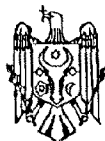




MD 4481 C1 2017.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4481** (13) **C1**
(51) Int.Cl: **A61K 39/245** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2012 0127 (22) Data depozit: 2012.12.27 (31) Nr.: 11196171.0 (32) Data: 2011.12.30 (33) Țara: EP (41) Data publicării cererii: 2013.07.31, BOPI nr. 7/2013	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.05.31, BOPI nr. 5/2017
(71) Solicitant: GESVAL S.A., BE (72) Inventator: VANDERPLASSCHEN Alain Francis Claude, BE (73) Titular: GESVAL S.A., BE (74) Mandatar autorizat: ANDRIEȘ Ludmila	

(54) Herpesvirus recombinant Koi (KHV) și vaccin pentru profilaxia bolii cauzate de KHV

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la un herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) și poate fi utilizată pentru profilaxia și/sau tratamentul terapeutic al bolii peștilor cauzate de herpesvirusul Koi la crap, așa ca *Cyprinos carpio carpio* sau *Cyprinos carpio koi*.

Conform invenției, herpesvirusul menționat conține o genă, în care cadrul de citire deschis 56 (ORF56) și cadrul de citire deschis 57

2
(ORF57) au fost supuse mutației. De asemenea, invenția se referă la o metodă de obținere a acestui tip de KHV, la celule ce conțin așa KHV și la utilizarea acestui KHV în calitate de vector și în vaccinuri.

Revendicări: 16

Figuri: 8

Secvențe: 12

MD 4481 C1 2017.12.31

(54) Recombinant Koi herpesvirus (KHV) and vaccine for the prevention of a disease caused by KHV

(57) Abstract:

1

The invention relates to a live attenuated recombinant Koi herpesvirus (KHV) and can be used for the prevention and/or therapeutic treatment of a disease in fish caused by Koi herpesvirus in carp, such as *Cyprinus carpio carpio* or *Cyprinus carpio koi*.

According to the invention, said herpesvirus comprises a gene, in which the Open Reading Frame 56 (ORF56) and the

2

Open Reading Frame 57 (ORF57) were subjected to mutation. The invention also relates to a method for the production of such KHV, cells comprising such KHV and the use of such KHV as vector and in vaccines.

Claims: 16

Fig.: 8

Sequences: 12

(54) Рекомбинантный герпесвирус Кои (KHV) и вакцина для профилактики заболевания вызванного KHV

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к живому аттенуированному рекомбинантному герпесвирусу Кои (KHV) и может быть использовано для профилактики и/или терапевтического лечения заболевания рыб вызванного герпесвирусом Кои у карпов, например *Cyprinos carpio carpio* или *Cyprinos carpio koi*.

Согласно изобретению, упомянутый герпесвирус содержит ген, в котором

2

открытая рамка считывания 56 (ORF56) и открытая рамка считывания 57 (ORF57) были подвергнуты мутации. Также, изобретение относится к методу получения такого типа KHV, к клеткам содержащим такой KHV и к использованию такого KHV в качестве вектора и в вакцинах.

П. формулы: 16

Фиг.: 8

Последовательности: 12

Descriere:

Prezenta invenție se referă la un herpesvirus recombinant de Koi (KHV), metode de producere a astfel de KHV, celule care conțin asemenea KHV și utilizarea acestui KHV ca vector și în vaccinuri pentru prevenirea bolii cauzate de herpesvirusul de Koi la crap, cum ar fi *Cyprinus carpio carpio* sau *Cyprinus carpio koi*.

Crapul comun (*Cyprinus carpio carpio*) este peștele cel mai mult cultivat pentru consum uman, în principal în Asia, Europa și în Orientul Mijlociu. În contrast, subspecia Koi (*Cyprinus carpio koi*) este cultivată în calitate de animal de companie pentru plăcere personală sau prezentare competitivă în special în Japonia, dar și în întreaga lume. Virusul care provoacă o boală letală la crapii comuni și la crapii Koi, inițial numit herpesvirus de Koi al bolii (KHVD), a fost detectat în 1996 în Regatul Unit. Virusul a fost apoi rapid identificat ca fiind cauza mortalității în masă în rândul crapilor Koi și crapilor comuni în Israel, S.U.A. și Germania. Cultivarea intensivă a crapilor comuni, expoziții de crapi Koi și comerțul internațional, spre regret, au contribuit la răspândirea rapidă la nivel mondial a acestei boli foarte contagioase și extrem de virulente. De la apariția sa, KHVD a cauzat pierderi financiare și economice severe în industria de cultivare atât a crapului Koi, cât și a crapului comun în întreaga lume.

Caracterizarea inițială a virusului prezintă o structură asemănătoare herpesvirusului cu un înveliș și un nucleu electronic dens icosaedric de 100...110 nm, înconjurat de o structură asemănătoare tegumentului. Genomul virusului conține molecula de ADN bicatenară liniară (dsDNA) de ~295 kb similară cu cea a Cyprinid herpesvirus 1 (CyHV-1), dar mai mare decât cea a altor membri din familia Herpesviridae, în general, variind de la 125 la 240 kb ca mărime. Secvența genomului KHV a fost publicată foarte recent (Aoki T., Hirono I., Kurokawa K., Fukuda, H., Nahary R., Eldar A., Davison A. J., Waltzek T. B., Bercovier H. & Hedrick, R. P. Genome sequences of three Koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening Koi and common carp worldwide. 2007, J. Virol., nr. 81, p. 5058-5065). Genomul KHV conține un număr semnificativ de secvențe de ADN, fără omologie cu orice alte secvențe virale cunoscute. Mai mult decât atât, acesta conține secvențe de ADN extrem de divergente de polipeptide codificate, care seamănă cu dsDNA al unor virusi, cum ar fi herpesvirus, poxvirus, iridovirus și ADN al altor numeroși virusi.

Caracteristicile unice ale acestui virus au condus la crearea a trei nomenclatoare diferite: prim, herpesvirus de Koi (KHV), în conformitate cu manifestarea sa morfologică; secund, nefrita interstițială la crap și virusul Gill necrosis (CNGV), în funcție de efectele sale patogene la pești, și în sfârșit Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3), în conformitate cu similitudinea genei conținute cu CyHV-1 și CyHV-2. Nomenclatura din urmă a fost susținută ulterior de secvențierea recentă a genomului viral integral. Cu toate acestea, în continuare se va utiliza denumirea de KHV.

KHV poartă un genom de aproximativ 295 kb, care reprezintă cel mai mare genom identificat vreodată în rândul membrilor familiei *Herpesviridae*. De la izolarea primului KHV în a. 1996, nu sunt disponibile informații cu privire la rolul genelor individuale în patogenia KHV și în biologia infecției gazdei naturale.

Se cunoaște un KHV atenuat și utilizarea acestuia în calitate de vaccin candidat [1]. Cu toate acestea, acest vaccin candidat ascunde o deficiență potențială. Atenuarea este o consecință a mutațiilor aleatorii care au survenit în timpul replicării virale *in vitro*. În consecință, caracterul atenuării este necunoscut și nu poate fi exclusă reversia într-un fenotip completamente patogen.

Cercetările aplicative și fundamentale privind KHV au solicitat producerea de virus recombinant. Recent, manipularea cu numeroși genomi ai herpesvirusului a fost facilitată de utilizarea unor vectori artificiali bacterieni de cromozomi (BAC) [2]. Acești vectori permit menținerea și mutagenza eficientă a genomului viral în *Escherichia coli* (*E. coli*), urmată de reconstituția virionilor descendenți prin transfecția plasmidei BAC în celule eucariote permissive. Până în prezent, genoamele numeroaselor herpesvirusuri au fost cu succes propagate ca clone BAC infecțioase, incluzând Cytomegalovirus Human (HCMV), care în prezent reprezintă al doilea genom de herpesvirus cel mai clonat ca BAC (230 kb) [3].

Recent, mai multe KHV recombinante au fost pentru prima dată construite folosind tehnica cu BAC; toate aceste recombinante sunt descrise în [4]. În acest document se descrie o metodă de obținere a KHV recombinant având o deficiență de una sau mai multe dintre genele selectate din grupul constând din ORF55: gena timidin-kinazei; ORF12: gena putativă a receptorului factorului de necroză tumorală (TNF); ORF16: gena cuplată la receptorul G-

proteinei putative (GPCR); ORF134: gena putativă omoloagă cu interleucina 10; ORF140: gena putativă a timidilat-kinazei sau combinații ale acestora. Astfel de mutanți au fost utilizați ca vaccin viu cu virusuri atenuate.

S-a demonstrat că unii dintre acești mutanți au fost în siguranță când s-au utilizat la peștele specific SPF de o anumită dimensiune și vârstă. Cu toate acestea, în domeniul pentru crescătorii de pește prezintă interes vaccinarea precoce, adică când peștii sunt relativ tineri/mici și când există o mare dispersie a dimensiunilor peștilor. S-a dovedit că în astfel de condiții vaccinurile bazate pe deleția virusurilor mutanți (de exemplu, 6) nu pot fi, în unele situații, suficient de sigure: așa KHV recombinant este prea virulent pentru utilizare la peștii tineri/mici.

Aceasta înseamnă că, în prezent, persistă necesitatea unor vaccinuri recombinante atenuate sigure și eficiente pentru controlul infecției cu KHV, cum ar fi în piscicultură.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este crearea unor virusuri recombinante KHV noi, care pot fi utilizate pentru elaborarea unor vaccinuri atenuate sigure și eficiente în controlul infecției cu KHV în domeniu.

A fost surprinzător de constatat acum că KHV recombinant, în care Cadrul de Citire Deschis 57 (ORF57) este deficitar, prezintă o mortalitate redusă semnificativ sau lipsa mortalității la toți, chiar și la crapul foarte tânăr/mic infectat cu acest herpesvirus recombinant și asigură imunitate împotriva herpesvirusului Koi de tip sălbatec. Un asemenea KHV recombinant asigură, astfel, un vaccin cu virus atenuat sigur și eficient, care poate fi utilizat corespunzător la crapii tineri și/sau la crapii mici.

Această constatare este surprinzătoare, având în vedere faptul că ORF57 a fost considerat până acum a fi o genă esențială, fără de care nici un virus viu nu ar fi fezabil. Prin urmare, într-o primă realizare prezenta invenție se referă la un herpesvirus recombinant de Koi în care ORF57 este deficitar, rezultând într-un KHV care este atenuat și induce o rată a mortalității de 40% sau mai puțin la crap, de preferință la *Cyprinus carpio carpio* sau *Cyprinus carpio koi*, atunci când sunt infectați cu herpesvirusul menționat.

Așa cum este utilizat aici, ORF57 "deficitar" este un ORF57 care nu mai este funcțional, adică nu mai este capabil să codifice o proteină funcțională. Un ORF57 deficitar, așa cum se utilizează în continuare, rezultă într-un KHV, care este atenuat până la nivelul care induce la crap o rată a mortalității de 40% sau mai joasă. O astfel de deficiență se poate, de exemplu, obține prin mutație, cum ar fi inserția sau deleția unei sau a mai multor nucleotide în gena codificatoare ORF57, sau în regiunea promotor. O asemenea mutație poate, de exemplu, fi o decalare a cadrului de mutație la site-ul 5' al genei, sau deleția (a unei părți din) regiunii promotor, sau (a unei părți din) a genei înseși.

Un exemplu de secvență de ADN a ORF57 este secvența de ADN a ORF57 cu nr. de acces GenBank NC_009127, în care codonul de inițiere și de terminare ORF57 sunt situați în poziția 99382 și 100803. Se subînțelege că localizarea ORF57 poate fi diferită în alte tulpini de KHV datorită variației naturale. De asemenea, ca urmare a variației naturale, pot exista mici diferențe în secvența ORF57 într-o tulpină de KHV, comparativ cu o altă tulpină de KHV. De aceea, ORF57, așa cum este descris aici, este un cadru de citire deschis având o secvență de identitate depășind 80% cu secvența de ADN a ORF57 cu nr. de acces GenBank NC_009127.

Succesiunea nucleotidelor în regiunea care conține ORF56, 57 și 58, cuprinzând nucleotidele 96630-101558, este reprezentată în SEQ ID NR: 12. A se vedea, de asemenea, în fig. 1.

Este clar, că modul cel mai extensiv de a obține o genă deficientă, adică cu deleția întregii ORF57, va rezulta cu producerea de proteine fără ORF57 pentru toate.

Din punct de vedere practic și din punct de vedere al siguranței, o asemenea deleție completă ar fi un pas logic. De altfel, așa cum rezultă din fig. 1, o regiune promotor putativă este situată în poziția 100212-100261, care poate fi, eventual, implicată în expresia ORF58 adiacent. Din acest motiv, o mutație în ORF57 nu trebuie să se extindă de preferință în această regiune. Astfel, este potrivită introducerea mutațiilor în ORF57 în regiunea pe partea stângă a poziției 100212 sau pe partea dreaptă în poziția 100261.

Din fig. 1, de asemenea, se poate constata că două regiuni promotoare putative, aflate respectiv în poziția 99451-99500 și în poziția 99794-99843, posibil, vor participa în expresia ORF56 adiacent. De aceea teoretic este posibil, că deleția în regiunea ORF57 interferează cu expresia ORF56. În acest caz, poate că KHV recombinant, în care ORF57 este deficitar, conform invenției, se comportă ca fiind atenuat în rezultatul expresiei reduse a ORF56. În secțiunea Exemple este, totuși, prezentat că 1) ORF56 nu este o genă esențială și 2) ORF56

deficient nu contribuie la caracterul atenuat al KHV recombinant, conform prezentei invenții. În aceste exemple este prezentat că delețiile mari pot fi efectuate în ORF56 fără a influența asupra viabilității KHV recombinant și fără modificarea semnificativă a caracterului atenuat KHV recombinant. Din aceasta rezultă că sectoarele promotorului putativ ORF56, localizate în ORF57, pot fi eliminate fără probleme.

De asemenea, din fig. 1 rezultă că două site-uri promotor putative pentru ORF57 sunt situate în ORF56 în pozițiile 97075-97124 și 98712-98761. Prin urmare, nu poate fi exclus faptul că deleția unei părți mici din ORF57, cum ar fi în ORF57 Del 1, asigură o trunchiere a proteinei codificatoare-ORF57 încă funcțională. În scopul de a exclude această posibilitate, o deleție dublă mare ORF56-ORF57 a fost realizată așa cum este descris în secțiunea Exemple, care cuprinde regiunea de la poziția 97001-99750. Această deleție se comportă în esență identic cu un singur ORF57 al mutanților, cum se poate observa în fig. 5, în comparație cu fig. 7. Astfel, se poate conchide că proteina codificatoare-ORF57 este neesențială pentru virus.

Deleția doar a unei părți mici de ORF57 este o posibilitate, aceasta fiind chiar o posibilitate preferată din motivele menționate anterior, dar trebuie de avut în vedere că proteina trunchiată rezultată este nefuncțională. În cazul în care specialistul din oricare motiv ar decide să realizeze deleția incompletă a ORF57, el ar putea ușor să verifice dacă ORF57 se face deficitar: ORF57 nedeficitar ar conduce la un virus cu un nivel de virulență foarte înalt, adică cu un nivel foarte redus de atenuare.

De preferință, KHV recombinant este adițional deficitar de una sau mai multe gene virale, care contribuie la virulență, dar fiind/nefiind esențiale pentru replicarea virusului.

Astfel, o formă preferată a acestei realizări se referă la un herpesvirus recombinant de Koi, conform invenției, care este deficitar de cel puțin o genă adițională, care contribuie la virulență, dar nu este esențială pentru replicarea virusului.

O formă mai preferată de realizare se referă la un herpesvirus recombinant de Koi, conform invenției, care este deficitar de cel puțin o genă adițională, care contribuie la virulență, această genă fiind selectată din grupa constând din: gena timidin-kinazei; ORF12: gena putativă a receptorului factorului de necroză tumorală (TNF); ORF16: gena cuplată la receptorul G-proteinei putative (GPCR); ORF 134: gena putativă omoloagă cu interleucina 10; ORF140: gena putativă a timidilat-kinazei sau orice combinație a acestora.

Intr-o formă mult mai preferată de realizare, KHV recombinant prezintă adițional deficiență de cel puțin gena timidin-kinazei sau gena putativă a timidilat-kinazei.

