



H U 0 0 0 2 2 0 0 9 9 B

(19) Országkód

HU**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL****SZABADALMI
LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

220 099 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 00039
(22) A bejelentés napja: 1993. 07. 08.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
92202096.1 1992. 07. 09. EP
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/NL 93/00146
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/01573

(51) Int. Cl.⁷**C 12 N 15/86**
A 61 K 39/245
C 12 N 7/04

(40) A közzététel napja: 1995. 11. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 10. 29.

(72) Feltalálók:

Gielkens, Arnold Leonard Josef, Lelystad (NL)
Moormann, Robertus Jacobus Maria,
Dronten (NL)
Peeters, Bernardus Petrus Hubertus,
Lelystad (NL)
Pol, Jan Maria Antonius, Lelystad (NL)

(73) Szabadalmas:

AKZO N. V., Arnhem (NL)

(74) Képviseelő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

**Aujeszky-féle betegség és más, álveszettségvírus-mutáns
által okozott állati megbetegedések elleni vakcina****KIVONAT**

A találmány állati megbetegedések megelőzésére és/vagy terjedésének megakadályozására szolgáló vakcinákkal foglalkozik, melyek gp50 glikoproteint tartalmazó Pseudorabies vírust tartalmaznak, és a gp50 génjükben mutációt hordoznak. A találmány szerinti vakcinák Aujeszky-féle megbetegedés (álveszettség) ellen alkalmazhatók, vagy alkalmazhatók egyéb állati betegsé-

gek ellen, ha a mutáció egy, az említett állati betegségnek megfelelő antigént kódoló heterológ gént tartalmazó inszertálás. Az álveszettségvírus tartalmazhat ezenkívül legalább még egy mutációt egy másik génjében, például a gp63 vagy a gl génekben. A találmány szerinti vakcinák nem képesek vakcinázott állatokról nem vakcinázott állatokra való terjedésre.

HU 220 099 B

A találmány tárgyát feltételelesen letális mutációt hordozó álveszettségvírus (PRV), más néven Aujeszky-féle betegségvírus- (ADV-) mutánsok képezik. A PRV egy igen neurotrop herpeszvírus, amely háziállatokban és vadállatokban az Aujeszky-féle betegséget okozza [összefoglalókat lásd, Mettenleiter, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 14, 151–163 (1991); Wittman és Rziha, G. Wittman szerkesztő, *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Kluwer, Boston, 230–325 (1989); Pensaert és Kluge, Pensaert szerkesztő, *Virus infections of porcines*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 39–64 (1989)]. A sertések viszonylag ellenállóak a PRV vírus ellen, ezért a vírus természetes gazdájának tekinthetők. A természetes fertőzési kapu az orr-garat üreg. A vírus képes az orr és garat nyálkahártyasejtjeiben szaporodni, majd a perifériás idegek fertőzését követően a központi idegrendszerbe jut, ahol súlyos agyvelőgyulladás okoz, amely fiatal malacokra gyakran végzetes. Az idősebb malacok rendszerint túlélnek a fertőzést, azonban láz és tüdőgyulladás jelentkezhet náluk. Az érzékelő idegdúcok fertőzésével általában tünetmentes vírushordozás alakul ki.

Az Aujeszky-féle betegség elleni vakcinázást a fertőzött állatok pusztulása és a gyarapodás elmaradása következtében létrejött gazdasági kár mérséklése érdekében végzik. A célra legyengített élővírus- és inaktiváltvírus-alapú vakcinák állnak rendelkezésre. Általában a legyengített élővírus-vakcinák előnyösebbek, mivel könnyebben előállíthatók, és ezért az inaktivált vakcináknál kevésbé költségesek. Ezenkívül a legyengített vírus orron át adagolható, amivel megfelelőbb védetség hozható létre, mint a parenterálisan adagolt, legyengített élő vagy inaktivált vírussal végzett vakcinázással.

