



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **84667** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
C12N 15/38 (2006.01)
C12N 1/21
A61K 39/255 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ВАКЦИНА, НАПРАВЛЕНА ПРОТИ ІНФЕКЦІЇ, ВИКЛИКАНОЇ ВІРУСОМ ГЕРПЕСУ ХВОРОБИ МАРЕКА

1

2

(21) 2003021829
(22) 01.08.2001
(24) 25.11.2008
(86) РСТ/ЕР01/08893, 01.08.2001
(31) 00202757.1
(32) 03.08.2000
(33) ЕР
(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 2008 р.
(72) ФЕЛЕР ФРАНК, ОСТЕРРІДЕР КЛАУС
(73) ЛОМАНН ЕНІМАП ХЕЛТ ГМБХ УНД КО. КГ
(56) WO 9906582, 11.02.1999.
WO 0035476, 22.06.2000.
EP 0522535, 13.01.1993.
WO 0026396, 11.05.2000.
WO 9853854, 03.12.1998.
US 3959466, 25.05.1976.
SCHUMACHER D. ET AL.: "Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA clones as a Bacterial Artificial Chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant." J. VIROL., vol. 74, no. 23, December 2000 (2000-12), pages 11088-11098, XP002156798.
SUTER M. ET AL.: "BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: a bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 96, no. 22, 26 October 1999 (1999-10-26), pages 12697-12702, XP002156799.
Biggs P.M. "The history and biology of Marek's disease virus" Curr Top Microbiol Immunol. 2001; 255:1-24.
Morgan RW et al.: "Transfection of chicken embryo fibroblast with Marek's disease virus DNA" Avian Dis. 1990 Apr-Jun; 34 (2):345-51.
(57) 1. Вакцина, направлена проти інфекції, викликаній вірусом герпесу хвороби Марека, яка відрізняється тим, що вказана вакцина включає щонайменше рекомбінантний реплікативний міні-геном вірусу хвороби Марека і послідовність вектора штучної бактеріальної хромосоми (BAC), причому вказаний вектор дозволяє здійснювати рекомбінацію за відсутності хазяйської клітини.

2. Вакцина за п. 1, яка відрізняється тим, що вказаний геном включає нуклеїнову кислоту, яка кодує антигенну речовину, здатну до вияву імунної відповіді проти інфекції у індивідуума вказаним вірусом герпесу.
3. Вакцина за п. 1 або 2, яка відрізняється тим, що вказаний геном включає функціональну делецію в гені, необхідну для вияву імунної відповіді, специфічної для вказаного вірусу герпесу, що дозволяє проводити розрізнення між індивідуумом, вакцинованим вказаною вакциною, та індивідуумом, інфікованим вказаним вірусом герпесу, асоційованим по суті з клітиною.
4. Вакцина за будь-яким з пп. 1-3, яка відрізняється тим, що вказаний геном включає щонайменше нуклеїнову кислоту, яка кодує речовину білкової природи, здатну модулювати транскрипцію і/або трансляцію нуклеїнової кислоти, що кодує антигенну речовину, здатну до вияву імунної відповіді проти інфекції у індивідуума вказаним вірусом герпесу.
5. Вакцина за будь-яким з пп. 1-4, яка відрізняється тим, що вказаний геном включає копію повної довжини, одержану з вказаного вірусу герпесу.
6. Вакцина за будь-яким з пп. 1-5, яка відрізняється тим, що у вказаному геномі щонайменше функціонально відсутній щонайменше один ген.
7. Вакцина за будь-яким з вказаних вище пунктів, що включає також нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше антигенну речовину додаткового патогену.
8. Вакцина за будь-яким з пп. 1-7, яка відрізняється тим, що вказаний вірус хвороби Марека включає серотип 1.
9. Вакцина за п. 7 або 8, яка відрізняється тим, що вказаний вірус хвороби Марека одержаний з вірулентного, дуже вірулентного або дуже вірулентного плюс польового вірусу.
10. Вакцина за будь-яким з пп. 7-9, яка відрізняється тим, що вона додатково включає нуклеїнову кислоту, що походить від вірусу хвороби Ньюкастла, Eimeria spp., Salmonella spp., вірусу інфекційної

(13) **C2**

(11) **84667**

(19) **UA**

анемії курчат, вірусу грипу, вірусу інфекційного захворювання синовіальної сумки або реовірусу.

11. Рекомбінантний вірусний геном, одержаний з вірусу герпесу хвороби Марека, який по суті асоційований з клітиною, який **відрізняється** тим, що вказаний геном включає послідовність вектора штучної бактеріальної хромосоми (BAC), що дозволяє проводити рекомбінацію за відсутності вказаної хазяйської клітини.

12. Геном за п. 11, який включає щонайменше реплікативний міні-геном.

13. Геном за п. 11, який **відрізняється** тим, що вказаний геном включає копію по суті повної довжини, одержану з вказаного вірусу герпесу.

14. Застосування геному за будь-яким з пп. 11-13 для приготування вакцини, направленої проти хвороби, викликаной інфекцією вірусом герпесу хвороби Марека.

15. Вакцина, що включає рекомбінантний геном за п. 11.

16. Спосіб обмеження ризику набуття або повного вияву у індивідуума інфекції, яка викликається вірусом герпесу хвороби Марека, що включає введення вказаному індивідууму вакцини за будь-яким з пп. 1-10 або геному за будь-яким з пп. 11-13.

17. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що вказаний індивідуум являє собою птаха.

Даний винахід відноситься до області вакцинації проти так званого асоційованого з хазяйською клітиною вірусу герпесу, що бере участь у таких захворюваннях, як вірусна хвороба Марека птахів (MDV) і вірус вітряної віспи людини (VZV, що викликає вітряну віспу та оперізувальний лишай після реактивації з латентного періоду), і до вакцинації проти захворювань, викликаних вказаними вірусами, у тому числі до хвороб птахів, зокрема, до області вакцинації проти хвороби Марека.

Зокрема, хвороба Марека стала проблемою у птаівництві у зв'язку з початком інтенсивного виробництва пташиного м'яса. Вона є захворюванням, що викликається вірусом герпесу, яке супроводжується великою кількістю клінічних симптомів, що починаються з імуносупресії, неврологічних розладів, анемії та невизначеної апатії і закінчуються важкими захворюваннями лімфатичних судин на більш пізніх стадіях інфекції. Спочатку при захворюванні Марека не проводилося лікування і яких-небудь профілактичних заходів. Пізніше з індичок виділили вірус (HVT) апатогенного типу (серотип 3) і використали його для первинної вакцинації.

Однак, через деякий час після проведення вакцинації з використанням HVT, хвороба Марека виникла знову і стало очевидним, що віруси, які циркулюють у середовищі, змінилися, обійшовши захисний механізм, індукований штамом HVT. У цей же час був виявлений новий апатогенний вірус (штам Rispens), який загалом має той же серотип, що і віруси, які викликають захворювання. Вказаний вакцинний штам був дуже швидко введений на фармацевтичний ринок і привів до дуже хороших результатів при вакцинації.

Однак, приблизно через десять років знову був відмічений спалах захворювання, знову віруси, які циркулюють у середовищі, змінилися, обійшовши захисний механізм, що індукується вакцинним штамом, який використовувався у даний момент. Після цього для захисту тварин використовували комбінацію обох вакцин (HVT і Rispens), однак задовільні результати спостерігалися тільки тимчасово. У наш час, незважаючи на проведення всіх

таких вакцинацій, спостерігається новий спалах захворювання. Причина вказаного спалаху досі незрозуміла, але цілком очевидна потреба у впровадженні нових потужних вакцин.

Проблеми, пов'язані з вакцинацією проти хвороби Марека, полягають у тому, що незалежно від того факту, що вакцини Марека виготовляють протягом тривалого часу, спосіб одержання вказаних вакцин не вдається вдосконалити. Причиною цього є, головним чином, те, що практично нерозривно зв'язаний з хазяйською клітиною вірус може бути вирощений по суті тільки у клітинах первинного хазяїна, наприклад, у випадку MDV або HVT, у первинних клітинах, таких як фібробласти, що одержують з птахів, таких як курчата, вільні від патогену, або, у випадку вірусу вітряної віспи, у клітинах (по суті первинних) людини (також, зрозуміло, вільних від зараженості патогенами), і не можуть або тільки з великими труднощами можуть бути вирощені поза межами специфічної клітини відповідного хазяїна. Дана обставина робить виготовлення вакцин, направлених проти вірусних інфекцій або хвороб, викликаних вказаними типами вірусів, складним, якщо взагалі можливим у практичному плані, і, виходячи з цього, дорогим.

Так наприклад, направлена проти хвороби Марека вакцина Rispens, яка у наш час вважається єдиною досить потужною, є, як і всі віруси Марека серотипу 1, строго зв'язаною з хазяйською клітиною. Інфекційність асоційованого з клітиною вірусу (як, наприклад, у випадку серотипів 1 і 2) повністю втрачається у ході нормального процесу заморожування або ліофілізації. У зв'язку з цим, приготування вказаної вакцини включає дуже складну і дорогу стадію, на якій цілі клітини повинні бути заморожені у рідкому азоті. При цьому вакцина повинна зберігатися і транспортуватися, а надалі і зберігатися, у рідкому азоті до моменту використання, що породжує величезні витрати і проблеми у процесі транспортування.

Далі на місці використання при роботі з вказаною вакциною потрібно ретельно дотримуватися умов обережності, оскільки інфіковані клітини дуже чутливі до факторів навколишнього середовища. Фактори, такі як підвищена температура, вплив

світла і наявність залишкових детергентів у скляному посуді, що використовується, часто здатні пошкодити вірус так, що не вдається приготувати досить життєздатну партію вакцини, що веде до повної нездатності вакцини виконувати свою функцію. Причому, такий невдалий результат може бути розпізнаний лише у тому випадку, коли захворювання вже починає розповсюджуватися і уражені птахи демонструють симптоми захворювання.

Коротко, потрібно зазначити, що, аж до даного моменту, всі спроби створити інактивовані, субодиночні або рекомбінантні вакцини для захисту від хвороби Марека були невдачі, і у зв'язку з цим у наш час навіть не розглядаються альтернативи живим асоційованим з клітинами вакцинам, що включають віруси хвороби Марека. З хворобою Марека продовжують боротися шляхом застосування препаратів з інфікованими клітинами як вакцини. Вказані препарати не тільки містять живі клітини, суспендовані у середовищі, яке містить ДМСО, і велику кількість клітинних антигенів, вони, крім того, повинні зберігатися у рідкому азоті. Отже, на шляху від виготовлення вакцини до споживача і аж до стадії застосування вакцини повинен забезпечуватися холодовий ланцюг. Крім того, після відтавання вакцина повинна бути введена протягом дуже короткого періоду часу кожному з птахів, які підлягають ін'єкції. Деякі з вказаних проблем є спільними для випадку одержання вакцин проти інших, безпосередньо пов'язаних з клітинами вірусів герпесу, таких як вірус вітряної віспи.

Вірус хвороби Марека (MDV) відноситься до підсімейства *Alphaherpesvirinae* з сімейства *Herpesviridae* [Lee et al, 2000, Murphy et al., 1995]. На основі вірулентності відносно курчат і здатності індукувати Т-клітинні лімфоми, MDV поділяють в основному на три серотипи (MDV-1, MDV-2 і MDV-3). Серотип MDV-3 представлений вірусом герпесу індичок (HVT), який широко використовується для вакцинації проти захворювань, пов'язаних з MDV. Однак невдачі результати вакцинації і вдосконалення так званого вірулентного і дуже вірулентного MDV-1 [Witter, 1985] привели до застосування у композиціях для вакцинування ослаблених MDV-2 штамів і пізніше ослаблених MDV-1 штамів [наприклад, штаму CVI 988 Rispens]. В останні роки, причому перше повідомлення з'явилося у Сполучених Штатах Америки, з'явилися навіть більш вірулентні MDV-1, так звані дуже вірулентні плюс (w+) варіанти MDV-1, і викликали різкий підйом рівня захворюваності хворобою Марека і смертності, обумовленої розвитком пухлини та імуносупресією на ранній стадії після інфекції [Witter, 1997]. Один з vv+ штамів, 584A, пасирували більше 100 разів на ембріональних фібробластах курчати (CEF) і показали втрату його патогенності по відношенню до курчат [Witter, 1997]. Однак, молекулярну основу вказаного зростання патогенності vv+ MDV-1 і, відповідно, втрати вірулентності дуже важко зрозуміти, оскільки молекулярний аналіз MDV-1 складний для проведення. З одного боку, потомство вірусу у клітинах, що культивуються, не вивільнялося зовсім або вивільнялося тільки у невеликих кількостях, з іншого боку, утворення рекомбінантів MDV-1 являє собою трудомісткий процес і, у зв'язку

з високим ступенем природної асоційованості агента з клітинною культурою, потребує численних циклів очищення вірусних рекомбінантів [Cantello et al., 1991; Sakaguchi et al., 1993; Parcells et al., 1994; Schat et al., 1998; Anderson et al., 1998].

