



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118335** (13) **C2**
(51) МПК**C12N 15/869** (2006.01)**A61K 39/17** (2006.01)**A61K 39/12** (2006.01)**A61P 31/22** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2014 11726	(72) Винахідник(и): Фудзісава Аюмі (JP), Кубомура Маюмі (JP), Саекі Сакіко (JP), Саїто Судзі (JP)
(22) Дата подання заявки: 29.03.2013	(73) Власник(и): СЕВА САНТЕ АНІМАЛЬ, 10 avenue de la Ballastière, F-33500, Libourne, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.01.2019	(74) Представник: Слободянюк Тарас Олександрович, реєстр. №217
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12305390.2	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010/119112 A1, 21.10.2010. WO 03/064595 A2, 07.08.2003. Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens / K. Tsukamoto, S. Saito, S. Saeki et al. // Journal of virology. - 2002. - Vol.76. - №11. - P. 5637-5645. Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens / S. Reddy, J. Sharma, J. Ahmad et al. // Vaccine. - 1996. - Vol.14. - №6. - P. 469-477.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 30.03.2012	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 12.05.2015, Бюл.№ 9	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2019, Бюл.№ 1	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2013/056839, 29.03.2013	

(54) МУЛЬТИВАЛЕНТНИЙ РЕКОМБІНАНТНИЙ ВІРУС ПТАШИНОГО ГЕРПЕСУ Й ВАКЦИНА ДЛЯ ІМУНІЗАЦІЇ ПТАХІВ**(57) Реферат:**

Винахід стосується рекомбінантного вірусу пташиного герпесу, який включає щонайменше дві рекомбінантні нуклеотидні послідовності, що кодують окремий антигенний пептид, у якому зазначені щонайменше дві рекомбінантні нуклеотидні послідовності вбудовані у окрему некодуючу область вірусного геному, яку вибирають із області, розташованої між UL44 і UL45, області, розташованої між UL45 і UL46, області, розташованої між US10 і SORF3, області, розташованої між SORF3 і US2. Винахід також стосується мультивалентної вакцини, яка включає ефективну імунізуючу кількість рекомбінантного вірусу пташиного герпесу, способу вакцинації птаха одночасно проти щонайменше двох патогенів, та набору для вакцинації.

UA 118335 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід, у цілому, відноситься до галузі одержання вакцин. Даний винахід, зокрема, відноситься до мультивалентних рекомбінантних вірусів герпеса, у які були вставлені, щонайменше, два чужорідні гени, та їх застосування для одночасної індукції захисного імунітету проти багатьох хвороб птахів.

Рівень техніки

М'ясо птиці і яйця служать важливими продуктами живлення, споживання яких безупинно зростає у зв'язку з ростом чисельності населення та вигідного співвідношення ціни та їх якості. Недавня епідемія пташиного грипу зосередила суспільну увагу на здоров'ї свійських птахів, а також на безпеці харчових продуктів та її забезпеченні. Проблемою технології виробництва вакцин для птахів стурбовані в усьому світі.

Як пташину вакцину проти цільових патогенів звичайно використовують вірусні вектори, які експресують патогенні білки. Вакцини, які містять такі вірусні вектори, індукують експресію чужорідних патогенних білків в інфікованих клітинах, і, таким чином, індукують відповідний Т-клітинний імунітет.

Добре відомо, що всі віруси герпеса, включаючи вірус герпеса індички (HVT) і вірус хвороби Марека (MDV), можуть постійно жити в тілі зараженої тварини в стані латентної або хронічної інфекції. Отже, рекомбінантні віруси герпеса, у які включили чужорідний ген, отриманий з патогена, були розроблені для застосування як вакцини на основі вірусних векторів, які збільшують тривалість імунітету для щепленої тварини.

Геномна структура HVT, його широке застосування як вакцини проти MDV і його здатність залишатися незмінним у курей, роблять цей вірус привабливим вектором для одержання рекомбінантної пташиної вакцини.

Препарати вакцин були розроблені для досягнення ефективної вакцинації птахів за допомогою рекомбінантного вірусу герпеса, який включає ген, що кодує чужорідний антиген. Такі вакцинні препарати дозволяють проводити вакцинацію як проти MDV (вектор), так і проти іншого захворювання птахів, за допомогою вбудованої послідовності чужорідної ДНК.

Незважаючи на те, що такі вакцинні препарати забезпечують ефективні результати при вакцинації птахів проти багатьох смертельних захворювань, між патогенами може існувати конкуренція й імуносупресія, якщо птахам уводять ін'єкцію із двома або кількома рекомбінантними вірусами герпеса, кожний з яких несе відмінний ген чужорідного антигену.

Отже, особливо, будуть вивчені мультивалентні рекомбінантні віруси герпеса (тобто ті, які несуть щонайменше, два різні гени антигенів) для імунізації одночасно проти різних захворювань. Однак дотепер рекомбінантні HVT (rHVT), які експресують множинні чужорідні гени виявлялися нестабільними, і всі гени або частина чужорідних генів видалялися під час повторюваних пасажів у культурі клітин. Відповідно, такі нестабільні мультивалентні вірусні вектори не можуть бути застосовані як ефективні вакцини.

Відповідно, існує необхідність у стабільних мультивалентних рекомбінантних вірусних векторах, які дозволяють здійснювати спільну експресію чужорідних генів в інфікованих клітинах.

Розкриття винаходу

Робота, виконана заявником, призвела до дивного відкриття. Виявилося, що набір певних сайтів вбудовування в геномі вірусу герпеса може бути застосований для стабільного вбудовування й експресії двох або декількох генів антигену, тим самим забезпечуючи ефективні мультивалентні вірусні вектори для вакцинації птахів. Зокрема, заявник виявив, що деяке число сайтів вбудовування може бути одночасно застосоване для включення різних генів антигену, забезпечуючи стабільні мультивалентні рекомбінантні вірусні вектори.

Отже, даний винахід відноситься до рекомбінантного вірусу пташиного герпеса, який включає, щонайменше, дві рекомбінантні нуклеотидні послідовності, кожна рекомбінантна нуклеотидна послідовність, яка кодує та експресує у клітинах птаха антигенний пептид, у якому зазначені, щонайменше, дві рекомбінантні нуклеотидні послідовності вбудовано у окремі, некодуючі області вірусного генома, які вибирають з поміж області, розташованої між UL44 і UL45, області, розташованої між UL45 і UL46, області, розташованої між US10 і SORF3, та області, розташованої між SORF3 і US2.

У кращому втіленні, одну рекомбінантну нуклеотидну послідовність вбудовують в область, розташовану між UL45 і UL46, і одну рекомбінантну нуклеотидну послідовність вбудовують в область, розташовану між UL44 і UL45, між US10 і SORF3 або між SORF3 і US2. Як проілюстровано в заявці, такі рекомбінантні конструкції вірусу пташиного герпеса забезпечують особливо стабільну й ефективну експресію двох відповідних антигенних пептидів в інфікованих клітинах птахів.

Особливо, бажано, дві або кілька рекомбінантних нуклеотидних послідовностей спільно експресуються у фібробластах ембріона курчат (CEF), навіть після 10-ти або більше пасажів, і бажано навіть після 15-ти пасажів.

Відповідно до винаходу, рекомбінантні нуклеотидні послідовності бажано перебувають під контролем певних промоторів. Промотори бажано вибирають з поміж промотору бета-актину курчати (Bac), промотору Рес, передраннього (іе)1 промотору мишачого цитомегаловірусу (Mcmv), промотору цитомегаловірусу людини (Hcmv), промотору вірусу мавп (SV)40 і промотору саркоми Рауса (RSV) або з поміж будь-яких їхніх фрагментів, які зберігають активність промотору. Бажано, кожна рекомбінантна нуклеотидна послідовність перебуває під контролем окремого промотору.

Відповідно до винаходу, чужорідні гени бажано вибирають з поміж антигенного пептиду пташиного параміксовірусу типу 1, і бажано, з поміж білка F вірусу хвороби Ньюкасла (NDV), антигенного пептиду вірусу хвороби Гамборо, бажано, з поміж білка VP2 вірусу інфекційного бурситу (IBDV), антигенного пептиду вірусу інфекційного ларинготрахеїту (ILT), бажано, з поміж білка gB, антигенного пептиду Mycoplasma galisepticum, бажано, з поміж білка 40K, і антигенного пептиду вірусу пташиного грипу, бажано, з поміж поверхневого білка гемаглютиніну (HA).

У кращому втіленні, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає першу рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує перший антигенний пептид, яка вбудована у некодуючу область, розташовану між UL44 і UL45, і другу рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує другий антигенний пептид, вбудовану в некодуючу область, розташовану між UL45 і UL46, між US10 і SORF3 або між SORF3 і US2.

Ще у одному з кращих втілень, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає першу рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує перший антигенний пептид, яка вбудована у некодуючу область, розташовану між UL45 і UL46, і другу рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує другий антигенний пептид, вбудовану в некодуючу область, розташовану між US10 і SORF3, або між SORF3 і US2.

У ще кращому втіленні, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає першу рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує перший антигенний пептид, яка вбудована у некодуючу область, розташовану між US10 і SORF3, і другу рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує другий антигенний пептид, вбудовану в некодуючу область, розташовану між SORF3 і US2.

Додаткова мета винаходу відноситься до мультивалентної вакцини для імунізації таких птахів, як домашні птахи, яка включає ефективну імунізуючу кількість рекомбінантного вірусу пташиного герпеса винаходу. Дана вакцина може бути застосована для імунізації таких птахів, як домашні птахи.

Додаткова мета винаходу стосується антисироватки, спрямованої проти вірусу пташиного герпеса, отриманої шляхом імунізації птахів ефективною кількістю рекомбінантного вірусу пташиного герпеса запропонованого винаходом й вилучення антисироватки після забору крові в птаха.

Винахід додатково відноситься до способу імунізації птаха, який передбачає введення зазначеному птахові ефективної імунізуючої кількості вакцини відповідно запропонованої винаходом.

Винахід додатково забезпечує набір для вакцинації для імунізації птахів, який включає ефективну кількість вакцини запропонованої винаходом, і засоби для введення зазначених компонентів зазначеним видам.

Винахід може бути застосований до будь-якого птаха для вакцинації проти будь-якого патогена птахів.

Короткий опис креслень

Фігура 1 ілюструє схему генома HVT. Виділене місце розташування унікальної довгої області (Unique Long (UL)) 44, UL45 і UL46 і місце розташування унікальної короткої області (Unique Short (US))10, SORF3 і US2. Рекомбінантні нуклеотидні послідовності можуть бути вставлені в створені за допомогою ПЛР сайти Sfil між UL44 і UL45, і/або між UL45 і UL46, і/або між US10 і SORF3, і/або між SORF3 і US2.

Фігури 2A і 2B ілюструють схему генома HVT, яка підсумовує різні кластери нуклеотидних послідовностей і промоторів, відповідно до конкретних втілень винаходу.

Фігура 3 показує імунофлуоресцентне фарбування клітин CEF, інфікованих подвійним рекомбінантним HVT відповідно до втілень винаходу (FW129 і FW141), які спільно експресують NDV-F і IBDV-VP2 (клітини, інфіковані rHVT/ND/IBD). Експресію білка VP2 детектували за допомогою антитіл до VP2 Mab (R63) і Alexa Flour 546. Експресію білка F детектували за

допомогою анти-F #35 кролячої сироватки й Alexa Flour 488. Результати показали, що обидві клітини, інфіковані FW129 або FW141, експресують як вбудований білок NDV-F, так і вбудований білок IBDV-VP2.

Фігури 4A і 4B представляють результати аналізу методом вестерн-блотингу, що показують експресію білка VP2 і/або білка F у клітинах CEF, інфікованих rHVT відповідно до винаходу. Як показано на Фігурі 4A, смугу білка з масою 60 кілодальтон (кДа) спостерігали тільки на доріжці із клітинами, інфікованими rHVT/ND/IBD, що відповідає очікуваному розміру білка F (→). На доріжці rHVT/44-45BacVP2 (FW123) смуги не було. Як показано на Фігурі 4B, білок VP2 спостерігали в районі 38-ми кілодальтон (кДа) на доріжках кожного rHVT/ND/IBD (⇒). Напроти, на доріжці rHVT/45-46 RecF (FW029) смуги не було. Білок з молекулярною масою 38-kd є зрілим білок VP2 (A. A. Azad et al., 1987, Virol. 161:145-152, K. J., Fahey et al., 1985 J. Gen. Virol. 66:1479-1488). Подвійні rHVT винаходу експресували як NDV-F, так і IBDV-VP2.