Intr-o altă formă mai preferată de realizare KHV recombinant, conform prezentei invenții, prezintă adițional deficiență de gena timidin-kinazei și de cel puțin o genă care contribuie în continuare la virulență, selectată din grupa constând din ORF12: gena putativă a receptorului factorului de necroză tumorală (TNF); ORF16: gena cuplată la receptorul G-proteinei putative (GPCR); ORF 134: gena putativă omoloagă cu interleucina 10; ORF140: gena putativă a timidilat-kinazei.

Intr-o formă încă și mai preferată de realizare, KHV recombinant prezintă adițional deficiență de cel puțin gena timidin-kinazei și gena putativă a timidilat-kinazei.

În continuare într-o realizare preferată herpesvirusul recombinant de Koi, conform prezentei invenții, este în formă vie. De preferință, herpesvirusul recombinant de Koi are abilitatea de reconstituire a particulelor infecțioase, adică de reproducere când este introdus în celulele eucariote permissive sau individual la pești, de preferință la crap, mai preferați fiind *Cyprinus carpio*, mai preferați în continuare fiind *Cyprinus carpio carpio* și/sau *Cyprinus carpio koi*.

Intr-o realizare alternativă KHV recombinant, conform prezentei invenții, este deficitar de una sau mai multe gene virale, care este/sunt esențiale pentru replicare (și opțional deficitar de una sau mai multe gene virale, care contribuie la virulență, dar care nu este/sunt esențiale pentru replicarea virusului), oferind astfel herpesvirusul recombinant de Koi, conform prezentei invenții, într-o formă nereplicativă.

Astfel, o variantă alternativă se referă la KHV recombinant, conform prezentei invenții, în care herpesvirusul menționat este într-o formă nereplicativă.

Astfel, "forma nereplicativă" înseamnă că herpesvirusul recombinant de Koi are încă capacitatea de a infecta celule sau pești (de exemplu, *Cyprinus carpio*, *Cyprinus carpio carpio* sau *Cyprinus carpio koi*), dar nu este abil să se reproducă în măsura în care să formeze virus descendent infecțios.

Tulpina recombinantă nereplicativă se produce prin inactivarea (prin tehnici cunoscute, cum ar fi inserția, deleția sau mutația, de exemplu utilizând clonarea cu BAC) genei KHV care este esențială pentru replicare.

Un asemenea virus deficient este cultivat pe o linie de celule permissive care stabil expresează gena deletată (trans-complementare).

Această abordare este una bine cunoscută în domeniu. Ea, de exemplu, a fost folosită cu succes pentru diferite herpesvirusuri, cum ar fi Suid Herpesvirus 1 gH deletat (Aujeszky virus) (Babic N., Klupp B.G., Makoschey B., Karger A., Flamand A., Mettenleiter T.C., Glycoprotein gH of pseudorabies virus is essential for penetration and propagation in cell culture and in the nervous system of mice. 1996, The Journal of general virology, nr. 77 (Pt 9), p. 2277-2285) și Bovine Herpesvirus 1 (Schroder C., Keil G.M., 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. 1999, The Journal of general virology, nr. 80 (Pt 1), p. 57-61).

Orice genă care contribuie la replicare poate fi reprodusă deficitară pentru a obține herpesvirus recombinant de Koi nereplicativ. Adică, orice genă care conduce la inactivarea herpesvirusului recombinant de Koi nereplicativ, poate fi deletată. De preferință, genele de KHV recombinant, conform prezentei invenții, care sunt deletate pentru a obține o formă nereplicativă de virus, sunt selectate din grupul format din: ORF25, ORF31, ORF32, ORF34, ORF35, ORF42, ORF43, ORF45, ORF51, ORF59, ORF60, ORF62, ORF65, ORF66, ORF68, ORF70, ORF72, ORF78, ORF81, ORF84, ORF89, ORF90, ORF92, ORF95, ORF97, ORF99, ORF108, ORF115, ORF131, ORF132, ORF136, ORF137, ORF148 și ORF149.

Herpesvirusul recombinant de Koi, conform prezentei invenții, de preferință conține o secvență a vectorului cromozomului bacterian artificial (BAC).

De aproximativ un deceniu și jumătate manipularea genomilor herpesvirusurilor mari a fost facilitată de utilizarea unor asemenea cromozomi bacterieni artificiali. Acești vectori permit menținerea și mutageneza genomului viral în *Escherichia coli*, urmată de reconstituirea virionilor descendenți prin transfecția plasmidei BAC în celule eucariote permissive. Într-o primă etapă, secvențele pentru vectorul BAC sunt introduse în genomul herpesvirusului prin recombinare omoloagă convențională în celule infectate.

Genomul ADN liniar dublu catenar al herpesvirusurilor circulă în timpul replicării. Este suficient să se izoleze intermediarul de replicare circular al mutantului BAC și este transferat prin transformarea ADN în *E. coli*. Este necesară realizarea acestui transfer doar o singură dată pentru a stabili sistemul. BAC herpesvirusului este apoi înmulțit și mutat în *E. coli*. ADN clonal, omogen al BAC herpesvirusului este transferat înapoi în celulele eucariote permissive doar pentru reconstituirea virusului. Funcțiile virale nu sunt necesare, genomul virusului rămâne neactiv un timp în *E. coli*, conservând funcțiile virale prezente la momentul clonării. Acest lucru este important pentru virusurile care *in vitro* în procedurile cu cultură modifică proprietățile autentice ale izolatelor.

Așa cum este folosit în această descriere, termenul de "recombinare omoloagă" indică faptul că două molecule omoloage diferite de acid nucleic se confruntă reciproc, se produce încrucișarea, fiind generată o combinație nouă de acid nucleic. Așa cum este folosit în această descriere, termenul de "secvență de mediere a recombinării omoloage" se referă la o secvență care cauzează o recombinare omoloagă, care este dependentă de o proteină specifică de recombinare, care catalizează, realizează sau care asistă recombinarea omoloagă. O asemenea proteină de recombinare, de preferință, acționează în mod specific pe o "secvență de mediere a recombinării omoloage" și nu se acționează pe alte secvențe.

Secvențele vectorului BAC sunt bine cunoscute în domeniu, iar utilizarea lor în construcția virusurilor recombinante, cum ar fi herpesvirusurile, a fost frecvent descrisă în literatura de specialitate (Borst E. M., Hahn G., Koszinowski U. H. & Messerle M. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. 1999, J. Virol., nr. 73, p. 8320-8329), (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. 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*. 2008, J. Virol., nr. 82, p. 4955-4964), (Dewals B., Boudry C., Gillet L., Markine-Goriaynoff N., de Leval L., Haig D. M. & Vanderplasschen A. Cloning of the genome of Alcelaphine herpesvirus 1 as an infectious and pathogenic bacterial artificial chromosome. 2006, J. Gen. Virol., nr. 87, p. 509-517), (Gillet L., Daix, V., Donofrio G., Wagner M., Koszinowski U. H., China B., Ackermann

M., Markine-Goriaynoff N. & Vanderplasschen A. Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. 2005, J. Gen. Virol., nr. 86, 9. 907-917), (Messerle M., Crnkovic I., Hammerschmidt W., Ziegler H. & Koszinowski U. H. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, nr. 94, p. 14759-14763), (Warming S., Costantino N., Court D. L., Jenkins N. A. & Copeland N. G. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. 2005, Nucleic. Acids. Res., nr. 33, e36), (Wagner M., Ruzsics Z. & Koszinowski U. H. herpesvirus genetics has come of age. 2002, Trends Microbiol., nr. 10, p. 318-324).

Secvența vectorului BAC nu trebuie în mod strict introdusă în ORF57. Alternativ aceasta poate fi introdusă în orice altă genă virală, care contribuie la virulență și/sau în orice altă genă virală, care este sau nu este esențială pentru replicarea virală și/sau în orice regiune intergenică.

Cu toate acestea, într-o formă mult mai preferată, herpesvirusul recombinant de Koi conține o secvență de vector BAC, care este introdusă în ORF57. Această inserție este avantajoasă prin aceea că la introducerea vectorului BAC în ORF57, ORF57 devine în același timp deficitar, asigurând astfel nemijlocit un KHV recombinant, conform invenției.

Un exemplu de KHV recombinant, conform prezentei invenții, a fost realizat prin clonarea genomului KHV prin inserția unei casete modificate loxP-BAC flancate în ORF55. Această inserție rezultă cu un virus recombinant BAC, genomul căruia este menținut stabil în bacterie, fiind abil să regenereze virioni când este transfectat în celule permissive (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. 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*. 2008, J. Virol., nr. 82, p. 4955-4964). Acest vector a fost utilizat pentru a introduce o deleție în ORF57.

Termenul de "vector BAC" se referă la o plasmidă, care este produsă utilizând plasmida F de *E. coli* și la un vector care poate fi menținut stabil și care poate crește un fragment de ADN de dimensiuni mari de circa 300 kb sau mai mult în bacterii, cum ar fi *E. coli* și altele asemenea. Vectorul BAC conține cel puțin o secvență de vector BAC esențială pentru replicarea vectorului BAC. Exemplele de astfel de regiuni esențiale pentru replicare includ, dar nu exhaustiv, originea replicării plasmidei F și variante de aceasta.

Așa cum este folosit în această descriere, termenul de "secvență a vectorului BAC" se referă la o secvență care cuprinde o secvență esențială pentru funcția de vector BAC. Opțional, secvența vectorului BAC mai poate conține cel puțin o "secvență recombinantă protein-dependentă de recombinare" și/sau un "marker selectabil".

Detalii privind "secvența recombinantă protein-dependentă de recombinare" și/sau "markerul selectabil" sunt prezentate în literatura de specialitate (WO 2009027412 A1 2009.03.05).

Indiferent de locul în care vectorul BAC este introdus în genom, potrivit este flancarea secvenței vectorului BAC la secvențele omoloage mediatore de recombinare, de preferință loxP. De asemenea, de preferință secvența vectorului BAC cuprinde un marker selectabil. Într-o formă mult mai preferată markerul selectabil este un marker selectabil de medicamente.

Intr-un alt exemplu de realizare preferat genomul herpesvirusului recombinat este prezent în formă de plasmidă. Aceasta se realizează prin izolarea formelor circulare ale herpesvirusului recombinant de Koi menționat, care conțin o secvență a vectorului BAC și introducerea în celule bacteriene. Cum s-a menționat anterior, nu este esențial pentru invenție că secvența vectorului BAC (cromozom bacterian artificial) se introduce în una sau în mai multe gene virale, care contribuie la virulență sau sunt necesare pentru replicare, atât timp cât una sau mai multe dintre genele menționate, care contribuie la virulență sau sunt necesare pentru replicare, este/sunt obținute deficiente prin tehnici de inginerie genetică.

De aceea, secvența vectorului BAC poate fi inserată în orice regiune a genomului virusului, cu condiția ca ORF57 și, de preferință, una sau mai multe gene virale care contribuie la virulență sunt, de asemenea, deficitare.

Desigur, utilizarea tehnicilor de clonare mediate de vectorul BAC, așa cum este descris anterior, poate fi realizată în mod repetat: de exemplu, prima dată pentru a obține ORF57 deficient și a doua oară pentru a obține o genă adițională deficientă.

Secvența vectorului BAC poate, în principiu, să rămână prezentă în KHV recombinant, conform invenției, în aplicațiile ulterioare fără probleme. Cu toate acestea, pentru utilizarea herpesvirusului de Koi, conform invenției, de exemplu, într-un vaccin, este preferată

eliminarea a mai multor secvențe de BAC. Acesta este, de exemplu, cazul secvențelor BAC care conțin gene codificatoare de markeri selectabili și, chiar mai mult, pentru gene de rezistență. Prezența unor asemenea gene într-un vaccin nu este numai inutilă, dar chiar indezirabilă.

Astfel, de preferință cel puțin o parte (de exemplu, o parte care conține o genă de rezistență sau un marker selectabil) sau mai preferabil majoritatea din secvențele vectorului BAC sunt excizate de la genomul herpesvirusului, astfel de preferință menținând o secvență heteroloagă în locul exciziei sau în locul fostei inserții în genomul herpesvirusului. De preferință, secvența heteroloagă are o dimensiune de cel mult 200 de nucleotide. Excizia se realizează prin introducerea KHV recombinat într-o celulă eucariotă permisivă care exprimă recombinaza Cre, care este excizată de secvența vectorului de BAC flancată cu loxP.

Astfel, o formă preferată a acestei realizări se referă la un herpesvirus recombinant de Koi, conform invenției, caracterizat prin aceea că o parte din secvența vectorului BAC este excizată de la genomul herpesvirusului menținând o secvență heteroloagă în locul exciziei sau în locul fostei inserții, respectiv, în genomul herpesvirusului.

Și într-o formă mult mai preferată a acestei realizări, o parte din secvența vectorului BAC, care este excizată de la genomul herpesvirusului, conține cel puțin o genă codificatoare a markerului selectabil și/sau o genă de rezistență.

Este, de asemenea, posibilă eliminarea în totalitate a secvenței casetei BAC prin recombinare omoloagă în celule eucariote utilizând un fragment de ADN din genomul viral de tip sălbatic care cuprinde locul de inserție a casetei BAC (de exemplu, ORF55 care codifică TK). Selectarea plăcii virale, care nu mai exprimă EGFP (codificată de caseta BAC), permite selectarea recombinanțelor care au reîntors locul de inserție a BAC la secvența de tip sălbatic.

Herpesvirusul recombinat de Koi, conform prezentei invenții, fie în formă de clonă KHV BAC și de construct KHV menționat anterior în cazul în care cel puțin o parte din secvența vectorului BAC este excizată de la genomul herpesvirusului, pot fi utilizate pentru manipulațiile ulterioare implicând, de exemplu, tehnici de inginerie genetică pentru a obține un genom deficitar de gene specifice adiționale. Deficiența de asemenea gene adiționale se poate obține în mod egal utilizând tehnica BAC, cum deja s-a menționat mai sus.

Deși KHV recombinant, conform invenției, poate fi utilizat pentru a obține un vaccin ca atare (a se vedea în continuare), în scopul de a preveni la pești, în special la crap, mai special la *Cyprinus carpio carpio* sau *Cyprinus carpio koi*, bolile provocate de KHV, acesta, de asemenea, poate fi folosit eficient ca virus purtător pentru fragmentul de ADN (de exemplu, non-KHV) heterolog. În acest caz, caracteristicile avantajoase ale KHV recombinant, conform invenției, ar fi complet utilizate și, în plus, virusul ar obține proprietăți suplimentare, cum ar fi proprietăți de marcă, proprietăți de imunizare suplimentare sau proprietăți adiționale.

"Proprietăți de marker" în acest sens, înseamnă că fragmentul de ADN heterolog permite, direct sau indirect, o diferențiere între infecția cu virus de câmp sau infecția cu virus de vaccin.

O modalitate directă de a diferenția infecția cu virusul de câmp de infecția cu virusul de vaccin trebuie, de exemplu, să prevadă reacția PCR cu utilizarea primerilor, care reacționează specific cu fragmentul de ADN heterolog (adică non-KHV) în KHV recombinant, conform invenției, și nu cu ADN al virusului de câmp KHV.

Modalitatea indirectă de diferențiere a infecției cu virusul de câmp de infecția cu virus de vaccin trebuie, de exemplu, să prevadă o reacție imunologică folosind un anticorp care reacționează specific cu o proteină imunogenică codificată de un fragment de ADN (adică non-KHV) heterolog într-un KHV recombinant, conform invenției, și nu cu orice proteină a virusului de câmp KHV.

Astfel, o altă realizare a prezentei invenții se referă la un KHV recombinant, conform invenției, care conține un fragment de ADN heterolog, de exemplu, o gena heteroloagă.

De preferință, un astfel de fragment de ADN heterolog este o genă heteroloagă care codifică o proteină imunogenică a unui alt virus sau microorganism patogen, care este patogen pentru pești, mai specific fiind pentru crap, în special pentru *Cyprinus carpio carpio* sau *Cyprinus carpio koi*.

De preferință, gena heteroloagă este glicoproteina G a rabdovirusului care provoacă viremia de primăvară a crapului. Un asemenea construct, fiind utilizat într-un vaccin, va proteja peștele vaccinat împotriva KHV, dar și împotriva viremiei de primăvară a crapului.