Але насамперед, як вже відмічалось вище, вакцинація не може гарантувати захист тварин від всієї сукупності вірусів хвороби Марека. Вказаний вірус, як всі віруси герпесу, здатний знаходити шляхи для обходу імунної реакції, індукованої вказаними вакцинами. У зв'язку з цим, була б необхідна швидка адаптація вакцин до ситуації, що складається. У наш час з цією метою проводять виділення набору ізолятів (таких як HVT або Rispens) і/або їх подальше ослаблення *in vitro*. Саме по собі виділення вже породжує величезні проблеми у зв'язку зі складністю одержання асоційованого з клітиною інфекційного вірусу поза курчатами та інфікованими клітинами у клітинній культурі. Стадії ослаблення, які повинні слідувати за цим, є дуже трудомісткими і тривалими, особливо через те, що є надзвичайно складним очищення бляшок, що знов-таки пов'язане з природною асоційованістю вірусу з клітиною.

Результат ослаблення звичайно не визначають. Внаслідок цього факту, вже протягом тривалого періоду часу на фармацевтичний ринок не поступали вакцини, які могли б забезпечити заміну вакцинам HVT і Rispens, що є у наш час, там, де останні не здійснюють потрібного ефекту. Крім того, часто спостерігається надмірне ослаблення при виготовленні вакцини, оскільки вірус пасирують дуже багато разів. Остання обставина додатково погіршує низьку ефективність вакцин типу HVT і Rispens у польових умовах. Коротко, потрібно зазначити, що наступні проблеми складають значну частину безвихідного становища з контролем MDV, яке існує у наш час. Це низька репродуктивність виготовлення класичної вакцини, іноді надмірне ослаблення вакцинного вірусу, що спостерігається, невизначене ослаблення вакцинного вірусу, висока вартість виготовлення, висока вартість зберігання і транспортування, висока чутливість вакцини до факторів навколишнього середовища і дуже повільна розробка нових вакцинних штамів, особливо для вірусів, асоційованих з клітиною.

На вказані проблеми накладається той факт, що віруси, які циркулюють у середовищі у наш час, приводять до утворення високих титрів антитіл у запасах продуктів птахівництва, так що вказані високі титри антитіл передаються по лінії потомства через материнські антитіла в яйцях. Вплив вказаних материнських антитіл у процесі первинної інфекції за допомогою вірусних вакцин, що використовуються у наш час, додатково знижує ефективність вакцинації проти хвороби Марека.

Даний винахід пропонує вакцину, направлену проти інфекції, викликаной вірусом герпесу, який по суті асоційований з хазяйською клітиною, причому вказана вакцина включає рекомбінантний вірусний геном, одержаний з вказаного вірусу герпесу, причому вказаний геном дозволяє здійснювати рекомбінацію практично без наявності вказаної хазяйської клітини. У зв'язку з цим, даний винахід відноситься до рекомбінантного вірусного геному,

одержаного з вірусу герпесу, який розглядається як по суті асоційований з хазяйською клітиною, причому вказаний геном переважно здатний, що найменше у деякій мірі, до реплікації у вказаній хазяйській клітині і у той же час дозволяє здійснювати рекомбінацію по суті за відсутності або незалежно від вказаної хазяйської клітини, ¹ тобто гомологічна рекомбінація в еукаріотичних клітинах вже не є необхідною. У приведеному нижче докладному описі пропонується такий геном для випадку вірусу, подібного вірусу, що викликає хворобу Марека.

У зв'язку з зазначеним вище, як приклад геному вірусу хвороби Марека серотипу 1 (MDV-1), штам 584Ar80C був клонований в *Escherichia coli*, яку використовують як штучну бактеріальну хромосому (BAC). Векторні послідовності BAC вводили у локус *Us2* геному MDV-1 за допомогою гомологічної рекомбінації після спільної трансфекції ембріональних фібробластів курчати (CEF) вірусною ДНК і рекомбінантною плазмідною рDS-pHA1, яка включає BAC-послідовності і ген *Eco-gpt* замість *Us2*-гена MDV-1 і послідовності, що фланкують. Трансфіковане потомство пасирують на клітинах CEF у присутності мікофенолової кислоти і суміші ксантин/гіпоксантин. Після чотирьох циклів відбору одержують вірусну ДНК і використовують її для трансформації *Escherichia coli* штам DH10B. Ідентифікують декілька колоній, які несуть повний геном MDV-1. Вказані BAC, які несуть MDV-1, трансфікують у клітини CEF і, починаючи з третього дня після трансфекції інфекційність MDV-1 відновлюється. Ріст MDV-1, відновлений за допомогою різних BAC, не відрізняється від росту батьківського вірусу, на що вказують результати аналізу утворення бляшок та визначення кривих росту.

Таким чином, даний винахід пропонує спосіб виготовлення або одержання рекомбінантного геному вірусу герпесу, асоційованого по суті з хазяйською клітиною, що включає похідне (в залежності від потреби майже повне або повне) нуклеїнової кислоти, одержаної з ізоляту MDV і/або VZV.

І оскільки по суті повний геном одержаний без присутності хазяйських клітин, хоч спочатку вважалось, що вони тісно асоційовані, то даний винахід також пропонує геном відповідно до даного винаходу, який дозволяє здійснювати у повній мірі застосування всіх рекомбінантних методик, доступних фахівцям у даній області молекулярної біології, наприклад, пропонує також вакцину відповідно до даного винаходу, яка принаймні включає (реплікативний) міні-геном.

Так, наприклад, даний винахід пропонує міні-геном, який забезпечує тільки експресію тільки зчеплених глікопротеїнів (таких як gB, gC, gD або їх сполучень), і, наприклад, ICP4 або інший генний продукт, який, як було показано, індукує клітинний імунітет на вірус герпесу. Такий міні-геном, наприклад, служить цілям ідентифікації генів, важливим для захисту, якщо вважати, що реплікація геному в (еукаріотичних) хазяйських клітинах більше не відбувається. Додавання, наприклад, промотору HCMV або SV40 перед кожним геном або генною конструкцією могло б забезпечити остаточну ідентифікацію мінімальної захисної одиниці. У випадку

компетентного для реплікації міні-геному даний винахід також пропонує можливість видалення повного або основної частини *US*-регіону, за допомогою чого міні-вірус, що одержують, реплікується також у хазяйських клітинах.

В іншому варіанті даний винахід пропонує такий геном, який включає по суті копію повної довжини, одержану з вказаного вірусу герпесу, при цьому термін «по суті повної довжини» вказує на те, що велика частина генів вказаного вірусного геному присутня, за винятком деяких з них, які переважно (принаймні функціонально) відсутні, таких як ген, необхідний для реплікації або поширення вірусу у хазяйській клітині або у культурі хазяйських клітин, що більш детально буде розглянуто далі у даному описі. У зв'язку з цим, наприклад, в одному з відновлених геномів відповідно до даного винаходу послідовності BAC20, що кодують глікопротеїн B (gB), були піддані видаленню за допомогою одностадійного гесЕ-опосередкованого мутагенезу з використанням фрагменту лінійної ДНК. Негативні по глікопротеїну B MDV-1, відновлені після трансфекції gB-негативної BAC20 ДНК (20DgB), були здатні рости тільки на клітинах, що забезпечують gB *in trans* (у процесі трансфекції), вказуючи на те, що gB необхідний для росту MDV-1 у культурі хазяйських клітин. Інші гени, необхідні для росту, і для яких можуть бути передбачені клітини, які продукують генний продукт *in trans*, являють собою gH, ICP4, UL15, UL28 і UL9 або інші гени, що вважаються незамінними для росту, такі, як перераховані нижче.

Крім того, даний винахід відноситься до використання геному відповідно до даного винаходу при одержанні вакцини, причому в одному з варіантів втілення така вакцина направлена проти захворювання, викликаного інфікуванням вірусу герпесу, асоційованого по суті з хазяйською клітиною, однак в іншому варіанті втілення винаходу така вакцина може бути використана як векторна вакцина і може включати інші або додаткові патогени або тяжі нуклеїнової кислоти, що кодують їх. У випадку MDV нуклеїнова кислота переважного додаткового патогену включає нуклеїнову кислоту, одержану, наприклад, з вірусу хвороби Ньюкастла, *Eimeria* spp., *Salmonella* spp, вірусу інфекційної анемії курчат, вірусу грипу, вірусу інфекційного захворювання синовіальної сумки, реовірусу або інших патогенів, що звичайно зустрічаються у птахи́вництві.

Таким чином, даний винахід також відноситься до вакцини, причому вказаний геном містить функціональну делецію у гені, необхідному для реплікації і/або для поширення вказаного вірусу герпесу у хазяйській клітині, або вказаний геном вірусу включає по суті нуклеїнову кислоту, що кодує антигенну речовину, здатну до надання (переважно по суті захисної) імунної відповіді проти інфекції індивідуума вказаним вірусом герпесу. Типовий необхідний ген або його фрагмент, який повинен бути видалений, може являти собою, наприклад, у MDV гомолог UL-1 = глікопротеїн L; UL5; UL8; UL9; UL15; UL18; UL19; UL22 = глікопротеїн H; UL26; UL26,5; UL27 = глікопротеїн B; UL28; UL29; UL30;

UL52; UL53; ICP4 або гени або їх фрагменти, вибрані з US-регіону вказаного геному (Fig.1).

У переважному варіанті втілення даний винахід відноситься до вакцини, що включає функціональну делецію у гені, необхідну для вияву маркерної імунної відповіді, специфічної для вказаного вірусу герпесу, яка дозволяє проводити імунологічне розділення між результатом вакцинації індивідуума вказаною вакциною і результатом, що спостерігається у індивідуума, інфікованого вказаним вірусом герпесу, асоційованим по суті з клітиною. Реакції переважного маркера направлені, наприклад, на gC, gM, gD або gE, при цьому приведений нижче докладний опис містить пояснення (у даному варіанті для випадку gM) відносно делеції у гені, необхідної для вияву маркерної імунної відповіді.

Крім того, даний винахід відноситься до вакцини, що розглядається у ньому, причому вказаний вірусний геном включає щонайменше нуклеїнову кислоту, яка кодує протеїноподібну речовину, здатну до модуляції транскрипції і/або трансляції нуклеїнової кислоти, що кодує антигенну речовину, здатну до вияву імунної відповіді проти інфекції індивідуума вказаним вірусом герпесу.

Переважно вказана вакцина включає копію по суті повної довжини, одержану з вказаного вірусу герпесу з метою підтримки такої кількості функцій, яка потрібна для ефективною модуляції транскрипції і/або трансляції геному вакцини у хазяйській клітині, яку вакцинують, однак винахід також відноситься до вакцинації з використанням міні-геному. Безсумнівно, переважно здійснювати ефективну модуляцію транскрипції і/або трансляції нуклеїнової кислоти, що кодує чужорідний патоген або одержану з нього антигенну речовину, коли експресується додатковий патоген або антигенна речовина, одержана на його основі з вказаного геному, і можна також вважати, що чужорідні речовини (тобто, регуляторні елементи не з вірусом герпесу) забезпечені вказаним геномом, коли пропонується вакцина відповідно до даного винаходу, забезпечена нуклеїновою кислотою, що кодує додатковий патоген.

Зокрема, даний винахід надає вакцину відповідно до даного винаходу, в якій вказаний вірус герпесу включає вірус, подібний збуднику хвороби Марека. Зокрема, переважно забезпечити наявність вакцини, в якій вказаний вірус, подібний збуднику хвороби Марека, включає серотип 1. І крім того, оскільки методи маніпуляцій з геномом можуть здійснюватися поза хазяйською клітиною, з якою геном спочатку був зв'язаний, то вакцину, що пропонується, замість того, щоб одержувати її з нормальних ослаблених або авірулентних ізолятів вірусу, подібного збуднику хвороби Марека, одержують з вірулентного, дуже вірулентного або дуже вірулентного плюс польового вірусу, оскільки швидке виділення інфекційних клонів з польових ізолятів тепер вже стало можливим, що дозволяє одержати вакцинні ДНК для профілактики хвороби Марека у курчат та індичок, коли мутації у геномі можуть бути швидко застосовані для використання. Схожа система може також використовуватися для інших по суті асоційованих з клітиною вірусів герпесу, таких як вірус вітряної віспи.