A sejtenyészetekken végzett sorozatos passzálások útján nyert, legyengített élő vírustörzseket tartalmazó korábbi vakcinák több hátránnyal rendelkeztek. Az ilyen vakcinák nem voltak homogének, és az elegyben ismeretlen virulenciájú és immunogenitású vírusvariánsokat is tartalmaztak. Az ilyen vakcinák ezenkívül azzal a kockázattal jártak, hogy bennük virulens revertánsok jöhetnek létre. Napjainkban a vírusok szerkezetére és szaporodására vonatkozó molekuláris szintű ismereteink megnövekedésével és kifinomult molekuláris biológiai eljárások ismeretében a szakmában járatos személy ahelyett, hogy a véletlenre hagyatkozna, képessé vált legyengített vakcinák tervezésére. A vírusgenetika- és DNS-szekvencia-vizsgálat lehetővé teszi a vírusgenomon belül azon régiók azonosítását, melyek megváltoztatása hozzájárulhat a vírus kórokozó képességének gyengüléséhez. A rekombináns DNS-eljárások alkalmazása lehetővé teszi az ilyen régiók módosítását vagy kiiktatását, ami meghatározott és stabil módosításokat tartalmazó, legyengített vírus előállításához vezet. Ezt a megközelítést először Kit és munkatársai alkalmazták [Am. J. Vet. Res., 46, 1359–1367 (1985)] a PRV legyengítésére. A PRV timidinkináz- (TK-) génjének inaktiválása sertésekben nagymértékben csökkent virulenciával rendelkező vírust eredményezett (141 458 számú európai szabadalmi leírás). A TK-génben létrehozott laesión kívül deléciókat hoztak létre glikoproteingénekben, például a gI, gIII és

gX génekben [Kit és munkatársai, Am. J. Vet. Res., 48, 780–793 (1987); Marchioli és munkatársai, 1577–1583 (1987); Quint és munkatársai, J. Gen. Virol., 68, 523–534 (1987); Moormann és munkatársai, J. Gen. Virol., 71, 1591–1595 (1990); WO-9102795 számon nyilvánosságra hozott nemzetközi szabadalmi bejelentés], ami a vírus virulenciájának további csökkenéséhez vezetett, valamint ahhoz, hogy szerológiai módszerrel meg lehessen különböztetni a vakcinázott állatokat a fertőzött állatoktól [Platt és munkatársai, Vet. Microbiol., 11, 25–40 (1986); Van Oirschot és munkatársai, J. Gen. Virol., 67, 1179–1182 (1986); Van Oirschot és munkatársai, J. Virol. Meth., 22, 191–206 (1988); Eliot és munkatársai, Vet. Rec., 128, 91–94 (1989)].

A vakcinafejlesztés új megközelítési módja idegen kórokozókól származó gének expresszálása élő, legyengített vírusvakcinatörzsek hordozóként (vírus-vakcinavektorokként) való alkalmazásával. Az antigének élő vektorvírus által történő expresszálása utánozza a természetes fertőzést követően történő expresszálást és mind a humorális, mind a celluláris immunválaszt stimulálhatja. Vakcinavektorok olyan betegségek ellen alkalmazhatók immunizálásra, amelyek ellen jelenleg nem áll rendelkezésre megfelelő vakcina, illetve a vakcina nem állítható elő biztonságosan vagy könnyen.

A vakcinavektorok fejlesztése főként a himlővírusra összpontosult [Moss és Flexner, Ann. Rev. Immunol., 5, 305–324 (1987); Piccini és Paoletti, Adv. Virus Res., 34, 43–64 (1988)]. A himlővírust kiterjedten alkalmazták emberben a himlő felszámolására, és az igen hatásosnak és viszonylag biztonságosnak bizonyult. A széles gazdaszervezet-spektrum és az a képessége, hogy nagy mennyiségű idegen DNS-t tud befogadni, a himlővírust tették elsősorban vakcinavektorokként vizsgálendő vírussá [Hruby, Clin. Microbiol. Rev., 3, 153–170 (1990); Tartaglia és munkatársai, Crit. Rev. Immunol., 10, 13 (1990)]. A himlővíruson kívül más poxvírusokat, például a raccoonpoxvírust, avipoxvírusokat, capripoxvírust, valamint a suipoxvírust fejlesztették vakcinavektorokká [Taylor és munkatársai, Vaccine, 6, 504–508 (1988); Lodmell és munkatársai, J. Virol., 65, 3400–3405 (1991); Letellier és munkatársai, Arch. Virol., 118, 43–56 (1991)].