Фігури від 5A до 5D показують результати аналізу методом саузерн-блотингу для перевірки структури генома очищеного FW129 (rHVT/45-46 RecF/44-45 Rsv VP2), видно, що подвійний рекомбінантний HVT/ND/IBD запропонований винаходом мав очікувану геномну структуру. Конкретніше, результати саузерн-блотингу показали, що

- 2077-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом VP2 у ДНК кожного подвійного рекомбінантного HVT FW129 (стовпчики 1, 2 і 3 на Фігурі 5A). Напроти, ніякої смуги не виявили в р45/46Rec F (Фігура 5A).

- 2744-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом F у ДНК кожного подвійного рекомбінантного HVT FW129 (стовпчики 1, 2 і 3 Фігура 5C). У р45/46 Sfil ніякої смуги не виявили.

- 2077-п.о. і 1228-п.о. фрагменти гібридизувалися із зондом IS44/45 у ДНК кожного подвійного рекомбінантного HVT FW129 (стовпчики 1, 2 і 3 на Фігурі 5B). Для маркера молекулярних мас, HindIII гіролізата фага лямда, ніякої смуги не виявили (стовпчик M на Фігурі 5B).

- 2744-п.о. і 770-п.о. фрагменти гібридизувалися із зондом IS45/46 у ДНК кожного подвійного рекомбінантного HVT FW129 (стовпчики 1, 2 і 3 на Фігурі 5D).

Фігури 6A і 6B показують результати аналізу методом вестерн-блотингу для перевірки стабільності рекомбінантного HVT FW129 у послідовних пасажах, які вказують на те, що після 15-ти пасажів білок F і білок VP2 стабільно експресуються в CEF, інфікованих rHVT FW129 відповідно до винаходу.

Фігури від 7A до 7D показують результати аналізу методом саузерн-блотингу для перевірки стабільності рекомбінантного HVT після 15-ти пасажів (Фігура 7A). Результати саузерн-блотингу показали, що 2077-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом VP2 у ДНК із FW129. 2334-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом VP2 у ДНК із FW130. Напроти, ніякої смуги не детектували з р45/46Rec F (Фігура 7C). Результати саузерн-блотингу показали, що 2744-п.о. фрагмент гібридизувався з F-зондом у ДНК кожного подвійного рекомбінантного HVT FW129 і FW130. У р45/46 Sfil ніякої смуги не виявили (Фігура 7B). Результати саузерн-блотингу показали, що 2077-п.о. і 1228-п.о. фрагменти гібридизувалися із зондом IS44/45 у ДНК із FW129, і що 2334-п.о. і 1022-п.о. фрагменти гібридизувалися із зондом IS44/45 у ДНК із FW130. 1350-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом IS44/45 в р45/46 RecF, який не містив ген у сайті IS44/45 (Фігура 7D). Результати саузерн-блотингу показали, що фрагменти 2744-п.о. і 770-п.о. гібридизувалися із зондом IS45/46 у ДНК кожного подвійного рекомбінантного HVT FW129 і FW130. Саузерн-блотинг із зондом 44/45 і зондом 45/46 показав, що ген VP2 або ген F стабільно зберігається в сайті вбудовування 44/45 або 45/46, відповідно в FW129 і FW130. Дані результати показують, що після 15-ти пасажів білок F і білок VP2 стабільно експресуються в CEF, інфікованих rHVT FW129 винаходу.

Фігури 8A і 8B показують порівняльні результати для анти-NDV титрів (Фігура 8A) і анти-IBDV титрів (Фігура 8B), отриманих від курчат, заражених подвійним рекомбінантним HVT (FW122, FW137, FW129, FW130, FW135), у порівнянні з титрами, отриманими з курчат, заражених одиночним рекомбінантним HVT (FW029 і FW023, відповідно).

Здійснення винаходу

Даний винахід, у цілому, відноситься до мультівалентних рекомбінантних вірусів герпеса та їх застосуванню для одночасної імунізації птахів проти, щонайменше, двох захворювань. Відповідно до винаходу, послідовності чужорідної ДНК, в основному, вбудовують у сайти вбудовування усередині генома rHV, забезпечуючи стабільні й ефективні конструкції, придатні для застосування в композиціях або способах вакцинації.

Даний винахід буде більш зрозумілим з посиланнями на наступні визначення:

Визначення

У контексті винаходу, термін "реконструйовані" або "рекомбінантні" стосовно послідовності,

позначає послідовність, нуклеїнову кислоту або одиницю, яка не існує у природі й/або яка була виготовлена за допомогою технології рекомбінантної ДНК (яка також називається генним клонуванням або молекулярним клонуванням).

Термін "рекомбінантний" стосовно вірусу герпеса відноситься до вірусу герпеса, геном якого був модифікований вставкою, щонайменше, однієї гетерологічної нуклеїнової кислоти, тобто нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК), яка не виявлена в природі в геномі вірусу герпеса, або яка виявлена в природі в зазначеному геномі, але в іншій формі або в іншому положенні. Слід розуміти, що рекомбінантний вірус герпеса може бути створений за допомогою різних способів, і, будучи одного разу створений, може бути відтворений без застосування додаткових технологій рекомбінантної ДНК. Отже, структура "рекомбінантного вірусу герпеса" описується в термінах ДНК-вставки.

У даному описі, терміни "нуклеїнова кислота", "послідовність нуклеотидів" і "нуклеотидна послідовність" застосовуються як взаємозамінні, і вони відносяться до молекули нуклеїнової кислоти, що має певну послідовність, яка може бути дезоксирибонуклеотидом й/або рибонуклеотидом. Початково, нуклеотидна послідовність може бути отримана, наприклад, за допомогою рекомбінантних, ензиматичних і/або хімічних технологій, і надалі реплікована в клітині-хазяїні або в системі *in vitro*. Нуклеотидна послідовність бажано включає відкриту рамку зчитування, яка кодує пептид. Нуклеотидна послідовність може містити додаткові послідовності, такі як термінатор транскрипції, сигнальний пептид, IRES, інтрон тощо. Бажано, відкрита рамка зчитування в рекомбінантній нуклеїновій кислоті не містить інтрон.

Термін "нетрансльована область", як він застосовується у даному документі, відноситься до області нуклеотидів, яка не має ORF і не визначає амінокислотну послідовність білка, яку слід експресувати шляхом трансляції, або до області нуклеотидів, у якій ORF не приймає участі ні в транскрипції, ні в трансляції або в експресії білка.

Термін "птахи" призначений для позначення всіх птахів, таких як птахи класу Aves, тобто хребетних тварин, які є пернатими, крилатими, двоногими, ендотермічними тваринами, що відкладають яйця. У контексті винаходу, термін птахи (avians) або види птахів (avian species) відноситься, зокрема, до птахів, які представляють економічний і/або агрономічний інтерес, таких як свійські птахи (такі як кури й індички), водоплавні птахи (такі як качки й гуси) і декоративні птахи (такі як лебеді й папуги).

Термін "вакцина", як він застосовується у даному документі, позначає засіб, який може бути застосований для того, щоб викликати, стимулювати, або підсилювати імунну відповідь в організмі.

Віруси

Віруси, для застосування в даному винаході, є такими вірусами, які відносяться, в основному, до роду вірусів пташиного герпеса.

Наприклад, віруси пташиного герпеса для застосування в даному винаході включають без обмежень віруси герпеса індички (HVT), вірус хвороби Марека, серотип 2, бажано, штам SB1 вірус хвороби Марека, серотип 2, або вірус хвороби Марека, серотип 1, бажано штам CVI988/Rispens вірусу хвороби Марека, серотип 1. Кращі віруси герпеса винаходу одержують із серотипів або штамів, які є непатогенними для цільових птахів.

Мультивалентні рекомбінантні віруси пташиного герпеса

Ціль винаходу відноситься до рекомбінантних вірусів пташиного герпеса, придатних для імунізації птахів проти, щонайменше, двох захворювань, з удосконаленою стабільністю при багаторазових пасажах. Авторами винаходу були встановлені конкретні сайти вбудовування, які, у комбінаціях, забезпечують удосконалену стабільність для генів чужорідного антигену.

Ціль винахід, отже, відноситься до рекомбінантного вірусу пташиного герпеса, який включає, щонайменше, дві рекомбінантні нуклеотидні послідовності, кожна рекомбінантна нуклеотидна послідовність, яка кодує окремий антигенний пептид, у якому зазначені, щонайменше, дві рекомбінантні нуклеотидні послідовності вбудовують у окремі некодуючі області вірусного генома, які вибираються із області, розташованої між UL44 і UL45, області, розташованої між UL45 і UL46, області, розташованої між US10 і SORF3 та області, розташованої між SORF3 і US2.

Місце розташування зазначених некодуючих областей відоме в даній галузі техніки і може бути знайдене, наприклад, в роботі ("The genome of herpesvirus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses" – Journal of General Virology (2001) 82, 1123-1135).

Наприклад, згідно посиланню на повний геном FC126 (код доступу в Банку генів: AF291866.1), область, розташована між UL44 і UL45, відповідає нуклеотидам 94243-94683 генома HVT, область, розташована між UL45 і UL46 відповідає нуклеотидам 95323-95443 генома HVT, область, розташована між US10 і SORF3 відповідає нуклеотидам 138688-138825

генома HVT, і область, розташована між SORF3 і US2, відповідає нуклеотидам 139867-140064 генома HVT.

Нуклеїнова кислота, що представляє інтерес для вставки в геном вірусу герпеса, може бути гомологічною або гетерологічною стосовно вірусу герпеса. Нуклеїнова кислота звичайно кодує антиген з патогена й може бути вилученою або отриманою з будь-якого патогенного організму, здатного викликати інфекцію в птахів. Звичайно, клоновані нуклеїнові кислоти одержують із патогенів, які викликають захворювання, що мають економічний вплив на птахівництво. Приклади патогенів, які викликають інфекцію в птахів, включають віруси, бактерії, гриби, найпростіші тощо.

Таким чином, гомологічна або гетерологічна нуклеотидна послідовність для вставки у вірусний геном може бути будь-якою послідовністю, яка кодує антигенний пептид збудника пташиного захворювання. Послідовність нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу може бути отримана з будь-якого джерела, наприклад, вірусного, прокаріотичного, еукаріотичного або шляхом синтезу. Зазвичай, нуклеотидні послідовності кодують імуногенний пептид патогена, і, бажано, який є поверхневим білком, секретованим білком або структурним білком зазначеного патогена або їх фрагментом.

Нуклеотидна послідовність може кодувати, наприклад, антигенний пептид, отриманий з вірусу пташиного грипу, пташиного параміксовірусу типу 1, який також називається вірусом хвороби Ньюкасла (NDV), пташиного метапневмовірусу, вірусу хвороби Марека, вірусу хвороби Гамборо, який також називається вірусом інфекційного бурситу (IBDV), вірусу інфекційного ларинготрахеїту (ILVT), вірусу інфекційного бронхіту (IBV), *Escherichia coli*, видів *Salmonella*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, мікроорганізмів, які відносяться до *Mycoplasmas*, які заражають птахів, або до кокцидій.

Бажано, нуклеотидні послідовності, вбудовані у вірусний геном, вибирають з поміж білка F з NDV, білка VP2 з IBDV, білка gB з ILTV, білка 40K з *Mycoplasma galisepticum*, і поверхневого білка гемаглютинін (HA) вірусу пташиного грипу.

Різні комбінації антигенних пептидів можуть становити значний інтерес, залежно від декількох факторів, таких як вид птаха, країна вирощування, умови вирощування тощо.

Наприклад, у втіленні, мультивалентний рекомбінантний вірус пташиного герпеса запропонований винаходом включає у своєму геномі нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, і нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV.

Відповідно до особливого втілення, у вірусний геном можуть бути вбудовані три або більше нуклеотидних послідовностей.

Рекомбінантний вірус герпеса запропонований винаходом може експресувати два або більше антигенів з того самого патогена.

Гомологічні або гетерологічні нуклеотидні послідовності, які кодують антигени, що представляють інтерес, можуть бути функціонально пов'язані із промотором і надалі вбудовані у вірусний геном. Застосований промотор може бути як синтетичним, так і природним, ендегічним або гетерологічним промотором.

Промотор не обмежують, доти, поки він може ефективно функціонувати в клітинах птахів, інфікованих гHVT. Отже, вибір промотору поширюється на будь-який еукаріотичний, прокаріотичний або вірусний промотор, здатний направляти транскрипцію гена в клітинах птахів, заражених гHVT.

Бажано, промотори вибирають з поміж промотору бета-актину курчати (Bac), промотору Рес, промотору мишачого цитомегаловірусу (Mcmv) ie1, промотору цитомегаловірусу людини (Hcmv), промотору мавпячого вірусу (SV)40 і промотору саркоми Рауса (RSV), або будь-яких їхніх фрагментів, які зберігають активність промотору.