Використання реплікативних вірусних геномів у контексті даного опису, що містять частини цілого та інфекційного геномів вірусу хвороби Марека (MDV-1), відкриває велику кількість нових можливостей для одержання більш ефективних, біологічно безпечних і стабільних вакцин MDV-1. У зв'язку з тим фактом, що рекомбінантні MDV-1 відновлюють з клонованої ДНК, вірусне потомство, яке одержують після трансфекції ДНК, може бути краще охарактеризовано і у зв'язку з цим може бути реально позбавлене наслідків «надмірного ослаблення» вакцинних вірусів. Наприклад, кількість повторів 132-bp, яка, очевидно, здається пов'язаною з ослабленням [Maotani et al., 1986], може бути точно визначена і, якщо необхідно, бути знижена або збільшена відповідно до потреби, що диктується вимогами виготовлення вакцини або ситуацією у польових умовах (див. нижче). Створення мутанту MDV-1 значно спрощується. Потрібно нагадати, що мутанти MDV-1 одержують за допомогою трудомісткого і тривалого процесу гомологічної рекомбінації і процедур селекції в еукаріотичних клітинах. Вказані процедури відбору, як відмічається для інших вірусів герпесу, часто приводять до мутацій геному в інших, відмінних від бажаних, сайтах, особливо оскільки у випадку MDV-1 не може бути одержаний безклітинний варіант вірусу, що робить процедури відбору, відновлення і розмноження мутантів ще більш ускладненими. І навпаки, даний винахід забезпечує спосіб маніпуляцій з вірусним геномом на основі мутагенезу з використанням *гесЕ*-, *гесТ*- і *гесВ/С*-супресування гена λ *gam*, присутнього на плазміді *pGETrec* (Narayanan et al., 1999). Перевагами вказаної системи є: (i) те, що тільки гомологічні ділянки довжиною від 30 до 50 bp потрібні для досягнення специфічної послідовності, яка підлягає видаленню, тобто видалення будь-якої відкритої рамки читування може бути досягнуте без необхідності клонувати рекомбінаційні касети, (ii) спосіб дуже швидкий і (iii) те, що вектор *pGETrec*, який визначає здатність системи до мутагенезу і експресує стійкість до ампіциліну, швидко зникає з бактеріальних клітин за відсутності ампіциліну.

При застосуванні потужних технологій, що використовують так звані процедури Е/Т клонування, можливо здійснення одностадійної мутації та відбору в *Escherichia coli* [Muyers et al., 1999; Narayanan et al., 1999; Zhang et al., 1998]. Така методика дозволяє також проводити видалення обов'язкових генів MDV-1 без необхідності використання клітинних ліній, що доповнюють, оскільки реплікація геномів MDV-1, які мутували, відповідно до даного винаходу не вимагає транс-комплементарності у випадку видалення необхідного гена. Крім того, стають необов'язковими процедури клонування.

В іншому варіанті даний винахід відноситься до способу одержання MDV-1 або інших (по суті асоційованих з клітинами вірусів герпесу) вірусних ВАС, що включає трансформацію, наприклад, клітин *Escherichia coli* DH10В плазмідною *pBAD $\alpha\beta\gamma$* , *pGETrec* або будь-якою іншою плазмідною, яка індукційно або стабільно експресує ген *гесЕ*, *гесТ* і λ *gam*, з подальшим одержанням кільцевої вірусної ДНК з літично або латентно інфікованих клітин,

взятих, наприклад, *ex vivo*, або з клітинних культур. Як паралельна або окрема процедура також пропонуються лінійна ДНК, що несе послідовності ВАС-вектора і послідовності, які дозволяють здійснювати гомологічну рекомбінацію послідовностей ВАС-вектора з вірусною ДНК. Вказана лінійна ДНК може бути, наприклад, одержана за допомогою ПЛР або за допомогою лінеаризації плазмідної ДНК. Потім здійснюють експресію гена *gusE*, *gusT* і λ *gam* в *Escherichia coli* та одержують електрокомпетентні клітини [див., наприклад, Sambrook et al., 1989]. Вірусну ДНК потім піддають електропорації разом з лінійною ДНК, що несе послідовності ВАС-вектора, у компетентні клітини *Escherichia coli*. Потім для одержання колонії або колоній їх поміщають на агарові пластинки, які містять відповідні антибіотики, і ВАС-ДНК може бути одержана як описано, наприклад, у процедурі, приведений у розділі докладного опису даного винаходу. Інфекційність клонованої вірусної ВАС-ДНК контролюють за допомогою трансфекції чутливих клітин. Даний винахід, таким чином, пропонує спосіб генетичної рекомбінації геному вірусу герпесу, асоційованого по суті з хазяйською клітиною, який одержують з хазяйської клітини або тканини без необхідності проводити (гомологічну) рекомбінацію в еукаріотичних клітинах, що дозволяє одержувати (при необхідності повний або майже повний) інфекційний геном або нуклеїнову кислоту вірусу герпесу з польових ізолятів або аналогічних ослаблених ізолятів.

Спосіб відповідно до даного винаходу дозволяє також додатково ослаблювати передбачувану для використання вакцину MDV-1 або одержувати мутанти MDV-1, що несуть гени інших важливих для курчат патогенів. Крім того, ізоляти MDV-1, які виникають у польових умовах, і несуть, можливо, інші та змінені антигенні властивості, можуть бути зупинені за допомогою вакцини, побудованої на основі обміну відповідних генів, які мутували, між клонованими MDV-1 та ізолятом(ами), що виник(ли) у польових умовах. Такі заміни, як вказано вище, можуть бути проведені за допомогою подібної методики Е/Т клонування, і як такі вони забезпечують можливість дуже швидко реагувати на зміни MDV-1 у польових умовах. Привабливою особливістю відновлення інфекційних MDV-1 відповідно до даного опису є, однак, використання геному, що розглядається у ньому, як ДНК вакцини. Аж до цього часу боротьба з хворобою Марека проводилася шляхом застосування препаратів з інфікованими клітинами.

Такі препарати не тільки містять живі клітини, суспендовані у середовищі, що містить ДМСО, і великий набір клітинних антигенів, вони також повинні зберігатися у рідкому азоті. Отже, на всьому шляху від стадії виготовлення вакцини до надходження її до користувача і аж до введення повинен постійно підтримуватися холодний ланцюг. Крім того, після відтавання вакцина повинна бути введена протягом дуже короткого періоду часу, причому ін'єкція кожному птаху. У випадку ДНК геному MDV-1 відповідно до даного опису, очищення «вакцини» (ДНК) легко досягне і відтворюване. ДНК надзвичайно стабільна, підтримка холодного ланцюга не потрібна і інфекційна ДНК

може бути введена декількома способами (внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, всередину яйця клітини, перорально, респіраторним шляхом і т.п.) та у вигляді різних композицій (при наявності носія і без нього і т.д.). Крім того, наявність материнських антитіл не перешкоджає первинній ін'єкції імунотену.

По суті, геноми MDV-1 відповідно до даного опису вперше дають можливість виготовляти і конструювати високо ефективні і біологічно безпечні вакцини проти захворювань, які викликають пухлини, і є економічно значущими. Таким чином, даний винахід пропонує спосіб зниження ризику індивідуума відносно набуття або повного вияву захворювання, що викликається інфекцією вірусом герпесу, по суті асоційованого з хазяйською клітиною, який включає введення вказаному індивідууму вакцини відповідно до даного винаходу або геному відповідно до даного винаходу.

Докладний опис:

Вірус хвороби Марека (MDV) є представником підсмейства *Alphaherpesvirinae* сімейства *Herpesviridae* (van Regenmortel et al., 1999). На основі вірулентності відносно курчат, здатності індукувати Т-клітинні лімфоми та антигенних властивостей, MDV поділяються на три серотипи (MDV-1, MDV-2 і MDV-3) (Payne, 1985). Серотип MDV-3 представлений вірусом герпесу, що уражує індичок (HVT), який широко використовувався для вакцинації проти захворювань, пов'язаних з MDV. Відповідно до сучасної номенклатури, MDV-1 класифікують як вірус герпесу 2 *gallid* (GHV-2), MDV-2 як GHV-3 і HVT як вірус герпесу *meleagrid*. Всі три віруси належать до нового роду вірусів, подібних вірусу хвороби Марека, всередині підсмейства *Alphaherpesvirinae*.

Контроль над інфекцією, пов'язаною з MDV-1, досягається вакцинацією переважно HVT, однак після невдач з вакцинацією і опису так званого «дуже вірулентного» MDV-1 (Witter, 1989) у композиціях для вакцинації стали застосовувати штами MDV-2 і, пізніше, ослаблені штами MDV-1 (наприклад, штам CVI 988 Rispens) (Witter, 1985).

В останні роки, причому перше повідомлення про це з'явилося у Сполучених Штатах Америки, з'явився ще більш вірулентний MDV-1, так званий «дуже вірулентний плюс» (w+) варіант MDV-1, і викликав різкий підйом смертності навіть серед вакцинованих груп птахів (Witter, 1997). Один з вказаних w+ штамів, 584A, був серійно пасирований на ембріональних фібробластах курчати (CEF), після чого він втрачав патогенність по відношенню до курчат (Witter, 1997). Молекулярна основа вказаної збільшеної патогенності w+ MDV-1 і, відповідно, втрати вірулентності дуже важко зрозуміти, оскільки молекулярний аналіз MDV-1 дуже складений для проведення.

З одного боку, ніякого потомства вірусу не вивільнялося у клітинах, що культивуються, з іншого боку, одержання рекомбінантів MDV-1 являє собою трудомісткий процес і, у зв'язку з високим ступенем природної асоційованості агента з клітиною культурою *in vitro*, існує необхідність у численних циклах очищення вірусних рекомбінантів [Cantello et al., 1991; Sakaguchi et al., 1993; Parcells et al., 1994, 1995; Schat et al., 1998;

Anderson et al., 1998]. Крім того, для росту MDV-1 необхідно використовувати первинні клітини (Payne), а це приводить до того, що аналіз основних генів MDV-1 практично неможливий, оскільки не можуть бути одержані транс-комплементарні клітинні лінії.

З використанням вказаної методики були клоновані у вигляді інфекційних BAC геноми мишачих і людських цитомегаловірусів [MCMV і HCMV; Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999], віруси простого герпесу типу 1 [HSV-1; Suter et al., 1998], вірус помилкового сказу [PrV; Smith et al., 1999, 2000], і вірус Епштейна-Барра [EBV; Delecluse et al., 1998].

Мета даного дослідження полягала у створенні основи для швидкого і ефективного одержання рекомбінантів MDV-1 за допомогою клонування повного геному розміром 180 тис. п.н. в *Escherichia coli*. Інфекційний MDV-1 легко відновлювали після трансфекції клонованої ДНК MDV-1 BAC з використанням клітин CEF, при цьому MDV-1 BAC залишалися стабільними після декількох циклів росту бактерій або серії розмножень у клітинах CEF.

І, нарешті, у зв'язку з тим, що одностадійна делеція необхідного гена в *Escherichia coli* стала можливою, вказана система володіє великим потенціалом з точки зору полегшення подальшого аналізу обов'язкових і необов'язкових генів MDV-1 і може служити як інструмент для одержання модифікованих біологічно безпечних вакцин на основі живих вірусів і/або ДНК.

Матеріали і методи:

Віруси і клітини. Первинні або вторинні ембріональні фібробласти курчати (CEF) або м'язові клітини перепелиці (QM7) підтримували на модифікованому за Дульбекко основному середовищі (DMEM), збагаченому 5-10% фетальною сироваткою теляти (FCS). Штам MDV-1 584Ar80C був люб'язно наданий лікарем Ріхардом Віттером [Dr. Richard Witter, ADOL, East Lansing, Michigan, США]. Штам 584Ar80C являє собою пасированого на культурі клітин авірулентного потомка wt+ штаму 584A (Witter, 1997) і вирощується на первинних і вторинних клітинах CEF, як було описано раніше (Osterrieder, 1999). Клітини QM7 тестували на відсутність послідовностей MDV-1 за допомогою методу ПЛР і Саузерн-блот гібридизацією, направленою на різні ділянки геному перед використанням їх для розмноження MDV-1 (Zelnik and Osterrieder, неопубліковані дані). Криві росту вірусу були побудовані за описаною раніше методикою з невеликими модифікаціями (Parcells et al., 1994). В основних рисах процедура полягає у тому, що 100 одиниць, що утворюють бляшки, (ОУБ) використовують для інфікування 2×10^6 свіжопосяєних клітин CEF. У різні моменти часу після інфікування (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 годин) інфіковані клітини обробляють трипсином і титрують на свіжих клітинах CEF. Визначають кількість бляшок і результати виражають у вигляді середнього значення з двох незалежних експериментів.

