рGEMT-ТК (молекулярное соотношение 1:75). Через семь дней после трансфекции вирусные бляшки, негативные по EGFP экспрессии (ВАС cassette кодирует EGFP экспрессионную cassette), отбирали и обогащали тремя последовательными раундами очистки бляшек. Подобным образом, для воссоздания вирионов, с усеченной ВАС cassette из вирусного генома, плазмиды ВАС котрансфицировали в клетки ССВ вместе с вектором рEFIN3-NLS-Cre, кодирующим рекомбиназу Cre, слитую с сигналом ядерной локализации (Costes et al.; 2008 JVI) (молекулярное соотношение: 1:70).

i) Тесты безопасности

Обычных карпов акклиматизировали в 60-литровых резервуарах при 24°C в течение 10 дней. Карпов (биомасса 50 г рыбы/л) погружали на 2 ч в воду, содержащую 4, 40 или 400 БОЕ/мл КНВ штамма, который должен быть тестирован. Контрольную группу (имитационно инфицированную) погружали в воду, в которую добавляли равный объем культуральной среды. В конце инкубационного периода рыб возвращали в большой резервуар. Вирусные инокуляты титровали перед инокулированием и обратно титровали после инокулирования для обеспечения того, чтобы дозы были эквивалентными между группами. Рыб проверяли ежедневно на клинические признаки заболевания КНВ, и

мертвых рыб удаляли.

ж) Вакцинация/стимуляция

Обычных карпов акклиматизировали в 60-литровых резервуарах при 24°C в течение 10 дней. Для вакцинации карпов (биомасса 50 г рыбы/л) погружали на 2 ч в воду, содержащую 4, 40 или 400 БОЕ/мл KHV штамма, который должен быть протестирован. В конце инкубационного периода рыбу возвращали в больший резервуар. Через 3 недели или 6 недель после вакцинации рыб стимулировали вирулентным KHV выдерживанием совместно с рыбами, инфицированными непосредственно перед их высвобождением в резервуар с вакцинированной рыбой. Этим рыб инкулировали иммерсией в воду, содержащую 300 БОЕ/мл вирулентного родительского штамма FL, в течение 2 ч. Двух инфицированных рыб выпускали в каждый резервуар, содержащий вакцинированную рыбу.

к) Результаты безопасности и стимуляции

Безопасность штаммов FL BAC, усеченного по ORF57 Del 1 galK (фиг. 5 A), и FL BAC, усеченного по ORF57 Del 2 galK (фиг. 5B), тестировали, как описано в примерах (Тесты безопасности) на обычном карпе (возраст 7 месяцев, средняя масса 3,74 г, n=20). Усеченный штамм FL BAC (фиг. 5C) и имитирующую инфекцию (фиг. 5D) применяли в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Количества процентов выживших карпов выражали в соответствии с днями после инфекции с днем 0 в качестве исходного. Через шесть недель после инфекции рекомбинантами ORF57 с одиночной делецией (фиг. 5E и F) рыб стимулировали, как описано в примерах (вакцинация/стимуляция). Имитированно инфицированных рыб применяли в качестве контролей (фиг. 5G). Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем 42 в качестве исходного.

Из фиг. 5A и B очевидно, что ORF57 делеционный мутант в соответствии с изобретением является безопасным, даже при применении по отношению к маленьким рыбам.

Также очевидно из фиг. 5E и F, что делеционный мутант KHV ORF57 в соответствии с изобретением является весьма пригодным в качестве эффективной вакцины, особенно при введении в дозе 40 БОЕ/мл или выше.

Безопасность FL BAC, усеченного по ORF56 Del 1 galK (фиг. 6A), и FL BAC, усеченного по ORF56 Del 2 galK (фиг. 6B), штаммов тестировали, как описано в примерах (Тесты безопасности) на обычном карпе (возраст 7 месяцев, средняя масса 3,74 г, n=20). Штамм FL с усеченной BAC (фиг. 6C) и имитирующую инфекцию (фиг. 6D) применяли в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Количества процентов выживших карпов выражены в соответствии с днями после инфекции с днем 0 в качестве исходного. Как очевидно из фиг. 6A и B, ORF56 делеционные мутанты демонстрируют вирулентность, которая приблизительно сопоставима с вирулентностью вируса дикого типа (Сравнение панелей A и B с панелью C).

Как видно из фиг. 7 и 8, KHV, несущий делецию в обоих ORF57 и ORF56, демонстрирует безопасность и профиль эффективности, сравнимые с KHV, несущим одиночную ORF57 делецию.

Ссылки

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

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

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

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

Dewals, B., Boudry, C., Gillet, L., Markine-Goriaynoff, N., de Leval, L., Haig, D. M. & Vanderplasschen, A. (2006). Cloning of the genome of Alcelaphine herpesvirus 1 as an infectious and pathogenic bacterial artificial chromosome. *J Gen Virol* 87, 509-17.

Gillet, L., Daix, V., Donofrio, G., Wagner, M., Koszinowski, U.H., China, B., Ackermann, M., Markine-Goriaynoff, N. & Vanderplasschen, A. (2005). Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J Gen Virol* 86, 907-17.

Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S.C., McDowell, T.S., Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Adkison, M.A. (2005). Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from Koi and common carp. *Bull. Fish. Res. Agen. Supplement* 2, 1-7.

Ilouze, M., Dishon, A. & Kotler, M. (2006). Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and Koi. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 147-56.

Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., Karlsen, O. A., Haarr, L., Minner, F., Pastoret, P. P., Fukuda, M. & Vanderplasschen, A. (2004). The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-M encoded by bovine herpesvirus 4 is not essential for virus replication despite contributing to post-translational modifications of structural proteins. *J Gen Virol* 85, 355-67.

Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. & Koszinowski, U.H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14759-63.

Morgan, R.W., Cantello, J.L. & McDermott, C.H. (1990). Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Dis* 34, 345-51.

Neukirch, M., Böttcher, K., Bunnajrakul, S. (1999). Isolation of a virus from Koi with altered gills. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 19, 221-224.

Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M. & Kotler, M. (2003). Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* 21, 4677-84.

Schroder, C., Keil, G.M., 1999. Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH(W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *The Journal of general virology* 80 (Pt 1), 57-61.

Wagner, M., Ruzsics, Z. & Koszinowski, U.H. (2002). herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol* 10, 318-24.

Warden, C., Tang, Q., Zhu, H., 2011. Herpesvirus BACs: past, present, and future. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 124595.

Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33, e36.

(57) Формула изобретения

1. Живой аттенуированный рекомбинантный герпесвирус кои (KHV), включающий геном, в котором открытая рамка считывания 56 (ORF 56) и открытая рамка считывания

57 (ORF 57) подвергнуты делеции, для применения в вакцине для профилактики у рыбы заболевания, вызываемого герпесвирусом кои (KHV).