Послідовність нуклеїнової кислоти курячого Bac-промотору наведена в SEQ ID NO: 1, послідовність промотору Рес наведена в SEQ ID NO: 2, послідовність промотору Mcmv ie1 наведена в SEQ ID NO: 3, послідовність промотору Hcmv наведена в SEQ ID NO: 4, послідовність промотору SV40 наведена в SEQ ID NO: 5, і послідовність промотору RSV наведена в SEQ ID NO: 6.

Слід зазначити, що варіанти таких послідовностей, які кодують функціональні промотори, відомі й/або можуть бути сконструйовані/протестовані фахівцем, для застосування в даному винаході.

У кращому варіанті рекомбінантного вірусу герпеса запропонованого винаходом, щонайменше, одна з нуклеїнових кислот включає промотор Рес або Bac для керування експресією антигенного пептиду.

Мультивалентна конструкція

Клонування генів і конструювання плазмід добре відомі фахівцям в цій галузі техніки й можуть власне бути виконані за допомогою стандартних методів молекулярної біології (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, N.Y. 2001).

Для того щоб конструювати мультивалентний рекомбінантний вірус герпеса запропонований даним винаходом, спочатку вірус герпеса розмножують у придатній клітині-хазяїні й потім одержують геномну ДНК. Хазяїна і умови для розмноження вірусу вибирають залежно від обставин. Як клітин-хазяїни краще використовувати клітини, отримані з курей, а також можуть бути застосовані клітини CEF (фібробласти курячого ембріона), клітини курячих нирок тощо. Їх можна культивувати в такому культуральному середовищі, як MEM Ігла, культуральному середовищі Лейбовіца-L-15/МакКоя 5A (суміш 1:1), при приблизно 37 °C протягом від 3-х до 4-х днів.

ДНК екстрагують із інфікованих вірусом клітин, культивованих, як описано вище, відповідно до традиційного способу. Після денатурації в буфері для лізису й видалення білка, ДНК екстрагують фенолом і етанолом.

Зазвичай, рекомбінантні віруси можуть бути отримані шляхом гомологічної рекомбінації між вірусним геномом і конструкцією (наприклад, плазмідною), яка включає нуклеїнову кислоту, яку передбачається вставити, фланковану нуклеотидами із сайту вбудовування, щоб дозволити рекомбінацію.

Плазміда з послідовністю сайту вбудовування

Однією з можливостей для вставки чужорідного гена в одну з нетрансльованих областей вірусного генома відповідно до винаходу може бути вихідне клонування послідовності, яка містить цільову нетрансльовану область, у плазміді, або в інший придатний вектор. Відповідно до винаходу, таку послідовність вибирають з поміж послідовності області, розташованої між UL44 і UL45, послідовності області, розташованої між UL45 і UL46, послідовності області, розташованої між US10 і SORF3, і послідовності області, розташованої між SORF3 і US2.

Приклади плазмід включають pBR322, pBR325, pBR327, pBR328, pUC18, pUC19, pUC7, pUC8 і pUC9, приклади фагів включають фаг лямбда й фаг M13, і приклад космід включає pHC79.

Послідовність нетрансльованої області вбудовують у плазміді відповідно до традиційного способу клонування. Послідовності області вставки бажано мають достатню довжину, так що після вставки нуклеїнової кислоти, послідовності, які фланкують нуклеїнову кислоту, мають відповідну довжину, таку, щоб забезпечити гомологічну рекомбінацію з вірусним геном *in vivo*. Бажано фланкуючі послідовності повинні мати, щонайменше, приблизно 50 нуклеотидів у довжину.

Для того щоб вставити одну чужорідну послідовність або кілька чужорідних послідовностей у нетрансльовану область, у певному сайті може бути виконана мутація нетрансльованої області з одержанням нового сайту розщеплення для ферментів рестрикції. Спосіб здійснення мутації може бути традиційним способом, а також може бути застосований спосіб, який звичайно застосовується фахівцем у цій галузі техніки, такий як *in vitro* мутагенез і ПЛР. Так, у способі ПЛР, здійснюють таку мутацію, як делеція, заміщення або приєднання 1-2 нуклеотидів у ПЛР праймер, і потім цей праймер застосовують для створення мутації.

Плазміда, яка додатково містить цільову чужорідну нуклеотидну послідовність (цільові чужорідні нуклеотидні послідовності)

Нуклеотидні й промоторні послідовності, для вставки у вірус, далі вбудовують в область вставки вірусного генома в плазміді.

Більш конкретно, нуклеотидні й промоторні послідовності вводять у фрагмент геномної ДНК вірусу герпеса, що містить послідовності області вставки, субклоновані в плазміді.

За необхідності, може бути отримана плазміда, яка містить дві або більше послідовності чужорідної нуклеїнової кислоти, наприклад, отримані від того самого або від різних патогенів, зазначені послідовності фланковані послідовностями області вставки, як описано в даному документі.

Вірусний геном, який включає чужорідну нуклеотидну послідовність у сайті вбудовування

Плазміди, у яких, щонайменше, одна нуклеотидна послідовність вбудована в нетрансльовану область, отриману як описано вище, можуть бути введені в HVT-інфіковану клітину або в клітини, трансфіковані геном HVT, за допомогою електропорації, фосфату кальцію, способу із застосуванням ліпофектину або подібних способів. Якщо кількість плазмід, призначеної для введення, перебуває в діапазоні від 0,1 до 1000 мкг, то в клітинах ефективність утворення рекомбінантних вірусів у результаті рекомбінації між гомологічними областями HVT-ДНК і плазмідною стає високою.

Одержання мультивалентних рекомбінантних вірусів герпеса

Мультивалент винаходу може бути отриманий шляхом спільної трансфекції в тій же клітинній культурі плазмиди, яка містить, як описано вище, послідовність сайту вбудовування, у яку вбудовують чужорідну нуклеотидну послідовність, і рекомбінантний вірус герпеса, який

5 містить, як описано вище, той же сайт вбудовування, вільний від чужорідної нуклеотидної послідовності, і другий сайт вбудовування, у який вбудовують чужорідну нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від вказаної. Дана спільна трансфекція призводить до рекомбінації плазмідної ДНК у вірусний геном.

Іншим способом, мультивалент винаходу може бути отриманий шляхом спільної

10 трансфекції в тій же клітинній культурі двох плазмід, кожна з яких містить різні послідовності сайту вбудовування, у які вбудовують різні чужорідні нуклеотидні послідовності, і вірус герпеса, який містить, як описано вище, ті ж сайти вбудовування, вільні від чужорідної нуклеотидної послідовності. Спільна трансфекція призводить до рекомбінації обох плазмідних ДНК у вірусний геном.

Отриманий мультивалентний рекомбінантний вірус може бути обраний генотипово або фенотипово за допомогою відомих методик відбору, наприклад, шляхом гібридизації, визначення ферментативної активності, кодованої геном, спільно інтегрованим разом з послідовностями рекомбінантних нуклеїнових кислот, або детектуванням антигенного пептиду, експресованого рекомбінантним вірусом герпеса імунологічно. Обраний рекомбінантний вірус

20 герпеса може бути культивований у великому масштабі в клітинній культурі, після чого рекомбінантний вірус герпеса, який містить пептиди, може бути зібраний.

Кращі мультивалентні конструкції

Завдання винаходу полягає в тому, щоб запропонувати мультивалентні рекомбінантні віруси герпеса, у яких присутні, щонайменше, дві чужорідні нуклеотидні послідовності, кожна з

25 яких відповідним чином вбудована в конкретний сайт вбудовування, для кодування й експресії відповідних антигенних пептидів у клітинах птахів.

Серед багатьох можливих втілень, заснованих на комбінації цільових сайтів вбудовування й кращих рекомбінантних нуклеотидних послідовностях, і, необов'язково, на кращих промоторах, заявник несподівано виявив, що конкретні комбінації демонструють високий рівень стабільності,

30 що дозволяє застосовувати їх для одержання вдосконалених мультивалентних вакцин.

Виходячи з цього зауваження, ціль винаходу полягає в тому, щоб запропонувати специфічні мультивалентні рекомбінантні віруси пташиного герпеса з високим рівнем стабільності.

Кращі мультивалентні рекомбінантні віруси пташиного герпеса запропоновані винаходом включають дві рекомбінантні нуклеотидні послідовності, кожна рекомбінантна нуклеотидна

35 послідовність, яка кодує окремий антигенний пептид й вбудована у окрему некодуючу область вірусного генома, яка обирається із області, розташованої між UL44 і UL45, області, розташованої між UL45 і UL46, області, розташованої між US10 і SORF3 та області, розташованої між SORF3 и

Кращі антигенні пептиди винаходу вибирають з поміж білка F з NDV, білка VP2 з IBDV, білка gB з ILTV, білка 40K з *Mycoplasma galisepticum* і поверхневого білка HA вірусу пташиного грипу.

40

Бажано, промотори, які застосовуються з нуклеотидними послідовностями, вбудованими в сайт вбудовування між UL44 і UL45, вибирають з поміж промотору Pес, промотору MсmV іе1, промотору HсmV, промотору SV40 і промотору RSV, або з будь-яких їхніх фрагментів, які зберігають активність промотору. Дійсно, заявник несподівано виявив, що Вас-промотор,

45 вбудований між UL44 і UL45, не дає стабільної експресії чужорідного гена. Однак Вас-промотор, вбудований в область між UL45 і UL46, дійсно забезпечує стабільну експресію.

Відповідно до першого втілення, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає вбудовану між UL45 і UL46 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, або його фрагмент, бажано під контролем промотору Pес, і, вбудовану між UL44 і UL45

50 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його фрагмент, бажано під контролем промотору SV40 (FW130).

У відповідності із другим втіленням, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає в сайті вбудовування між UL45 і UL46 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, або його фрагмент, бажано під контролем промотору Pес, і в сайті вбудовування між

55 UL44 і UL45 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його фрагмент, бажано під контролем промотору RSV (FW129).

Відповідно до третього втілення, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає в сайті вбудовування між UL45 і UL46 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, або його фрагмент, бажано під контролем промотору Pес, і в сайті вбудовування між UL44

60 і UL45 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його фрагмент,

фрагмент, бажано під контролем промотору Рес (FW156).

Відповідно до шістнадцятого втілення, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає в сайт вбудовування між US10 і SORF3 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, або його фрагмент, бажано під контролем промотору Рес, і в сайті вбудовування між SORF3 і US2 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його фрагмент, бажано під контролем промотору Mctv ie1 (FW157).

Відповідно до сімнадцятого втілення, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає в сайт вбудовування між US10 і SORF3 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, або його фрагмент, бажано під контролем промотору Mctv ie1, і в сайті вбудовування між SORF3 і US2 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його фрагмент, бажано під контролем промотору Vac (FW158).

Відповідно до вісімнадцятого втілення, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає в сайт вбудовування між US10 і SORF3 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV, або його фрагмент, бажано під контролем промотору Vac, і в сайті вбудовування між SORF3 і US2 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV або його фрагмент, бажано під контролем промотору Mctv ie1 (FW159).

Відповідно до дев'ятнадцятого втілення, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає в сайт вбудовування між US10 і SORF3 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV, або його фрагмент, бажано під контролем промотору Mctv ie1, і в сайті вбудовування між SORF3 і US2 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV або його фрагмент, бажано під контролем промотору Рес (FW160).

Відповідно до двадцятого втілення, рекомбінантний вірус пташиного герпеса включає в сайт вбудовування між UL45 і UL46 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його фрагмент, бажано під контролем промотору Mctv ie1, і в сайті вбудовування між US10 і SORF3 рекомбінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, або його фрагмент, бажано під контролем промотору Рес (FW161).

Культури клітин

Отримані рекомбінантні віруси даного винаходу можуть бути розмножені в культурах клітин, у яких зазначений рекомбінантний вірус може розмножуватися й рости. Після того як досягають необхідного росту вірусу, клітини можуть бути відділені від комірок за допомогою шкребка або трипсину, і інфіковані клітини можуть бути відділені від супернатанта центрифугуванням.

У кращих втіленнях винаходу, як клітини-хазяїни для розмноження рекомбінантного вірусу герпеса можуть бути застосовані CEF, запліднене яйце, клітини курячих нирок тощо. Мультивалентні рекомбінантні віруси даного винаходу можуть бути культивовані в такому культуральному середовищі, як MEM Ігла, культуральне середовище Лейбовіца-L-15/МакКоя 5A (суміш 1:1), приблизно при 37 °C протягом 4-х днів. Інфіковані клітини, отримані таким способом, суспендують у культуральному середовищі, яке містить 10 % диметилсульфоксиду (DMSO), і зберігають замороженими в рідкому азоті.