Клітинна лінія QM7, яка стійко експресує gB MDV-1, була одержана шляхом трансфекції 1×10^6 клітин QM7 з використанням 10 мкг pcMgB (Фіг.1), що базується на pcДНК3 (Invitrogen) і містить gB-ген MDV-1 з штамом Rispens CV1988, під контролем

раннього промотору людського цитомегаловірусу. Клітини QM7, які містять pcMgB, виділяють у присутності 1 мг/мл G418, і клони, що експресують gB, ідентифікують з використанням анти-gB моноклональних антитіл (mab) 2K11 (люб'язно наданих лікарем Jean-Francois Vautherot, INRA, Tours, Франція). Одержана при цьому клітинна лінія, що експресує gB MDV-1, була позначена як MgB1.

Конструювання MDV-1 BAC. ДНК MDV-1 очищують з інфікованих клітин за допомогою екстракції сумішшю додецилсульфат натрію-протеїназа K, як було описано раніше (Morgan et al., 1990). Плазмиду pDS-pHA1 конструюють наступним чином. Фрагменти розміром 2,1 і 3,1 тис. п.н. на будь-якій стороні US2-гена MDV-1 (Фіг.1) ампліфікують у ході полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням стандартних праймерів, що містять відповідні сайти для ферментів рестрикції (таблиця 1), і обидва фрагменти клонують в pTZ18R (Pharmacia-Amersham). BAC-вектор, що містить ген Eco-gpt під контролем раннього промотору HCMV, вивільняють з плазмиди pHA1 [люб'язно наданою лікарем M.Messerle, LMU Munich, Німеччина; Messerle et al., 1997] і вставляють у сайти PacI, представлені у двох фрагментах розміром 2,1 і 3,1 тис. п.н., які присутні у плазміді pDS (Фіг.1).

Первинні клітини CEF піддають спільній трансфекції 2 мкг ДНК 584Ar80C і 10 мкг pDS-pHA1. На 5 день після трансфекції клітини нашаровують на первинні клітини CEF у присутності 250 мкг/мл мікофенолової кислоти (МФК), 50 мкг/мл ксантину і 100 мкг/мл гіпоксантину. Відбір з використанням суміші МФА/ксантин/гіпоксантин повторюють загально чотири рази. Після розвитку повного цитопатичного ефекту (цпе) внаслідок чотирьох циклів селекції, з інфікованих клітин одержують вірусну ДНК і 1 мкг клітини ДНК, що інфікує, вводять методом електропорації у клітини *Escherichia coli* DH10B. Колонії реєструють через 16 годин після трансфекції на чашках з агаром, що містять 30 мкг/мл хлорамфеніколу (Sarabrook et al., 1989). Окремі колонії відбирають і потім виділяють BAC-ДНК з *Escherichia coli* з використанням стандартної процедури лужного лізису (Sainbrook et al., 1989). Одержання BAC-ДНК у великих масштабах проводять методом афінної хроматографії на основі силікагелю з використанням комерційно доступних наборів (Qiagen, Macherey & Nagel). Для подальшого аналізу були відібрані три BAC-клони 584Ar80C MDV-1 (BAC 19, BAC20, BAC24).

Мутагенез BAC MDV-1. Для мутагенезу клонованої ДНК MDV-1 в *Escherichia coli* проводять реакції, що каталізуються recE, які прискорюють гомологічну рекомбінацію між лінійними фрагментами ДНК, що одержали назву Е/Т-клонування [Zhang et al., 1998; Narayanan et al., 1999]. Плазмиду pGETrec (люб'язно наданою лікарем Panos Ioannou, Murdoch Institute, Melbourne, Австралія), яка несе recE, recT і gam-ген бактеріофагу 1, трансформують у клітини DH10B, що містять BAC20 (Narayanan et al., 1999). Після індукції recE, recT і gam за допомогою додавання 0,2% арабінози одержують електрокомпетентні клітини, по суті так, як було описано Narayanan. Для видалення gB-гена у BAC20 за допомогою методу ПЛР ампліфікують ген стійкості

до канаміцину (kan^R) у плазміді pEGFP-N1 (Clontech). Підготовані праймери містять гомологічні плечі по 50 нуклеотидів, що обмежують бажану делецію всередині gB і 20 нуклеотидів для ампліфікації kan^R (таблиця 1). Одержаний фрагмент розміром 1,6 тис. п.н. очищають на агарозному гелі (Qiagen) і вводять методом електропорації у клітини з BAC20, що містить pGETrec. Колонії, які несуть гени cam^R і kan^R , ідентифікують на чашках, що містять обидва антибіотики [Narayanan et al., 1999].

Аналіз ДНК. ДНК BAC або вірусну ДНК 584Ap80C розщеплюють за допомогою EcoRI, BamHI, BglI або StuI і розділяють у 0,8% агарозних гелях. Фрагменти ДНК переносять на позитивно заряджені нейлонові мембрани (Pharmacia-Amersham) і проводять Саузерн-блот гібридизацію з використанням міченої дигоксигеніном BAC 19 ДНК або індивідуальних BamHI фрагментів MDV-1 штаму GA [Fukuchi et al., 1991; Osterrieder, 1999].

Додатково готують gB-специфічний зонд з плазміді psgB і зонд, який несе ген kan^R , для аналізу gB-негативної BAC MDV-1. Хемілюмінісцентне виявлення гібридів ДНК з використанням CSPD™ проводять відповідно до інструкції виробника (Roche Biochemicals).

Непряма імуофлуоресценція. Для проведення аналізів методом непрямой імуофлуоресценції (НІФ) клітини вирощують на 6- або 24-ямкових планшетах (Greiner) або на накривних скельцях і потім інфікують у потрібних варіантах. Клітини фіксують 90% ацетоном у різні моменти часу після інфікування або трансфекції і проводять аналіз методом НІФ точно відповідно до описаної методики [Meindl and Osterrieder, 1999]. Зразки аналізують за допомогою флуоресцентної мікроскопії або конфокальної лазерної мікроскопії, що сканує (CLSM).

Антитіла, що використовуються, являють собою анти-gB моноклональні антитіла 2K11, анти-rp38 моноклональні антитіла H19 (любезно надані лікарем Lucy Lee, ADOL, East Lansing, MI) або конвалесцентну сироватку з курчат, інфікованих MDV-1 (MDSI).

Результати:

Конструювання і аналіз BAC, що містять повні геноми MDV-1. Один мільйон первинних клітин CEF інфікують з використанням 1×10^4 ОУБ штаму MDV-1, тобто інфіковані клітини змішують з неінфікованими клітинами. Після досягнення повного цитопатичного ефекту виділяють ДНК з інфікованих клітин і 2 мкг вірусної ДНК трансфікують в 1×10^6 первинних клітин CEF разом з 10 мкг pDS-rHA1 плазмідною ДНК. Через п'ять днів після трансфекції клітини висівають разом зі свіжими CEF і нашаровують зверху селективне поживне середовище.

Вказану процедуру повторюють загалом чотири рази. У результаті, виділяють ДНК з рекомбінаційних MDV-1, які здатні рости у присутності суміші МФАксантин/гіпоксантин, і піддають її Саузерн-блот аналізу з використанням міченої rHA1 як зонду. Можна показати, що частина вірусної ДНК містить вставлені у неї послідовності плазмід F (дані не приведені). Використовують один мікрограм вказаної вірусної ДНК для трансформації

клітин Escherichia coli DH10B. Трансформовані бактерії поміщають на чашки з агаром, що містять 30 мкг/мл хлорамфеніколу і відбирають одиничні колонії. ДНК з бактеріальних колоній екстрагують з використанням стандартних процедур одержання плазмід [Sambrook et al., 1989] і розганяють в 0,8% агарозних гелях.

Було встановлено, що декілька бактеріальних колоній містять високомолекулярну позахромосомну ДНК, і три з вказаних клонів (BAC 19, BAC20 і BAC24) були відібрані для подальшого аналізу (Фіг.2). Для подальшої характеристики виділених BAC-клонів проводять Саузерн-блот аналізи ДНК 584Ap80C і BAC після розщеплення за допомогою BamHI або EcoRI, використовуючи як зонд мічену BAC 19 ДНК. Можна було показати, що ДНК з BAC 19, BAC20 і BAC24 утворюють практично ідентичні фрагменти при розщепленні рестриктазами у порівнянні з такими, що утворюються при розщепленні батьківської 584Ap80C (Фіг.3A і B). Однак, виразно відмічають два істотних виключення. Фрагмент BamHI-A розміром 20 тис. п.н., що присутній у ДНК 584Ap80C, відсутній у всіх проаналізованих BAC-клонах. Замість цього, у ДНК BAC 19, BAC20 і BAC24 виявлені фрагменти розміром 16 і 10 тис. п.н. (Фіг.3B). Вказані дві смуги відповідають збільшеному фрагменту BamHI-A, в який за допомогою вставки плазмід F і делеції послідовностей Us2 був введений додатковий сайт BamHI (Фіг.1).

У BAC ДНК, розщепленій EcoRI, виявляється одна додаткова смуга розміром 5,8 тис. п.н. (BAC послідовності) та невеликі зміни у розмірах фрагментів, викликані делецією гена Us2 (Фіг.1 і 3B). Правильність вставки BAC послідовностей у різні клони далі перевірялася у ході аналізу методом Саузерн-блот гібридизації з використанням мічених вставок плазмід pDS або rHA1 як зонду, при цьому спостерігалася очікувана картина реакції відносно ДНК, розщепленої за допомогою BamHI або EcoRI. У BAC ДНК фрагменти, одержані після розщеплення BamHI, розміром 16 і 10 тис. п.н. специфічно реагують з pDS зондом, тоді як тільки один фрагмент розміром 10 тис. п.н. реагує із зондом, одержаним з плазмід rHA1 (Фіг.1; Фіг.3C і D).

У ДНК з BAC 19, BAC20 або BAC24, розщеплених за допомогою EcoRI, фрагменти розміром 4,3, 2,8 і 1,7 тис. п.н. специфічно реагують з pDS зондом, тоді як фрагменти розміром 5,8 і 1,7 тис. п.н., специфічно гібридизуються з rHA1 зондом (Фіг.1, Фіг.3C і D). Вказані фрагменти точно відповідають тим структурам, які прогнозувалися як результат вставки послідовностей rHA1 (Фіг.1), на основі чого був зроблений висновок про те, що послідовності плазмід F були правильно вставлені замість OPC Us2 у всі проаналізовані BAC MDV-1. Крім того, деякі варіації у характері розташування смуг у зразках BAC 19, BAC20 і BAC24 були відмічені у ДНК, розщепленій як BamHI, так і EcoRI, наприклад, відмічається додаткова смуга розміром приблизно 6,2 тис. п.н. у BAC 19 ДНК, розщепленій BamHI, або додаткові смуги у ДНК з BAC20 і BAC24, розщеплених EcoRI (Фіг.2, 3A і B). Що стосується питання про варіації, які спостерігалися, у розмірах індивідуальних фрагментів, одержаних під дією рестриктаз, то гібридизація з

міченим фрагментом BamHI-D мала місце, оскільки варіації у розмірі кінцевих і внутрішніх повторів унікального довгого регіону (TRL і IRL) були спільними.

Методом Саузерн-блотингу було показано, що додаткові фрагменти, які спостерігаються у розщеплених як BamHI, так і EcoRI ДНК з BAC 19, BAC20 або BAC24, дійсно були результатом варіацій у TRL і IRL. В той час, як у вірусній ДНК 584Ar80C, розщепленій за допомогою BamHI, виявлялися дві широкі смуги зонду BamHI-D, розміри яких варіювали у межах приблизно від 9 до 15 тис. п.н. і від 4 до 8 тис. п.н. (що відповідає BamHI-D і -H фрагментам вірулентного MDV-1, відповідно; Фіг.1), виразні, але відмінні смуги спостерігалися у всіх проаналізованих BAC-клонів (Фіг.4). Усі інші фрагменти різних BAC-клонів, одержані під дією рестриктаз, були, скоріш за все, ідентичними таким з вірусної ДНК 584Ar80C. Вказаний факт був підтверджений з використанням декількох інших мічених фрагментів BamHI як зондів, включаючи BamHI-A, -B, -C -I₂ фрагменти (дані для зонду BamHI-C як приклад приведені на Фіг.4).