2. Герпесвирус по п.1, причем герпесвирус является способным к репликации.

3. Герпесвирус по п.1, в котором делеция выбрана из частичных делеций открытых рамок считывания или полных делеций открытых рамок считывания.

4. Герпесвирус по п.3, в котором делеция включает частичные делеции открытых рамок считывания.

5. Герпесвирус по п.3, в котором делеция включает полные мутации открытых рамок считывания.

6. Герпесвирус по п.1, который дополнительно включает последовательность вектора бактериальной искусственной хромосомы (BAC).

7. Герпесвирус по п.6, в котором последовательность вектора BAC вырезана из генома герпесвируса, в результате чего сохранен гетерологичный фрагмент ДНК в сайте вырезания в геноме герпесвируса.

8. Герпесвирус по п.1, дополнительно включающий по меньшей мере одну дополнительную мутацию в по меньшей мере одном дополнительном гене.

9. Герпесвирус по п.8, в котором по меньшей мере один дополнительный ген выбран из группы, состоящей из гена тимидинкиназы, ORF 12: предполагаемого гена рецептора фактора некроза опухолей (ген рецептора TNF), ORF 16: предполагаемого гена сопряженного с G-белком рецептора (GPCR), ORF 134: предполагаемого гена гомолога интерлейкина 10, и ORF 140: предполагаемого гена тимидилаткиназы.

10. Герпесвирус по п.1, дополнительно включающий гетерологичный фрагмент ДНК.

11. Вектор экспрессии, включающий геном рекомбинантного герпесвируса кои (KHV) по п.1.

12. Выделенная клетка, включающая геном рекомбинантного герпесвируса кои, способная продуцировать рекомбинантный герпесвирус кои по п.1.

13. Вакцина для профилактики у рыбы заболевания, вызываемого герпесвирусом кои (KHV), содержащая эффективное количество живого рекомбинантного герпесвируса кои по п.1.

14. Вакцина по п.13, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

15. Способ профилактики у рыбы заболевания, вызываемого герпесвирусом кои (KHV), включающий введение эффективного количества вакцины по п.14.

16. Иммуногенная композиция для профилактики у рыбы заболевания, вызываемого герпесвирусом кои (KHV), содержащая фармацевтически приемлемый носитель и эффективное количество живого рекомбинантного герпесвируса кои по п.1.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Universite de Liege

<120> Рекомбинантный герпесвирус кои (КНВ) и вакцина для профилактики
Заболевания, вызываемого КНВ

<130> 23186 FF

<160> 12

<170> Patent In version 3.5

<210> 1
 <211> 77
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 1
 cgtacagggt ggcggtgcac ctgtcccaga aggccttcac cgcctgggag ctccctgttg 60
 acaattaatc atcgga 77

<210> 2
 <211> 71
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 2
 cggctcatca tctgcgggtc catccaggcg cccttgcccc acagcagagc ttcagcactg 60
 tcctgctcct t 71

<210> 3
 <211> 74
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 3
 ctttgtgctg cacaagggt tcaaccacca ctacgccttc tgcgatcacc cctgttgaca 60
 attaatcatc ggca 74

<210> 4
 <211> 74
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 4
 ctgagcgttg ttgaaggcct ccatcagggt ctgcctgac tgcttggtgca gagctcagca 60
 ctgtcctgct cctt 74

<210> 5
 <211> 74
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 5
 tcaggatcga ggccaccagc ttgagcttct cgggcattga ctgcgccac cctgttgaca 60

2

attaatcatc ggca 74

<210> 6
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 6
 cggcgagggtg atttcgggtca tgagcaaadc gattgcggcc gaacagcagc tcagcactgt 60
 cctgctcctt 70

<210> 7
 <211> 74
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 7
 gatcgggtac gtcggcgtgc gccacttgac ctccctcaac gtccccgtca cctgttgaca 60
 attaatcatc ggca 74

<210> 8
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 8
 gcgcacacca tcaccatctg tcccatgtct ccccaacgct acaccgtgac tcagcactgt 60
 cctgctcctt 70

<210> 9
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 9
 gtccctcgac agccccagcc cgcacagcag tcgccactct tcctgttgga tcagcactgt 60
 cctgctcctt 70

<210> 10
 <211> 74
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 10
 aaccsgtaca cgacgcgctc aagcagcttg atcttgacga cgtcgtgcac cctgttgaca 60
 attaatcatc ggca 74

<210> 11
 <211> 499
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус кои

<400> 11

3

```

tttgtcaacc agtcctccag ggtcggtttg gcgctggcct ccttgccctt ggtcacggcg      60
atggcagacg ccacaatcct cgcgacgggt tccgtcagag cagagttctt aaacatttcg      120
acgcctcctc cgacggtgaa cactctgac caattcaggt cggagggcca cgtctgcctg      180
tgcacatcgc tctgcacagc gtccctcgac agccccagcc cgcacagcag tcgccactct      240
tccctgttga gtgcacgact cgtcaagatc aagctgcttg agcgcgtcgt gtacgggttc      300
atgatggccc tgcagaaggc gctgcgcatt cagaagcagg gctgcaggat ggtggggctc      360
gaggaccggg agaagggtga ggatatgaag aactttgtgc tgcacaaggg cttcaaccac      420
cactacgcct tctgcgatca ccactggcag cactggggccc tgggccgctc cttcgagggc      480
gagctgcccc acgtggtgg                                     499