Egyéb vakcinavektorokként alkalmazható vírusok az adenovírusok [Berkner, BioTechniques, 6, 6003–6020 (1988)] és herpeszvírusok [Shih és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 5867–5870 (1984); Thomsen és munkatársai, Gene, 57, 261–265 (1987); Lowe és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 3896–3900 (1987); Cole és munkatársai, J. Virol., 64, 4930–4938 (1990); van Zijl és munkatársai, J. Virol., 65, 2761–2765 (1991); Kit és munkatársai, Vaccine, 9, 564–572 (1991)]. Az a tény, hogy biztonságos, hatékony herpeszvírus-vakcinák állnak rendelkezésre, valamint hogy ezek nagy mennyiségű idegen DNS befogadására képesek, ezeket a vírusokat vakcinavektorok kifejlesztésére alkalmasnak látszó jelölteké teszi. Igen ígéretes a PRV vakcinavektorokként való alkalmazása. A PRV alaposan jellemzett, és célzott deletálással biztonságos és hatékony élő vakcinákat fejlesztettek

ki belőle (lásd fent). A vírus széles gazdaszervezet-spektrummal rendelkezik, de emberre ártalmatlan. A PRV hatékony hordozóvakcinaként való alkalmazását nemrégiben van Zijl és munkatársai írták le [J. Virol., 65, 2761–2765 (1991); WO–9100352 számon nyilvánosságra hozott nemzetközi szabadalmi bejelentés], akik kimutatták, hogy a sertéskolera-vírus E1 burokglikoproteinjét expresszáló PRV-rekombinánsok mind álveszettség, mind sertéskolera (klasszikus sertésláz) ellen védettséget hoztak létre malacokban.

A vakcinák egyik legfontosabb tulajdonsága a biztonságosságuk. Mivel azok a pontos molekuláris változások, amelyek a szokásos módon gyengített élő vakcinák megváltozott fenotípusát eredményezik, általában nem ismertek, mindig fennáll egy kis esélye annak, hogy azok virulenciájukat visszanyerik. Ez a probléma meghatározott és stabil deléciókat hordozó rekombináns vakcinák alkalmazásával küszöbölhető ki. Stabílan legyengített vakcinák előállítása azonban néha igen bonyolult, ha éppen nem lehetetlen. Ebben az esetben előlt vakcinák, illetve biztonságos vakcinavektorok alkalmazására kell hagyatkozni. Megfelelően előállított és vizsgált, élő, gyengített deléciós vakcinák és vakcinavektorok alkalmazása normális immunválaszra képes gazdaszervezetekben általában biztonságos. Legyen-gült immunrendszerrel rendelkező gazdaszervezetekben azonban súlyos komplikációk fordulhatnak elő. Mivel az élő gyengített vakcinák és vakcinavektorok szaporodásra képesek, kiszabadulhatnak a környezetbe, ahol a legyengült immunrendszerrel rendelkező gazdaszervezetre veszélyt jelenthetnek. Ezenkívül a célzott fajban biztonságosan alkalmazható vakcina egyéb fajokra még virulens lehet.