Promotorii potriviți pentru expresia genelor heteroloage în celulele eucariote sunt bine cunoscuți în domeniu. Un exemplu de promotor adecvat pentru expresia unei gene heteroloage,

de exemplu, a glicoproteinei G a rabdovirusului care provoacă viremia de primăvară a crapului este promotorul HCMV IE.

Prezenta invenție asigură în continuare o metodă de producere a particulelor infecțioase de herpesvirus recombinant de Koi (KHV), care prevede etapa (a) de introducere a KHV recombinant, conform invenției, sau de ADN al KHV recombinant, care conține genomul KHV recombinant, conform invenției, în celule eucariote permissive și (b) cultivarea celulei gazdă pentru producerea herpesvirusului recombinant de Koi (KHV).

Datorită caracterului lor atenuat, herpesvirusurile recombinante de Koi, conform invenției, și ADN acestora sunt foarte potriviți pentru imunizarea peștilor, de preferință a *Cyprinus carpio carpio* sau *Cyprinus carpio koi*, prin injectare sau îmbăiere, sau *per os*.

De aceea, o altă realizare a prezentei invenții prevede un herpesvirus recombinant de Koi, conform invenției, și/sau ADN KHV care conține genomul herpesvirusului recombinant de Koi, conform invenției, pentru utilizare pentru prevenirea și/sau tratamentul unei boli la pește cauzate de herpesvirusul de Koi (KHV).

Utilizarea preventivă are drept scop prevenirea infecției, sau cel puțin a manifestărilor clinice ale bolii, utilizarea terapeutică este o utilizare a KHV menționat sau ADN KHV la peștele, care deja suferă de boala cauzată de KHV.

În continuare, o altă variantă de realizare a prezentei invenții oferă un herpesvirus recombinant de Koi, conform invenției, și/sau ADN KHV care conține genomul herpesvirusului de Koi recombinant, conform invenției, pentru utilizare într-un vaccin pentru prevenirea și/sau tratamentul unei boli la pești cauzate de herpesvirusul de Koi (KHV).

Un alt exemplu de realizare a invenției prevede un vaccin pentru prevenirea și/sau tratamentul unei boli la pești cauzate de herpesvirusul de Koi (KHV), caracterizat prin aceea, că vaccinul menționat conține herpesvirusul de Koi, conform invenției, și/sau ADN KHV care conține genomul herpesvirusului recombinant de Koi, conform invenției, și un purtător farmaceutic acceptabil.

Intr-o altă variantă de realizare a prezentei invenții se prevede un vaccin pentru prevenirea și/sau tratamentul unei boli la pești cauzate de un rabdovirus, care provoacă viremia de primăvară la crap, vaccinul conținând KHV recombinant, conform invenției, care transportă gena ce codifică glicoproteina G a rabdovirusului menționat, care provoacă viremia de primăvară a crapului sau o secvență de ADN care conține genomul KHV recombinant menționat și un purtător farmaceutic acceptabil.

Așa cum este utilizat în prezenta descriere, termenul "vaccin" se referă la o compoziție pentru prevenirea și/sau tratamentul unei gazde de o anumită boală. Un asemenea vaccin poate produce imunitate profilactică sau terapeutică.

Purtătorul farmaceutic acceptabil poate fi la fel de simplu, cum este apa sau un tampon. Purtătorul farmaceutic acceptabil poate, de asemenea, conține stabilizatori. Pot, de asemenea, conține un adjuvant, sau poate fi înseși un adjuvant.

De obicei, vaccinurile sunt preparate în formă de soluții lichide, emulsii sau suspensii pentru injectare peștilor sau pentru imersie în apă. De exemplu, o emulsie lichidă sau un concentrat emulsionabil poate fi pregătit pentru a fi adăugat într-un rezervor de apă sau într-un bazin în care peștii sunt menținuți. Pot fi preparate în forme solide (de exemplu, pulbere) potrivite pentru dizolvare sau pentru formare de suspensii, de asemenea pot fi livrate în purtători lichizi sau pentru amestecare cu alimente solide înainte de administrare. Vaccinul poate fi o cultură liofilizată într-o formă gata pentru utilizare pentru reconstituire cu un diluant steril. De exemplu, celulele liofilizate pot fi reconstituite în soluție salină de 0,9% (opțional, cu condiția că este parte a vaccinului ambalat). O formulare preferată de vaccin injectabil este emulsia. Forma lichidă sau reconstituită a vaccinului poate fi diluată într-un volum mic de apă (de exemplu, de la 1 până la 100 volume), înainte de adăugare în stilou, rezervor sau bazin.

Intr-un mod de realizare preferat, vaccinul care conține tulpină de KHV recombinant este într-o formă uscată, de exemplu, în formă de praf, liofilizat, în formă de peletă sau tabletă comprimată etc.

Intr-o altă realizare, virusul menționat poate fi în formă de cultură tisulară fluidă. Lichidul menționat poate fi păstrat într-un mediu, de preferință la -70°C, fiind preferată soluția cu conținut de glicerol. Într-un exemplu specific lichidul de cultură tisulară conține glicerol de 20%.

Tulpina de KHV recombinant, conform prezentei invenții, poate fi transformată într-o formă uscată prin câteva metode. O forma preferată, în particular, de uscare este liofilizarea. Înainte de uscare, de exemplu, prin procedura de liofilizare, în mediu pot fi adăugate diverse

ingrediente, cum ar fi conservanți, antioxidanți sau agenți de reducere, diverși excipienți etc. Asemenea excipienți, de asemenea, pot fi adăugați în forma uscată, de exemplu, virusul activatenuat liofilizat poate fi de asemenea adăugat după etapa de uscare.

În cazul în care KHV recombinant, conform invenției, se utilizează ca un component al vaccinului pentru administrare pe cale orală, de obicei nu este necesară administrarea unui adjuvant.

Dacă vaccinul preparat este injectat direct în pește, folosirea unui adjuvant este opțională. Dacă KHV recombinant, conform invenției, este într-o formă nereplicativă, adăugarea unor stimulente ale sistemului imunitar poate fi preferată.

În general, pentru a stimula răspunsul imun, preparatul poate include o varietate de adjuvanți, citokine sau alte stimulente ale sistemului imunitar, în special în cazul preparatelor indicate pentru injectare.

Adjuvantul este o substanță imunostimulatoare, care amplifică răspunsul imun al gazdei într-un mod nespecific. Adjuvantul poate fi un adjuvant hidrofil, de exemplu, hidroxid de aluminiu sau fosfat de aluminiu, sau un adjuvant hidrofob, de exemplu, adjuvanți pe bază de ulei mineral. Adjuvanții, cum ar fi muramil dipeptide, avidină, hidroxid de aluminiu, fosfat de aluminiu, uleiuri, emulsii de ulei, saponine, sulfat de dextran, glucani, citokine, bloc copolimeri, oligonucleotide imunostimulatoare și alți adjuvanți cunoscuți în domeniu pot fi adăugați prin amestecare cu KHV recombinant, conform invenției. Exemplele de adjuvanți utilizați frecvent în piscicultură sunt muramil dipeptide, lipopolizaharide, numeroși glucani și glicani și Carbopol® (un homopolimer). Adjuvanți potriviți sunt, de exemplu, emulsii de tipul apă în ulei (a/u), emulsii u/a și dublu emulsii a/u/a. Adjuvanții de ulei potriviți pentru utilizare în emulsii a/u sunt, de exemplu, uleiurile minerale sau uleiurile metabolizabile. Uleiurile minerale sunt, de exemplu, Bayol®, Marcol® și Drakeol®; uleiurile metabolizabile sunt, de exemplu, uleiuri vegetale, cum ar fi uleiul de arahide și uleiul de soia, sau grăsimi animale, cum ar fi grăsimea de pește squalan și scuolen. O alternativă potrivită este utilizarea vitaminei E (tocoferol) solubile (EP0382271 A1 1990.08.16). Foarte potrivite sunt emulsiile u/a de exemplu, obținute din 5...50% din greutate de fază apoasă și 95...50% din greutate de ulei adjuvant, mai preferat fiind conținutul de 20...50% din greutate de fază apoasă și 80...50% din greutate de ulei adjuvant. Cantitatea de adjuvant adăugată depinde de originea adjuvantului în sine, precum și de informațiile cu privire la aceste cantități furnizate de către producător.

Intr-o realizare preferată vaccinul, conform prezentei invenții, conține adțional un stabilizator. Stabilizatorul poate fi adăugat în vaccinul, conform prezentei invenții, de exemplu, pentru a-l proteja de degradare, pentru a prelungi durata de conservare sau pentru a ameliora eficiența liofilizării. Stabilizatori utili sunt, de exemplu, SPGA (Bovarnik et al. 1950, J. Bacteriology, vol. 59, p. 509), laptele degresat, gelatina, albumina serică de bovină, hidrații de carbon, de exemplu, sorbitol, manitol, trehaloză, amidon, zahăr, dextran sau glucoză, lactoze, proteine, cum ar fi albumina sau cazeina sau produsele de degradare ale acestora, precum și tampon, cum ar fi fosfații de metale alcaline.

Antibioticele, cum ar fi neomicina și streptomycină, pot fi adăugate pentru a preveni creșterea potențială a germenilor.

Adițional vaccinul poate conține unul sau mai mulți compuși tensioactivi sau emulgatori, de exemplu, Span® sau Tween®. Vaccinul poate conține, de asemenea, așa-numitul "vehicul". Vehiculul este un compus la care aderă virusul KHV (fie în formă de particule de virus sau în formă de ADN), conform prezentei invenții, fără a fi covalent la acesta. Aceste vehicule includ, de exemplu, bio-microcapsule, micro-alginate, lipozomi și macrosoli, toți fiind cunoscuți din literatura de specialitate. O formă specială de un astfel de vehicul este Iscom. Este de la sine înțeles, că adăugarea prin amestecare a altor stabilizatori, purtători, diluanți, emulgatori și altor asemenea în vaccinurile, conform prezentei invenții, țin de asemenea de scopul invenției. Astfel de aditivi, de exemplu, sunt descriși în manualele de specialitate cunoscute (Remington: "the science and practice of pharmacy", 2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), (Pastoret P. et al. "Veterinary vaccinology", ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN: 0444819681).

KHV recombinant în cazul, în care este utilizat în forma sa uscată într-un vaccin, poate în continuare include un lichid de reconstituire, de preferință apă sterilă, soluție salină sau fiziologică. Vaccinul poate conține, de asemenea, cantități mici de materiale reziduale din procesul de producere, cum ar fi proteine celulare, ADN, ARN etc. În timp ce aceste materiale nu reprezintă aditivi în sine, ele pot fi totuși prezente în compoziția vaccinului.

Vaccinul poate fi administrat la pește de acvacultură în mod individual - oral, de exemplu, prin hrana lor sau prin administrare orală forțată, sau prin injectare (intramuscular sau intraperitoneal).

În mod alternativ, vaccinul poate fi administrat simultan pentru întreaga populație de pești, ce se conține într-un bazin de apă prin pulverizarea, dizolvarea și/sau imersiunea vaccinului. Aceste metode sunt utile pentru vaccinarea tuturor categoriilor de pești, de exemplu, pești alimentari și ornamentali, precum și în medii diferite, cum ar fi, nelimitându-se la acestea, heleșteie, acvarii, medii naturale și rezervoare de apă proaspătă.

Un alt aspect al invenției se referă la un vaccin cu ADN care conține KHV recombinant, conform prezentei invenții.

Vaccinurile cu ADN, conform invenției, nu diferă în esență de vaccinurile cu conținut de KHV recombinant, conform invenției, în sensul că acestea conțin genomul KHV recombinant, conform invenției.

Vaccinurile cu ADN poate fi ușor administrate, de exemplu, prin aplicare intradermică folosind un injector de tip GeneGun®. Acest mod de administrare livrează ADN direct în celulele animalului pentru a fi vaccinat. Cantitatea preferată de acid nucleic, de fragment de ADN, sau de moleculă de ADN recombinant, conform prezentei invenții, conținută într-o compoziție farmaceutică, conform prezentei invenții (se menționează în continuare), constituie de la 10 pg la 1000 μg. De preferință, se utilizează cantități între 0,1 și 100 μg. În mod alternativ, pentru a se administra vaccinul peștii pot fi imersați în soluții care conțin, de exemplu, între 10 pg și 1000 μg/ml de ADN. Toate acestea sunt modalități cunoscute în domeniu.

Vaccinul, conform prezentei invenții, poate fi formulat în orice formă potrivită pentru injectare sau pentru vaccinare prin imersiune, cum ar fi suspensia, soluția dispersată, emulsia etc.

Schema de dozare pentru aplicarea vaccinului, conform prezentei invenții, pentru organismul țintă prevede doze unice sau multiple, care pot fi administrate în același timp sau secvențial, într-un mod compatibil cu doza și formularea și într-o cantitate imunologic eficientă. Este complet în conformitate cu capacitatea unei persoane abile să determine dacă tratamentul este "imunologic eficient", de exemplu, prin administrarea unei infecții experimentale de provocare la animalele vaccinate, ulterior determinand semnele clinice de boală, parametrii serologici sau măsurând re izolarea agentului patogen la animalele țintă.

Cantitatea "farmaceutic eficientă" pentru un vaccin, conform prezentei invenții, care se bazează pe KHV recombinant sau ADN KHV recombinant, conform invenției, depinde de efectul dezirabil și de organismul țintă. Determinarea cantității eficiente se realizează în conformitate cu calificările de rutină ale practicianului. Cantitatea potrivită de ADN KHV recombinant, conform prezentei invenții, conținută într-o compoziție farmaceutică, conform invenției, a fost descrisă anterior.

Cantitatea preferată de vaccin viu cu conținut de tulpină de virus recombinant KHV, conform prezentei invenții, este exprimată, de exemplu, în unități formatoare de placă (PFU). De exemplu, pentru un vector viral activ doza potrivită pentru animale este cuprinsă între 1 și 1010 unități formatoare de plăci (PFU), mai preferată fiind de 102 și 106 PFU/doză.

Modalitățile de administrare care pot fi aplicate sunt numeroase, toate fiind cunoscute în domeniu. Vaccinurile, conform prezentei invenții, de preferință, sunt administrate peștilor prin injectare (intramusculară sau intraperitoneal), imersiune, înmuiere sau *per os*. Protocolul de administrare poate fi optimizat în conformitate cu practicile standard de vaccinare.

În cazul în care vaccinul conține o formă nereplicativă de KHV recombinant, conform invenției, doza va fi exprimată ca număr de particule virale nerepliative care urmează să fie administrate. În cazul dat doza ar fi, de obicei, ceva mai mare comparativ cu administrarea de particule virale vii, deoarece particulele de virus viu se reproduc într-o anumită măsură în animalul țintă, înainte de a fi eliminate de către sistemul imunitar. Pentru vaccinurile pe bază de particule virale nerepliative, este, de obicei, potrivită o cantitate de circa 104...109 particule.