```

```

<210> 12
<211> 4929
<212> ДНК
<213> Герпесвирус кои

```

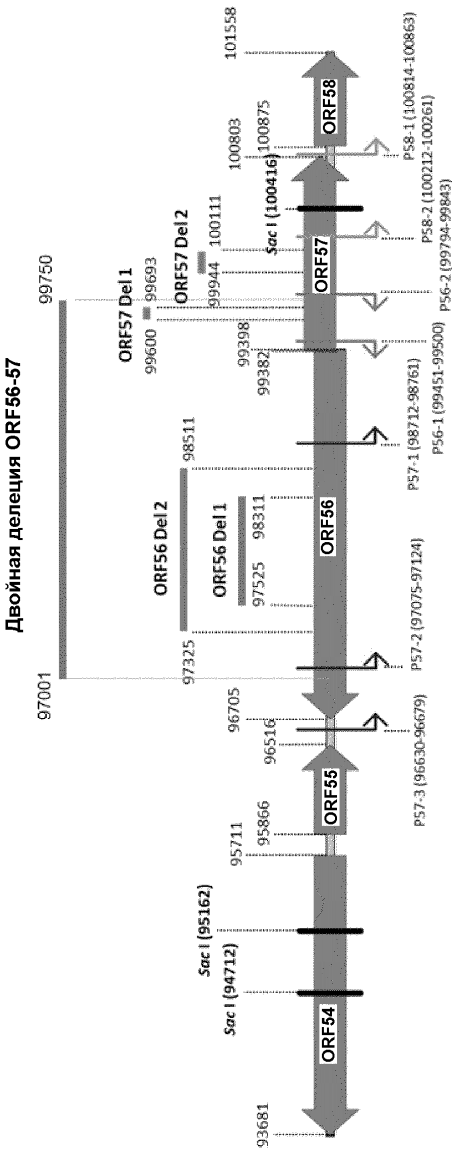
```

<400> 12
ccaatacttt aaaaaaaca ggagatatta aatatagttc aaacgtttat tgggatacac      60
acatcataca caaaatcatg tgctcaacag ttcgacgggg atggagcccg tgtgtccgta      120
ctttgtcaac cagtcctcca gggtcggttt ggogctggcc tccttgccct tggtcacggc      180
gatggcagac gccacaatcc tcgcgacggg ttccgtcaga gcagagttct taaacatttc      240
gacgcctcct ccgacggtga accactctga ccaattcagg tcggagggcc acgtctgcct      300
gtgcatcatc gtctgcacag cgtccctcga cagccccagc ccgcacagca gtgccactc      360
ttccctgttg agcggcacga acgccaacgc gtgcacccc accgtcgagg ccagcatctc      420
cgagtacatt agcgacgtct ggtcctcctg ggtaaagagg cgggtgggca cgttctcggc      480
gaagcacctc atcagcacgg tccccacggc gtgcctaaag ttttggtagg gctgcttcat      540
gtacatcttg aaaacggcgt aggcctcgtc gattgtcaca tgctgggtcca ggcgcgtgtt      600
gatggcaaaag atggcctggg acaagacggc ctgctgcggg tcctcgatcg ggtacgtcgg      660
cgtgcgccac ttgaccttc tcaacgtccc cgtcatggaa gcctcgagg gcatgtagtc      720
gacggcgcac ttgggcacga tgctcttgat ctgttcaca ctcaggcccc tgatggtgcc      780
cagggtgggc agcgcgttga tgaccctggc gaagcccgtc gccgccttca gcttgggggt      840
gacgctcagg atcgaggtca ccagcttgag cttctcgggc atgtactcgc gccacagaaa      900
gagctgcgag cagctcgcgc cgttcagaaa gctcagcatg ttcttggggg agtcagacct      960
gaggtcacac acgttcacgc tgctgtgcga cccgttcgtc accacctgct ccagagtcgt      1020
accgtcatc atgtagtgca ggatgctgc gtggtacttg ttggcgtaca tggcaatgtc      1080
cagcaggcag gccttggcac tcaccgtgca agaatcgagc aggcaccgcg acatcctctg      1140
gcacatcatg tcactcgact ctagcaccgt tctcacgtag atgtacgagc ggcaggtcat      1200

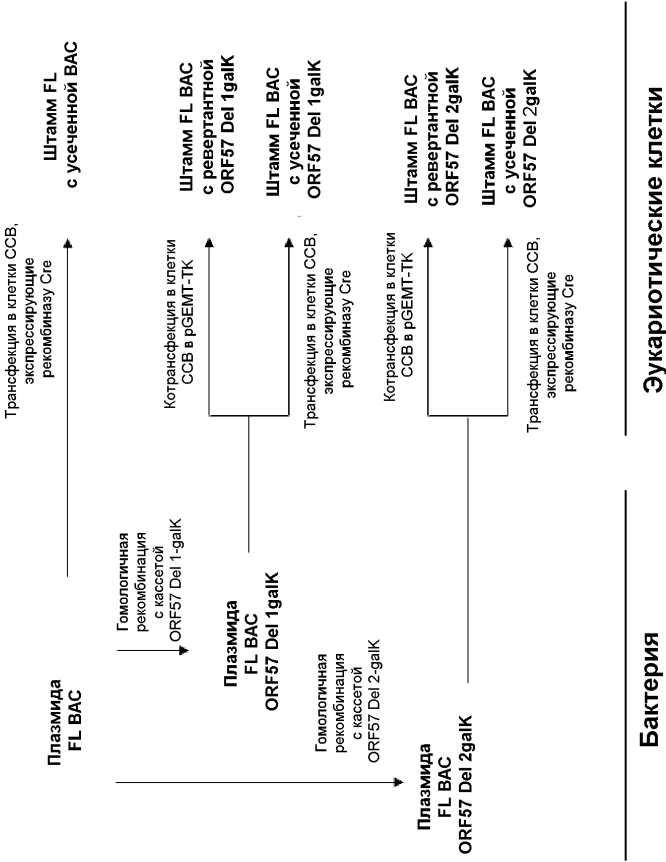
```

gggcgcactc atcacgcgtc cgacggccac cagttctgc tgcaccatct tcatcagctc 1260
 catcacgcct ttggtcttgt ggtagtcgtc ccacacgtag tggcagacca cgtcctgcag 1320
 aaactcgcag tccgatagca gctccctgaa gtgggacgg agcaccgcg tectgaaccc 1380
 ggccgcgcac gtcgcgcagt tcagcagcgc gatgtgctcc tcgctctggt cgcacttgcg 1440
 gtgggtcgga ttgggttgg gtgccgtctc tggcgccgc ttcaacgcgg gtaccttgag 1500
 gtgctgctga caaccgggtg gcctgaccgc agcttgagga gtctgagtct tctgcggagg 1560
 gtactgcgcc ttgggaacgt agatgtgagg gtgtgagagg tgaggggtcg ggtacggcgg 1620
 cgggtggcagc accagcgtct tgcctccctc gatggtgatg gtcagcttct tgggctgctg 1680
 ctgctgctgt tcggccgcaa tcgatttgc catgaccgaa atcacctgc cgtcgtcctc 1740
 atcagcctcg tcgtccgcat cgacttccat cctctcatc tcggccctca ccttctcccc 1800
 cctctctacg acccccgagg cggaggagg gttagtggtg gtgcctgagg aggacgcggt 1860
 ggaggtgac agcggagtct ccgtcacggt gtagcgttgg ggagacatgg gacagatggt 1920
 gatggtgtgc gccgtcgtgt gaggcggcag caccggcagg agcttgggag gctgaggttt 1980
 ggccgcctcc ggcgcgccc tcctgaagac gcccgctc caagttagcgg gcggcgtgtc 2040
 caccatcacg ttcacgatgg gggtcctctt ggcaaggac agaggcgcg gcctctgcgc 2100
 cgcgatggtc cacaccggcg gcaacatcct attgttgacg acggtgtccg aggcggatga 2160
 caccggacatg cacctgctca gggccaggc cctgagcatg gccctggacc cctcgtgctt 2220
 gctggtgctg gtggtgccgc cgctgcctga cagctcaga ttctcgggct cgtcaaccgt 2280
 ctccacatca atctcgtcct cctcatccgc cagggcgag acggcgccg agacggcggc 2340
 ggctgtagcc gaccggctgt tgcgcgcgt gtaggggtga tgcctctgcg tcttcttgtt 2400
 gaagatgtgc tccgagacgt gtttgttcga gatctcgatc tgcctctcga tctccttgta 2460
 cgagatcggc ttctggcgac ggcgccct gccgaggcga gtcggcaccg gactcgtgtc 2520
 gatgaccagg ttctcgtgat catctcttc ctcgggtccg ttaccgtcgt cggggacggg 2580
 tacggggttg ggtacgggtt tggcgacct gccatattt tcgttggcgt ttgcgttgg 2640
 agacatgata ttggcaaatt ttcggtctct ctgcgctaac ggagtttgt gtgacgaggg 2700
 gtgaccccg aggttcatat tccccctcga ctgggtgcga ccgcagcgc tgatggcagc 2760
 caggacatt gcgatgaac agcggggtgc tgcgggtgat ggcgcgagg acgaggaac 2820
 gaccttcgac aacagctgcg aggatctgcc cgactttgta gaggcctgcc tgacggagga 2880
 gaaccgcaag cgttacaaca tccaggacgg cgactttcct ccgtacaggg tggcggtgca 2940
 cctgtcccag aaggccttca ccgcctggga cgaggtcgac tacgggccc tggccgactg 3000
 cctgtgcgag ggtaccacc tgcaggcgt gcacactcac aagctctacg tgctggcgtg 3060
 cggcgctctg ctgtggggca agggcgctg gatggaccgc cagatgatga gccgtctcta 3120