Бажано, рекомбінантні мультивалентні віруси герпеса запропоновані винаходом демонструють високий рівень стабільності протягом багатьох пасажів, що відповідає спільній експресії рекомбінантних нуклеотидних послідовностей у клітинах птахів навіть після 10 або більше пасажів. У контексті винаходу термін "пасаж" або "пасирування клітин" означає культивування клітин за придатних умов для їхнього росту й підтримування їх у живому стані доти, доки вони не досягнуть від 90 % до 100 % злиття. Стадія пасирування полягає в переносі невеликої кількості клітин з попередньої конфлюентної культури в нове культуральне середовище. Аліквота з попередньої конфлюентної культури, яка містить кілька клітин, може бути розведена у великому обсязі свіжого середовища. У випадку прикріплених культур, клітини можуть бути спочатку відокремлені, наприклад, за допомогою суміші трипсину й ЕДТА, або будь-якого придатного ферменту, перед застосуванням невеликої кількості окремих клітин для висівання в новому культуральному середовищі.

Відповідно до кращих втілень винаходу, клітини CEF трансфіковані рекомбінантними вірусами пташиного герпеса винаходу, як і раніше спільно експресують відповідні антигенні пептиди після, щонайменше, 10 пасажів. Інакше кажучи, клітини CEF, отримані після 10 або більше пасажів клітин CEF, трансфікованих рекомбінантними вірусами пташиного герпеса винаходу, і, зокрема, отримані після 15 пасажів, як і раніше містять чужорідні нуклеотидні послідовності рекомбінантного вірусу пташиного герпеса, застосовані для вихідної трансфекції клітин і експресують, щонайменше, два відповідні антигенні пептиди. У контексті винаходу, приймають, що клітини зазначеного пасажу як і раніше експресують антигенні пептиди, якщо рівень їх продукції вище, ніж 80 % від рівня продукції першого пасажу, і, бажано, вище, ніж 85 %.

Композиції мультивалентної вакцини

Винахід також відноситься до мультивалентної вакцини для імунізації таких птахів, як свійські птахи, яка містить ефективну імунізуючу кількість мультивалентного рекомбінантного вірусу пташиного герпеса запропонованого винаходом.

Бажано, вакцини запропонованої винаходом здатні викликати або стимулювати або підсилювати імунітет проти, щонайменше, двох патогенів, обраних з поміж пташиного параміксовірусу типу 1, вірусу хвороби Гамборо, вірусу інфекційного ларинготрахеїту, *Mycoplasma galisepticum* і вірусу пташиного грипу.

Вакцини запропонованої винаходом включають імунологічно ефективну кількість мультивалентного рекомбінантного вірусу герпеса як описано вище, у фармацевтично прийнятному носії.

Мультивалентний рекомбінантний вірус герпеса відповідно до винаходу, бажано, може бути застосований у вигляді живої вакцини, хоча інші альтернативи, такі як інактивовані вакцини або ослаблені вакцини, добре укладаються в межі кваліфікації фахівця в цій галузі техніки.

Вакцина відповідно до даного винаходу може додатково включати придатний розчинник, такий, наприклад, як водний буфер або фосфатний буфер. Бажано, вакцина також включає допоміжні засоби. Допоміжні засоби даного винаходу можуть бути отримані з будь-якого числа джерел, що включають різні білки й пептиди, отримані із тварин (наприклад, гормони, цитокіни, ко-стимулюючі фактори), і нові нуклеїнові кислоти, отримані з вірусів і з інших джерел (наприклад, дволанцюгові РНК, CpG тощо), які вводять із вакциною в кількості, достатній для посилення імунної відповіді. Крім того, будь-яка кількість комбінацій з вищевказаних речовин може забезпечувати імунопотенціюючий ефект, і, отже, може утворювати імуностимулятор запропонований даним винаходом.

До складу вакцин запропонованих даним винаходом можуть додатково входити одна або кілька додаткових допоміжних речовин для підтримання ізотонічності, фізіологічного рН і стабільності, наприклад, буфер, такий як фізіологічний сольовий розчин (0,85 %), фосфатно-сольовий буфер (PBS), цитрамультивалентні буфери, Трис(гідроксиметиламінометан (ТРИС), Трис-сольовий буфер тощо, або антибіотик, наприклад, неоміцин або стрептоміцин тощо.

Шлях введення може бути будь-яким шляхом, який включає пероральне, офтальмологічне (наприклад, за допомогою очних крапель) введення, очноносове введення із застосуванням аерозолі, інтраназальне, клоакальне, у кормі, у воді або за допомогою спрею, у яйці, місцеве введення або вакцинацію за допомогою ін'єкції (наприклад, внутрішньовенної, підшкірної, внутрішньом'язової, інтраорбітальної, внутрішньоочної, внутрішньошкірної й/або внутрішньоочеревинної). Фахівець легко підбере склад композиції вакцини для кожного типу шляху введення.

Кожна доза вакцини може містити відповідну дозу, достатню, щоб викликати захисну імунну відповідь у птахів. Спосіб оптимізації таких доз добре відомий у цій галузі техніки. Кількість антигену на дозу може бути визначена за допомогою відомих способів із застосуванням взаємодій антиген/антитіло, наприклад, методом ELISA.

Вакцини запропоновані винаходом можуть бути введені у вигляді одиночних доз або багаторазових доз, залежно від протоколу вакцинації.

Вакцини запропоновані даним винаходом додатково вигідні тим, що вони забезпечують птахам аж до 80 % захисту від цільового пташиного патогена через 3 тижні після вакцинації.

Даний винахід додатково відноситься до застосування вакцини як описано вище для імунізації птахів, таких як свійські птахи, і до способу імунізації птахів шляхом введення імунологічно ефективної кількості вакцини відповідно до винаходу. Вакцина бажано може бути введена внутрішньошкірно, підшкірно, внутрішньом'язово, перорально, *in ovo*, шляхом введення через слизову оболонку або через очноносовий шлях введення.

Даний винахід додатково відноситься до наборів для вакцинації для імунізації птахів, які включають ефективну кількість мультивалентної вакцини, як описано вище, і засобу для введення зазначених компонентів зазначеним видам. Наприклад, такий набір включає обладнання для ін'єкцій, заповнене мультивалентною вакциною запропонованою винаходом й інструкцію для внутрішньошкірної, підшкірної, внутрішньом'язової ін'єкції або ін'єкції *in ovo*. Альтернативно, набір включає спрей/аерозоль або обладнання для введення очних крапель, заповнене мультивалентною вакциною запропонованою винаходом й інструкції для очноносового введення, перорального введення або введення через слизову оболонку.

Далі даний винахід буде описаний більш докладно з посиланнями на наступні експерименти і приклади, але це не повинно бути витлумачене так, що даний винахід обмежений цими експериментами й прикладами.

Експерименти

В експериментах застосовували кілька рекомбінантних вірусів герпеса (моновалентних або

мультивалентних відповідно до винаходу), позначених у такий спосіб (HVT/перший сайт вбудовування-перший чужорідний ген/другий сайт вбудовування-другий чужорідний ген):

FW122: HVT/45-46 Hcmv VP2 Bac F

FW123: HVT/44-45 Bac VP2,

5 FW125: HVT/45-46 Bac F/44-45 Hcmv VP2

FW129: HVT/45-46 PecF/44-45 Rsv VP2

FW130: HVT/45-46 PecF/44-45 SV40 VP2

FW135: HVT/45-46 sv40 F/44-45 Bac VP2

FW137: HVT/45-46 Pec F sv40 VP2

10 FW141: HVT/45-46 PecF/44-45 Mcmv ie1VP2

FW142: HVT/45-46 Bac VP2/44-45 Mcmv ie1 F

FW144: HVT/45-46 Pec F/87-88 Mcmv ie1 VP2

FW145: HVT/45-46 Bac VP2/87-88 Mcmv ie1 F

FW023: HVT/45-46 Bac VP2

15 FW029: HVT/45-46 Pec F

Експеримент 1: Конструкція гомологічних векторів

Конструкція плазмиди переважно була виконана відповідно до стандартних методів молекулярної біології (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001). Рестрикційні фрагменти ДНК аналізували за допомогою електрофорезу на агарозних гелях і очищали за допомогою набору Plasmid plus Midi Kit (QIAGEN, Cat # 12945)

Конструкція p44/45d46Sfi

Виходячи з інформації про гомолога gC (gCh) гена MDV серотип 1 (Coussens et al., J. Virol. 62:2373-2379, 1988) і про фрагмент BamHI-B, який прилягає до нього (Японська нерозглянута патентна публікація No. H6-292583), ДНК-фрагмент, що має сайт SfiI між двома ORF UL44h і UL45h, одержували за допомогою ПЛР і клонували в pUC18. Спочатку, ДНК HVT одержували із клітин CEF, інфікованих штамом HVT FC126 у відповідності зі способом, запропонованим Lee et al. (J. Gen. Virol., 51: 245-253, 1980). Застосовуючи отримані HVT ДНК як матрицю, проводили ПЛР із двома парами праймерів.

30 Перша пара мала вигляд

SEQ NO: 7 (5'-CCCCGAATTCATGGAAGAAATTTCC-3') і

SEQ NO: 8 (5'-CGCGGGCCAATAAGGCCAACATCGGGACGTACATC-3').

Друга пара мала вигляд

SEQ NO: 9 (5'-GCGCGGCCTTATTGGCCTTAAATACCGCGTTTGGAG-3') і

35 SEQ NO: 10 (5'-CCCCAAGCTTTCAAGTGATACTGCGTGA-3').

Застосовуючи суміш двох отриманих продуктів ПЛР як матрицю, проводили ще одну ПЛР із SEQ NO.7 і SEQ NO.10 для створення фрагмента, який має сайт SfiI між двома ORF, UL44h і UL45h.

40 Отриманий фрагмент потім розщеплювали в присутності EcorI і HindIII і лігували з pUC18, який був розщеплений за допомогою EcorI і HindIII. Отриману плазмиду позначили як p44/45Sfi.

Для конструкції подвійного рекомбінантного HVT, у якому два гени були вбудовані в UL44/45 і UL45/46, відповідно, ген UL46 видаляли з p44/45Sfi. p45/46Sfi (US 7569365), розщеплений за допомогою EcorI і SfiI, лігували з лінкером dSfiI -EcorI, і одержували плазмиду p44/45d46. p44/45Sfi, розщеплений за допомогою SphI і PstI, лігували з p44/45d46, розщепленим за допомогою тих же ферментів, і одержували плазмиду p44/45d46Sfi.

45 Конструкція pHVT 87-88

HVT ДНК одержували із клітин CEF, інфікованих штамом HVT FC126 у відповідності зі способом, запропонованим Lee et al. (J. Gen. Virol., 51: 245-253, 1980). Застосовуючи отриману ДНК HVT як матрицю, проводили ПЛР із двома парами праймерів. Кожний праймер розробляли, виходячи з інформації, отриманої в Genbank X68653.1. ДНК-фрагмент, що має сайт SfiI між двома ORF, US2 (HVT088) і SORF3 (HVT087), одержували за допомогою ПЛР і клонували в pUC18.

Перша пара мала вигляд

55 SEQ NO.11 (5'-GGGAATTCGAAGAGCCCCGCGGACGCATG-3') і

SEQ NO. 125'-CCGCTAGCGGCCGCAAGTTCCTTCACCATGACCAG-3')

Друга пара мала вигляд

SEQ NO.13 (5'-GCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCCGTAGCATAAAGACGCAGG-3')

і SEQ NO.14 (5'-CCAAGCTTCTAGTACATATATACATGAC-3')

60 Перший отриманий фрагмент розщеплювали за допомогою EcorI і NheI. Другий отриманий фрагмент розщеплювали за допомогою NheI і HindIII. Дані розщеплені фрагменти вбудовували

в pUC18, розщеплену за допомогою EcorI і HindIII, і одержували плазмиду pHVT 87-88.

Конструкція pHVT 86-87

ДНК HVT одержували із клітин CEF, інфікованих штамом HVT FC126 у відповідності зі способом Lee et al. (J. Gen. Virol., 51: 245-253, 1980). Застосовуючи отриману ДНК HVT як матрицю, проводили ПЛР із дві парами праймерів. Кожний праймер розробляли, виходячи з інформації, отриманої в Genbank X68653.1. ДНК-фрагмент, який має сайт SfiI між двома ORF, US10 (HVT086) і SORF3 (HVT087), одержували за допомогою ПЛР і клонували в pUC18.