De preferință vaccinul se administrează prin imersiune, în special când se utilizează KHV recombinant viu, conform invenției. Este deosebit de eficientă utilizarea unor asemenea vaccinuri într-un mediu de acvacultură comercială.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1- 8, în care:

- fig. 1: reprezentarea schematică a regiunii genomului CyHV-3 care conține ORF57. Coordonatele ATG și codoanele de stopare din fiecare ORF (conform nr. de acces în GenBank

NC_009127) sunt indicate. Sunt prezentate coordonatele promotorilor putativi (P) identificați prin silico-analize în ORF56 și ORF57 sau în apropierea lor. Numărul care urmează după litera P identifică ORF sub controlul secvenței promotorului identificat. Secvențele selectate pentru a fi deletate în scopul invalidării ORF56 și/sau ORF57 sunt prezentate în partea superioară. Coordonatele de deleție sunt indicate;

- fig. 2, 3: diagrama etapelor realizate pentru producerea plasmidelor recombinante FL BAC galK cu deleție pentru ORF57 (fig. 2) sau ORF56 (fig. 3), precum și demonstrarea reconstituției virusului infecțios din plasmidele produse. Regiunile ORF57 sau ORF56, identificate în fig. 1, au fost înlocuite cu o casetă de expresie galK folosind recombinația omoloagă în *E. coli*. Pentru a reconstitui virusul infecțios cu locusul (tulpini FL BAC revertante) timidin kinazei (TK) de tip sălbatic, plasmidele recombinante au fost co-transfectate în celule permissive CCB cu plasmida pGEMT-TK. Pentru a reconstitui virusul infecțios cu o formă trunchiată de TK (tulpini FL BAC excizate), plasmidele recombinante au fost transfectate în celule CCB care expresează recombinaza Cre;

- fig. 4: diagrama etapelor realizate pentru producerea plasmidelor recombinante FL BAC cu deleție pentru ORF57 și ORF56 (ORF56-57), precum și demonstrarea reconstituției virusului infecțios din plasmidele produse. Regiunea ORF56-57, astfel cum este identificată în figura 1, a fost înlocuită cu o casetă de expresie galK utilizând recombinația omoloagă în *E. coli*. Casetă de expresie galK a fost apoi eliminată prin recombinație omologă cu o secvență de ADN sintetic corespunzătoare regiunilor genomului KHV din caseta de expresie galK flancate (casetă ORF56-57 Del). Pentru a reconstitui virusul infecțios cu locusul timidin kinazei (TM) de tip sălbatic (tulpini FL BAC revertante) plasmida recombinantă a fost co-transfectată în celule permissive CCB cu plasmida pGEMT-TK. Pentru a reconstitui virusul infecțios cu o formă trunchiată de TK (tulpini FL BAC excizate), plasmida recombinantă a fost transfectată în celulele CCB care expresează recombinaza Cre;

- fig. 5: testele de inofensivitate (A-D) și vaccinare/provocare (E-G) pentru recombinante cu deleția unui ORF57. Inofensivitatea tulpinilor FL BAC excizate ORF57 Del 1 galK (A) și FL BAC excizate ORF57 Del 2 galK (B) a fost testată cum este descris în exemple (testele de inofensivitate) pe crapul comun (cu vârsta de 7 luni, greutatea medie de 3,74 g, n = 20). Tulpina FL BAC excizată (C) și mostra infectată (D) au fost folosite în calitate de control pozitiv și negativ, respectiv. Procentele de supraviețuire la crap sunt exprimate în funcție de zilele post-infecție, luând ziua 0 de referință. Șase săptămâni după infecția cu recombinante cu deleția unui ORF57 (E și F) la pește s-a realizat provocarea așa cum este descris în exemple (vaccinare/provocare). Peștele, care a constituit mostra infectată, a fost folosit în calitate de lot martor (G). Procentele de supraviețuire a crapilor sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua 42 ca referință;

- fig. 6: inofensivitatea recombinantelor cu deleția unui ORF56.

Inofensivitatea tulpinilor FL BAC excizate ORF56 Del 1 galK (A) și FL BAC excizate ORF56 Del 2 galK (B) a fost testată cum este descris în exemple (testele de inofensivitate) la crapul comun (vârsta 7 luni, greutatea medie de 3,74 g, n = 20). Tulpina FL BAC excizată (C) și mostra infectată (D) au fost folosite în calitate de control pozitiv și negativ, respectiv. Procentele de supraviețuire la crap sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua 0 ca referință;

- fig. 7: testele de inofensivitate (A-C) și vaccinare/provocare (D-G) pentru tulpina FL BAC excizată ORF56-57 Del. Inofensivitatea tulpinii FL BAC excizate ORF56-57 Del (B) se testează așa cum e descris în exemple (testele de inofensivitate) pe crapul comun (vârsta 7 luni, greutatea medie de 4,41 g, n = 30). Tulpina FL BAC excizată (A) și mostra infectată (C) au fost folosite în calitate de control pozitiv și negativ, respectiv. Modelarea infecției s-a realizat în grupe duble. Procentele de supraviețuire a crapului sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua 0 ca referință.

Testele de vaccinare/provocare (D-G). Peștii (n=15) care au fost vaccinați cu tulpină FL BAC excizată ORF56-57 Del au fost ulterior provocați cu tulpină KHV FL la 3 săptămâni (D) sau la 6 săptămâni (F) după vaccinare așa cum este descris în exemple (vaccinare/provocare). Grupele duble cu pești la care s-a imitat infectarea sunt utilizați în calitate de martori (E și G). Procentele de supraviețuire a crapului sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua de provocare ca referință;

- fig. 8: testele de inofensivitate (A-C) și vaccinare/provocare (D-G) pentru tulpina FL BAC revertantă ORF56-57 Del. Inofensivitatea tulpinii FL BAC revertante ORF56-57 Del (B) a fost testată așa cum e descris în exemple (Teste de inofensivitate) pe crapi comuni (vârsta de 7

luni, greutatea medie de 3,74 g, n = 30). Tulpina FL BAC revertantă (A) și mostra infectată (C) au fost folosite în calitate de control pozitiv și negativ, respectiv. Modelarea infecției s-a realizat în grupe duble. Procentele de supraviețuire a crapului sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua 0 ca referință. Testele de vaccinare/provocare (D-G). Peștii (n=15) care au fost vaccinați cu tulpină FL BAC revertantă ORF56-57 Del au fost ulterior provocați cu tulpină KHV FL la 3 săptămâni (D) sau la 6 săptămâni (F) după vaccinare așa cum este descris în exemple (vaccinare/provocare). Grupele duble cu pești la care s-a imitat infectarea erau utilizate în calitate de martor (E și G). Procentele de supraviețuire a crapului sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua de provocare ca referință.

Exemple

a) Celule și virusuri. Celulele de creier de *Cyprinus carpio* (CCB) (Neukirch M., Bottcher K., Bunnajrakul S. Isolation of a virus from Koi with altered gills. Bull. 1999, Eur. Ass. Fish. Pathol. Nr. 19, p. 221-224) au fost cultivate într-un mediu esențial minimal (MEM, Invitrogen) cu conținut de 4,5 g/l de glucoză (monohidrat de D-glucoză, Merck) și 10% ser fetal de vițel (FCS). Celulele s-au cultivat la 25°C într-o atmosferă umedă cu conținut de 5% CO₂. Tulpina CyHV-3 FL s-a izolat din rinichii peștelui care a pierit din cauza infecției cu KHV (CER Marloie, Belgium).

b) Plasmida CyHV-3 BAC. Plasmida CyHV-3 FL BAC s-a utilizat în calitate de plasmidă parentală pentru producerea recombinanțelor CyHV-3. Această plasmidă este amplu descrisă în literatura de specialitate (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. 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*. 2008, J. Virol., nr. 82, p. 4955-4964), (WO 2009027412 A1 2009.03.05). Plasmida CyHV-3 FL BAC este o clonă a unui cromozom artificial bacterian infecțios (BAC) al genomului tulpinii CyHV-3 FL. În această plasmidă, caseta BAC loxP-flancată se inserează în locusul CyHV-3 TK (ORF55).

c) Producerea plasmidelor recombinante ORF 57 CyHV-3 FL BAC utilizând selecția pozitivă galK în bacterii. Două plasmide recombinante CyHV-3 FL BAC cu deleție în locusul ORF57 (a vedea ORF57 Del 1 și ORF57 Del 2 în fig. 1) sunt produse utilizând selecția pozitivă galK în bacterii așa cum a fost descris în literatura de specialitate (Warming S., Costantino N., Court D. L., Jenkins N. A. & Copeland N. G. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. 2005, Nucleic. Acids. Res., nr. 33, e36), (fig. 2). Fragmentul de recombinare constă din gena galactokinazei (galK) (1231 bp) flancată cu 50 bp ale secvenței omoloage la regiunea genomului CyHV-3 adiacentă secvenței care urmează a fi deletată (fig. 1).

Aceste fragmente au fost produse prin PCR, utilizând vectorul pgalK ca șablon. Pentru amplificare s-au utilizat primerii următori: (Tabelul pentru secvența primer): pentru producerea deleției ORF57 Del 1: primerii ORF57 Del1 fw și ORF57 Del1 rev rezultând amplicon ORF57 Del 1-galK; pentru producerea deleției ORF57 Del 2: primerii ORF57 Del2 fw și ORF57 Del2 rev rezultând amplicon ORF57 Del 2-galK. Produsul de amplificare se purifică (QIAquick Gel Extraction Kit). Ulterior celulele electrocompetente SW102, care conțin plasmida CyHV-3 FL BAC, se electroporează cu 50 ng de produse PCR descrise mai sus. Celulele electroporate se plachează pe un mediu minimal solid M63 suplimentat cu 20% galactoză și cloramfenicol (17 µg/ml) pentru selectarea bacteriei în care s-a produs recombinarea omoloagă. În cele din urmă, coloniile obținute au fost brăzdate pe plăci indicatoare MacConkey așa cum este descris în alte surse pentru a confirma producerea de clone pozitive galK. Moleculele recombinante BAC au fost amplificate și purificate (QIAGEN Large-Construct Kit), iar structura lor moleculară a fost controlată cu o restricție combinată endonuclează-transfer Southern, PCR și secvențiere.

Tabelul 1

Oligonucleotide utilizate pentru amplificare PCR			
Primer	Secvență*	bp	Coordonate de secvențe subliniate, conform nr. de acces în Genbank NC_009127
ORF57 Del1 fw	<u>5'-CGTACAGGGTGGCGGTGCACCTGTC</u> <u>CCAGAAGGCCTTCACCGCCTGGGAGCT</u> <u>CCCTGTTGACAATTAATCATCGGCA-3'</u>	77bp	99551-99599
ORF57 Del1 rev	<u>5'-CGGCTCATCATCTGCGGTCCATCC</u> <u>AGGCGCCCTTGCCCCACAGCAGAGCTT</u> <u>CAGCACTGTCCTGCTCCTT-3'</u>	71bp	99743-99694
ORF57 Del2 fw	<u>5'-CTTTGTGCTGCACAAGGGCTTCAAC</u> <u>CACCACTACGCCCTTCTGCGATCACCCC</u> <u>TGTTGACAATTAATCATCGGCA-3'</u>	74bp	99894-99943
ORF57 Del2 rev	<u>5'-CTGAGCGTTGTTGAAGGCCTCCATC</u> <u>AGGTGCTGCCTGATCTGCTTGTGCAGA</u> <u>GCTCAGCACTGTCCTGCTCCTT-3'</u>	74bp	100161-100112

* Primerii reprezintă secvențe omoloage la genomul CyHV-3 (secvențele subliniate) și la caseta de expresie galK.

d) Reconstituirea virusului infecțios din plasmida recombinantă ORF 57 CyHV-3 FL BAC. Plasmidele CyHV-3 BAC sunt transfectate (Lipofectamine Plus, Invitrogen) în CCB permissive. Pentru producerea tulpinilor derivate din plasmida BAC cu locusul TK de tip sălbatic, plasmidele CyHV-3 BAC sunt co-transfectate în celulele CCB împreună cu vectorul pGEMT-TK (raportul molecular de 1:75). Șapte zile după transfecție plăcile virale negative pentru expresia EGFP (caseta BAC codificată pe casetă de expresie EGFP) au fost selectate și îmbogățite în trei runde succesive de purificare a plăcilor. În mod similar, pentru reconstituirea virionilor cu caseta BAC excizată de la genomul viral, plasmidele BAC sunt co-transfectate în celulele CCB împreună cu vectorul pEFIN3-NLS-Cre de codificare a recombinazei Cre asociate la semnalul de localizare nucleară (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. 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*. 2008, J. Virol., nr. 82, p. 4955-4964), (raportul molecular de 1:70).

e) Producerea plasmidelor recombinante ORF 56 CyHV-3 FL BAC utilizând selecția pozitivă galK în bacterii. Două plasmide recombinante CyHV-3 FL BAC cu deleție în locusul ORF56 (a vedea ORF56 Del 1 și ORF56 Del 2 în fig. 1) se produc utilizând selecția pozitivă galK în bacteria descrisă anterior (Warming S., Costantino N., Court D. L., Jenkins N. A. & Copeland N. G. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. 2005, Nucleic. Acids. Res., nr. 33, e36), (fig. 3). Fragmentul de recombinare constând din gena galactokinazei (galK) (1231 bp) este flancat cu 50 bp ale secvenței omoloage la regiunile genomului CyHV-3 adiacente secvenței care urmează a fi deletată (fig. 1). Aceste fragmente au fost produse prin PCR, utilizând vectorul pgalK ca șablon. Pentru amplificare s-au utilizat primerii următori: (tab. 2 pentru secvența primer); pentru producerea deleției ORF56 Del 1: primerii ORF56 Del1 fw și ORF56 Del1 rev rezultând amplicon ORF56 Del 1-galK; pentru producerea deleției ORF56 Del 2: primerii ORF56 Del2 fw și ORF56 Del2 rev rezultând amplicon ORF56 Del 2-galK. Produsul de amplificare se purifică (QIAquick Gel Extraction Kit). Ulterior celulele electrocompetente SW102, care conțin plasmida CyHV-3 FL BAC, se electroporează cu 50 ng de produse PCR descrise mai sus. Celulele electroporate se plachează pe un mediu minimal solid M63 suplimentat cu 20% galactoză și cloramfenicol (17 μg/ml) pentru selectarea bacteriei în care s-a produs recombinarea omoloagă. În cele din urmă,

coloniile obținute au fost brăzdate pe plăci indicatoare MacConkey, așa cum este descris în alte surse, pentru a confirma producerea de clone pozitive galK. Moleculele recombinante BAC au fost amplificate și purificate (QIAGEN Large-Construct Kit), iar structura lor moleculară a fost controlată cu o restricție combinată endonuclează-transfer Southern, PCR și secvențiere.

Tabelul 2

Oligonucleotide utilizate pentru amplificarea PCR			
Primer	Secvență*	bp	Coordonate de secvențe subliniate, conform nr. de acces în Genbank NC_009127
ORF56 Del1 fw	<u>5'-TCAGGATCGAGGTCACCAGCTTGAG</u> <u>CTTCTCGGGCATGTACTCGCGCCACCC</u> <u>TGTTGACAATTAATCATCGGCA-3'</u>	74bp	97475-97524
ORF56 Del1 rev	<u>5'-CGGCGAGGTGATTTTCGGTCATGAGC</u> <u>AAATCGATTGCGGCCGAACAGCAGCTC</u> <u>AGCACTGTCCTGCTCCTT-3'</u>	70bp	98361-98312
ORF56 Del2 fw	<u>5'-GATCGGGTACGTCGGCGTGCGCCAC</u> <u>TTGACCTTCCTCAACGTCCCCGTACCT</u> <u>GTTGACAATTAATCATCGGCA-3'</u>	74bp	97275-97324
ORF56 Del2 rev	<u>5'-GCGCACACCATCACCATCTGTCCCA</u> <u>TGTCTCCCCAACGCTACACCGTGACTC</u> <u>AGCACTGTCCTGCTCCTT-3'</u>	70bp	98561-98512

* Primerii reprezintă secvențe omoloage la genomul CyHV-3 (secvențele subliniate) și la caseta de expresie galK.

f) Reconstituirea virusului infecțios din plasmida recombinantă ORF 56 CyHV-3 FL BAC. Plasmidele CyHV-3 BAC sunt transfectate (Lipofectamine Plus, Invitrogen) în CCB permissive. Pentru producerea tulpinilor derivate din plasmida BAC cu locusul TK de tip sălbatic, plasmidele CyHV-3 BAC sunt co-transfectate în celulele CCB împreună cu vectorul pGEMT-TK (raportul molecular de 1:75). Șapte zile după transfecție plăcile virale negative pentru expresia EGFP (caseta BAC codificată pe casetă de expresie EGFP) au fost selectate și îmbogățite în trei runde succesive de purificare a plăcilor. În mod similar, pentru reconstituirea virionilor cu caseta BAC excizată de la genomul viral, plasmidele BAC sunt co-transfectate în celulele CCB împreună cu vectorul pEFIN3-NLS-Cre de codificare a recombinazei Cre asociate la semnalul de localizare nucleară (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. 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*. 2008, J. Virol., nr. 82, p. 4955-4964), (raportul molecular de 1:70).