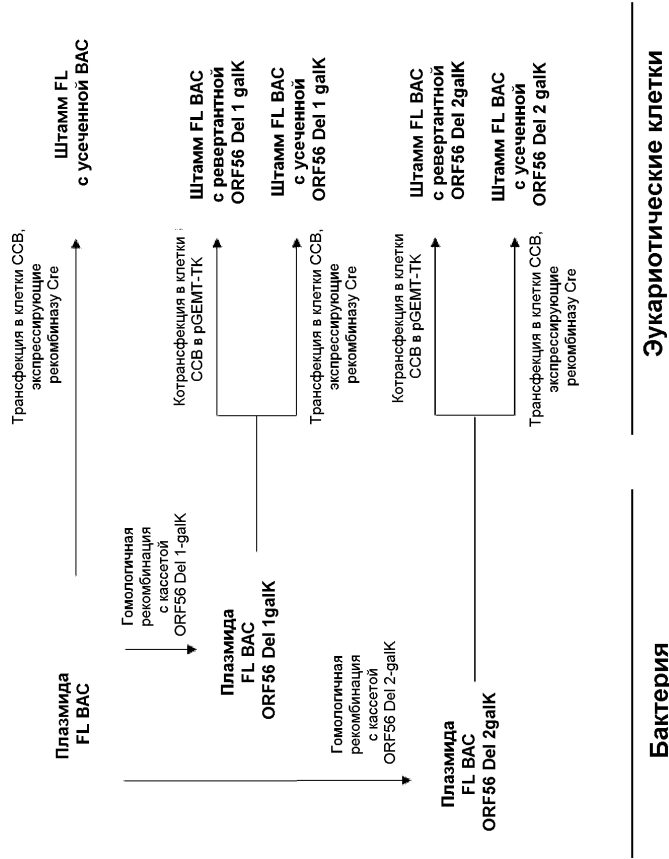
cgtgcacgac gtcgtcaaga tcaagctgct tgagcgcgtc gtgtacgggt tcatgatggc	3180
cctgcagaag gcgctgcgca ttcagaagca gggctgcagg atggtggggc tcgaggaccc	3240
ggagaagggtg gaggatatga agaactttgt gctgcacaag ggcttcaacc accactacgc	3300
cttctcgcat caccactggc agcactgggc cctgggccgc tccttcgagg gcgagctgcc	3360
cgacgtgggtg gtcaaggaga tgattagcga cggcctagcc tgcaccctgg agcgcgccgg	3420
tcccttctcg acgctggccg actggtctga gtccttcagt ctccgcgcct acccgcagcc	3480
catgcacaag cagatcaggc agcacctgat ggaggccttc aacaacgctc aggacgtcga	3540
ctttccgatg ttcaagagca gcctcaagtt cctggcctcg atgcaactgcc tctacaagac	3600
gccgcgctgg agcttcatgc ccagcgccgt caataccacc ctcgacacct tcgacgactg	3660
cgcttcgcac gtgcacgtcc tgcgccacgt cgagggccaa aacagctgcg actgtctgtg	3720
ctgccgtcgc cagggctgtc acgacgagga ctgccgtccc accgcggccc tggacgcggc	3780
cgagctccgc ggcgagggca tgtcggacga cgacgacatc gagagcgagg aggaggccct	3840
cggcgccgtc aagctggacg tgggcccgat gaagcagaag cgcattgcaga aggccatgcg	3900
ctacgcctcg gcagctgcgg cagccgacgc cgcggacggt cagaagatgt actccgtcaa	3960
agagcccaag gtggtggccg tcaaggctca gctggtgggt gtcggcgata ccgacgtccc	4020
ctcatcctcc acggcggcaa aggactgcgc ggacggcaag tgtcagggac cctgcaactg	4080
cgagcgtcct cccggccctc cgaccgacta cgacaagagg gttaaggcca agaagatcag	4140
gaagcccaag aacctacca aaaccaaacc ctaacatctc gtcactcac tcaccaataa	4200
aaaaagtcag agtctagtat tgtagtggtg tgtttttatt gtttcatgtt tcaaacaagt	4260
acgacagtga aagagttaac aaaatgtgat cggagggttc ttggtgatct gaaccgtccc	4320
ccacaacgtg aggatgtgtg tggacgagcc gtccgggggc tcgccgtcca tcacgtccca	4380
cacgagtcgc cggctcctagt cccgcttctg agcccaggcg agccgtcttg tcgaacggtt	4440
cccaacggcg acgtctaccg gtctgaggga ccagggtccg cggccggttg cgctcgcccg	4500
ctctgcgggt caggcggtea ccagaggac gtctggagcg ggttttcggc gacggtccgg	4560
ggtcgaccgt ctctgcacga tccgcgagt ggtaggcagc gctggcccga gccgtccgtc	4620
tcgacgtgcc cgcaggtaac tccaagccga gacggcgacg gcgagcaacc tcggtcgacg	4680
ccgacctacc ccgttgccg ggtgcaggtc agaggggctc tcacctccct ccttcccacg	4740
cggccgacgg cgtccgaagc cgtctcatca tcaaccgttc atcggaacaa ggcgtcccgc	4800
ggaacgctgc cgagcgtgga ccgccgggga taccaacgcc gtgaccctgc cgactcgaga	4860
accgtcagag gccggtgggg attcccgtgc cgagcgcctt cccttccctc ggacgcctgt	4920
ctctggtag	4929