Перша пара мала вигляд

SEQ NO.15 (5'-GGGGGAATTCATTATCCCATCTAACAGTTATATACG-3') і

SEQ NO.16 (5'-GCCGCTAGCGGCCCGCCTTTATTAACAACCTTAC-3')

Друга пара мала вигляд

SEQ NO.17 (5'-GCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCC GTTTATTCTATGTAAGAC-3') і SEQ NO.18 (5'-CCCAAGCTTAAGTTCCTTCACCATG-3')

Перший отриманий фрагмент розщеплювали за допомогою EcorI і NheI. Другий отриманий фрагмент розщеплювали за допомогою NheI і HindIII. Дані розщеплені фрагменти вбудовували в pUC18, розщеплену за допомогою EcorI і HindIII, і одержували плазмиду pHVT 86-87.

Конструкція гомологічного вектора

Хімічно синтезований промотор Mcmv ie1

Промотор Mcmv ie1 (SEQ NO.19) синтезували, виходячи з інформації про 4191-4731 п.о., Gene Bank L06816.1, наданої Koszinowski, U. H. Синтезований промотор Mcmv ie1 був розроблений так, щоб сайти BglI-pstI були додані перед ним і XbaI-notI сайти були додані на кінці.

SEQ NO.19: GGCCAATAAG GCTGCAGTAC TGAGTCATTA GGGACTTTCC AATGGGTTTT
GCCCAGTACA TAAGGTCAAT AGGGGTGAAT CAACAGGAAA GTCCCATTGG AGCCAAGTAC
ACTGAGTCAA TAGGGACTTT CCATTGGGTT TTGCCAGTA CAAAAGGTCA ATAGGGGGTG
AGTCAATGGG TTTTCCCAT TATTGGCACG TACATAAGGT CAATAGGGGT GAGTCATTGG
GTTTTCCAG CCAATTTAAT TAAAACGCCA TGACTTTCC CACCATTGAC GTCAATGGGC
TATTGAACT AATGCAACGT GACCTTTAAA CGGTACTTTC CCATAGCTGA TTAATGGGAA
AGTACCGTTC TCGAGCCAAT ACACGTCAAT GGGAAGTGAA AGGGCAGCCA AAACGTAACA
CCGCCCCGGT TTTCCCCTGG AAATTCCATA TTGGCACGCA TTCTATTGGC TGAGCTGCGT
TCTACGTGGG TATAAGAGGC GCGACCAGCG TCGGTACCGT CGCAGTCTTC GGTCTGACCA
CCGTAGAACG CAGAGCTCCT CGCTGCAGGC GGCCGCTCTA GA

Конструкція p44/45 Mcmv ie1 VP2 SPA

p44-45d46Sfi з розщепленим SfiI дефосфорилували за допомогою лужної фосфатази рекомбінанта S1B1 Shewanella sp. (PAP) (Funakoshi #DE110). Фрагмент лігували з p45/46BacVP2 з розщепленим BglI, одержували плазмиду p44/45d46 BacVP2. Синтезований промотор Mcmv ie1 (BglI/XbaI) лігували з p44/45d46 BacVP2, розщепленим за допомогою EcoRV і XbaI, і p44/45d46 Bac VP2 розщеплювали за допомогою EcoRV і BglI, і одержували p44/45d46 Mcmv ie1 VP2. Коротку синтезовану поліА сигнальну послідовність (SPA: SEQ NO.20 CTGCAGGCGGCCGCTCTAGAGTCGACAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGT) інтегрували в p44/45d46 Mcmv ie1 VP2, розщеплений за Sall і SfiI, і одержували гомологічну плазмиду p44/45d46 Mcmv ie1 VP2 SPA

Експеримент 2: Очищення рекомбінантного HVT в CEF, трансфікованих кожним з векторів переносу

Вірусну ДНК HVT дикого типу, штам FC126 (wt-HVT) одержували, як описано в роботі Morgan et al. (Avian Diseases, 34:345-351, 1990). Вірусні ДНК FW029 (rHVT/45-46PecF) і FW023 (rHVT/45-46BacVP2) одержували аналогічним способом. Перший подвійний зразок rHVT був таким, що клітини CEF трансфікували отриманою wt-HVT ДНК і p45/46sv40VP2 PecF (ex. FW137). Другий зразок був таким, що клітини CEF трансфікували отриманою FW029 ДНК і p44/45 Mcmv ie1 VP2 (ex. FW141). Третій зразок був таким, що клітини CEF трансфікували отриманою FW023 ДНК і p44/45 Mcmv ie1 F (ex. FW142). Четвертий зразок був таким, що CEF трансфікували отриманою FW029 ДНК і pHVT87-88Bac VP (ex. FW144). П'ятий зразок був таким, що CEF трансфікували отриманою FW023 і pHVT87-88Pec F (ex. FW145). Дані отримані рекомбінантні віруси очищали із бляшок шляхом фарбування бляшок антитілами проти NDV-F і антитілами проти IBVDV-VP2.

Коротко, 10⁷ первинних клітин CEF суспендували в 100 мкл MEF-1 (Lonza LNJVD-1004) і шляхом електропорації проводили спільну трансфекцію 1 мкг гомологічного вектора, наприклад, p44/45 Mcmv ie1 F і pHVT Bac VP2, і 2 мкг ДНК HVT, наприклад, FC126, FW029 і FW023. Електропорацію проводили за допомогою "Nucleofector II". Трансфіковані клітини розбавляли в 20 мл середовища Лейбовіца L-15 (GIBCO BRL, Cat. #41300-39), середовища Маккоя 5A (GIBCO

BRL, Cat. #21500-061) (1:1) і 4 % телячої сироватки (позначають як розчин середовища LM (+)), розподіляли по 100 мкл на комірку в 96-комірковому планшеті.

Інкубували при 37°C в 5%-му CO₂ поки бляшки не ставали видимими, клітини відокремлювали від планшета трипсинізацією, розбавляли у свіжоприготовлених вторинних клітинах CEF, переносили в рівних об'ємах на два 96-коміркових планшета й інкубували протягом 3-х днів для візуалізації бляшок. Потім один із двох планшетів фарбували моноклональними антитілами R63 проти VP2 (ATCC #: HB-9490) як первинними антитілами. Після детекції комірки, яка містила пофарбовані рекомбінантні бляшки, клітини з відповідної комірки іншого планшета вилучали, розбавляли у свіжих вторинних клітинах CEF і переносили в рівних об'ємах у два 96-коміркових планшета для завершення першого раунду очищення. Процедуру очищення повторювали доти, поки кожна з отриманих бляшок не фарбувалася позитивно моноклональними антитілами R63. Після цього, подвійного гHVT-кандидата фарбували антитілами 3-1G/5 проти NDV-F (Morrison, T. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 1020-1024, 1987) або кролячою сироваткою проти F. Нарешті, експресію білків з кожної бляшки кандидата гHVT підтверджували подвійним IFA-фарбуванням. CEF, інфіковані кожним гHVT, фіксували холодним ацетоном-метанолом (2:1), промивали PBS, який прореагував із сумішшю антитіл (розведення 1:1000 анти-F кроляча сироватка #35 і анти-VP2 мишачі Mab R63) при 37°C протягом 60 хвилин. Після 3-разового промивання з PBS, клітини взаємодіяли із сумішшю люмінесцентних антитіл (розведення 1:1000 мічені Alexa Fluor488 антитіла до кролячих імуноглобулінів і мічені Alexa Fluor488 антитіла до мишачих імуноглобулінів, що поставляються компанією "Invitrogen") при 37°C протягом 60-ти хвилин. Після 3-разового промивання з PBS, їх спостерігали за допомогою флуоресцентного мікроскопа при 400-разовому збільшенні.

Експресію білка VP2 детектували за допомогою Mab (R63) проти VP2 і Alexa Flour 546. Експресію білка F детектували за допомогою кролячої сироватки проти F #35 і Alexa Flour 488. Якщо всі бляшки експресували як F, так і VP2, то ми робили висновок, що очищення завершено. На Фігурі 3 наведені деякі приклади подвійних IFA.

Очищений рекомбінантний HVT позначали як гHVT/ND/IBD.

Наведена нижче таблиця 1 показує експресію VP2 і білка F, отриманих з різних гHVT/ND/IBD. Штам FW023 (HVT/45-46 Vac VP2) відповідає моновалентному рекомбінантному вірусу герпеса, який застосований як контроль експресії VP2, і FW029 (HVT/45-46 RecF) відповідає моновалентному рекомбінантному вірусу герпеса, який застосований як контроль експресії білка F.

Таблиця 1

Експресія вбудованих генів NDV-F і IBDV-VP2
за допомогою гHVT/ND/IBD (детекція флуоресценції)

Вірус	Первинні антитіла		
	Антисироватка проти F	Моноклональні кролячі антитіла (R63) проти VP2	PBS
FW137	+w	+w	-
FW129	+	+	-
FW130	+	+	-
FW141	+	+	-
FW142	+	+	-
FW144	+	+	-
FW145	+	+	-
FW029	+	-	-
FW023	-	+	-
FC126	-	-	-
немає	-	-	-

35 +: детектується, +w; слабо детектується, -: не детектується

Експеримент 3: Спільна експресія двох білків в CEF, інфікованих подвійним рекомбінантним HVT

Клітини CEF, 2×10⁵ в 2-х мл, інфікували рекомбінантним HVT і інкубували при 37°C в 5 %-му CO₂ протягом 3-х днів.

40 Потім культуру центрифугували при 300 g протягом 3-х хвилин, і клітини, які випали в осад,

ресуспендували в 100 мкл. До суспензії клітин додавали буфер Лемлі (100 мкл). Потім отриману суміш кип'ятили протягом 5-ти хв., і з них 5 мкл аналізували за допомогою електрофорезу в 10 %-вому SDS-поліакриламідному гелі. Розділені електрофорезом білки переносили з SDS-GEL на PVDF-мембрану (Immobilon-P, Millipore), яку блокували в 1 %-вому мас./об. сухому знежиреному молоці в PBS за кімнатної температури протягом однієї години.

Для детекції F (Фігура 4A), оброблену мембрану потім обробляли анти-F кролячою антисироваткою #35 в 500-разовому розведенні за кімнатної температури протягом однієї години, промивали три рази PBS, та інкубували протягом однієї години з біотинільованими козячими антитілами до імуноглобулінів кролика.

Для детекції VP2 (Фігура 4B), оброблену мембрану потім обробляли анти-VP2 Mab R63 в 500-разовому розведенні за кімнатної температури протягом однієї години, промивали три рази PBS, та інкубували протягом однієї години з біотинільованими козячими антитілами до імуноглобулінів миші.

Після промивання три рази в PBS, мембрану інкубували протягом однієї години з комплексом авідин-лужна фосфатаза, промивали три рази PBS і один раз TBS (Трис-сольовий буфер), і обробляли BCIP-NBT(субстрат лужної фосфатази.) Як показано на Фігурі 4A, смугу білка 60 кілодальтон (кДа) спостерігали тільки на доріжці із клітинами, інфікованими rHVT/ND/IBD, що було очікуваним розміром білка F (→). На доріжці rHVT/44-45BacVP2 (FW123) смуги не було.

Фігура 3B показує, що білок VP2 спостерігали в районі 38-кілодальтон (kd) на доріжках з кожним rHVT/ND/IBD (⇒). Напроти, на доріжці rHVT/РесF (FW029) смуги не було (Фіг. 1 B). 38-kd білок є зрілим білком VP2 (A. A. Azad et al., 1987, Virol. 161:145-152, K. J., Fahey et al., 1985 J. Gen. Virol. 66:1479-1488).

Подвійний рекомбінантний HVT відповідно до винаходу експресував як NDV-F, так і IBDV VP2.

Експеримент 4: Перевірка геномної структури

Саузерн-блотинг аналіз

Очищений rHVT/ND/IBD розмножували на клітинах CEF в одному 25-см² флаконі для одержання конфлюентних бляшок. Клітини видаляли із чашок зшкрібанням, переносили в пробірки Falcon і центрифугували при 300 x g протягом 5-ти хв. Зібрані клітини промивали PBS, ресуспендували в 0,6 мл PBS і 0,4 мл буфера для лізису (1,25 % TritonX-100, 250 мМ 2-ME, і 50 мМ ЕДТА в PBS), і лізували на вортексі протягом 3-х хв. Потім лізати центрифугували при 600 x g протягом 5-ти хв. за кімнатної температури й супернатанти переносили в 15 мл пробірки Falcon. Віруси збирали центрифугуванням при 20400 x g протягом 20 хв. Отримані осади потім центрифугували в 0,33 мл розчину нуклеази (12,5 мМ Трис-Cl (pH7,5), 1 мкг/мл ДНКазу I і 1 мкг/мл РНКазу A), інкубували при 37 °C протягом 30 хв., і руйнували шляхом інкубації при 55 °C протягом 30 хв. із 83 мкл розчину SDS-протеази (50 мМ ЕДТА, 5 % SDS, 0,5 мг/мл протеази K, і 28,5 мМ 2-меркаптоетанол). Отриману суміш обробляли двічі фенол-хлороформом, і до водної фази додавали NaCl у кінцевій концентрації, рівній 0,2 М. Вірусну ДНК осаджували додаванням 2,5 об'ємів крижаного етанолу, промивали 70 %-ним етанолом і центрифугували при 20400 x g протягом 20 хв. при 4 °C. Після висушування на повітрі, осади розчиняли в буфері TE (10 мМ Трис-Cl (pH8,0), 1 мМ ЕДТА).