g) Producerea plasmidelor recombinante ORF56-57 CyHV-3 FL BAC utilizând selecția pozitivă și negativă galK în bacterii. Plasmidele recombinante CyHV-3 FL BAC cu deleție în locii ORF56 și ORF57 (fig. 1) se produc utilizând selecția pozitivă și negativă galK în bacteria descrisă anterior (Messerle M., Crnkovic I., Hammerschmidt W., Ziegler H. & Koszinowski U. H. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, nr. 94, p. 14759-14763), (fig. 4). Primul proces de recombinare (selecția galK pozitivă) înlocuiește secvența identificată din ORF56 și ORF57 cu gena galactokinazei (galK) (1231 bp). Fragmentul de recombinare constă din gena galactokinazei (galK) (1231 bp) flancată cu 50 bp ale secvențelor omoloage la regiunile genomului CyHV-3 adiacente secvenței care urmează a fi deletată (fig. 1), ORF56-57 Del galK, fig. 4)). Acest fragment a fost produs prin PCR, utilizând primerii ORF56-ORF57 Del fw și ORF56-ORF57 Del rev (tab. 3) și vectorul pgalK ca șablon. Produsul de amplificare se purifică (QIAquick Gel Extraction Kit). Ulterior celulele electrocompetente SW102, care

conțin plasmida CyHV-3 FL BAC, se electroporează cu 50 ng de produs PCR descris mai sus. Celulele electroporate se plachează pe un mediu minimal solid M63 suplimentat cu 20% galactoză și cloramfenicol (17 µg/ml) pentru selectarea bacteriei în care s-a produs recombinarea omoloagă. În cele din urmă, coloniile obținute au fost brăzdate pe plăci indicatoare MacConkey așa cum este descris în alte surse pentru a confirma producerea de clone pozitive galK. Moleculele recombinante BAC au fost amplificate și purificate (QIAGEN Large-Construct Kit), iar structura lor moleculară a fost controlată cu o restricție combinată endonuclează-transfer Southern, PCR și secvențiere. Procesul de secvențiere secund (selecția galK negativă) înlocuiește caseta galK din plasmida FL BAC ORF 56-57 Del galK. Fragmentul de ADN sintetic cu 499 bp (caseta ORF 56-57 Del, a se vedea în continuare) a fost folosit pentru a atinge acest obiectiv. El constă din secvențe omoloage la regiunile genomului CyHV-3 adiacente secvenței care urmează a fi deletată: 250 bp (din coordonatele 96751...9700 cu nr de acces GenBank NC_009127) în amonte de gena galK și 249 pb (din coordonatele 99751 la 100000, cu deleția bazei 99760 cu nr. de acces GenBank NC_009127) în aval pe gena galK. Celulele electrocompetente SW102 care conțin plasmida BAC FL-57 ORF56 Del galK au fost electroporate cu 50 ng de produs PCR descris mai sus. Celulele electroporate au fost placcate pe mediu minimal solid suplimentat cu 2-dezoxi-galactoză pentru a selecta bacteriile în care s-a produs recombinarea omologă (digestia 2-dezoxi-galactozei de galK producând produse toxice). Molecule recombinante BAC au fost amplificate și purificate (QIAGEN large-Construct Kit), iar structura lor moleculară a fost controlată utilizând o restricție combinată endonuclează-transfer Southern, PCR și secvențiere.

Caseta ORF56-57 Del:

5'-

tttgtcaaccagctccagggtcggttggcgctggcctccttgccttgggtcacggcgatggcagacgccacaatcctcgcgacgggtt
ccgtcagagcagagttcttaaacatttcgacgcctcctccgacgggtgaaccactctgaccaattcaggctcgaggggccacgtctgcctgt
gcatcatcgtctgcacagcgtccctcgacagccccagcccgacagcagtcgccactcttcctgttgagtcacgactcgtaaatga
agctgcttgagcgcgtgtacgggttcgatggccctgcagaaggcgctgcgcattcagaagcagggtcgcaggatggtggggct
cgaggaccggagaagggtggaggatgaagaactttgtgctgcacaagggcttcaaccaccactacgccttctgcgatcaccactggc
agcactgggcctggggcctccttcgagggcgagctgccgacgtgggtg-3'

Tabelul 3

Oligonucleotide utilizate pentru amplificarea PCR			
Primer	Secvențe*	bp	Coordonate ale secvențelor subliniate, conform nr. de acces în Genbank NC_009127
ORF 56 - ORF 57 Del fw	<u>5'-GTCCCTCGACAGCCCCAGCCCGCAC</u> <u>AGCAGTCGCCACTCTTCCCTGTTGATC</u> AGCACTGTCCTGCTCCTT-3'	70bp	96951-97000
ORF 56 - ORF 57 Del rev	<u>5'-AACCCGTACACGACGCGCTCAAGCA</u> <u>GCTTGATCTTGACGACGTCGTGCACCC</u> TGTTGACAATTAATCATCGGCA-3'	74bp	99800-99751

* Primerii reprezintă secvențe omoloage la genomul CyHV-3 (secvențele subliniate) și la caseta de expresie galK.

h) Reconstituirea virusului infecțios din plasmida recombinantă ORF56-57 CyHV-3 FL BAC. Plasmidele CyHV-3 BAC sunt transfectate (Lipofectamine Plus, Invitrogen) în CCB permissive. Pentru producerea tulpinilor derivate din plasmida BAC cu locusul TK de tip sălbatic, plasmidele CyHV-3 BAC sunt co-transfectate în celulele CCB împreună cu vectorul pGEMT-TK (raportul molecular de 1:75). Șapte zile după transfecție plăcile virale negative pentru expresia EGFP (caseta BAC codificată pe casetă de expresie EGFP) au fost selectate și îmbogățite în trei runde succesive de purificare a plăcilor. În mod similar, pentru reconstituirea virionilor cu caseta BAC excizată de la genomul viral, plasmidele BAC sunt co-transfectate în celulele CCB împreună cu vectorul pEFIN3-NLS-Cre de codificare a recombinazei Cre

asociate la semnalul de localizare nucleară (Costes et al. 2008, JVI) (raportul molecular de 1:70).

i) Testele de inofensivitate.

Crapul comun a fost aclimatizat în rezervoare de 60 litri la 24°C timp de 10 zile. Crapul (biomasă de 50 g de pește/l) a fost scufundat timp de 2 ore în apa care conținea 4, 40 sau 400 PFU/ml de tulpina KHV pentru testare. Grupul de control (mostra infectată) a fost scufundat în apa, în care s-a adăugat un volum egal de mediu de cultură. La sfârșitul perioadei de incubare peștii au fost întorși în rezervorul mare. Inoculatele virale au fost titrate înainte de inoculare și retitate după inoculare pentru a se asigura că în grupuri dozele au fost echivalente. Peștii au fost examinați zilnic pentru semne clinice de boală cu KHV, peștii morți erau eliminați.

j) Vaccinarea/provocarea.

Crapul comun a fost aclimatizat în rezervoare de 60 litri la 24°C timp de 10 zile. Pentru vaccinare crapul (biomasă de 50 g de pește/l) a fost scufundat pentru 2 ore în apa care conținea 4, 40 sau 400 PFU/ml de tulpină KHV pentru testare. La sfârșitul perioadei de incubare, peștele era întors în rezervorul mare. La 3 săptămâni sau la 6 săptămâni după vaccinare peștele era provocat cu KHV virulent prin coabitare cu peștele necontaminat infectat chiar înainte de eliberarea lor în rezervorul cu pește vaccinat. Acești pești au fost inoculați prin scufundare pentru 2 ore în apa ce conține 300 PFU/ml de tulpină parentală virulentă FL. În fiecare rezervor ce conținea pește vaccinat au fost adăugați câte doi pești infectați.

k) Rezultatele privind inofensivitatea și provocarea.

Inofensivitatea tulpinilor FL BAC excizate ORF57 Del 1 galK (fig. 5A) și FL BAC excizate ORF57 Del 2 galK (fig. 5B) a fost testată așa cum e descris în exemple (testele de inofensivitate) pe crapul comun (varsta de 7 luni, greutatea medie de 3.74 g, n = 20). Tulpina FL BAC excizată (fig. 5C) și mostra infectată (fig. 5D) s-au utilizat în calitate de control pozitiv și negativ, respectiv. Procentele de supraviețuire a crapului sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua 0 ca referință. Șase săptămâni după infectare cu recombinante cu deleția unui singur ORF57 (fig. 5E și F), peștele era provocat așa cum e descris în exemple (vaccinare/provocare). Peștii din mostra infectată au fost utilizați în calitate de martor (fig. 5G). Procentele de supraviețuire a crapului sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua 42 ca referință.

Din fig. 5A și B se poate constata că deleția mutantă KHV ORF57, conform invenției, este inofensivă, chiar și când se aplică la peștișorii mici.

Din fig. 5A și B, de asemenea, se poate constata că deleția mutant KHV ORF57, conform invenției, este foarte potrivită ca vaccin eficient, în special când se administrează în doză de 40 PFU/ml sau mai mare.

Inofensivitatea tulpinii FL BAC excizate ORF56 Del 1 galK (fig. 6A) și FL BAC excizate ORF56 Del 2 galK (fig. 6B) a fost testată așa cum este descris în exemple (teste de inofensivitate) pe crap comun (varsta de 7 luni, greutatea medie de 3.74 g, n = 20). Tulpina FL BAC excizată (fig. 6C) și mostra infectată (fig. 6D) au fost utilizate în calitate de control pozitiv și negativ, respectiv. Procentele de supraviețuire a crapului sunt exprimate în funcție de zile post-infecție, luând ziua 0 ca referință.

Din fig. 6A și B, mutanții cu deleție ORF56 manifestă o virulență care este comparabilă cu cea a virusului de tip sălbatic de control (de comparat panourile A și B cu panoul C).

După cum se poate observa din fig. 7 și 8, KHV purtător de deleție atât în ORF57, cât și în ORF56 manifestă un profil de siguranță și eficacitate comparabil cu cel al KHV care transportă o singură deleție ORF57.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. WO 2004061093 A1 2004.07.22
2. Messerle M., Crnkovic I., Hammerschmidt W., Ziegler H. & Koszinowski U. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, nr. 94, 1997, p. 14759-14763
3. Borst E., Hahn G., Koszinowski U. & Messerle M. 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., nr. 73, 1999, p. 8320-8329
4. WO 2009027412 A1 2009.03.05

Descrierea este publicată în redacția solicitantului.

(57) Revendicări:

1. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, **caracterizat prin aceea că** conține o genă, în care cadrul de citire deschis 56 (ORF56) și cadrul de citire deschis 57 (ORF57) au fost supuse mutației.
2. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** herpesvirusul este capabil de reproducere.
3. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** mutația este selectată din grupul de inserții sau deleții parțiale ale cadrelor de citire deschise, deleții complete ale cadrelor de citire deschise.
4. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** mutația cuprinde deleții parțiale ale cadrelor de citire deschise.
5. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** mutația cuprinde deleții complete ale cadrelor de citire deschise.
6. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** conține o secvență a vectorului BAC (cromozom bacterian artificial).
7. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 6, **caracterizat prin aceea că** secvența vectorului BAC este excizată din genomul herpesvirusului, lăsând un fragment de ADN heterolog în locul exciziei în genomul virusului herpetic.
8. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** cuprinde cel puțin o mutație suplimentară în cel puțin o genă suplimentară.
9. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 8, **caracterizat prin aceea că** cel puțin una din genele suplimentare este selectată din grupul constând din: gena timidin-kinazei; ORF12: gena putativă a receptorului factorului de necroză tumorală (gena receptorului TNF); ORF16: gena putativă a receptorului cuplat la G-proteina (GPCR); ORF 134: gena putativă omoloagă interleucinei-10; ORF140: gena putativă a timidilat-kinazei.
10. Herpesvirus atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** acesta mai conține un fragment de ADN heterolog.
11. Vector, **caracterizat prin aceea că** conține herpesvirusul atenuat recombinant viu Koi (KHV) conform revendicării 1.
12. Celulă izolată, **caracterizată prin aceea că** conține herpesvirusul atenuat recombinant viu Koi (KHV) conform revendicării 1.
13. Vaccin, care conține herpesvirus atenuat recombinant viu Koi, conform revendicării 1 sau ADN-ul herpesvirusului recombinant atenuat recombinant viu Koi conținând genomul herpesvirusului Koi recombinant viu al crapului.
14. Vaccin, conform revendicării 13, **caracterizat prin aceea că** conține suplimentar un purtător farmaceutic acceptabil.
15. Procedeu de profilaxie sau de tratament terapeutic al unei boli la pești, cauzată de virusul herpetic Koi (KHV) al crapului, **caracterizat prin aceea că** se administrează vaccinul conform revendicării 14.
16. Compoziție imunogenă, **caracterizată prin aceea că** conține herpesvirusul atenuat recombinant viu Koi (KHV) al crapului conform revendicării 1 și un purtător farmaceutic acceptabil.