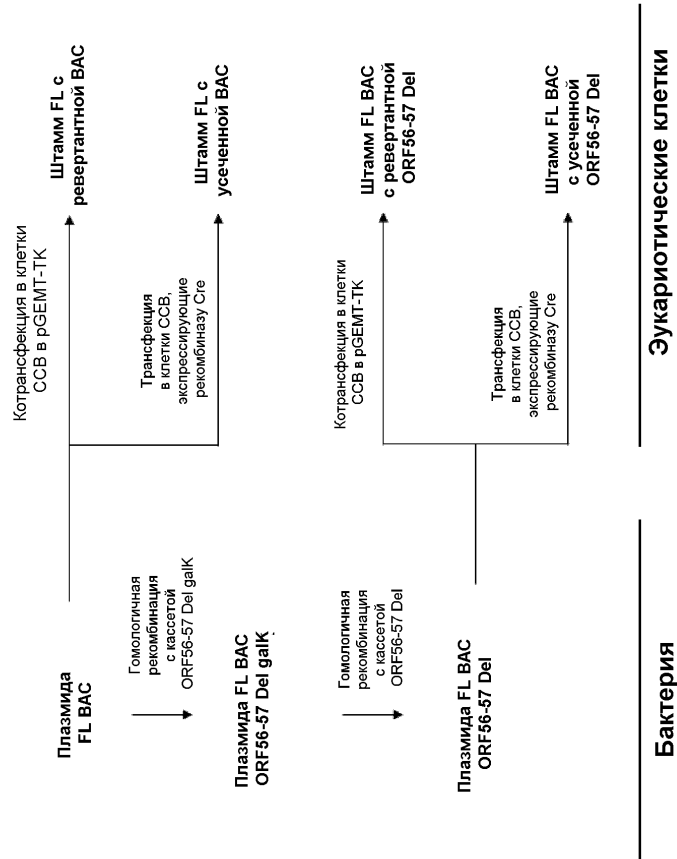
ФИГ. 1



ФИГ. 2

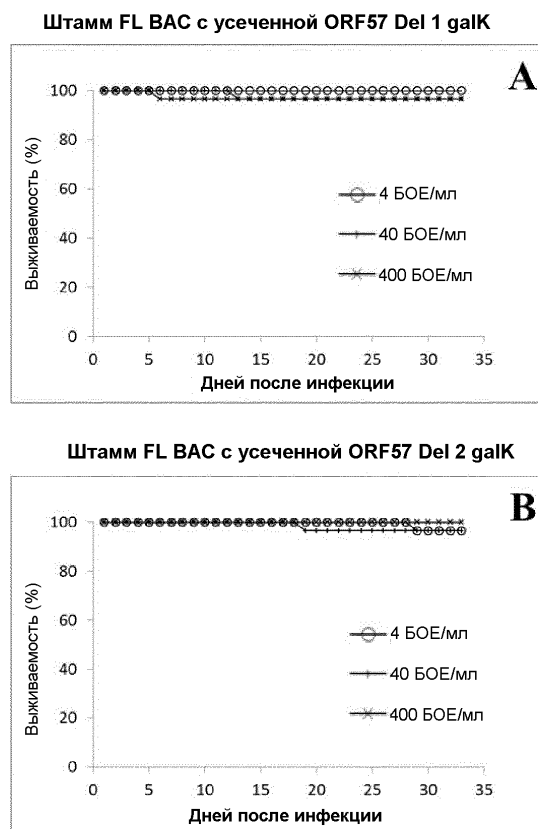


ФИГ. 3



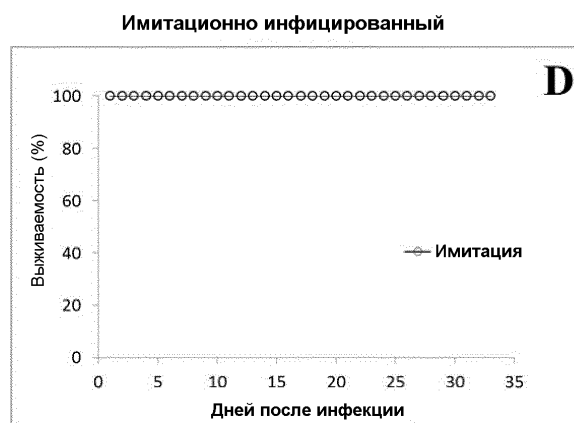
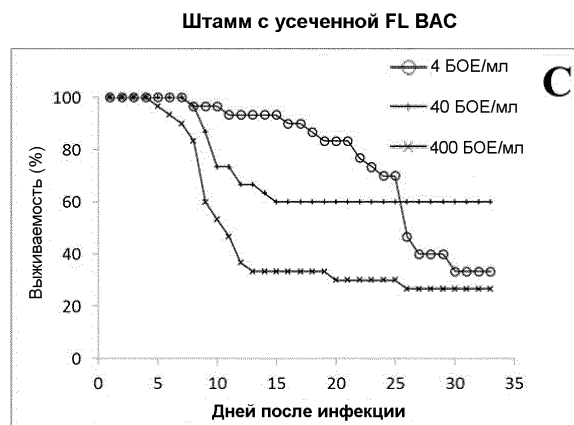
ФИГ. 4