Відновлення інфекційних MDV-1 з клонованої ДНК. ДНК з BAC 19, BAC20 або BAC24 трансфікують у первинні CEF. На 3-7 день після трансфекції з'являються специфічні вірусні бляшки MDV-1, як показав аналіз методом НІФ з використанням анти-MDV-1-gB моноклональних антитіл. MDV-1, що залишився після трансфекції різними BAC, був потім висіяний разом зі свіжими клітинами CEF і розміри бляшок були порівняні з розмірами таких, індукованих батьківським варіантом 584Ar80C. Як приклад показані бляшки, забарвлені на 2 день після інфікування (п.і.), при цьому ніяких помітних відмінностей у розмірах бляшок між рекомбінантним і батьківським вірусом не виявляється (Фіг.5A).

Для подальшої характеристики біологічних властивостей MDV-1, відновлених після трансфекції BAC, порівнюють кінетику росту вказаних вірусів з батьківським варіантом 584Ar80C. У випадку BAC, вірус, відновлений на 5 день після трансфекції, використовують для інфікування свіжих клітин CEF, висіяних на 6-ямкові планшети (використовують 50 ОУБ вірусу для інфікування однієї комірки, що містить 1x10⁶ клітин). Аналогічно, 50 ОУБ 584Ar80C використовують для інфікування свіжих клітин CEF тим же способом. У різні часові точки після інфікування вірус збирають і титрують за допомогою спільного посіву 10-кратних розведень вірусу зі свіжими клітинами CEF. Результати вказаних експериментів узагальнені на Фіг.5B.

Можна показати, що усі протестовані BAC MDV-1 демонструють ростові характеристики, практично ідентичні таким для батьківського варіанту 584Ar80C (Фіг.5B). Максимальні титри досягалися до 72 годин після інфікування і залишалися фактично постійними до закінчення періоду спостереження, через 120 годин після інфікування. На основі даних по розмірах бляшок і ростових характеристиках, автори зробили висновок про те, що біологічні властивості MDV-1 *in vitro* практично не відрізняються від таких батьківського штаму.

Для того, щоб підтвердити стабільність вірусів, одержаних на основі BAC, потомство, одержане

після трансфекції BAC19 і BAC20, пасирують чотири рази і виділяють вірусну ДНК. Далі вірусну ДНК розщеплюють за допомогою BamHI або EcoRI, розділяють електрофорезом у 0,8% агарозному гелі та переносять на нейлонові мембрани. Далі проводять гібридизацію з використанням rDS або rHA1 зонду. Спостерігали фрагменти ДНК, аналогічні описаним раніше, і характер розподілу смуг, що аналізується з використанням двох проб, не змінювався при серійних пасажах трансфікованого потомства (Фіг.6). На основі вказаних результатів автори зробили висновок про те, що послідовності, одержані з плазмиди F, залишаються стабільно вставленими у геноми 584Ar80C, відновлені з індивідуальних BAC-клонів MDV-1, навіть після серійного пасирування у клітинах CEF.

Однак, як показали гібридизація з фрагментом BamHI-D і ПЛР аналіз, варіабельність послідовностей, що повторюються, розміром 132 п.н. зберігається і дифузний мазок реактивних смуг спостерігається у розщеплених BamHI або EcoRI ДНК трансфікованого потомства вже після першого пасирування вірусу (дані не приведені).

Мутагенез BAC20 і делеція послідовностей, що кодують gB. У наступних експериментах був використаний розроблений останнім часом метод мутагенезу для видалення ділянки розміром 2,3 тис. п.н. з gB-гена BAC20 розміром 2,8 тис. п.н. (Фіг.7). Після трансформації плазмиди pGETrec (Narayanan) у BAC20, що містить DH10B, ген kan^R ампліфікують з використанням праймерів, які дозволяли здійснити гомологічну рекомбінацію з gB-послідовностями MDV-1 (таблиця 1; Фіг.8), і вводять електропорацією у клітини BAC20-pGETrec. Бактерії поміщають на чашки з LB-агаром, що містить хлорамфенікол і канаміцин; та відбирають колонії з подвійною стійкістю. Після виділення ДНК з окремих колоній проводять Саузерн-блот аналіз рекомбінантної BAC20, що несе делецію у gB-гені (20DgB). Зонди, специфічні відносно kan^R і gB, виявляють фрагменти 20DgB після її розщеплення з використанням BamHI, EcoRI, BglII або StuI, що повністю відповідає результатам, розрахованим на випадок включення гена стійкості до канаміцину (kan^R) у послідовності, що кодують gB (Фіг.9). Було відмічено, як повідомлялося раніше, що pGETrec, яка додає стійкості до ампіциліну, легко втрачається клітинами *Escherichia coli*, що ростуть за відсутності антибіотика (Фіг.9). Виходячи з вказаних результатів, автори зробили висновок про те, що відкрита рамка для зчитування gB була практично повністю видалена з 20DgB.

Аналіз gB-негативних MDV-1, відновлених з 20DgB. Оскільки gB обов'язковий для росту всіх вірусів герпесу, проаналізованих до цього часу (розглянуті в огляді Pereira), була створена клітинна лінія QM7, яка експресувала gB MDV-1 під контролем дуже раннього промотору HCMV. Непрямий імуофлуоресцентний аналіз показав, що фактично кожна клітина клітинної лінії MgBI конститутивно експресує gB MDV-1, що було також продемонстровано з використанням моноклональних антитіл 2K11 або конвалесцентної сироватки курчати (MDSI) (Фіг.10). Для аналізу нарощування BAC20 і 20DgB у різних клітинних лініях одержують ДНК і потім використовують її для трансфекції

клітин CEF, QM7 або MgBl. На 3-5 день після трансфекції вірусні бляшки відмічалися у всіх клітинах, трансфікованих BAC20 (Фіг.10).

Однак, після трансфекції 20DgB ДНК бляшки спостерігаються тільки у клітинах MgBl, що експресують gB (Фіг.11). У клітинах CEF і QM7, трансфікованих 20DgB, лише одиничні клітини експресують ранній ген pp38, як було показано на основі їх здатності реагувати з моноклональними антитілами HI 9 (Lee et al.), але формування бляшок інгібується (Фіг.11). Вказані результати відносно необхідності gB для поширення MDV-1 з клітини у клітину *in vitro* підтверджуються при спільному посіві клітин MDV-1, інфікованих 20DgB, і клітин CEF, QM7 або свіжих клітин MgBl. Було показано, що після первинної трансфекції утворення бляшок спостерігається тільки після спільного посіву з клітинами, що експресують gB (таблиця 2). Виходячи з вказаних результатів, автори зробили висновок про те, що gB MDV-1 обов'язково потрібен для поширення MDV-1 з клітини у клітину в клітинах, що культивуються.

Незважаючи на те, що вірус хвороби Марека являє собою важливий патоген курчат, що викликає Т-клітинні пухлини і високу смертність інфікованих тварин, мало відомо про функцію окремих генів і генних продуктів у літичній, латентній або пухлинній фазі інфекції. Аналіз генів і генних продуктів MDV-1 надто ускладнений з двох основних причин. По-перше, клітини, що культивуються, інфіковані MDV-1, не продукують вільний вірус, що інфікує, а по-друге, ефективний ріст MDV-1 у клітинах, що культивуються, обмежується первинними або вторинними ембріональними фібробластами курчати.

У зв'язку з цим, мутагенез з використанням традиційної гомологічної рекомбінації, що застосовується для мутагенезу інших *Alphaherpesvirinae*, є трудомістким, витратним за часом і вимагає постійного надходження первинних клітин. У той час як мутагенез HSV і PrV явно полегшується за рахунок використання технології BAC, традиційний мутагенез, що базується на гомологічній рекомбінації в еукаріотичних клітинах, являє собою стандартну методику для вказаних двох вірусів, і була одержана велика кількість мутантних вірусів. І навпаки, для мутагенезу MDV-1 BAC-клонування і мутагенез є найбільш прийнятними. Оскільки геном MDV-1 клонують у вигляді BAC і він може стабільно підтримуватися в *Escherichia coli*, генерування мутантів і аналіз основних генів повинен бути відносно простим. Фактично, можливо клонувати повний геном штаму 584Ar80C у вигляді такого, що інфікує BAC. Штам 584Ar80C являє собою ослаблений варіант дуже вірулентного плюс (vv+) MDV-1 штаму 584A, одержаний після 80 серійних пасажів на клітинах CEF (Witter, 1997). Аналіз клонованих геномів MDV-1, присутніх у BAC19, BAC20 і BAC24, показує очевидну наявність варіацій у зразках, що одержують внаслідок обробки рестриктазами.

Вказана гетерогенність може бути пояснена варіаціями у фрагментах BamHI-D і H. Відомо, що у різних штамів MDV-1 присутня кількість тандемних повторів розміром 132 п.н., що варіює, і що число вказаних повторів підвищується після серій-

них пасажів на клітинах, що культивують (Maotani, Silva, Fukuchi). Крім того, число тандемних повторів ділянки 132 п.н. асоціюється з втратою онкогенності, оскільки у вірулентних штамів відмічається постійне число вказаних одиниць [Fukuchi et al., 1985; Bradley et al., 1989], хоча нещодавно дослідження на широко використовуваному вакцинному штамі Rispens CVI 988 вказує на те, що може існувати непряма кореляція невеликого числа повторів ділянки 132 п.н. і вірулентності. У випадку MDV-1 штам 584Ar80C гібридизація вірусної ДНК після її обробки рестриктазою з фрагментом BamHI-D приводить до появи картини з дифузним розподілом смуг, яка вказує на наявність числа повторів, що варіює, у популяції вірусу. І, навпаки, тільки прості дуже реакційноздатні смуги були ідентифіковані у кожному з BAC-клонів з тим же зондом. Однак розміри реакційноздатних смуг після розщеплення за допомогою BamHI або EcoRI варіюють серед BAC19, BAC20 і BAC24, вказуючи на те, що були клоновані геноми, які містять різне число повторів ділянки 132 п.н. Вказане пояснення було підтверджене результатами аналізу методом ПЛР, націленого на повтори ділянки 132 п.н. Тоді як при використанні ДНК 584Ar80C спостерігалася типова, подібна східцям сходів картина розподілу продуктів ПЛР (Becker et al., 1993), у випадку BAC19, BAC20 або BAC24 з клонованої вірусної ДНК були ампліфіковані чіткі смуги.

У зв'язку з зазначеним вище був зроблений висновок про те, що зміни у картині, яку одержують після обробки рестриктазами різних BAC-клонів, є результатом різної кількості тандемних повторів ділянки 132 п.н. в окремих клонах, які не впливають на інфекційність клонованої ДНК, оскільки інфекційний вірус відновлюється після трансфекції ДНК, виділеної з кожного з різних BAC-клонів.

Після клонування повного геному MDV-1 і доказу інфекційності клонованої ДНК MDV-1, для видалення послідовностей, що кодуєть gB, з BAC20 була використана нещодавно розроблена система мутагенезу, в якій лінійний фрагмент ДНК може бути рекомбінований у хазяїнський бактеріальний ДНК, причому вказаний процес каталізується *recE* (Narayanan, Muylers). Вказаний мутагенез базується на присутності у плазміді *pGETrec* гена *λ gam*, що супресує *recE*, *recT* і *recBC* (Narayanan et al., 1999).

Великими перевагами вказаної системи, яка була вперше використана для маніпуляцій з вірусним геномом, є: (i) те, що тільки гомологічні плечі розміром 30-50 п.н. необхідні для одержання специфічної послідовності, яка підлягає видаленню, тобто видалення будь-якої відкритої для зчитування рамки може бути здійснене без необхідності клонувати касети рекомбінації, (ii) те, що метод дуже швидкий, і (iii) те, що вектор *pGETrec*, який несе систему мутагенезу і експресує стійкість до ампіциліну, швидко втрачається клітинами бактерій за відсутності ампіциліну. Після електропорації продукту ПЛР з вибитим gB у клітини BAC20, що містять *pGETrec*, було виявлено від 10 до 30 колоній з подвійною стійкістю до *cam^R* і *kan^R*. Одна з колоній була позначена як 20DgB-I і відібрана для подальшого аналізу, оскільки вона втрачає

pGETrec відразу ж після поміщення на чашку з агаром, що містить хлорамфенікол і канаміцин.