Șef adjunct Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

GROSU Petru

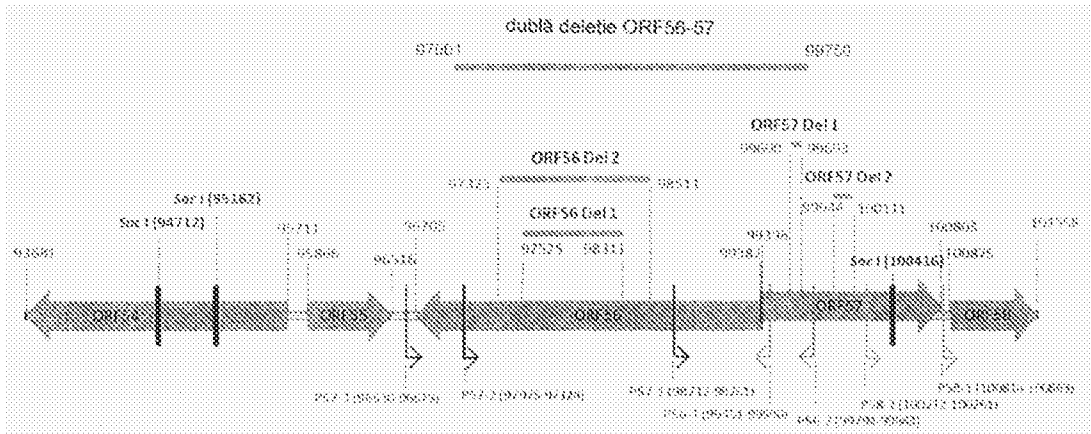


Fig. 1

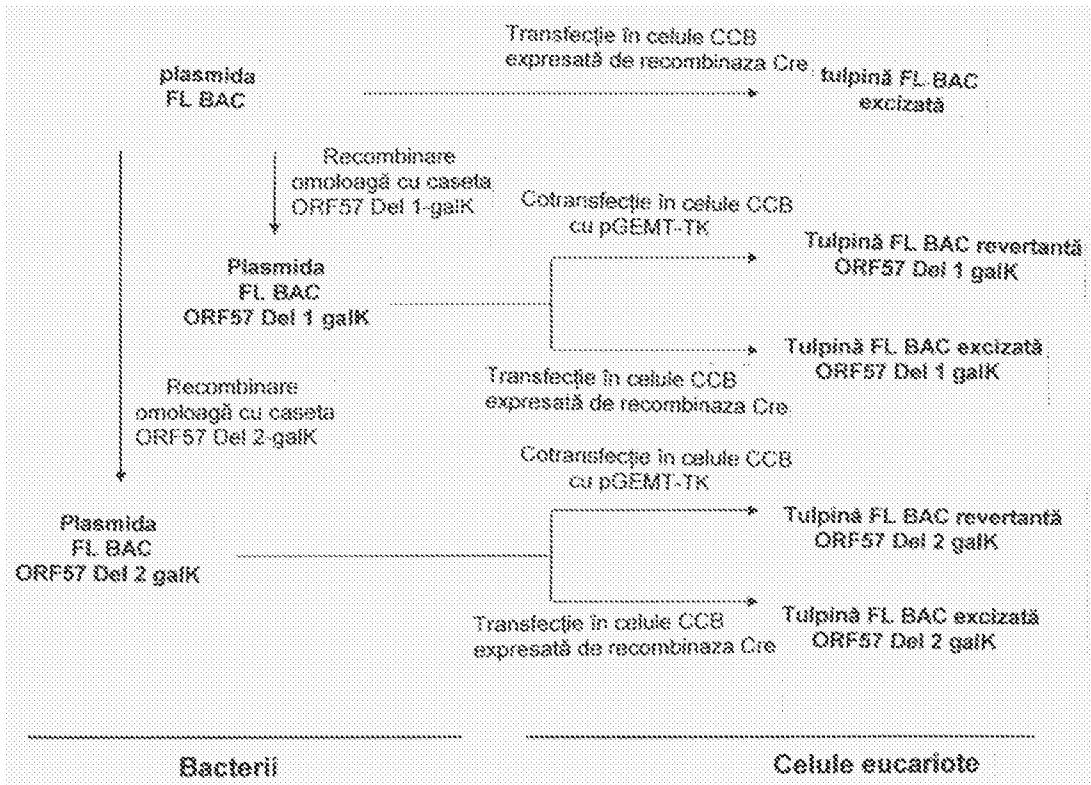


Fig. 2

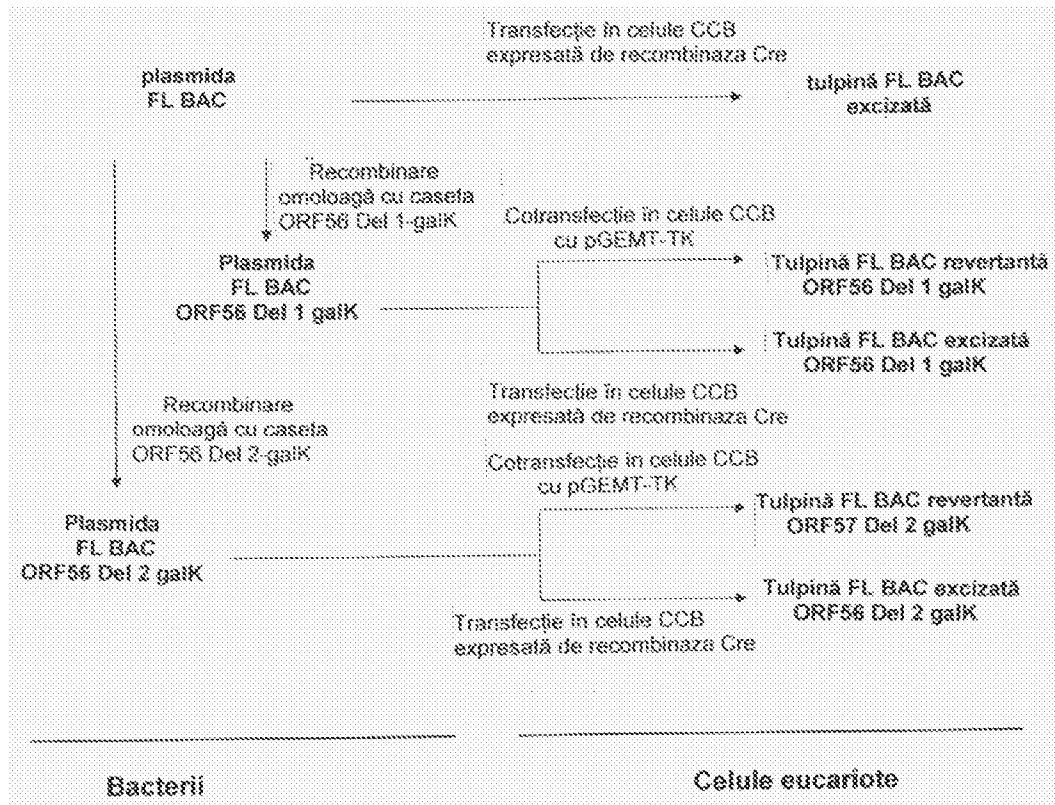


Fig. 3

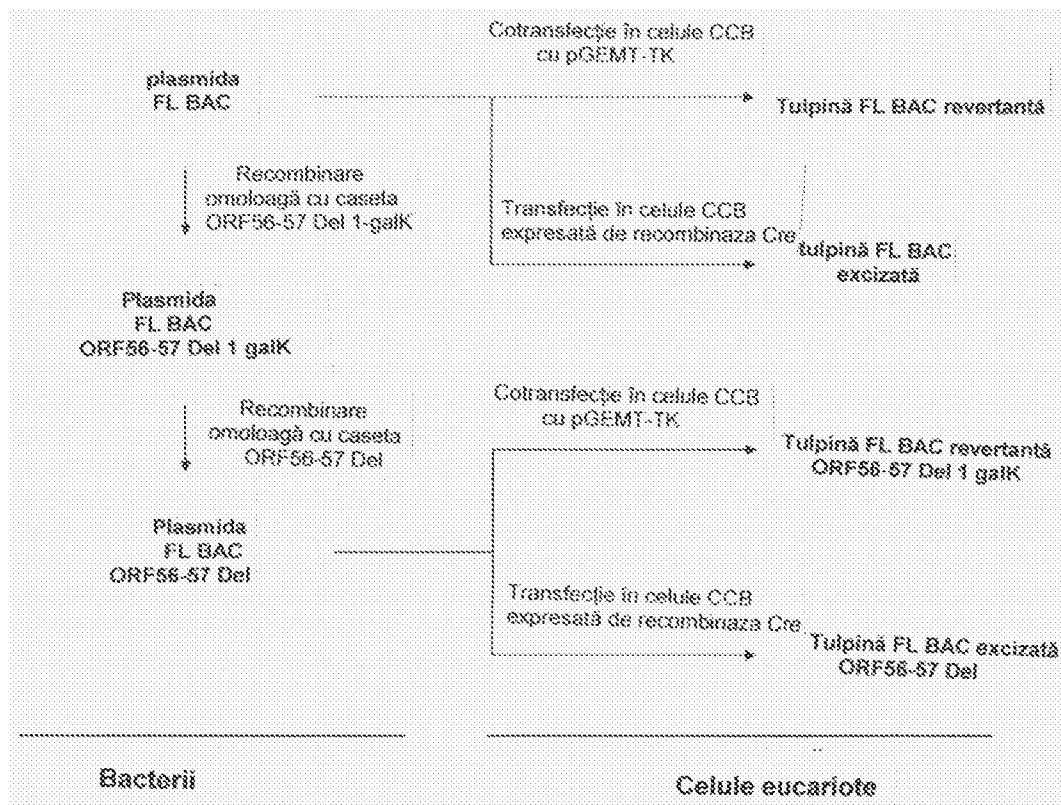


Fig. 4

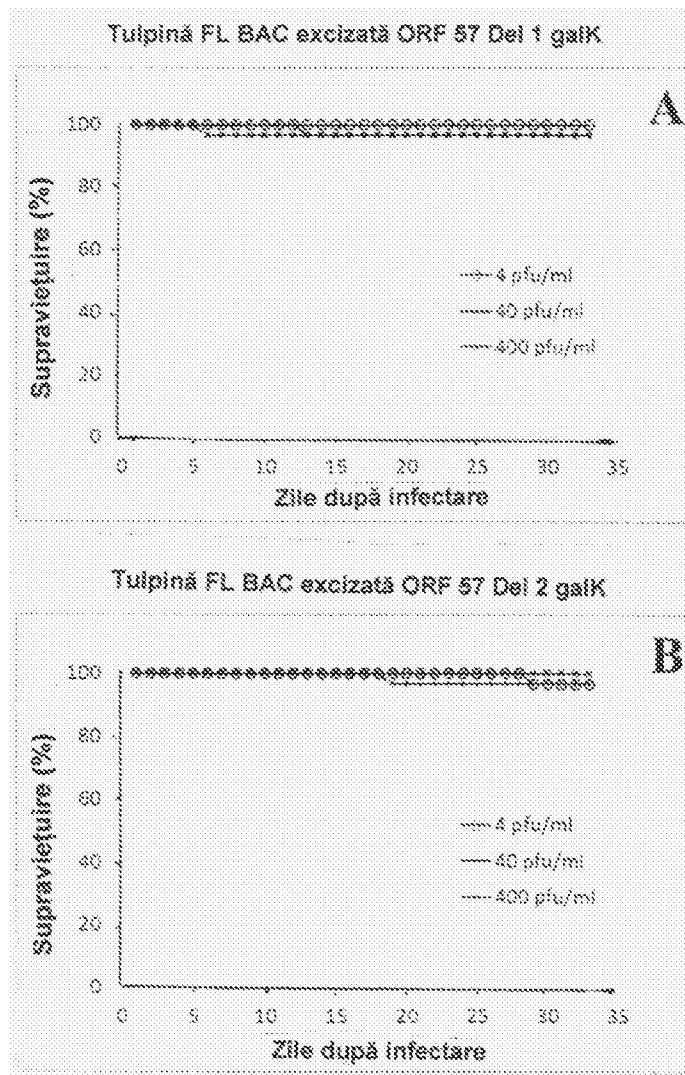


Fig. 5 A, B

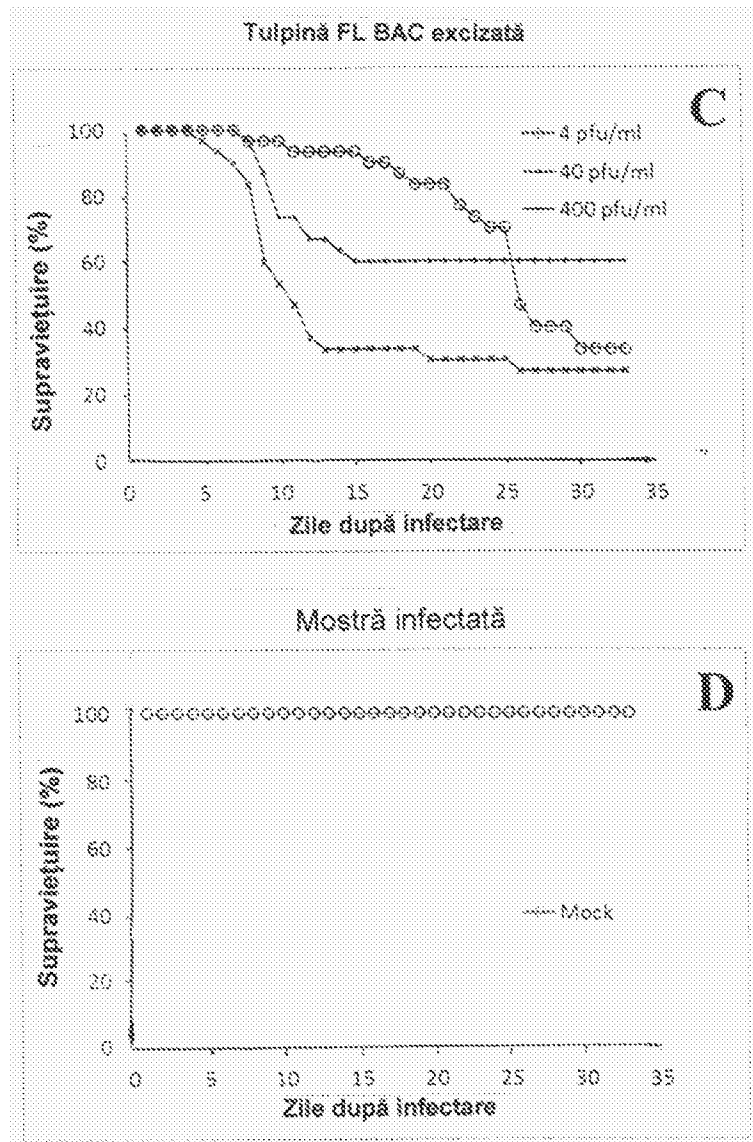