5/18

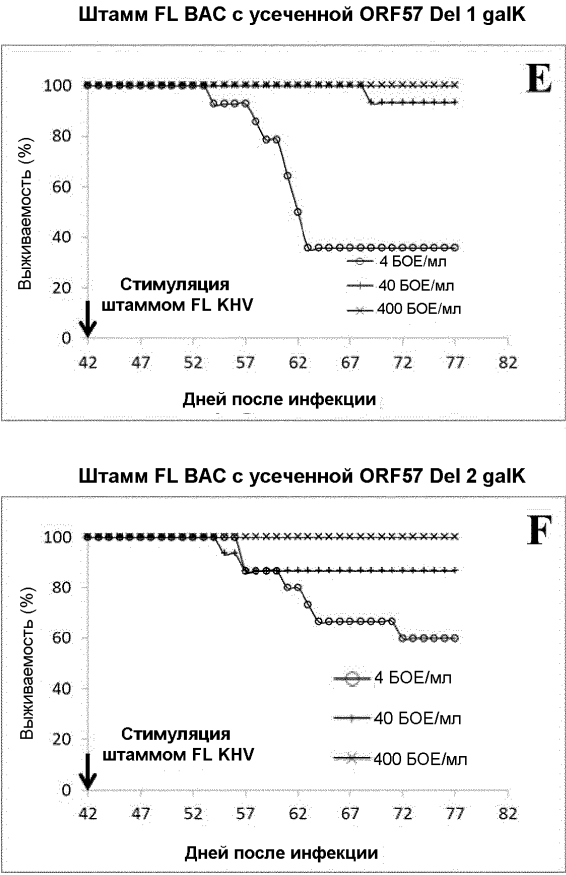


ФИГ. 5А, 5В

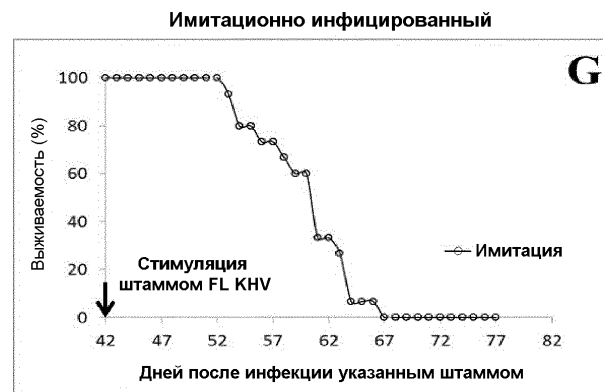
6/18



ФИГ. 5С, 5D

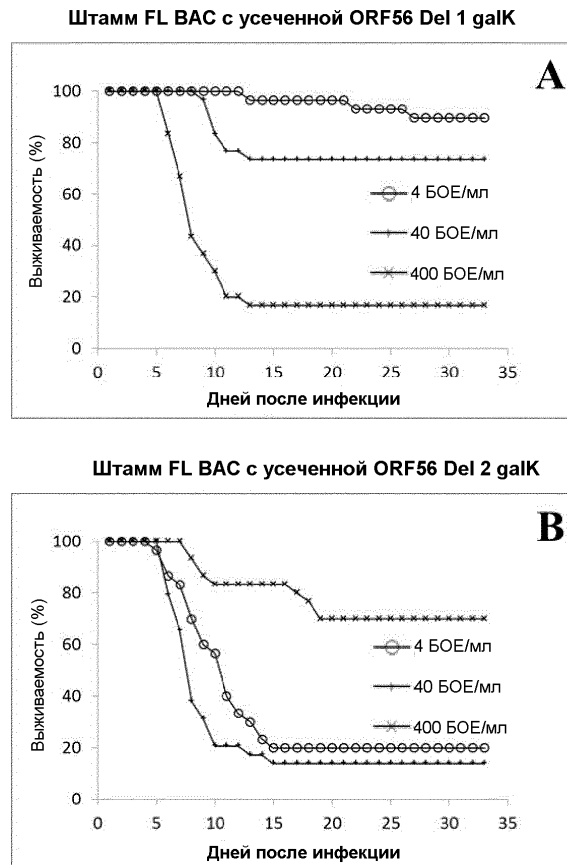


ФИГ. 5Е, 5F

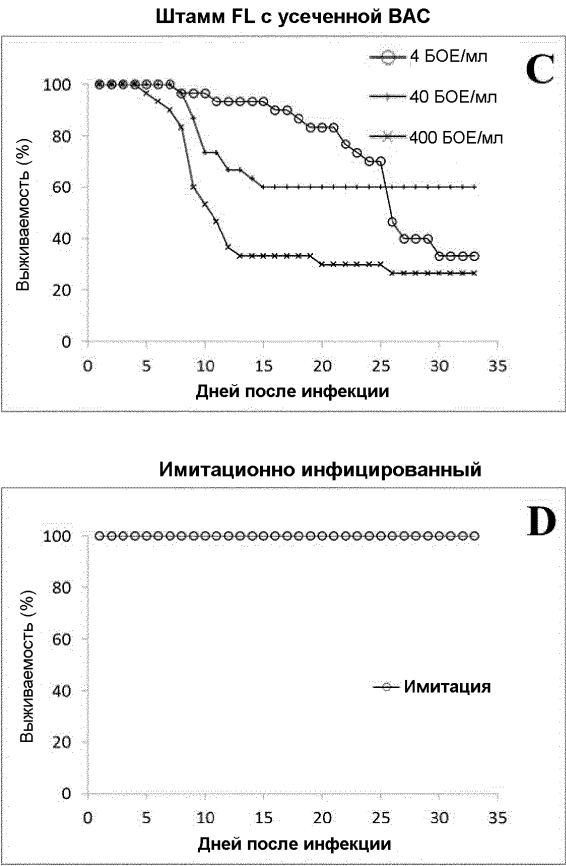


ФИГ. 5G

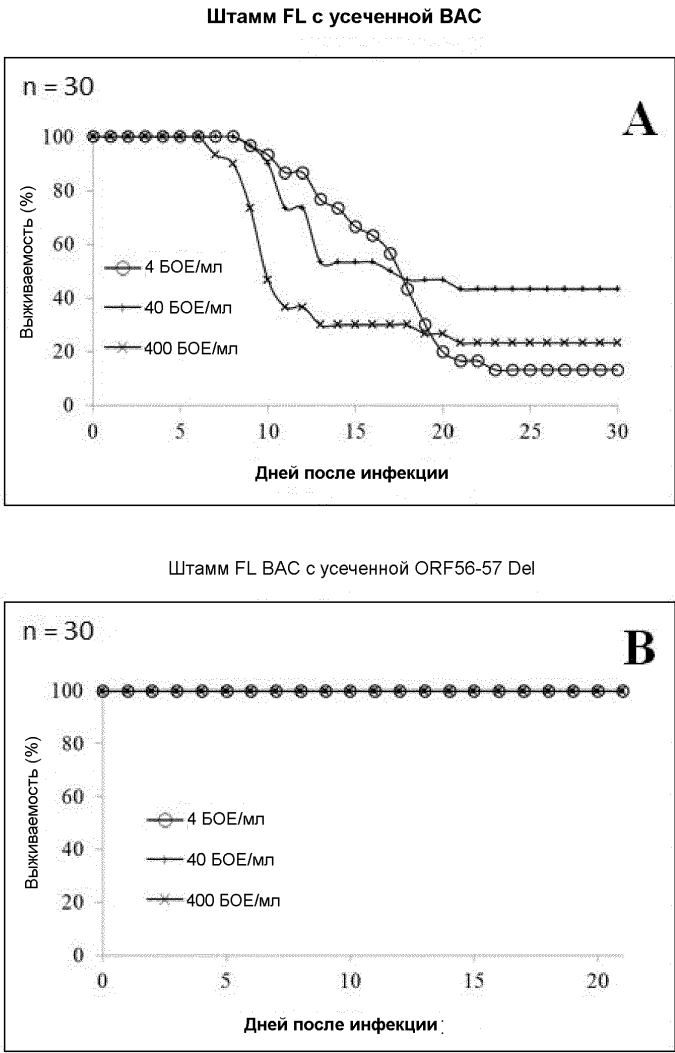
9/18



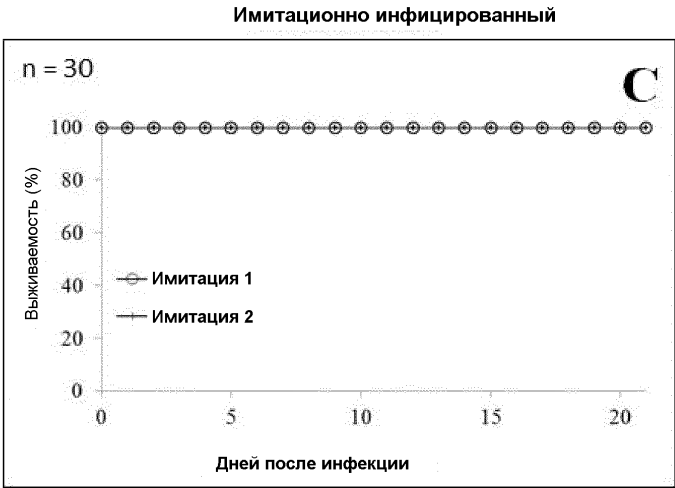
ФИГ. 6А, 6В



ФИГ. 6C, 6D

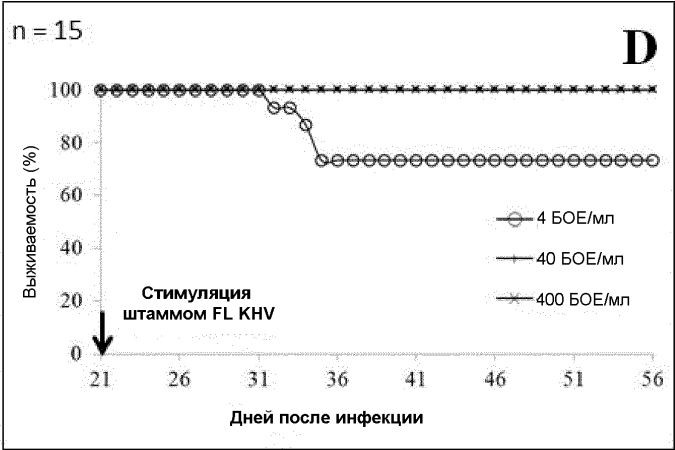