Вірусну ДНК в TE буфер розщеплювали за допомогою XhoI, SphI і SmaI, і розділяли за допомогою електрофорезу в 0,8 %-вому агарозному гелі. Розділені за допомогою електрофорезу на одиночному гелі фрагменти ДНК переносили одночасно на дві нейлонові мембрани (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition, 6,35, Sambrook, J., і Russell, D.W. Cold Spring Harbor Laboratory). Після фіксування ДНК за допомогою термообробки, іммобілізовану ДНК гібридизували з DIG-міченим зондом, "VP 2-зондом" або "IS44/ 45-зондом", які одержували за допомогою набору для синтезу DIG-мічених ПЛП-зондів (ROCHE DIAGNOSTICS, Cat. #1636090). Крім того, вірусну ДНК в TE буфері розщеплювали за допомогою XhoI і SphI, і гібридизували з DIG-міченим зондом, "F-зондом", "IS45/ 46-зондом" за допомогою тієї ж зазначеної вище методики. VP2 зонд одержували з VP2 STC-F (SEQ ID NO.21) і VP2 STC-R (SEQ ID NO.22) використовували як праймери і р45/46BacVP2-STC як матрицю. F-зонд одержували з F-F (SEQ ID NO.23) і F-R (SEQ ID NO.24) використовували як праймери і р45/46РесF як матрицю. IS45/ 46-зонд одержували з 45/46-F (SEQ ID NO.25) і 45/46-R (SEQ ID NO.26) використовували як праймери і рNZ45/46Sfi як матрицю. IS44/ 45-зонд одержували з 44/45-F (SEQ ID NO.27) і 44/45-R (SEQ ID NO.28) використовували як праймери і рNZ44/45d46Sfi як матрицю.

VP2 STC-F (SEQ ID NO.21) 5'-CACCGTCTCAGCTTACCCACATC-3'

VP2 STC-R (SEQ ID NO.22) 5'-ACGACGGATCCTGTTGCCACTCT-3'

NDV-F-F (SEQ ID NO.23) 5'-CTAGCAGTGGCAGTTGGGAAGAT-3'
 NDV-F-R (SEQ ID NO.24) 5'-GTTAAGGCAGGGGAAGTGATTTGT-3'
 45/46-F (SEQ ID NO.25) 5'-GGGGAAGTCTTCCGGTTAAGGGAC-3'
 45/46-R (SEQ ID NO.26) 5'-GGTGCAATTCGTAAGACCGATGGG-3'
 44/45-F (SEQ ID NO.27) 5'-GTACTATAGAATGTGTTCC-3'
 44/45-R (SEQ ID NO.28) 5'-GTATCCAACGCCTCAAGATC-3'

Результати саузерн-блотингу показали (Фігури 5A-5D), що 2077-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом VP2 у ДНК із FW129. Напроти, ніякої смуги не детектували з р45/46Рес F.

Крім того 2744-п.о. фрагмент гібридизувався з F-зондом у ДНК із кожного подвійного рекомбінантного HVT. Ніякої смуги не виявили в р45/46 Sfil.

2077-п.о. і 1228-п.о. фрагменти до IS44/45-зонду в ДНК із FW129. 1350-п.о. фрагмент до IS44/45-зонду в р45/46РесF, який не був вставлений у ген у сайті IS44/45.

2744-п.о. і 770-п.о. фрагменти до IS45/46-зонду в ДНК кожного подвійного рекомбінантного HVT. Фігура 5A-5D показує, що отримані подвійні рекомбінанти HVT/ND/IBD мали очікувану геномну структуру.

Експеримент 5: Стабільність рекомбінантного HVT при пасажі

Вестерн-блотинг аналіз

Подвійний рекомбінантний HVT серійно пасирували (аж до 15 разів) на фібробластах курячих ембріонів (CEF). Потім клітинні лізати наносили на вестерн-блотинг аналіз. На першій панелі (Фігура 6A), блот прореагував з анти-F кролячою сироваткою (#35). На другій панелі (Фігура 6B) блот прореагував з анти-VP2 Mab (R63). Контроль: неінфіковані CEF

М: Білки-стандарти (Precision Plus Protein Standards Bio Rad #161-0374)

Після 15-ти пасажів, F і VP2 стабільно експресуються в CEF, інфікованих подвійним рекомбінантним HVT. Однак FW137 не експресував сигнал антигенів F і VP2 після 15-ти пасажів, указуючи на те, що рекомбінантний HVT, який мав два гени в одному сайті був нестабільним.

Саузерн-блотинг аналіз

М: Маркер молекулярних мас, HindIII гідролізат фага лямбда

TP-24: перенос плазмиди р44-45d46SV40VP2

TP-25: перенос плазмиди р44-45d46RsvVP2

Кожного rHVT/ND/IBD пасирували п'ятнадцять разів у клітинах CEF і аналізували методом саузерн-блотингу, як описано в експерименті 4. Результати були аналогічні до результатів, отриманих в експерименті 4, що вказує на стабільність рекомбінантного вірусу навіть після 15-ти пасажів.

Результати саузерн-блотингу, наведені на Фігурі 7A показали, що 2077-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом VP2 у ДНК із FW129. 2334-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом VP2 у ДНК із FW130. Напроти, ніякої смуги не детектували з р45/46Рес F.

Фігура 7C показує, що 2744-п.о. фрагмент гібридизувався з F-зондом у ДНК із кожного подвійного рекомбінантного HVT. У р45/46 Sfil ніякої смуги не виявили.

Фігура 7B показує, що 2077-п.о. і 1228-п.о. фрагменти гібридизувалися із зондом IS44/45 у ДНК із FW129, і 2334-п.о. і 1022-п.о. фрагменти гібридизувалися із зондом IS44/45 у ДНК із FW130. 1350-п.о. фрагмент гібридизувався із зондом IS44/45 в р45/46РесF, яка не містила гена в сайті IS44/45.

Фігура 7D показує, що 2744-п.о. і 770-п.о. фрагменти гібридизувалися із IS45/46 зондом у ДНК кожного подвійного рекомбінантного HVT.

Саузерн-блот із зондом 44/45 і зондом 45/46 показав, що ген VP2 або ген F стабільно підтримується в сайті вбудовування 44/45 або 45/46, відповідно, в FW129 і FW130.

Експеримент 6: Отриманий способом ELISA титр антитіл проти NDV і IBVD у курчатах, інокульованих подвійним рекомбінантним HVT

По 3000 БУО/200 мкл/птаха кожної rHVT/ND/IBD інокульовали підшкірно в спину десяти одноденних курчат SPF (Linem, Біологічні лабораторії Японії) за допомогою шприца 20 Gauge. Через три тижні після вакцинації, збирали сироватку від вакцинованих птахів. Визначали титр антитіл до NDV за допомогою комерційного набору ELISA (IDEXX, набір ELISA для діагностики хвороби Ньюкасла). Антитіла до IBVD титрували за допомогою комерційного набору ELISA, тест-наборів для поголовної перевірки наявності антитіл до вірусу інфекційного бурситу (IDEXX Laboratory, Inc.). Курчатам із групи негативного контролю (неімунізованим) не вводили ніякої вакцини.

Фігура 8A демонструє зміну титру до NDV. Фігура 8B показує зміну титру до IBVD.

Подвійний рекомбінантний HVT із двома сайтами стабільно індукував як анти-NDV, так і

анти-IBDV титри.

Експеримент 7: Ефективність rHVT/ND/IBD проти NDV у курчатах SPF

Ефективність rHVT/ND/IBD (FW130, FW135, FW137, FW129) як ND-вакцини оцінювали, застосовуючи тест на ефективність як вакцину проти хвороби Ньюкасла.

5 3000 БУО/200 мкл/птаха rHVT/ND інокулювали підшкірно в спину десятизм одноденним курчатам SPF (Linem, Біологічні лабораторії Японії), застосовуючи шприц 20 Gauge. Через три тижні після вакцинації збирали сироватку від вакцинованих птахів і визначали титр антитіл до NDV за допомогою комерційного набору ELISA (IDEXX, Elisa-набір для діагностики хвороби Ньюкасла).

10 Курчат у групі позитивного контролю вакцинували в 14-денному віці комерційною живою вакциною NDV відповідно до рекомендації виробника. Курчатам із групи негативного контролю не вводили ніякої вакцини.

15 У віці 43 днів (на 42 день після вакцинації), курчат усіх семи груп піддавали зараженню 10^3 EID₅₀ з NDV-TexasGB, стандартний штаб для експериментального зараження в Сполучених Штатах, шляхом внутрішньом'язового введення в стегнову область. За зараженими курчатами спостерігали щодня для контролю смертності й для виявлення будь-яких симптомів хвороби Ньюкасла.

Таблиця 2

Експериментальне зараження rHVT/ND/IBD-вакцинованих курчат SPF вірулентним NDV

Вакцинація	Доза (БУО/ курча)	Число курчат	Число симптомів/сума (%)	Титр HI (ELISA) при вилупленні	Титр ELISA при зараженні
FW130	3000	10	0/10 (0)	0	0,649
FW135	3600	10	2/10(20)		0,085
FW137	3600	10	3/10(30)		0,050
FW129	3000	10	0/10(0)		0,233
FW029	4000	10	0/10(0)		0,544
Комерційна жива вакцина NDV	Згідно з етикеткою	10	0/10 (0)		1,089
Заражені контролі	N/A	10	11/12 (92)		0,089
Незаражені контролі	N/A	10	0/5 (0)		N/A

20 Як показано в таблиці 2, курчата вакциновані rHVT/ND/IBD винаходу, не демонстрували ніяких клінічних ознак, і титр ELISA у день проведення експериментального зараження був значно підвищений. Як очікували, курчата, вакциновані як FW137 (у якому дві рекомбінантні нуклеотидні послідовності вбудовані у той же сайт вбудовування), так і FW135 (у якому Вас-промотор вбудований між UL44 і UL45), продемонстрували клінічні ознаки, і титр ELISA був

25 низьким.

Експеримент 8: Ефективність rHVT/ND/IBD проти IBDV у курчатах SPF

Ефективність FW129 і FW141 (HVT/45-46 RecF/44-45 Msmv іe1VP2) як вакцини від IBD оцінювали експериментальним зараженням IBDV STC.

30 Початково, 2000 БУО rHVT/ND/IBD інокулювали в SPF із заплідненого курячого яйця на день 18 або підшкірно в спину одноденних курчат SPF. У віці трьох тижнів, вакцинованих курчат експериментально перорально заражали $10^{3,5}$ EID₅₀/птаха з IBDV STC. Через один тиждень, усіх курчат зважували й проводили розтин для вилучення фабрицієвої сумки, яку оглядали для виявлення будь-яких патологічних змін, спричинених інфекційним бурситом.

35 Захист оцінювали за двома наступними критеріями. (1) Співвідношення маси сумки до маси тушки (індекс В/В) статистично не відрізнялося від такого співвідношення для невакцинованих, незаражених курчат. (2) Не спостерігали таких вад розвитку фабрицієвої сумки, як набряклість, крововилив, жовтуватий ексудат, знебарвлення, атрофія або драглистий ексудат. Результати підсумовано в таблиці 3.

Таблиця 3

Експериментальне зараження rHVT/ND/IBD-вакцинованих курчат SPF вірулентним IBDV

Вакцинація		# Захищені/сума
Вакцина	Шлях	(%)
FW129	SQ	7/8 (88 %)
FW141	SQ	8/8 (100 %)
FW023	SQ	8/8 (100 %)
FW129	In ovo	8/10 (80 %)
FW141	In ovo	9/10 (90 %)
FW023	In ovo	9/10 (90 %)
Немає	N/A	0/4 (0 %)
Немає	N/A	5/5 (100 %)

Більше ніж 80 % усіх вакцинованих курчат були захищені від зараження штамом IBDV STC, що вказує на здатність rHVT/ND/IBD індукувати захисний імунітет у курчат проти вірулентного IBDV.

5

Експеримент 9: Дослідження із зараження IBDV на 8 тижні в MDA+ курчат

Групи:

G1: NINC (невакциновані, не заражені)

G2: NICC (невакциновані, заражені)

10

G3: FW141

G4: FW144

G5: FW 023 (позитивний контроль)

Курчата

MDA+ птахи (несучки), 16-17 птахів/група в кожній групі.