Vakcinavektorokba építhető gének gyakran igen immunogén strukturális virionproteineket kódolnak. Ezek a proteinek lehetnek vírus eredetű glikoproteinek, fúziós proteinek, valamint hemagglutinin-neuraminidázok [Hruby, Clin. Microbiol. Rev., 3, 153–170 (1990)]. Az említett proteinek gyakran olyan vírus-sejt kölcsönhatásokban játszanak szerepet, amelyek meghatározóak a vírus-gazdaszervezet és/vagy sejt tropizmusában. Az ilyen géneknek a hordozóvírusban való expresszálása elméletileg megváltoztathatja annak biológiai sajátosságait, úgymint annak kórokozó képességét, szövettropizmusát, valamint gazdaszervezet-fajlagosságát. Ezenkívül a megváltozott biológiai sajátságok homológ rekombináció révén átkerülhetnek a legyengített vektorvírusról egy virulens vad típusú vírusra.

A fent említett szempontok olyan önkorlátozó élő vakcinák és vakcinavektorok kifejlesztése mellett szólnak, amelyeket a vakcinázott gazdaszervezet nem terjeszt. Ideális esetben egy ilyen vakcinánál nem fertőző utódok jönnek létre, és nem képes a megfelelő vad típusú vírussal való rekombináció révén fertőző vírus létrehozására. Az alábbiakban ismertetett találmányunk a fenti kívánalmaknak megfelel.

A találmány tárgyát olyan feltételeken letális álveszettségvírus- (PRV-) mutánsok képezik, amelyek Aujeszky-féle betegség elleni vakcinázásra, és biztonságos vakcinavektorokként alkalmazhatók. A találmány

szerinti törzsek nem képesek a vírus fertőzőképességéhez nélkülözhetetlen vírusburokprotein, a gp50 expresszálására. A gp50 gént vagy egy idegen oligonukleotid inszertálásával vagy deletálással, vagy mindkettővel (helyettesítéssel) inaktívtuk. Pontosabban, a gp50 gént egy, mindhárom olvasási keretben transzlációs befejezőkodonokat tartalmazó szintetikus oligonukleotid inszertálásával, illetve a PRV-genom egy olyan részének deletálásával inaktívtuk, amely a gp50, valamint a gp63 gének egy részét tartalmazza. A mutáns vírusokat egy olyan kiegészítő sejtvonalon tenyésztettük, amely expresszálja a gp50 vírusgént. A fenti sejtvonalon előállított utódvírusok fenotípusosan kiegészítettek, azaz a kiegészítő sejtvonalt szolgáltatja a szükséges gp50-et. Az ilyen fenotípusosan kiegészített mutáns virionok mind in vitro, mind in vivo képesek sejtek fertőzésére, valamint sejtről sejtre való közvetlen átjutás révén szaporodni és terjedni. A fertőzött sejtekből kiszabaduló utódvirionok azonban, mivel nem rendelkeznek gp50-nel, nem fertőzőképesek. Mivel nem képesek új fertőzési ciklus megindítására, ezek a vírusok nem terjedhetnek a vakcinázott állatokról nem vakcinázottakra. Ez a korlátozás az ezen vírusokon alapuló (hordozó) vakcinákat igen biztonságossá teszi.

Következtetésképp, a találmány tárgyát gp50 mutáns álveszettségvírusok alkalmazása képezi állati megbetegedések ellen alkalmazható vakcinák előállítására, az Aujeszky-féle betegség elleni vakcina előállítására, vagy az említett mutánsokba egyéb szóba jövő kórokozókból származó antigéneket, illetve antigének részét kódoló nukleotidszekvenciák beépítése révén egyéb állati megbetegedések elleni vektorvakcinák előállítására.

A találmány kiterjed állati betegség terjedésének megakadályozására szolgáló vakcinákra, melyek olyan álveszettségvírust tartalmaznak, amelyek glikoprotein gp50-et tartalmaznak, és a gp50 génjükben mutációt hordoznak. A vakcina szolgálhat Aujeszky-féle betegség elleni védettség létrehozására, ebben az esetben a mutáció deletálás, vagy szolgálhat egyéb állati betegségek elleni védettség kialakítására, ebben az esetben a mutáció az említett, más állati betegséget kiváltó egyéb kórokozókból származó antigént vagy egy antigén részét kódoló heterológ nukleotidszekvenciát tartalmazó inszertálás. Az álveszettségvírus genomjában tartalmazhat egyéb mutációkat virulenciájának módosítása vagy egyéb proteinek expresszálása céljából, például deléciókat és/vagy inszerciókat a gp63 génben, a gI, gIII, gX, 11K, a timidinkináz (TK), a ribonukleotid-reduktáz (RR), proteinkináz, illetve a 28K génekben, előnyösen a gI és a gp63 génekben.