ФИГ. 7А, В

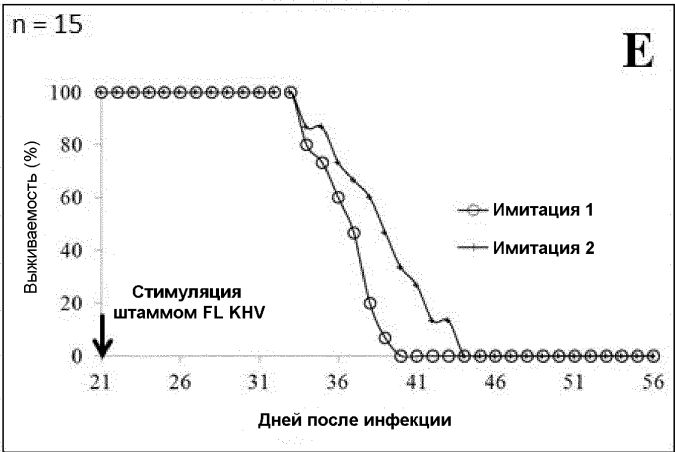


ФИГ. 7С

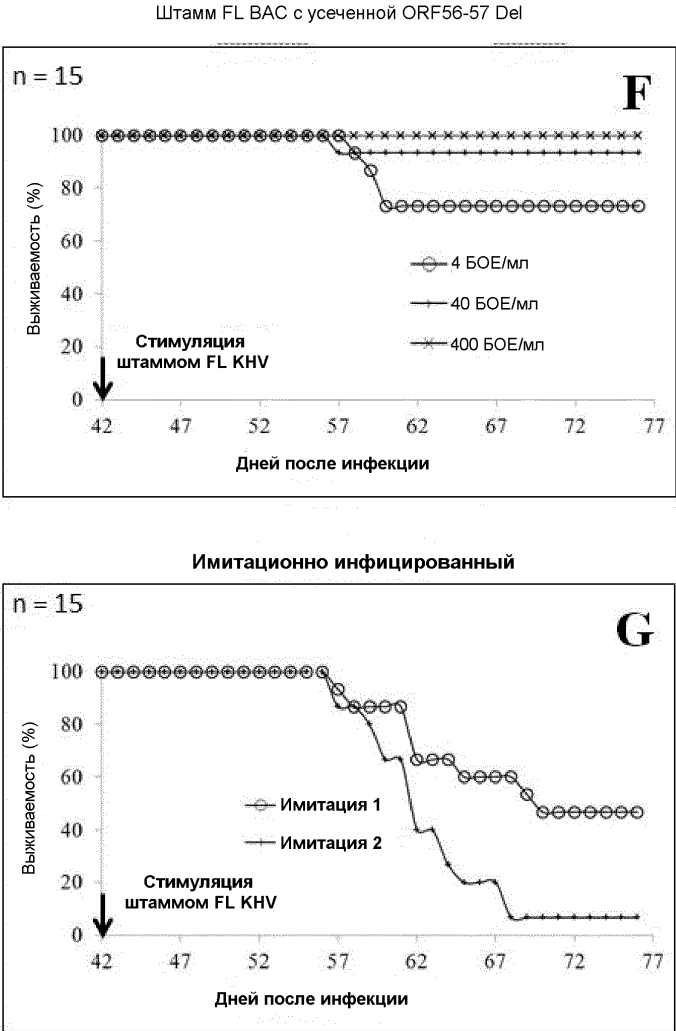
Штамм FL BAC с усеченной ORF56-57 Del



Имитационно инфицированный

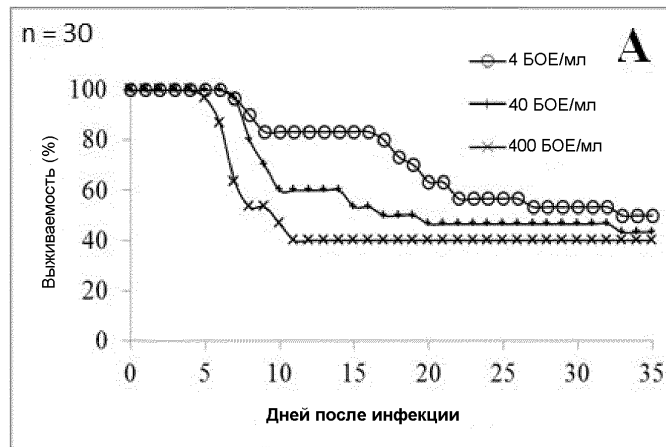


ФИГ. 7D, E

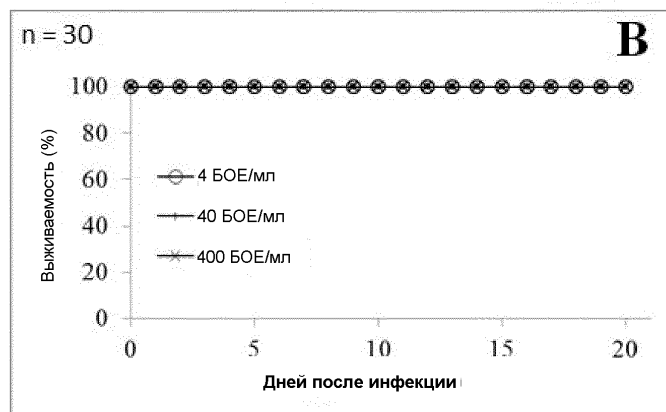


ФИГ. 7F, G

Ревертантный штамм FL BAC



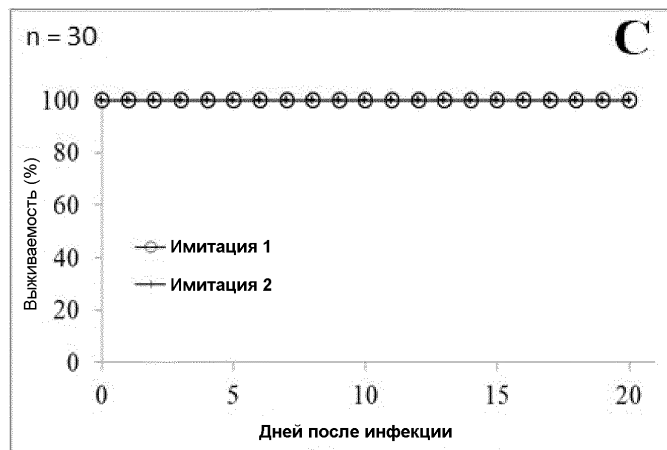
Штамм FL BAC с ревертантной ORF56-57 Del