15

Три тисячі БУО вакцин інюкулювали підшкірно в спину 16-17 одноденних MDA+ курчат. У віці 8-ми тижнів вакцинованих курчат експериментально заражали перорально 10^3 TCID₅₀/птаха з IBDV STC. Через один тиждень, усіх курчат зважували й проводили розтин для видалення фабрицієвої сумки, яку оглядали для виявлення будь-яких ушкоджень, викликаних інфекційним бурситом.

20

Захист оцінювали за двома наступними критеріями. (1) Співвідношення маси сумки до маси тушки (індекс В/В). (2) Не спостерігали таких вад розвитку фабрицієвої сумки, як набряклість, крововилив, жовтуватий ексудат, знебарвлення, атрофія або драглистий ексудат. Результати підсумовані в нижченаведеній таблиці.

	n	Індекс В/В	відхід	Патологічні зміни	% захисту
NINC	16	1,00	0	0/16	-
NICC	16	0,44	1	16/16	0
FW141	16	0,94	0	2/16	88
FW144	16	0,93	1	5/16	69
FW023	17	0,98	0	3/17	82

25

Дані результати показали, що мультивалентна вакцина запропонована винаходом викликає ефективний захист in vivo проти IBDV.

Експеримент 10: Дослідження із зараження NDV на 8-му тижні в MDA+ курчат

Група

30

G1: контроль зараження

G2: FW141

G3: FW144

G4: FW145

G5: FW 029 (позитивний контроль)

35

Курчата

MDA+ птахи (несучки), 17 птахів/група в кожній групі.

Три тисячі БУО вакцин інюкулювали підшкірно в спину 17 одноденних MDA+ курчат. У віці 8-ми тижнів вакцинованих курчат експериментально заражали 10^3 EID₅₀ з NDV-TexasGB, стандартний штам для експериментального зараження в Сполучених Штатах, шляхом внутрішньом'язового введення в стегнову область. За зараженими курчатами спостерігали

40

щодня для контролю смертності й для виявлення будь-яких симптомів хвороби Ньюкасла. Результати представлені нижче.

	Імунізування	Заражені	Відхід	Симптом*	% захисту
Контроль зараження	17	13	13	0	0,0
FW141	17	15	1	0	93,3
FW144	17	15	3	1	73,3
FW145	17	13	0	0	100,0
FW029	17	16	3	0	81,3

5 * деякі симптоми NDV, що не призводять до смерті

Дані результати показали, що мультивалентна вакцина запропонована винаходом призводить до ефективного захисту in vivo проти NDV і IBDV. Захист був сильним й стабільним.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

10

1. Рекombінантний вірус пташиного герпесу, який включає щонайменше дві рекombінантні нуклеотидні послідовності, що кодують окремий пташиний антигенний пептид, які вбудовують у окремі некодуючі області вірусного геному, які вибирають із області, розташованої між UL44 і UL45, області, розташованої між UL45 і UL46, області, розташованої між US10 і SORF3, і області, розташованої між SORF3 і US2.

15

2. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за п. 1, який **відрізняється** тим, що при інфікуванні фібробластів ембріона курчати (CEF) зазначеним вірусом щонайменше дві рекombінантні нуклеотидні послідовності спільно експресуються у фібробластах ембріона курчати (CEF) після щонайменше 10 пасажів.

20

3. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що рекombінантні нуклеотидні послідовності кодують антигенні пептиди з патогенів птахів.

25

4. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що рекombінантні нуклеотидні послідовності кодують антигенні пептиди, вибрані з-поміж антигенного пептиду пташиного параміксовірусу типу 1, бажано, білка F вірусу хвороби Ньюкасла (NDV) або його імуногенного фрагмента, антигенного пептиду вірусу хвороби Гамборо, бажано білка VP2 вірусу інфекційного бурситу (IBDV) або його імуногенного фрагмента, антигенного пептиду вірусу інфекційного ларинготрахеїту (ILT), бажано білка gB або його імуногенного фрагмента, антигенного пептиду *Mycoplasma galisepticum*, бажано білка 40K або його імуногенного фрагмента, і антигенного пептиду вірусу пташиного грипу, бажано поверхневого білка гемаглютиніну (HA) або його імуногенного фрагмента.

30

5. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що включає першу рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує перший пташиний антигенний пептид, яка вбудована у некодуючу область, розташовану між UL44 і UL45, і другу рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує другий антигенний пептид, вбудовану в некодуючу область, розташовану між UL45 і UL46, між US10 і SORF3 або між SORF3 і US2.

35

6. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що включає першу пташину рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує перший антигенний пептид, яка вбудована у некодуючу область, розташовану між UL45 і UL46, і другу пташину рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує другий антигенний пептид, вбудовану в некодуючу область, розташовану між US10 і SORF3 або між SORF3 і US2.

40

7. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що рекombінантна нуклеотидна послідовність, вбудована в область, розташовану між UL45 і UL46, перебуває у тій же транскрипційній орієнтації як UL46, у протилежній транскрипційній орієнтації до UL45.

45

8. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що кожна рекombінантна нуклеотидна послідовність перебуває під контролем окремого промотору.

50

9. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за п. 8, який **відрізняється** тим, що промотори, які контролюють рекombінантні нуклеотидні послідовності, вибирають з-поміж промотору бета-актину курчати (Bac), промотору Рес, передраннього (ie)1 промотору мишачого цитомегаловірусу (Mcmv), промотору цитомегаловірусу людини (Hcmv), промотору вірусу (SV)

40 мавп і промотору саркоми Рауса (RSV) або з будь-яких їхніх фрагментів, які зберігають активність промотору.

10. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що включає вбудовану між UL45 і UL46 рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F в NDV, або його імуногенний фрагмент, і вбудовану між UL44 і UL45 рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його імуногенний фрагмент.

11. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що включає вбудовану між UL45 і UL46 рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV, або його імуногенний фрагмент, і вбудовану між UL44 і UL45 рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV або його імуногенний фрагмент.

12. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з пп. 1, який **відрізняється** тим, що включає вбудовану між UL45 і UL46 рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, або його імуногенний фрагмент, і вбудовану між SORF3 і US2 рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його імуногенний фрагмент.

13. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з пп. 1, який **відрізняється** тим, що включає в сайті вбудовування між UL45 і UL46 рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок VP2 з IBDV або його імуногенний фрагмент, і в сайті вбудовування між SORF3 і US2 рекombінантну нуклеотидну послідовність, яка кодує білок F з NDV, або його імуногенний фрагмент.

14. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за п. 1, який **відрізняється** тим, що є рекombінантним вірусом герпесу індички (rHVT).

15. Мультивалентна вакцина, яка включає ефективну імунізуючу кількість рекombінантного вірусу пташиного герпесу за будь-яким з попередніх пунктів.

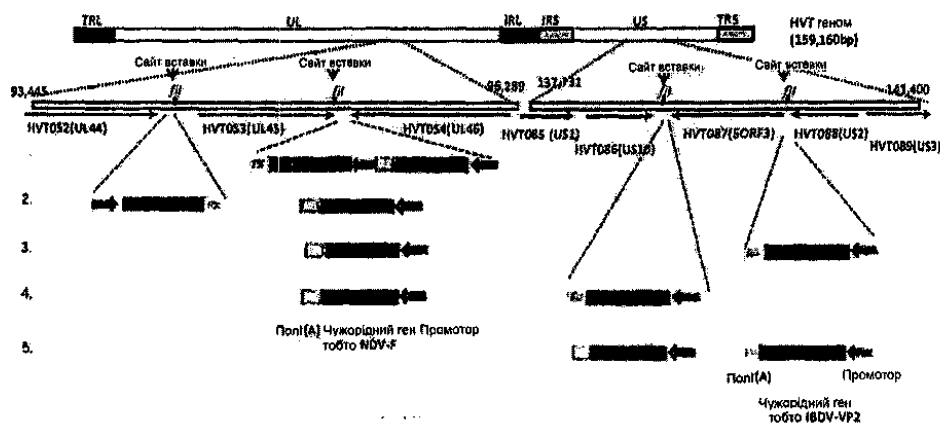
16. Рекombінантний вірус пташиного герпесу за будь-яким з пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що його застосовують для імунізації птахів, таких як свійські птахи, проти патогена.

17. Спосіб вакцинації птаха одночасно проти щонайменше двох патогенів, який передбачає введення зазначеному птахові мультивалентної вакцини за п. 15.

18. Набір для вакцинації для імунізації птахів, який включає наступні компоненти:

а) ефективну кількість вакцини за п. 15, і

б) засоби для введення зазначених компонентів зазначеним видам.



Фіг. 1

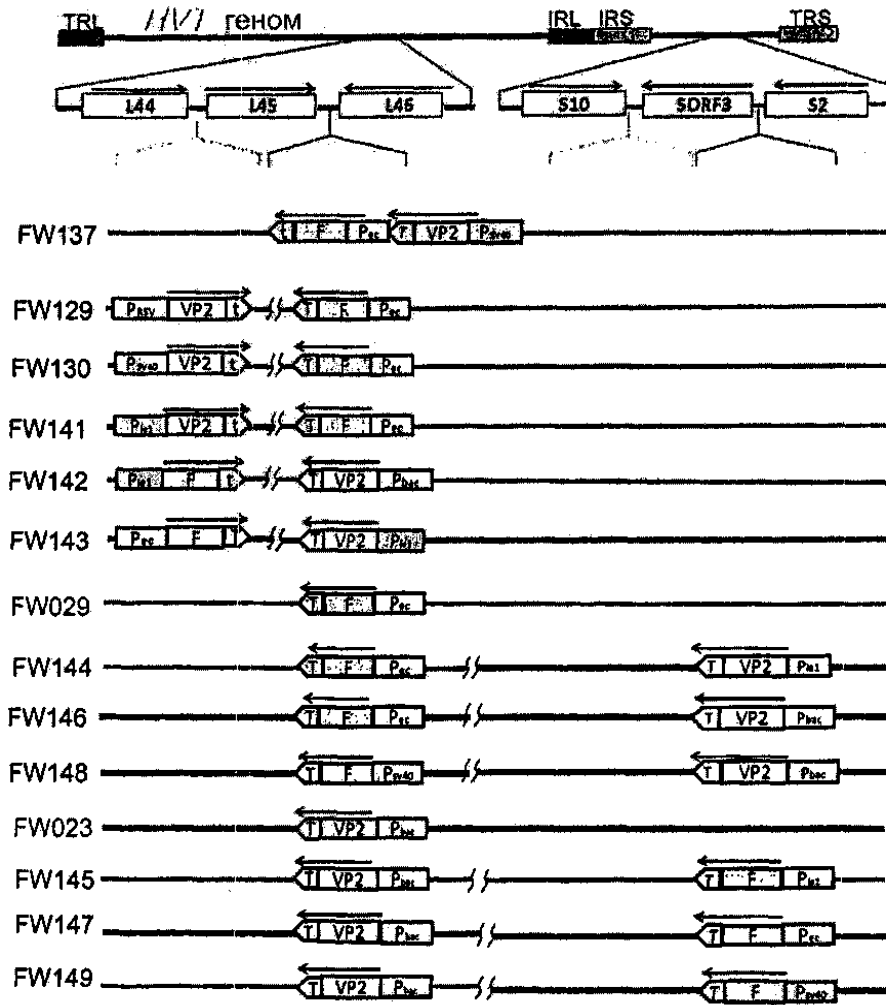
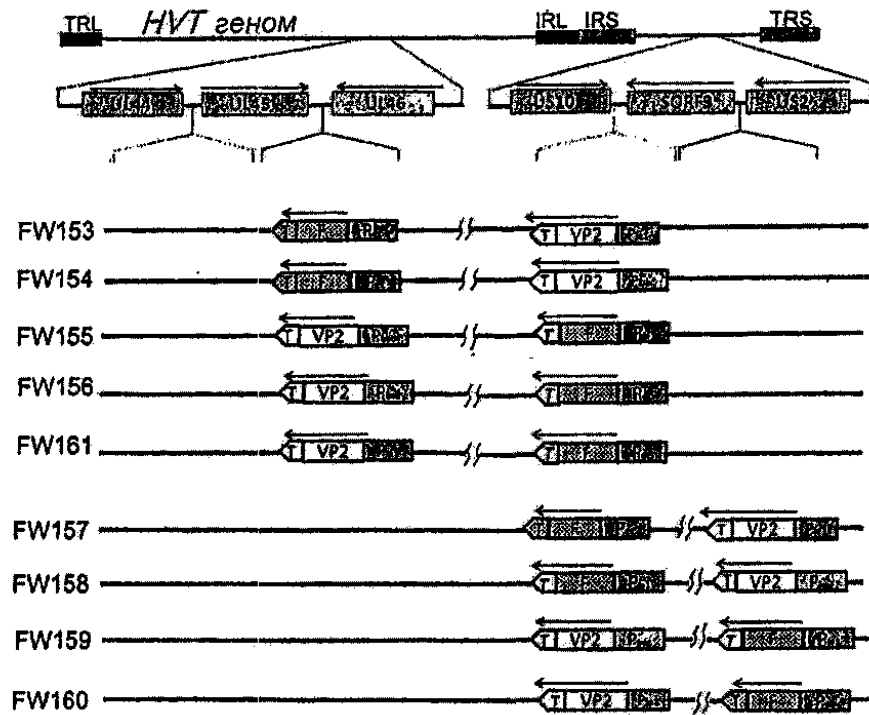
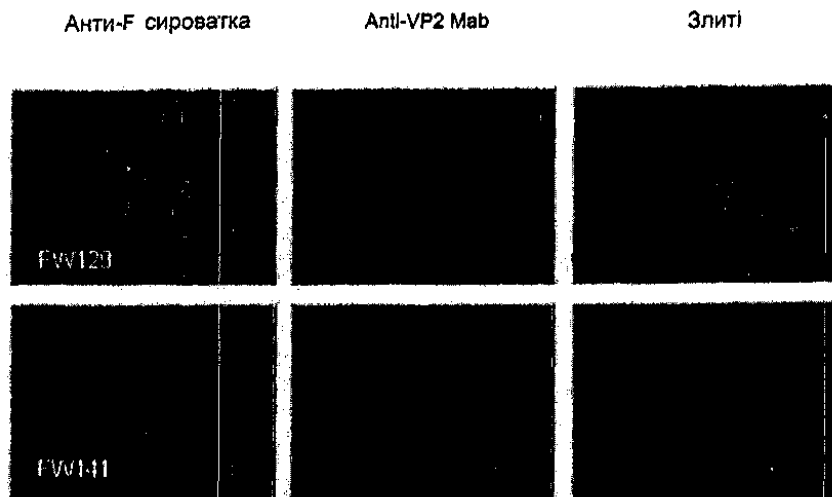