Саузерн-блот аналіз продемонстрував успішну делецію гена gB і вставку гена *kan^R* у 20DgB-I. MDV-1, відновлений після трансфекції клітин CEF за допомогою 20DgB-I, був нездатний передаватися від інфікованих клітин оточуючим клітинам, і це вказує на те, що gB MDV-1, подібно до його дублікатів в інших вірусах герпесу, необхідний для передачі інфекційного початку від клітини до клітини. Оскільки MDV-1 характеризується високою асоційованістю з клітиною у клітинах, які культивують, і не вивільняє вірус, що інфікує, у культуральне середовище, автори не змогли дослідити можливу роль gB MDV-1 у процесі проникнення вірусу. Одержаний gB мутант являє собою перший приклад MDV-1 з делецією основного гена і демонструє серйозні можливості ВАС-клонування і системи мутагенезу, які особливо корисні у випадку MDV-1. Використання ВАС MDV-1 і постійної клітинної лінії QM7, яка дозволяє здійснювати розмноження MDV-1 і яка, на відміну від клітинної лінії фібробластів перепелиці QT35, не несе послідовностей MDV-1 [Zelnik et al., неопубліковані дані], являє собою чудовий приклад комбінації з ретельно проаналізованими основними генами MDV-1. Крім того, порівняльні аналізи функцій генів у різних *Alphaherpesvirinae* можуть тепер включати MDV-1 і дозволяють проводити дослідження дуже далеко віддалених представників, таких як VZV або BHV-4, одного сімейства вірусів.

Для клонування геномів, що пропонуються у даному описі, приводиться нижче докладна подальша оцінка літичних, латентних генів та генів, що індукують пухлину, у вірусу, відносно якого використання генетичних маніпуляцій було б дуже обмежене.

References:

1. Anderson A.S., Parcells M.S., and R.W. Morgan. 1998. The glycoprotein D (US6) homolog is not essential for oncogenicity or horizontal transmission of Marek's disease virus. *J. Virol.* 72: 2548-2553.
2. Backer Y., E. Tabor, Y. Asher, I. Davidson, M. Malkinson, and R.L. Witter. 1993. PCR detection of amplified 132 bp repeats in Marek's disease virus type 1 (MDV-1) DNA can serve as an indicator for critical genomic rearrangement leading, to the attenuation of virus virulence. *Virus Genes* 7:277-287.
3. Borst E.M., G. Hahn, U.H. Koszinowski, and M. Messerle. 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: 8320-8329.
4. Bradley G., M. Hayashi, G. Lancz, A. Tanaka, and M. Nonoyama. 1989. Structure of the Marek's Disease virus BamHI-H gene family: Genes of putative importance for tumor induction, *J. Virol.* 63: 2534-2542.
5. Bradley G., G. Lancz, A. Tanaka, and M. Nonoyama. 1989. Loss of Marek's disease virus tumorigenicity is associated with truncation of RNAs transcribed within BamHI-H. *J. Virol.* 63: 4129-4235.
6. Brune W., C. Menard, U. Hobom, S. Odenbreit, M. Messerle, and U.H. Koszinowski. 1999. Rapid

identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 17:360-364.

7. Brunovskis P., and L.F. Velicer. 1995. The Marek's disease virus (MDV) unique short region: alphaherpesvirus-homologous, fowlpox virus-homologous, and MDV-specific genes. *Virology* 206: 324-38.

8. Cantello J.L., A.S. Anderson, A. Francesconi, and R.W. Morgan. 1991. Isolation of a Marek's disease virus (MDV) recombinant containing the lacZ gene of *Escherichia coli* stably inserted within the MDVUS2 gene. *J. Virol.* 65:1584-1588.

9. Cui Z.Z., D. Yan, and L.F. Lee. 1990. Marek's disease virus gene clones encoding virus-specific phosphorylated polypeptides and serological characterization of fusion proteins. *Virus Genes* 3:309-322.

10. Delecluse H.J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt. 1998. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 8245-8250.

11. Fuckuchi K., M. Sudo, Y.S. Lee, A. Tanaka, and M. Nonoyama. 1984. Structure of Marek's disease virus DNA: detailed restriction enzyme map. *J. Virol.* 51: 102-109.

12. Lee L.F., P. Wu, D. Sui, D. Ren, J. Kamil, H.J. Kung, and R. L. Witter. 2000. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6091-6096.

13. Maotani K., K. Kanamori, K. Ikuta, S. Ueda, S. Kato, and K. Hirai. 1986. Amplification of a tandem repeat within inverted repeats of Marek's disease virus DNA during serial in vitro passage. *J. Virol.* 58: 657-659.

14. Meindl A. and N. Osterrieder. 1999. The equine herpesvirus type 1 Us2 homolog encodes a nonessential membrane-associated virion component. *J. Virol.* 73, 3430-3437.

15. Messerle M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U.H. Koszinowski. 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:14759-14763.

16. Morgan R.W., J.L. Cantello, and C.H. McDermott. 1990. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Dis.* 34:345-351.

17. Muylers J.P., IT. Zhang, G. Testa, and A.P. Stewart. 1999. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.* 27: 1555-1557.

18. Narayanan K., R. Williamson, Y. Zhang, A.F. Stewart, and P.A. Ioannou. 1999. Efficient and precise engineering of a 200 kb beta-globin human/bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Ther.* 6: 442-447.

19. Osterrieder N. 1999. Sequence and initial characterization of the UL10 (glycoprotein M) and UL11 homologous genes of serotype 1 Marek's Disease Virus. *Arch. Virol.* 144,1853-63.

20. Osterrieder N., A. Neubauer, C. Brandtmiller, B. Braun, O.-R. Kaaden, and J.D. Baines. 1996. The

equine herpesvirus type 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM-homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *J. Virol.* 70: 4110-4115.

21. Parcells M.S., A.S. Anderson, J.L. Cantello, and R.W. Morgan. 1994. Characterization of Marek's disease virus insertion and deletion mutants that lack US 1 (ICP22 homolog), US 10, and/or US2 and neighboring short-component open reading frames. *J. Virol.* 68: 8239-8253.

22. Parcells M.S., A.S. Anderson, and R.W. Morgan. 1994. Retention of oncogenicity by a Marek's disease virus mutant lacking six unique short region genes. *J. Virol.* 69: 7888-7898.

23. Parcells M.S., A.S. Anderson, and R.W. Morgan. 1994. Characterization of a Marek's disease virus mutant containing a lacZ insertion in the US6 (gD) homologue gene. *Virus Genes* 9:5-13.

24. Payne L.N. 1985. Pathology. In: LN Payne(ed) Marek's Disease. Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA, U.S.A., pp. 43-76.

25. Pereira L. 1994. Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae. *Infect. Agents Dis.* 3: 9-28.

26. Ross N.L.J., Binns M.M., and J. Pastorek. 1991. DNA sequence and organization of genes in a 5.5 kbp EcoRI fragment mapping in the short unique segment of Marek's disease virus (strain RB1B). *J. Gen. Virol.* 72: 949-954.

27. Sakaguchi M., T. Urakawa, Y. Hirayama, N. Miki, M. Yamamoto, G.S. Zhu, and K. Hirai. 1993. Marek's disease virus protein kinase gene identified within the short unique region of the viral genome is not essential for viral replication in cell culture and vaccine-induced immunity in chickens. *Virology* 195: 140-1488.

28. Sambrook J., D.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

29. Senat K.A. 1985. Characteristics of the virus. In: LN Payne(ed) Marek's Disease. Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA, U.S.A., pp. 77-112.

30. Schat K.A., B.J. van Iddekinge, H. Boerrigter, P.H. O'connell, and G. Koch. 1998. Open reading frame LI of Marek's disease herpesvirus is not essential for in vitro and in vivo virus replication and establishment of latency. *J. Gen. Virol.* 79: 841-849.

31. Silva R.F., and R.L. Witter. 1985. Genomic expansion of Marek's disease virus DNA is

associated with serial in vitro passage. *J. Virol.* 54: 690-696.

32. Smith G.A., and L.W. Enquist. 1999. Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus. *J. Virol.* 73: 6405-6414.

33. Smith G.A., and L.W. Enquist. 2000. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 4873-4878.

34. Suter M., A.M. Lew, P. Grob, G.J. Adema, M. Ackermann, K. Shortman, and C. Fraefel. 1999. BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: A bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 12697-12702.

35. van Iddekinge B.J., L. Stenzler, K.A. Schat, H. Boerrigter, and G. Koch. 1999. Genome analysis of Marek's disease virus strain CVI-988: effect of cell culture passage on the inverted repeat regions. *Avian Dis.* 43:182-188.

36. van Regenmortel M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E. Carstens, M.K. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D. McGeoch, C.R. Pringle, and R.B. Wickner (eds). 1999. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, San Diego.

37. Wagner M., S. Jonjic, U.H. Koszinowski, and M. Messerle. 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 73:7056-7060.

38. Witter R.L. 1985. Principles of vaccination. In: L.N. Payne(ed): Marek's Disease. Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA, U.S.A., pp. 203-250.

39. Witter R.L. 1997. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis.* 41:149-163.

40. Witter R.L., J.M. Sharma, and A.M. Fadly. 1980. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Dis.* 24: 210-232.

41. Zhang X., F. Buchholz, J.P. Muyrers, and A.F. Stewart. 1998. A new log for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genet.* 20:123-128.

Таблиця 1: Праймери, що використовуються для генерування плазмід pDS і pCmGB і для делеції gB

Праймер	Послідовність	Генеровані фрагмент /плазміда
MUS21	5'-ACAG gattc CGTGTTTGAATACTGG-3' ^a	2,1 kb pDS
MUS22	5'-ATAG tcgac TttaattaaCCGGTAGTCATTAGC-3'	2,1 kb pDS
MUS23	5'-ATC gcatgc TAAATTAATTTGGCAAAACGAATAGG-3'	3,1 kb pDS
MUS24	5'-CGC aagctt AATATGAATCTCTAAAACTTCTCGGC-3'	3,1 kb pDS
gB-up	5'-GATAG aattc ATGCACTATTTTAGGCGG-3'	PcMgB
gB-low	5'-ATAC ctcgag TTACACAGCATCATCTTCTG-3'	PcMgB
gBkana	5'-TTTTCTTTTCATCAATAGATGTTTCGTTCCAAATCATCTGATT CCTCGCCATAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGC-3' ^b	Делеція гена kan ^R у gB
gBkanb	5'-ATATAGACAGATCACTAATCGATATACAGATAGGACGCC CGTTTCCATTGATTGTCTCCTCCGTGTTTCAGTTAGCCTC-3'	Делеція гена Kan ^R у gB

^aВиділені жирним шрифтом послідовності вказують сайти рестриктази, послідовності, позначені курсивом, означають додаткові основи не присутні у послідовності MDV-1;

^bПідкреслені послідовності вказують на послідовності з pEGFP-N1, використаної для ампліфікації гена kan^R, послідовності, виділені жирним шрифтом і підкреслені, вказують послідовності gB, використаної для гомологічної рекомбінації і гесE/T-обумовленої делеції gB.

Опис схем і креслень

На Фіг.1 приведена схематична ілюстрація процедури клонування з метою одержання ВАС, що несуть повні геноми MDV-1. Показана організація геному MDV-1 розміром приблизно 180 тис. п.н. (А) і карта рестрикції BamHI (В) відповідно до даних Fukuchi et al. (11). Показані також унікальна коротка послідовність (Us) і ОРС, що розміщені в Us (С і D). Фрагменти розміром 2,1 і 3,1 тис. п.н., що межують з геном Us2 (сірі прямокутники) ампліфіковані за допомогою ПЛР і клоновані у плазміді рTZ18R з одержанням рекомбінантної плазмиди рDS. ВАС-вектор розміром 7,2 тис. п.н., що вивільняється з рекомбінантної плазмиди рHA1 (15), вставляють у рDS з одержанням плазмиди рDS-рHA1 (Е). Сайти рестриктази відповідно до (2) мають наступні скорочені позначення: В = BamHI, Е = EcoRI, Р = PstI, Па = PacI, S - Sall.

На Фіг.2 приведена оцифрована картина сканування 0,8% агарозного гелю, забарвленого етидій-бромідом. ДНК, виділену з клонів ВАС 19, ВАС20 і ВАС24 *Escherichia coli* DH10B, розщеплюють з використанням BamHI та EcoRI і розділяють. Продукти розщеплення рестриктазами фланкують приставкою розміром 1 тис. п.н. (Gibco-BRL). Зірочки вказують додаткові смуги або варіації у розмірах окремих фрагментів, що є між трьома ВАС-клонами.

На Фіг.3 приведена оцифрована картина сканування ДНК з 584Ap80C (V), ВАС 19, ВАС20 і ВАС24, розщеплених з використанням BamHI або EcoRI з подальшим розділенням електрофорезом на 0,8% агарозному гелі та забарвлюванням етидій-бромідом (ліва панель). Після Саузерн-перенесення фрагментів ДНК на нейлонові мембрани проводять гібридизацію з дигоксигенін-міченими фрагментами, виділеними з плазмиди рDS або рHA1. Приведені розміри маркерів (приставка розміром 1 тис. п.н., Gibco-BRL) і розміри реакційноздатних смуг.