ФИГ. 8А. В

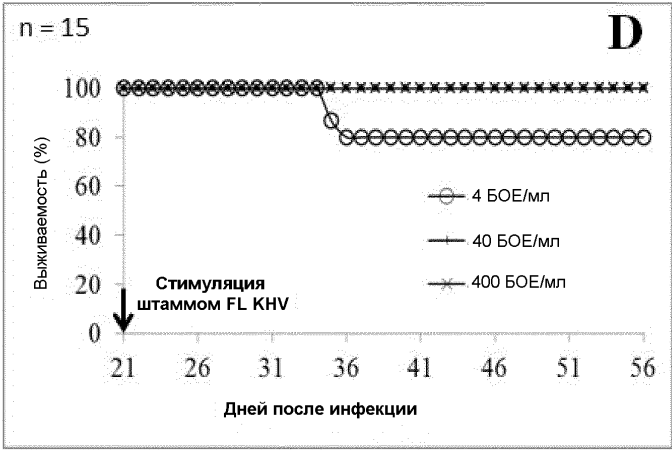
16/18

Имитационно инфицированный

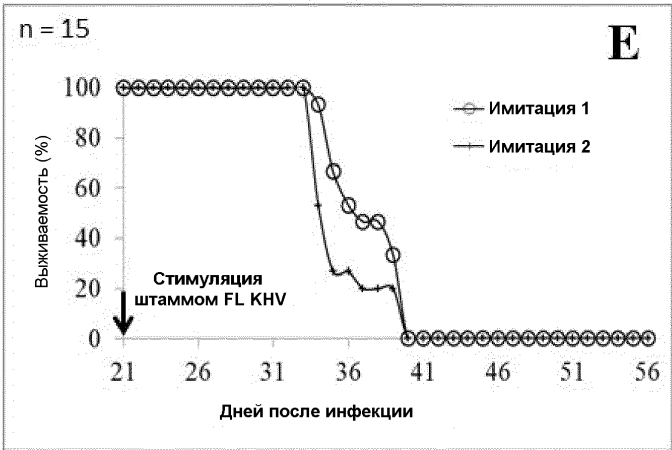


ФИГ. 8С

Штамм FL BAC с ревертантной ORF56-57 Del

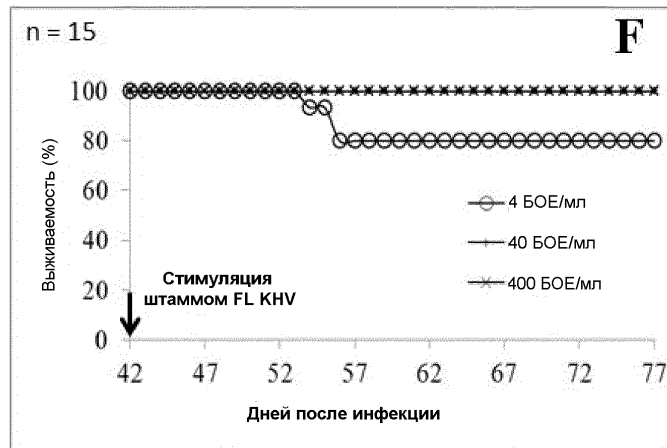


Имитационно инфицированный

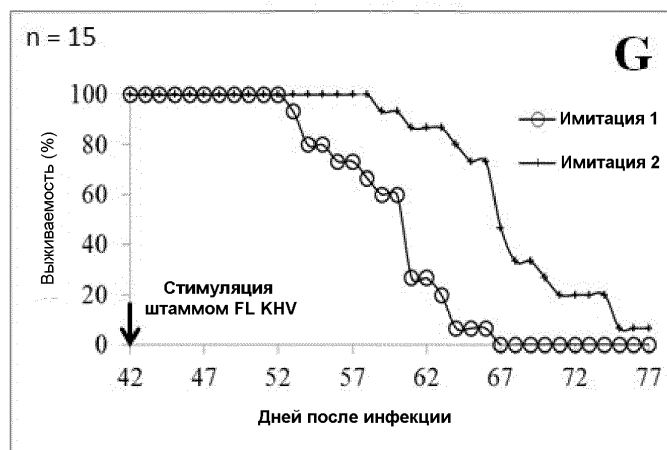


ФИГ. 8D, E

Штамм FL BAC с ревертантной ORF56-57 Del



Имитационно инфицированный



ФИГ. 8F, G