Fig. 5 C, D

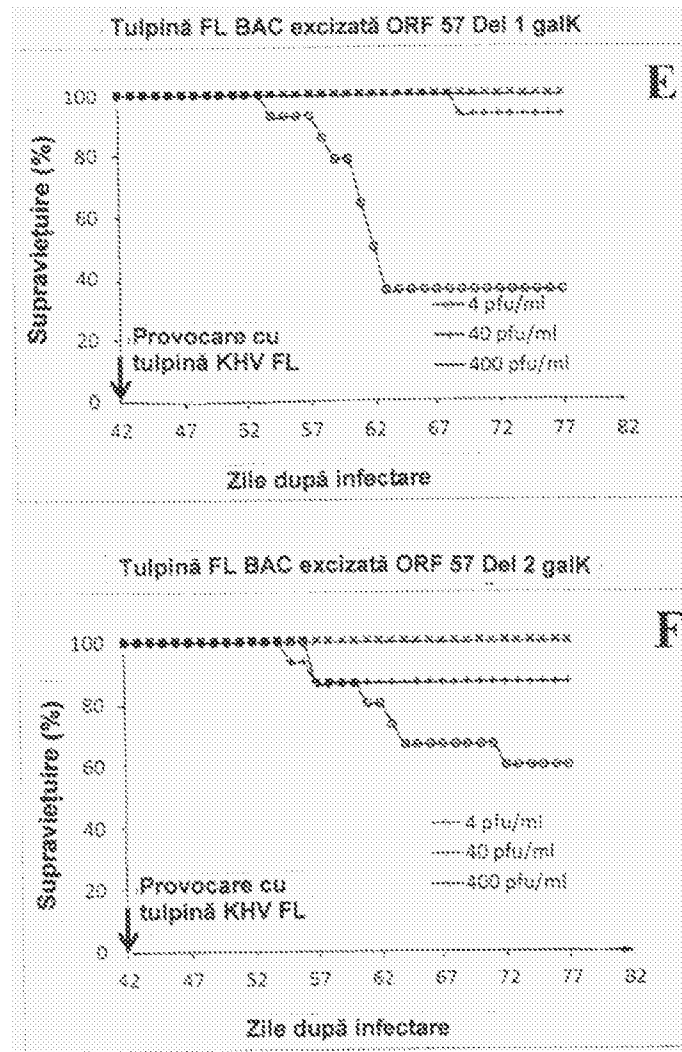


Fig. 5 E, F

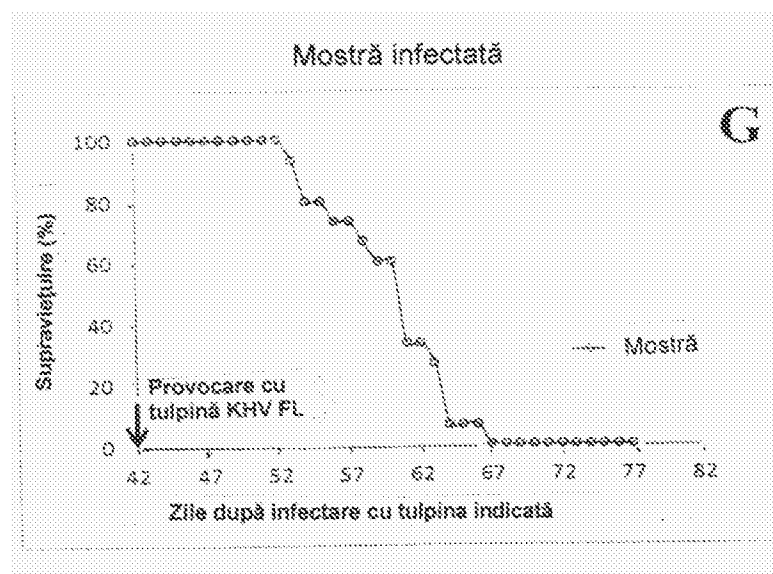


Fig. 5 G

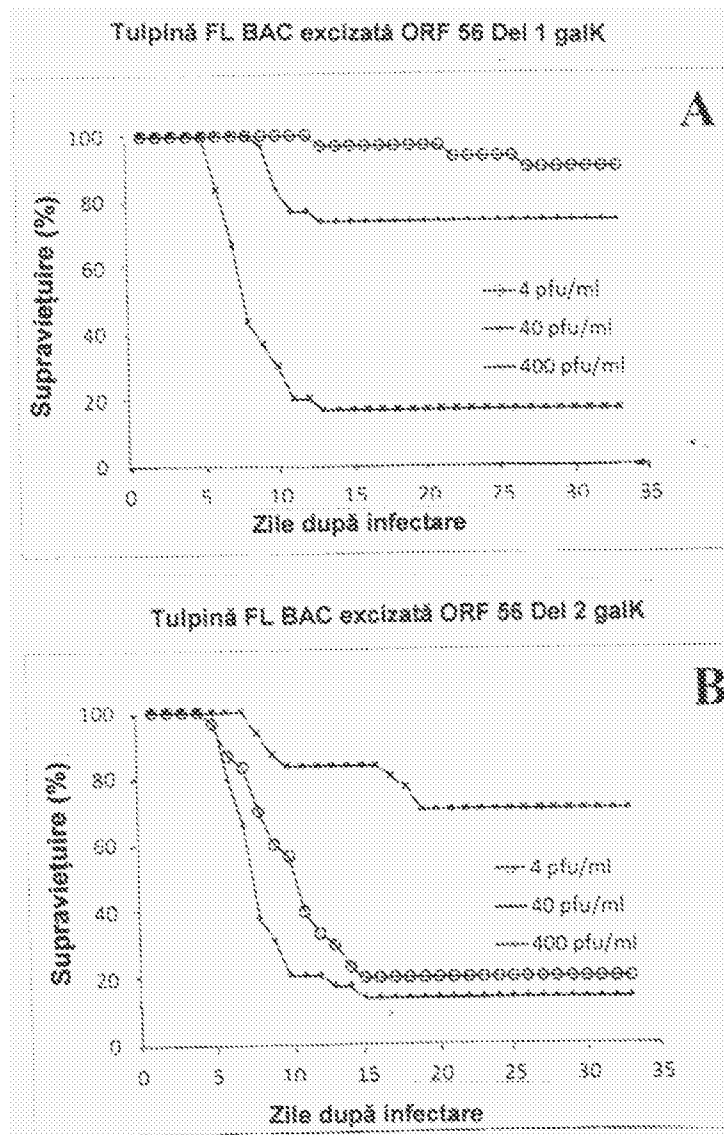


Fig. 6 A, B

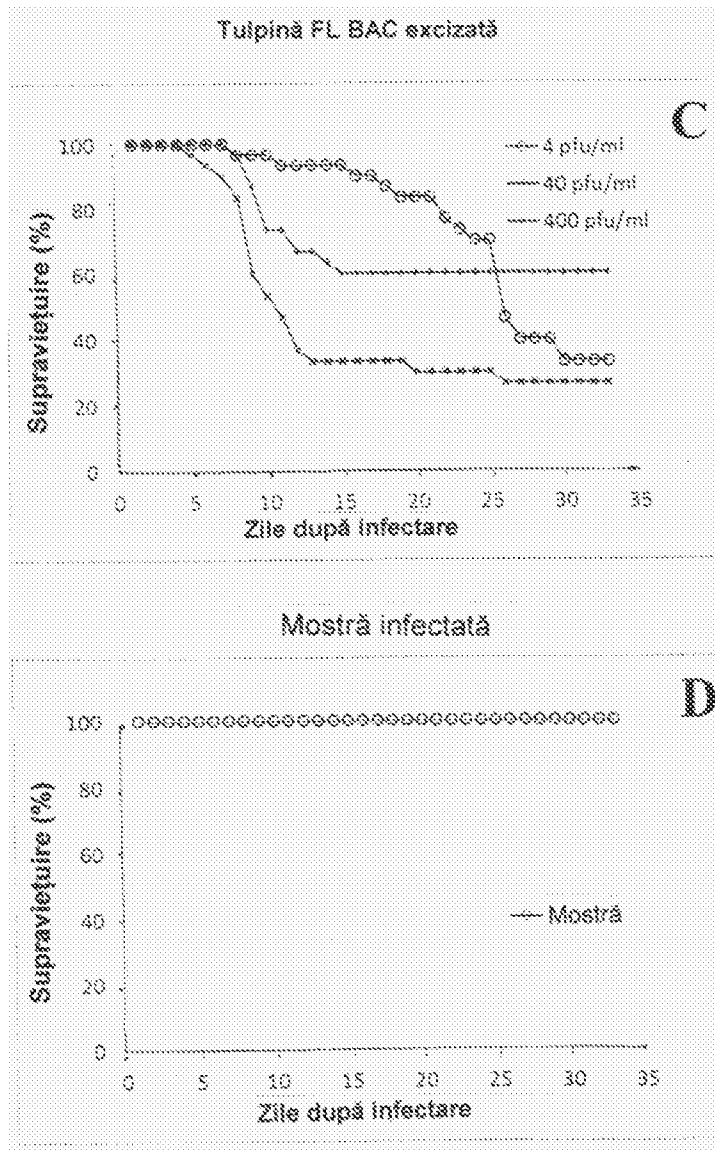


Fig. 6 C, D

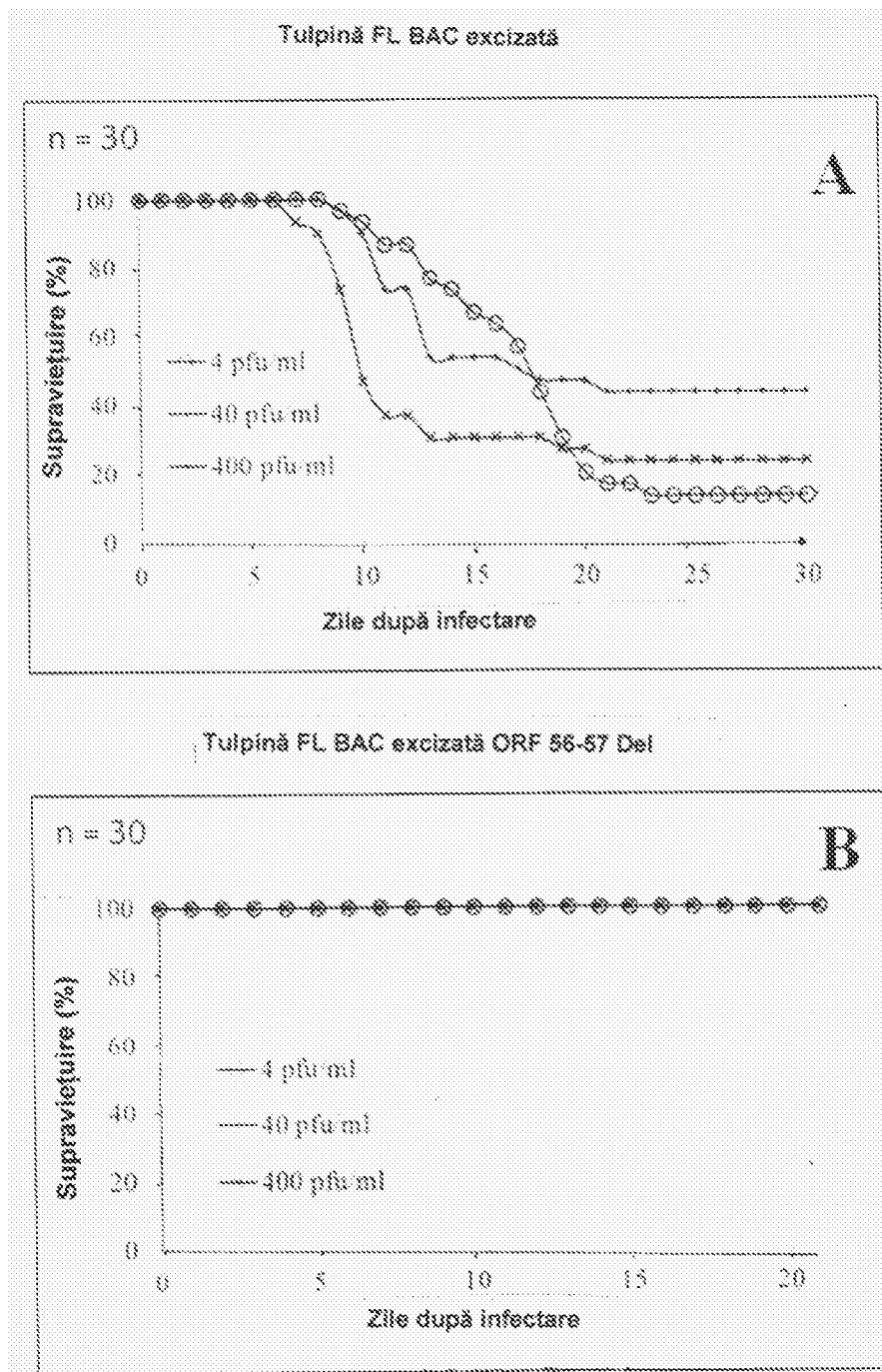


Fig. 7 A, B

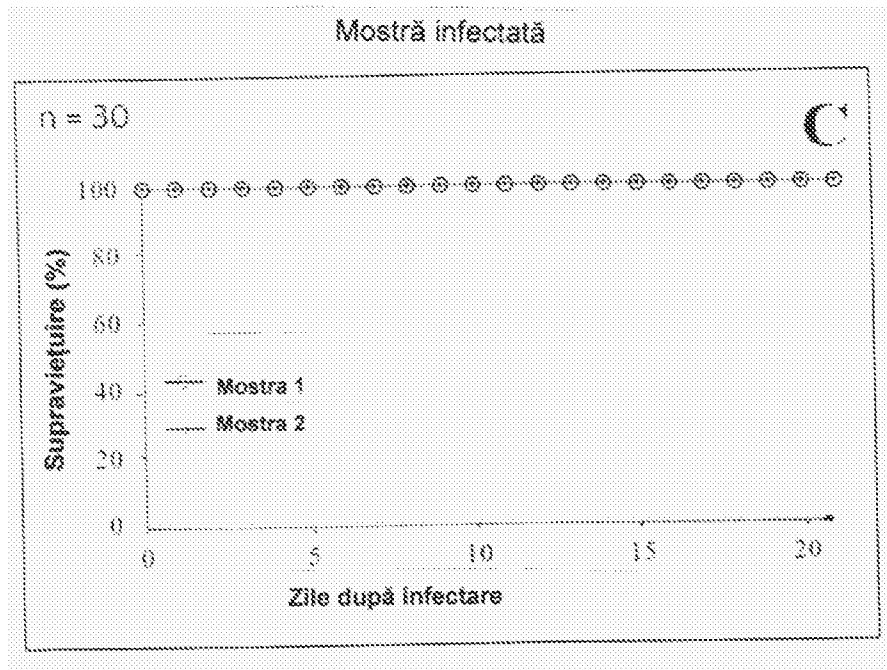
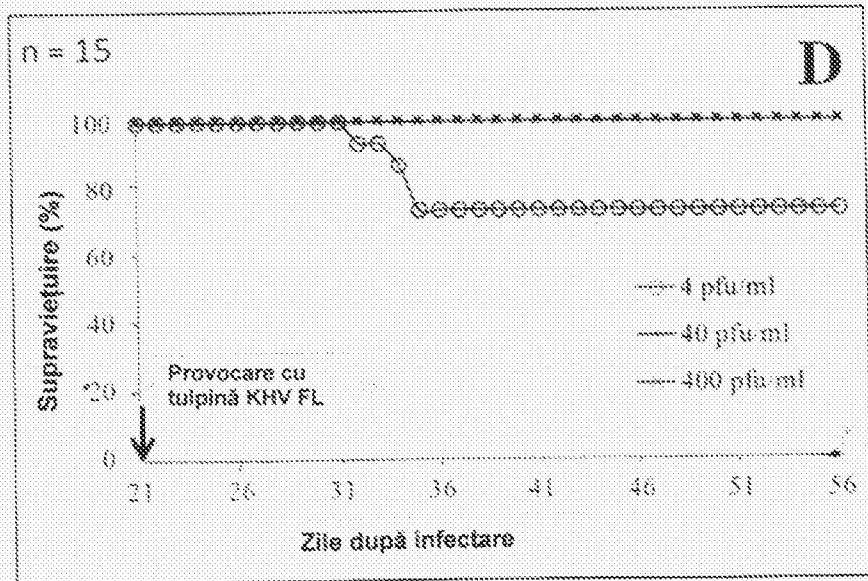