На Фіг.4 приведені оцифровані картини сканування Саузерн-блотів при аналізі варіацій розмірів ДНК ВАС19, ВАС20 і ВАС24. Вірусну ДНК з

штаму 584Ap80C (V) і окремі ВАС розщеплюють з використанням BamHI та EcoRI і переносять на нейлонові мембрани. Смуги інкубують з дигоксигенін-міченою ДНК ВАС 19 або з міченими фрагментами BamHI-С або BamHI-D. Приведені розміри маркерів (приставка розміром 1 тис. п.н., Gibco-BRL). Поява смуг у вигляді мазка у випадку ДНК 584Ap80C при гібридизації з послідовностями BamHI-D виділені за допомогою дужок.

Фіг.5 (А): НІФ аналіз бляшок MDV-1 після трансфекції ДНК ВАС 19, ВАС20 або ВАС24. На 5 день після трансфекції інфіковані клітини фіксують і піддають непрямому імуофлуоресцентному аналізу з використанням анти-gB моноклональних антитіл 2K11. Виявлення зв'язаних антитіл проводять з використанням антимишачих АіехаTM 488 (молекулярні зонди) і ядра контрастно забарвлюють пропідій-йодидом. Збільшення = 400^x.

(В): Криві росту MDV-1 штам 584 та різних ВАС. Після інфікування клітин СЕФ з використанням 100 ОУБ 584Ap80C або трансфікованим потомством ВАС19, ВАС20 або ВАС24 визначають титри вірусу у вказані моменти часу після інфікування за допомогою спільного посіву зі свіжими клітинами СЕФ. Бляшки підраховують після імуофлуоресцентного забарвлювання з використанням моноклональних антитіл 2K11.

На Фіг.6 приведені оцифровані картини Саузерн-блотів при аналізі стабільності послідовностей ВАС-векторів у вірусах, відновлених після трансфекції ВАС 19 і ВАС20. Трансфіковане потомство пасирують протягом чотирьох разів і після кожного пасирування виділяють вірусну ДНК. Вірусну ДНК розщеплюють з використанням BamHI або EcoRI, розділяють електрофорезом у 0,8% агарозному гелі та переносять на нейлонові мембрани. Проводять Саузерн-блот гібридизацію з використанням дигоксигенін-мічених фрагментів плазмид рDS або рHA1. Скорочення: V=584Ap80C, 19=ВАС19, 20=ВАС20. Пасажі з 1 по 4 після трансфекції ДНК ВАС 19 вказані номерами від 1 до 4. Пасаж 4 після трансфекції ДНК ВАС20 поміщений в останню лінію, відповідно, і

позначений номером 4а. Приведені розміри реактивних фрагментів. Зірочки відмічають реактивну лінію маркера розміром 1,6тис. п.н. (приставка розміром 1тис. п.н., Gibco-BRL).

Фіг.7 (А): Дана схематична ілюстрація мутагенезу BAC20 з метою видалення послідовностей, що кодують gB. Реконбінантну плазмиду рGETrec, що кодує gесЕ, gесТ і gат ген, які індуються L-арабінозою, трансформують у клітини DH10В, що містять BAC20. Після проведення ампліфікації методом ПЛР гена kan^R з плазмиди рEGFP-N1 (Clontech) за допомогою праймерів, які також містять гомологічні плечі розміром 50 п.н., що межують з делецією gB, ПЛР амплікон розміром 1,6тис. п.н. вводять електропорацією у клітини DH10В, що несуть BAC20 і рGETrec. Бактеріальні суспензії нашаровують на агар, який містить 30 мкг/мл канаміцину і 30мкг/мл хлорамфеніколу. Відбирають колонії з подвійною стійкістю і піддають подальшому аналізу.

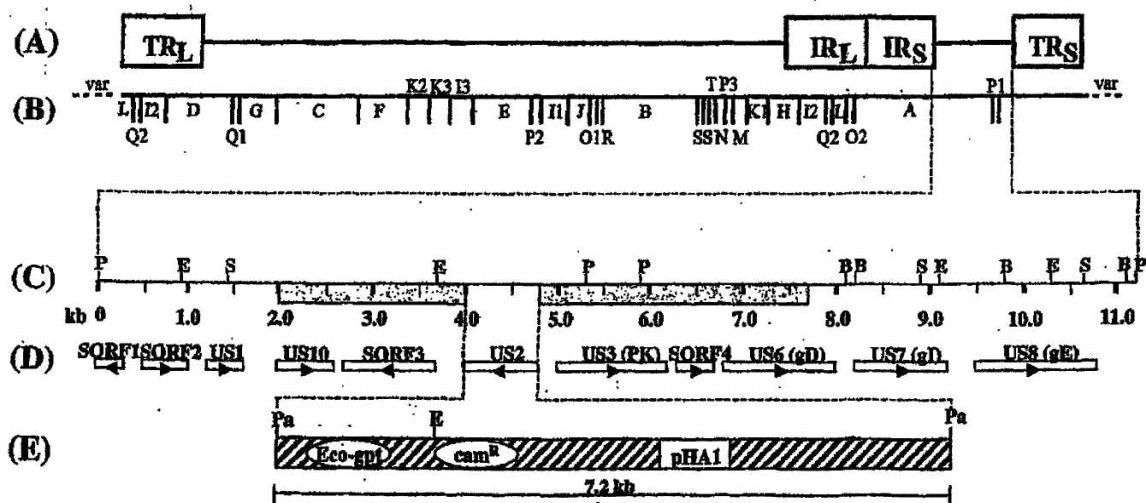
(В): Схематична ілюстрація розташування гена gB у MDV-1 та делеції, яка присутня у BAC 20DgB.

Фіг.8: Картина сканування забарвленого етидіум-бромідом 0,8% агарозного гелю, що містить ДНК BAC20 і 20DgB, розщеплені з використанням BamHI, EcoRI, BglI або StuI і розділенні електрофорезом у 0,8% агарозному гелі (ліва панель). Фрагменти ДНК переносять на нейлонові мем-

брани та гібридизують з дигоксигенін-міченими kan^R- або gB-специфічними зондами. Вказані розміри реакційноздатних фрагментів ДНК. Ско-рочення: B=BamHI, E=EcoRI, Bg=BglI, S=StuI.

На Фіг.9 показаний аналіз методом конфокального лазерного сканування MgB1 клітин, які конститутивно експресують gB MDV-1. Клітини MgB1 або QM7 висівають на накривні скельця та інкубують у присутності анти-gB моноклональних антитіл 2K11 або конвалесцентної сироватки курчати MDSI. Вторинними антитілами служили кон'югати антимишачих або антикурчачих IgG AlexaTM 488 (молекулярні зонди). Ядра контрастно забарвлюють пропідіум-йодидом. Смуга означає 10мкм.

На Фіг.10 приведені результати аналізу методом НІФ клітин MgB1, QM7 або CEF після їх трансфекції BAC20 (верхня панель) або 20DgB (нижня панель). На 5 день після трансфекції клітини фіксують ацетоном та інкубують з анти-pp38 моноклональними антитілами H19. Вторинними антитілами служили антимишачі IgG AlexaTM 488 (молекулярні зонди). У той час, як після трансфекції BAC20 ДНК бляшки MDV-1 спостерігаються на всіх клітинних лініях, після трансфекції з використанням 20DgB вірусні бляшки відмічаються тільки на клітинах MgB1. Тільки окремі варіанти інфікованих клітин спостерігаються на клітинах QM7 і CEF (стрілки). Збільшення = 400^x.