Fig. 2A



Фиг. 2В



Фиг. 3

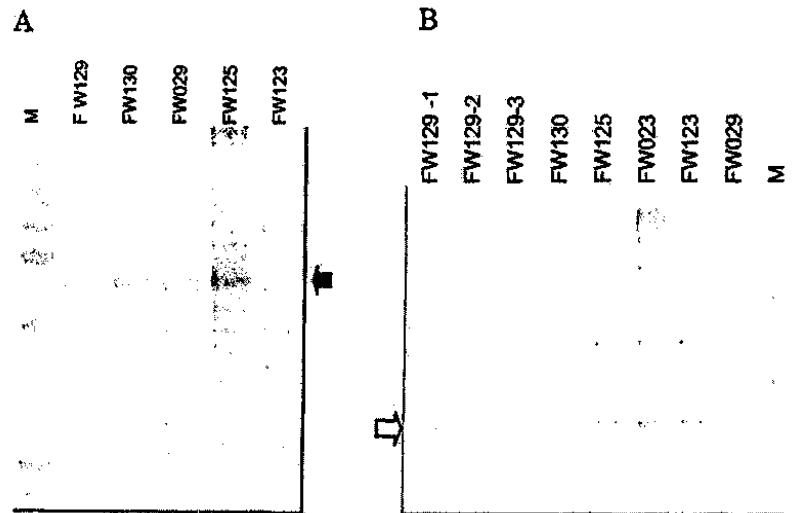
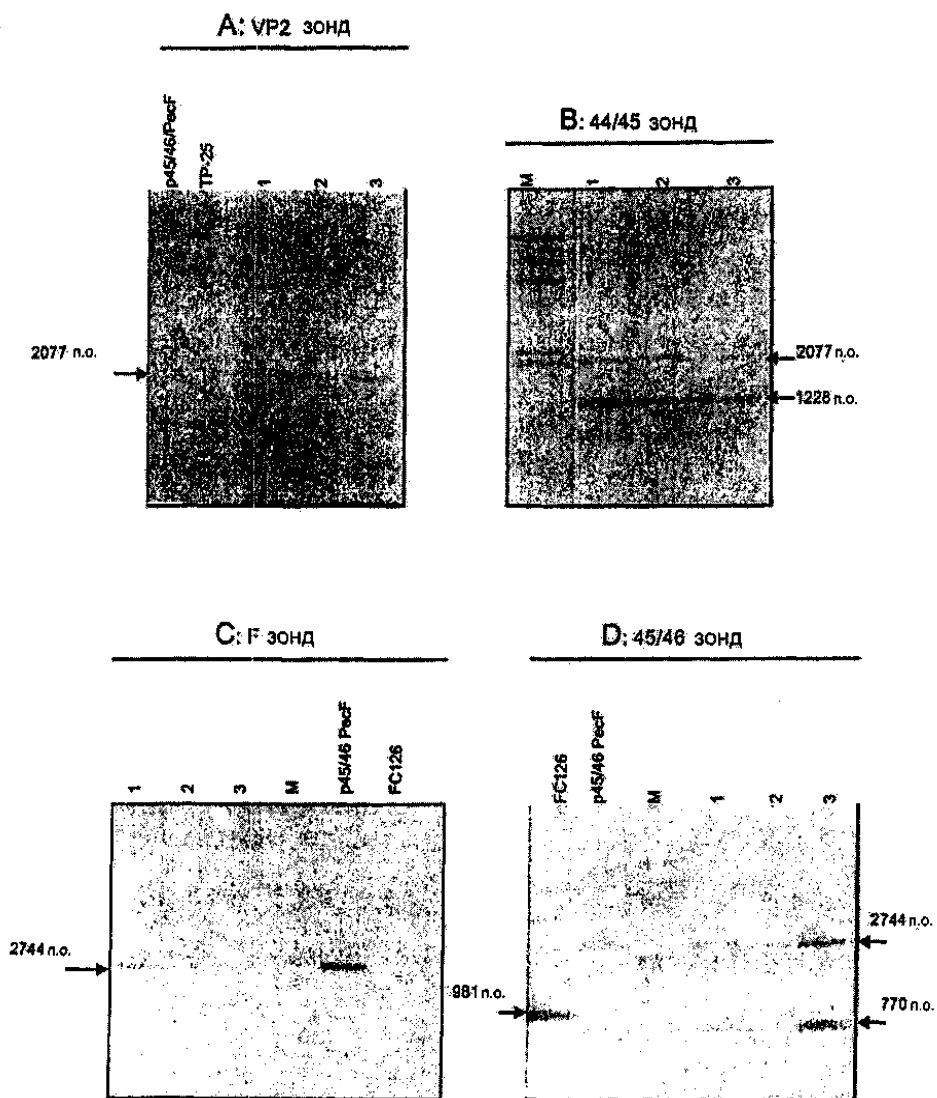
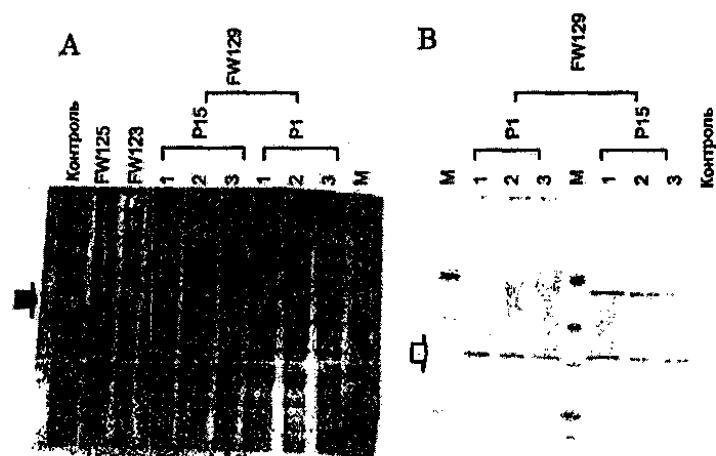


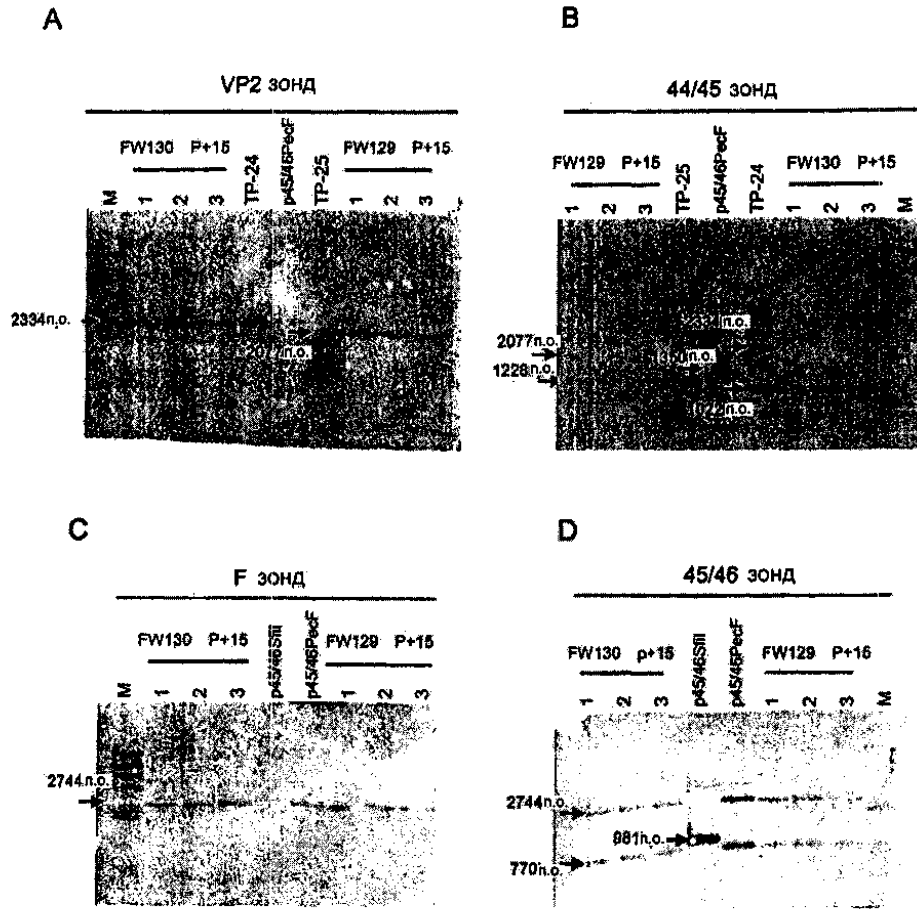
Fig. 4



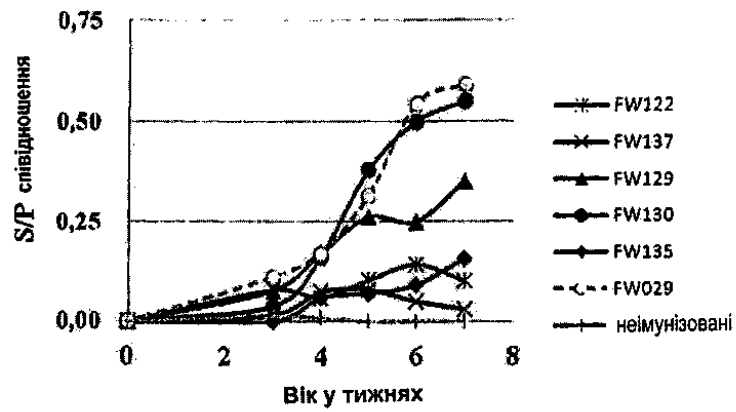
Фиг. 5



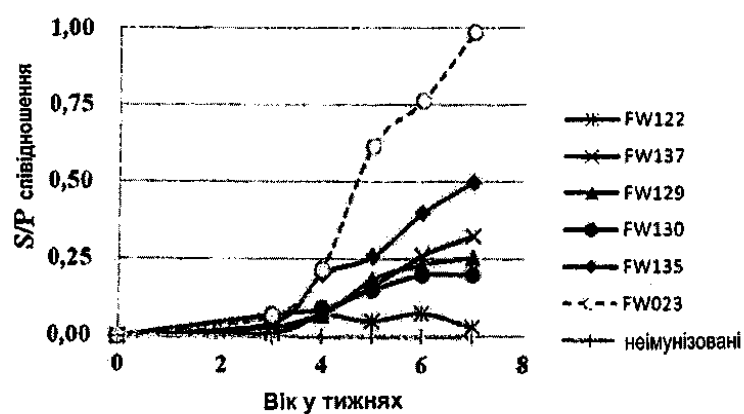
Фиг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8А



Фіг. 8В

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601