Fig. 7 C

Tulpină FL BAC excizată ORF56-57 Del



Mostră infectată

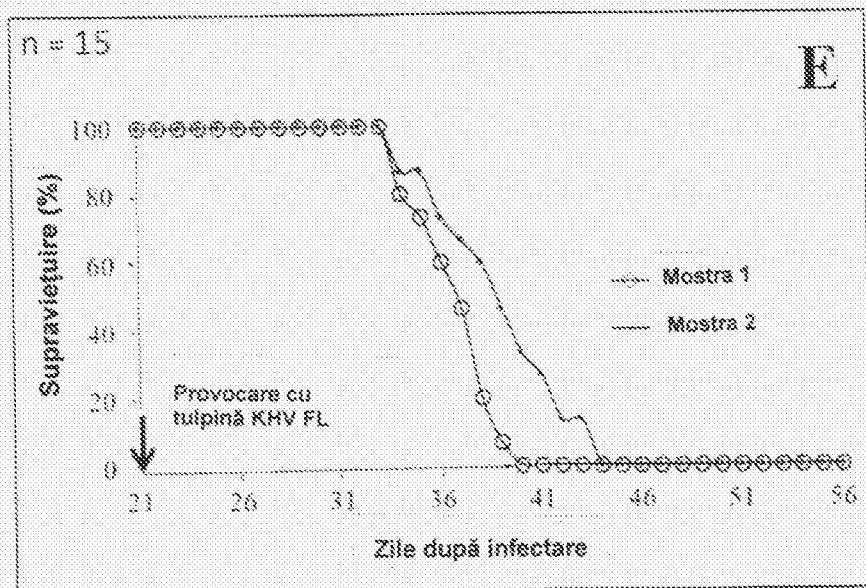


Fig. 7 D, E

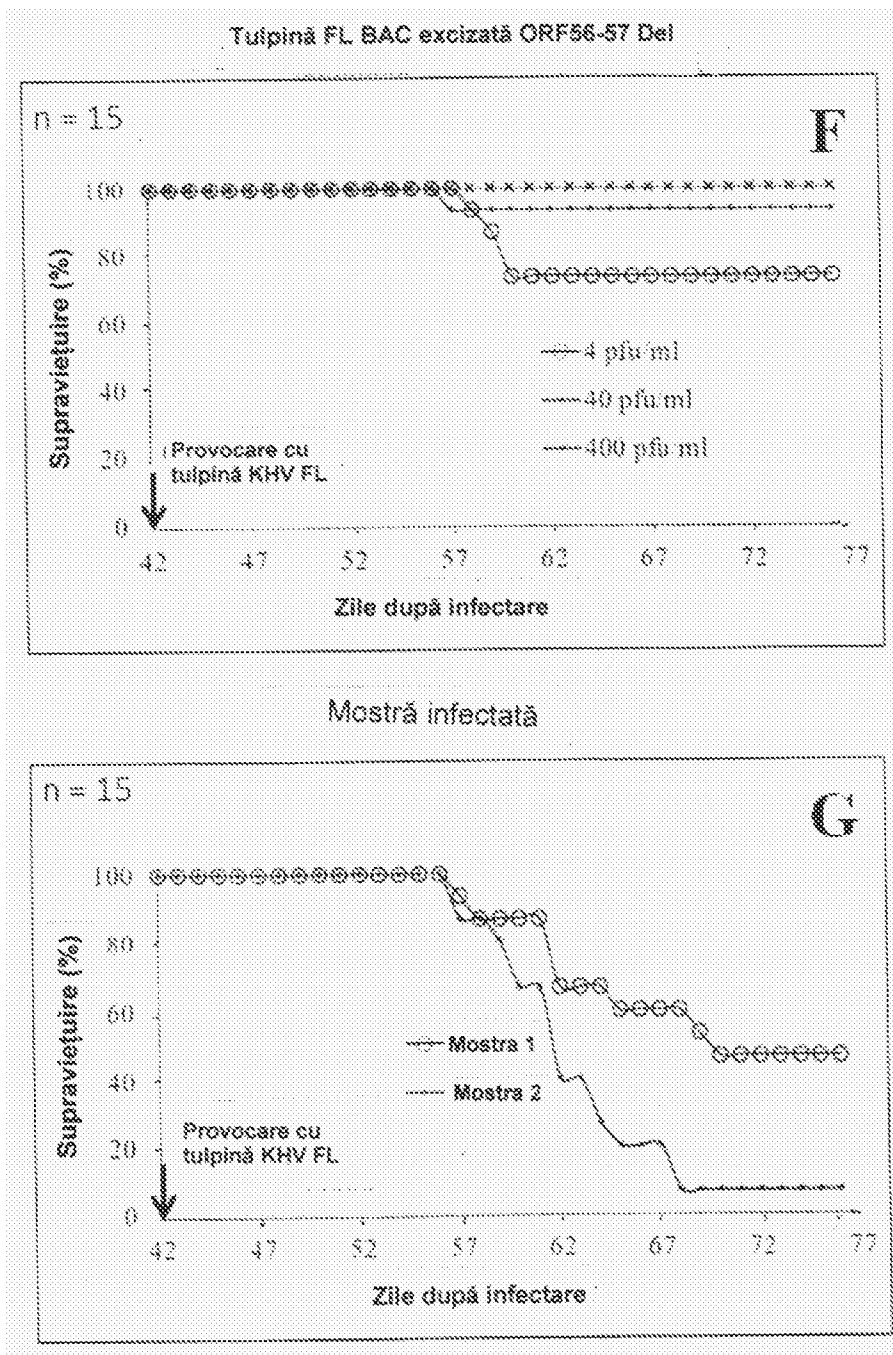


Fig. 7 F, G

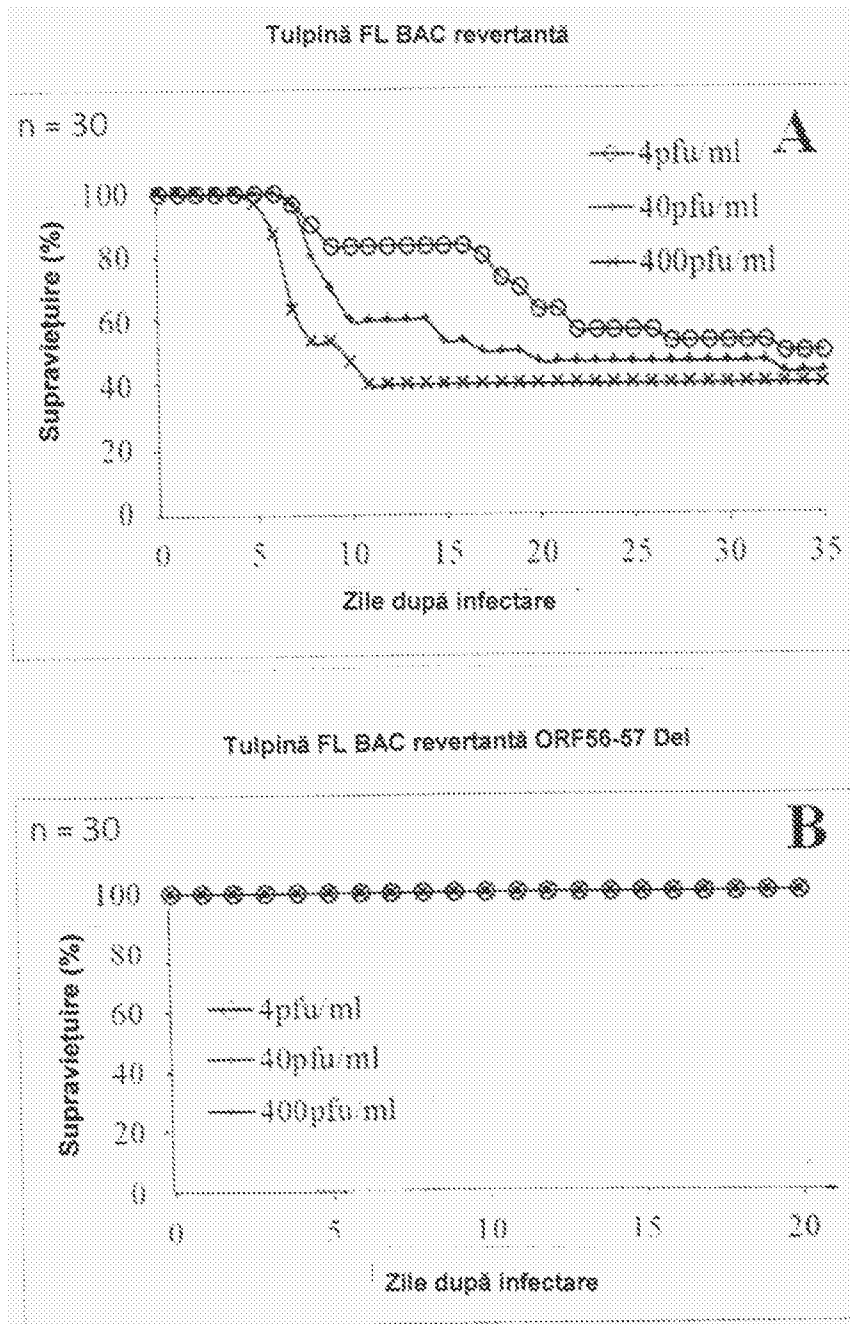


Fig. 8 A, B

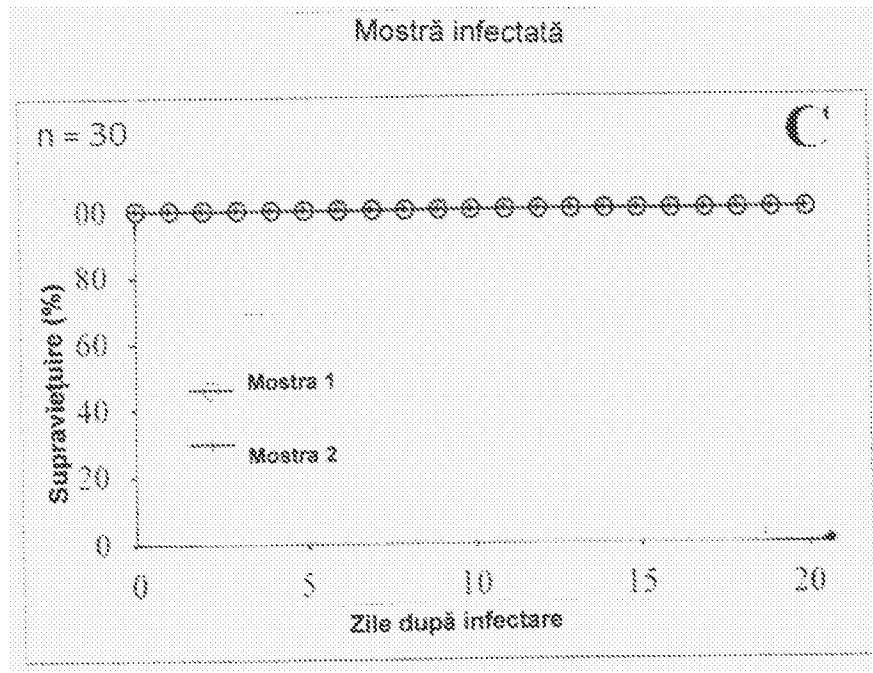


Fig. 8 C

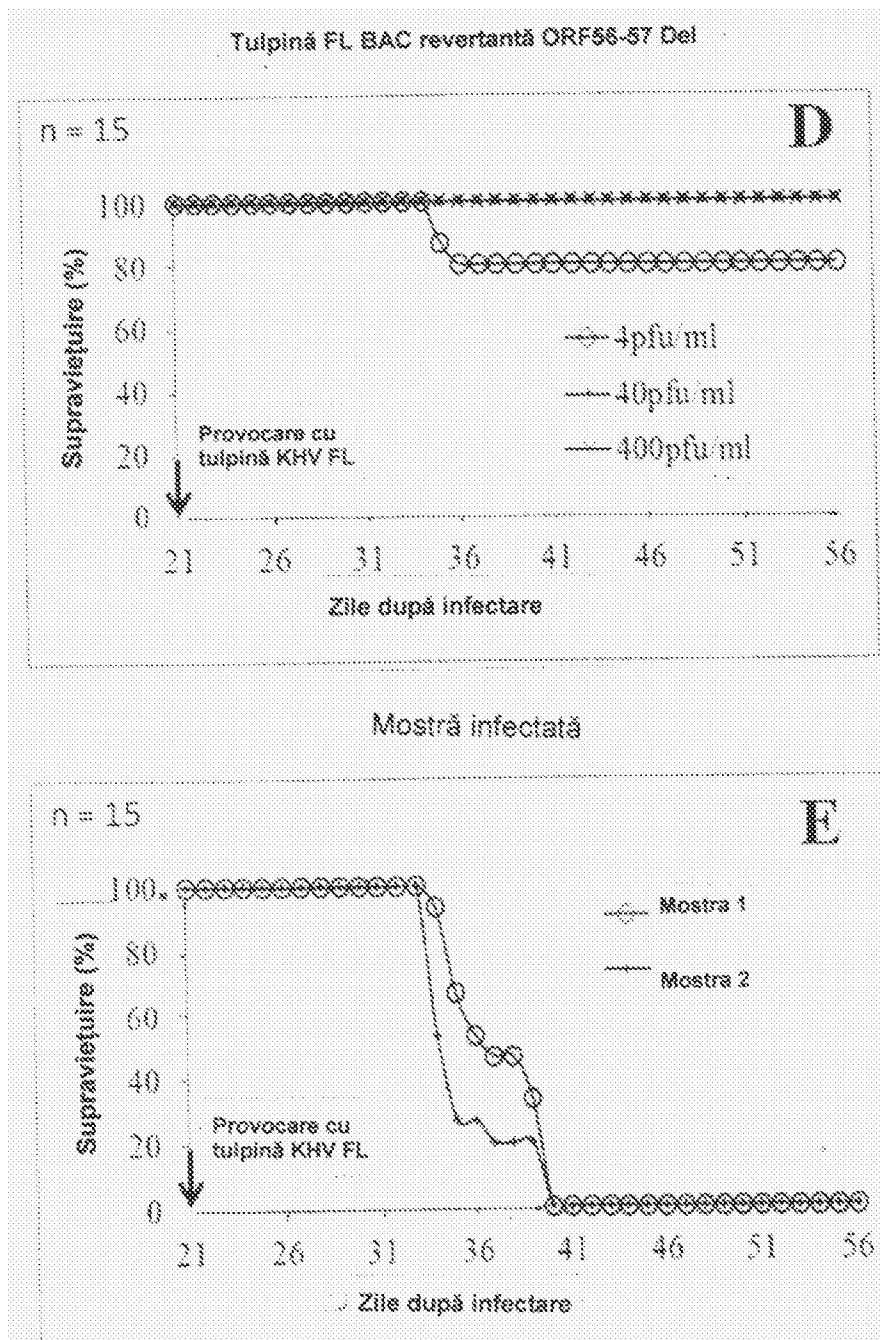


Fig. 8 D, E

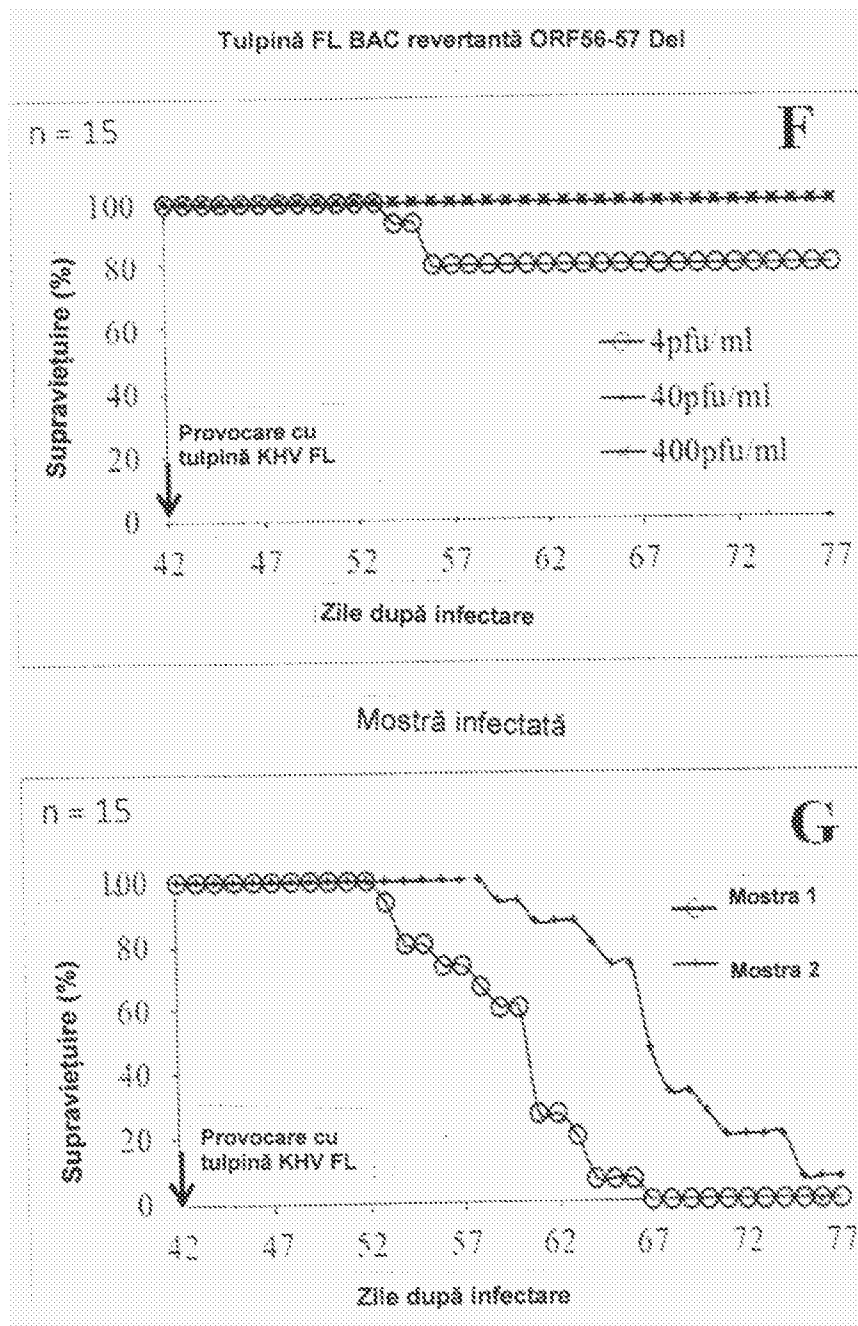


Fig. 8 F, G

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2012 0127 (32) Data de prioritate recunoscută: 2011.12.30
 (22) Data depozit: 2012.12.27
 (71) Solicitant: **GESVAL S.A., BE**
 (54) **Titlul: Herpesvirus recombinant Koi (KHV), metodă de producere a lui și vaccin pentru profilaxia bolii cauzate de KHV**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** **A61K 39/245** (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01) **C12N 7/04** (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): **Int.Cl:** **A61K 39/245** (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01) **C12N 7/04** (2006.01)
Herpesvirus Koi, KHV, *Cyprinus carpio*

"Worldwide" (Espacenet): **Int.Cl:** **A61K 39/245** (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01) **C12N 7/04** (2006.01)
Koi herpesvirus, KHV, *Cyprinus carpio*

EA, CIS (Eapatis): **Int.Cl:** **A61K 39/245** (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01) **C12N 7/04** (2006.01)
Герпесвирус Кои, KHV, *Cyprinus carpio*

SU (nonpublic): **Int.Cl:** **A61K 39/245** (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01) **C12N 7/04** (2006.01)
Герпесвирус Кои, KHV, *Cyprinus carpio*

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

1. Krzysztof L., Rakus et al. gene expression analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses. *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 37, no. 1, 2011.12.24, p. 65-76
2. Costes B et al. Cloning of the koi herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome demonstrates that disruption of the thymidine kinase locus induces partial attenuation in *Cyprinus carpio* koi. *J. of Virology, The American Society for microbiology, US*, vol. 82, no.10, 2008.05.01, p. 4955-4964

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	Krzysztof L., Rakus et al. gene expression analysis of common carp (Cyprinus carpio L.) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses. Developmental & Comparative Immunology, vol. 37, no. 1, 2011.12.24, p. 65-76	16
A	Costes B et al. Cloning of the koi herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome demonstrates that disruption of the thymidine kinase locus induces partial attenuation in Cyprinus carpio koi. J. of Virology, The American Society for microbiology, US, vol. 82, no.10, 2008.05.01, p. 4955-4964	16
A	WO 2009 027412 A1 2009.03.05	16
A	WO 2004 061093 A1 2004.07.22	16
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general		T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur		E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie		D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare		C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
		& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate		L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării		2016.05.25
Examinator		GROSU Petru