Фіг. 1

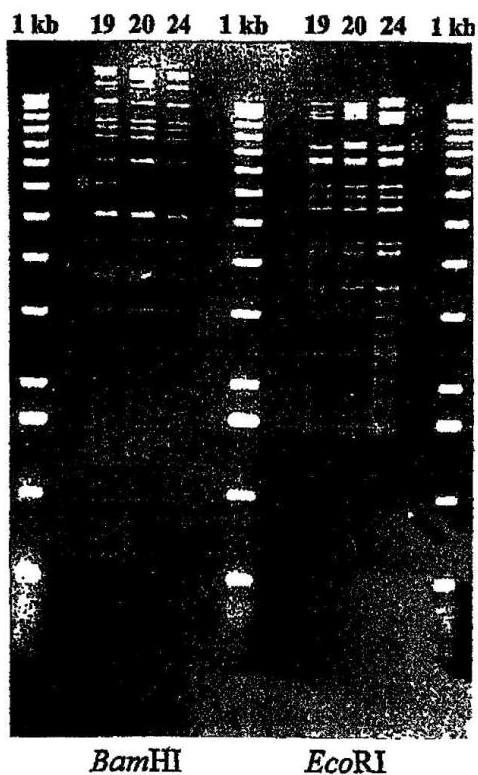


Fig. 2

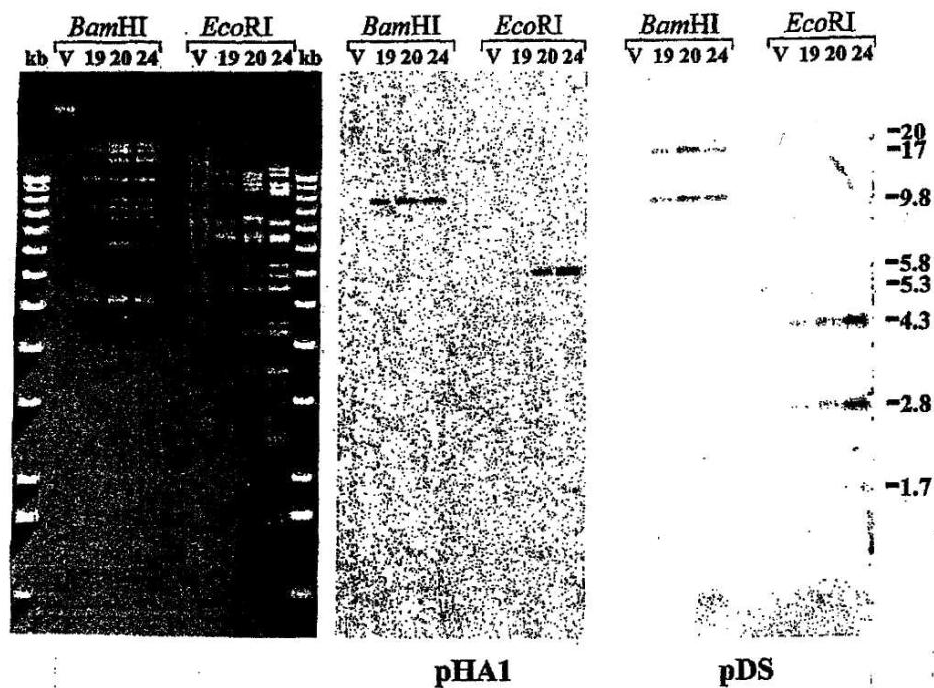


Fig. 3

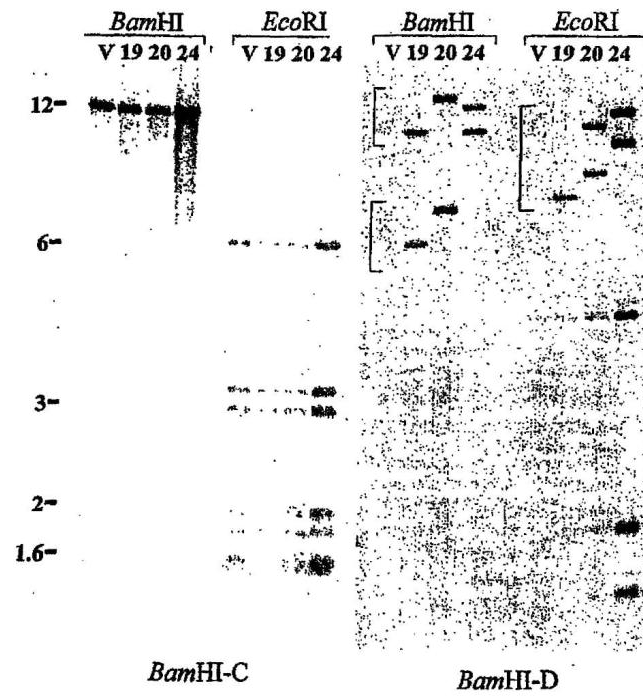


Fig. 4

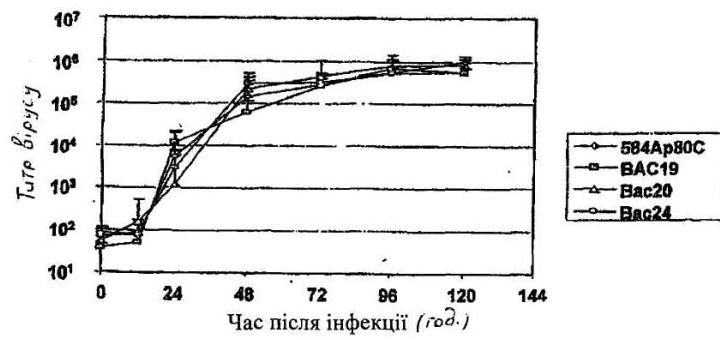
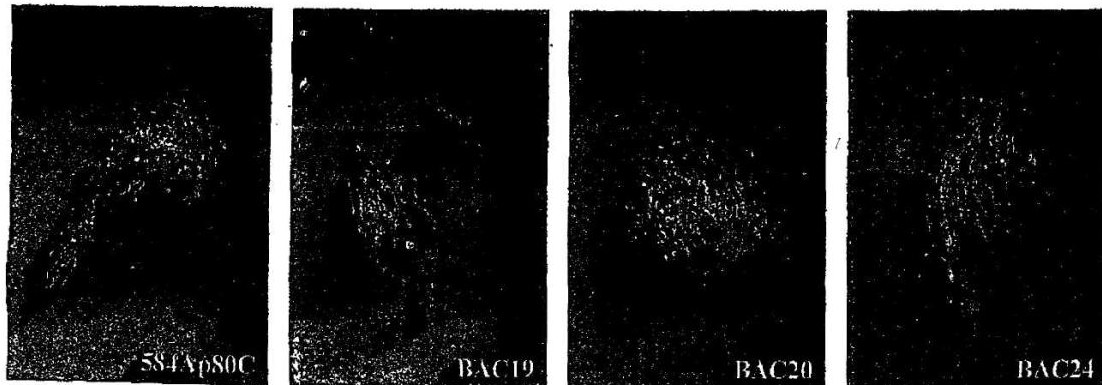


Fig. 5

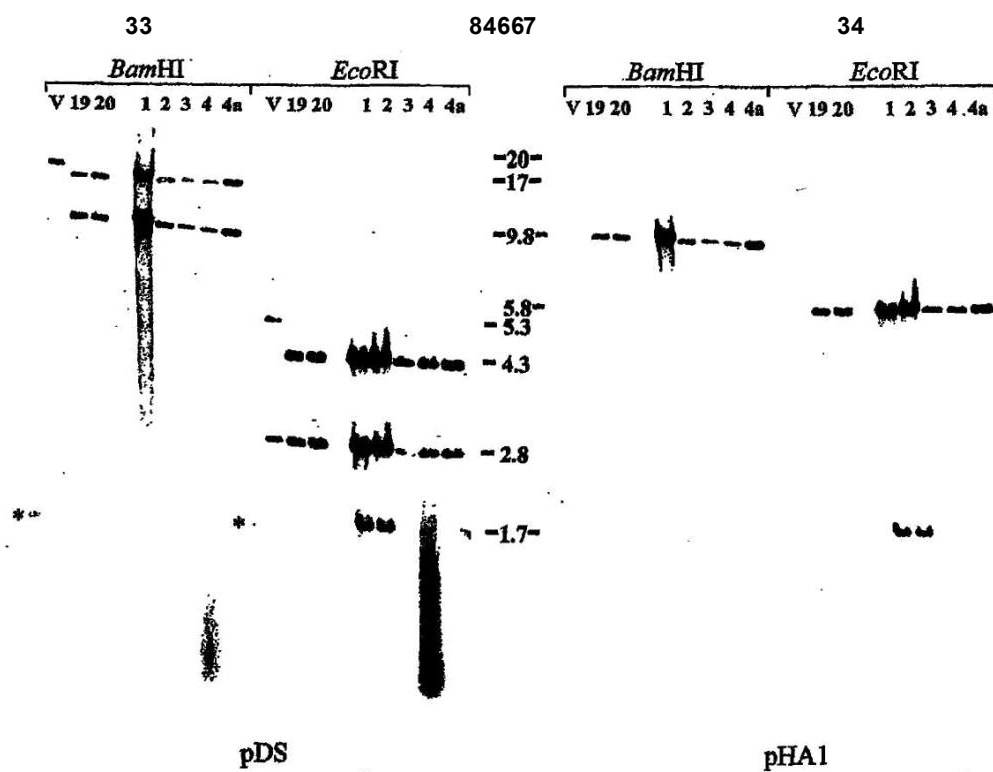


Fig. 6

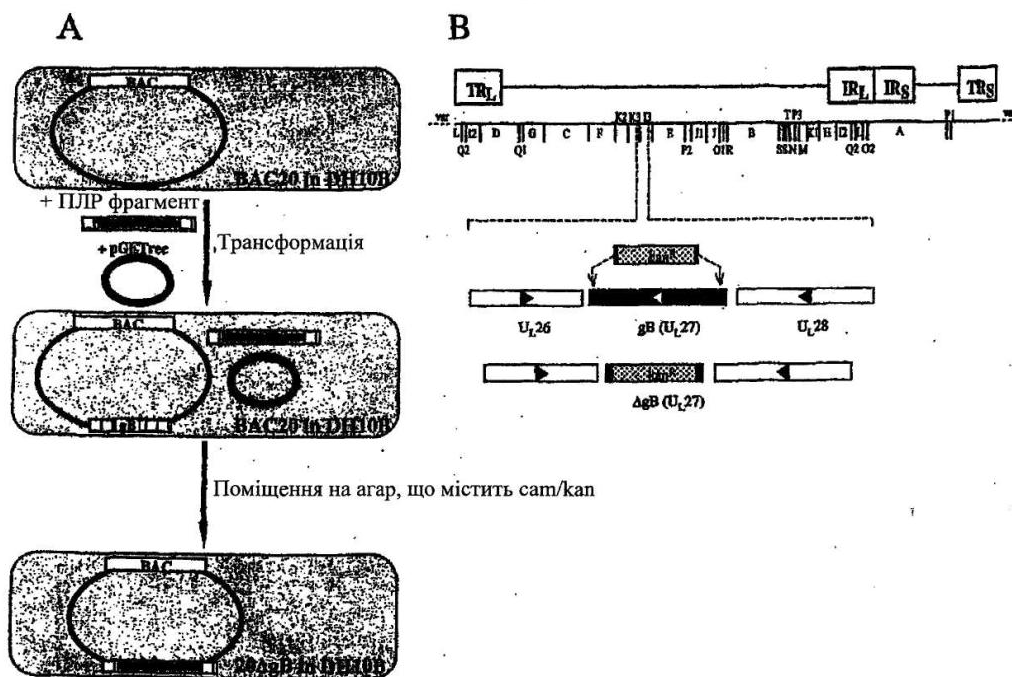
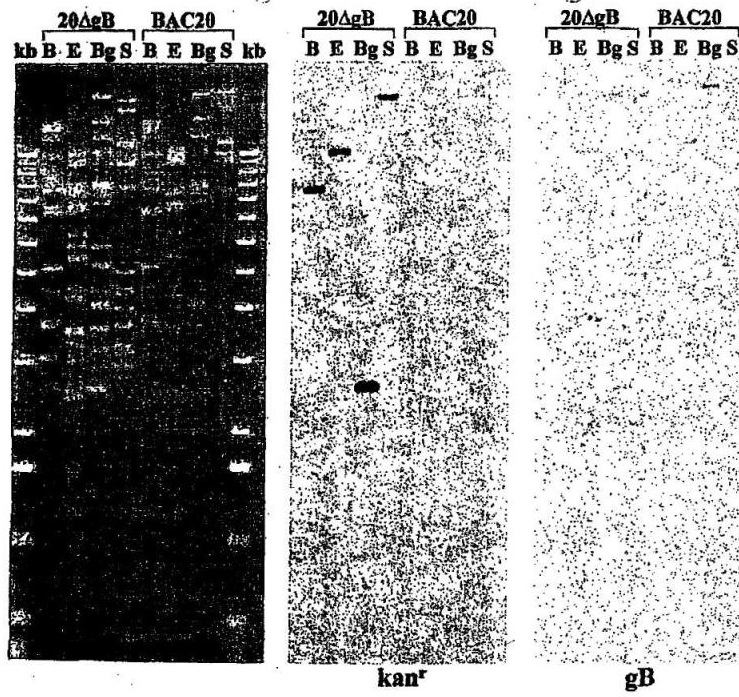


Fig. 7

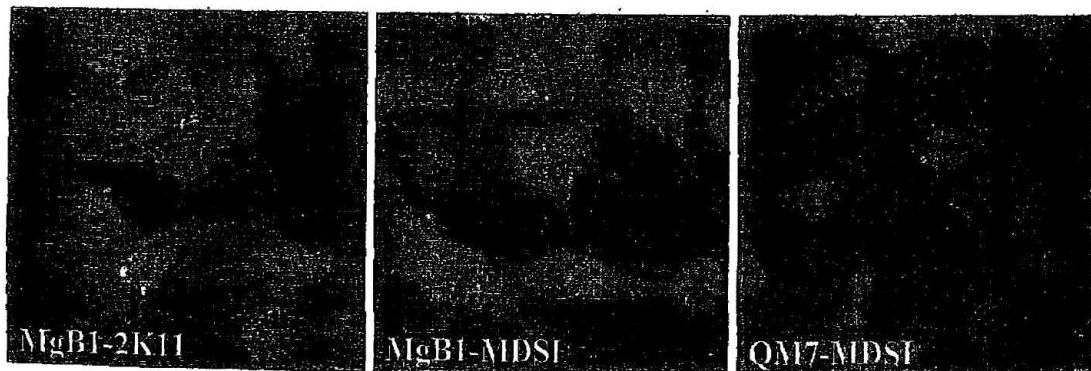
35

84667

36



Φir. 8



Φir. 9

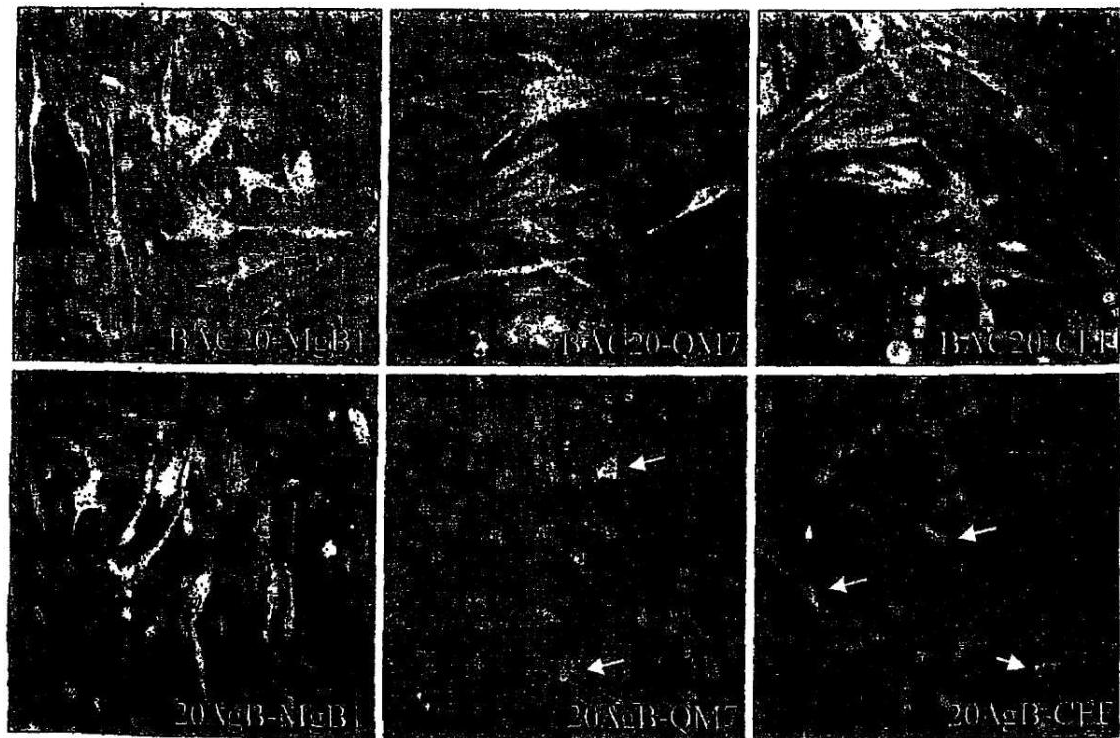


Fig. 10