A találmány tárgyát a gp50 génben mutációt hordozó PRV-mutánsok képezik, melyeket az R122, R332, D560 és a D1200 törzsek példának (lásd 1. ábra). Az R122 és az R332 törzsek nem képesek működőképessé gp50 expresszálására, míg a D560, és a D1200 törzsek nem képesek működőképessé gp50, valamint gp63 expresszálására. Mivel a gp50 nélkülözhetetlen a vírus penetrálásához, ezeket a mutánsokat egy gp50-et expresszáló kiegészítő sejtvonalon tenyésztjük. Bár mind-egyik törzs képes egy teljes szaporodási ciklust végezni

nem kiegészítő sejtekben, az ezekből a sejtekből kiszabaduló utódvirionok nem fertőzőképesek, mivel nem tartalmaznak gp50-et. Az a megfigyelés, hogy a gp50 mutánsok nem kiegészítő sejtvonalon plakkokat hoznak létre, arra utal, hogy a vírus képes a fertőzött sejtről nem fertőzött sejtre való átjutásra.

Egy, az 5'-TAGGCTAGAATTCTAGCCTA-3' (1. szekvencia) szekvenciával rendelkező szintetikus oligonukleotidot, amely egy EcoRI restrikciós felismerőhelyet (GAATTC), valamint mindhárom olvasási keretben translációs befejezőkodonokat tartalmaz, inszertáltunk a pN3HB plazmidba a gp50 gén két különböző helyére Wind és munkatársai leírása szerint [J. Virol., 64, 4691–4696 (1990)] (lásd 1. ábra), így kaptuk az R122 és R332 PRV törzseket. A pN3HB plazmid a pBR322 plazmidba klónozott HindIII fragmensből áll [van Zijl és munkatársai, J. Virol., 65, 2761–2765 (1988)]. Az így kapott plazmidot, amelybe az oligonukleotidot a gp50 gén 366-367., illetve a 996-997. nukleotidjai közé inszertáltuk, R1-nek, illetve 322-nek neveztük. A Rice PRV törzs gp50 szekvencia szerinti nukleotidszekvencia-számozást használtuk [Petrovskis és munkatársai, J. Virol., 59, 216–223 (1986), 2. ábra]. Megjegyzendő azonban, hogy a NIA-3 PRV törzs gp50 génjének nukleotidszekvenciája a 364. pozícióban eltér a Rice törzs szekvenciájától (G helyett A), ami a NIA-3 törzs gp50 génjében egy BglII restrikciós hasítási helyet eredményez. A vírusgenomok rekonstrukcióját átfedő rekombinációs eljárással végeztük [van Zijl és munkatársai, J. Virol., 65, 2761–2765 (1988)] a mutagenizált fragmens (az R1, illetve a 322), valamint a c-179, a c-27 és a c-443 kozmidokból származó, együttesen a teljes vírusgenomot tartalmazó három, átfedő szubgenomiális vad típusú PRV-fragmens kombinációjának felhasználásával. Az átfedő rekombinációt egy olyan kiegészítő sejtvonalban (G5 sejtvonal) végeztük, amely folyamatosan expresszál gp50-et [Peeters és munkatársai, J. Virol., 66, 894–905 (1992)]. Az így kapott vírustörzseket R122-nek, illetve R332-nek neveztük.

A D560 törzs előállításához a 322. jelzésű plazmidot (lásd fent) és a pN3HB plazmid egy másik, 149. jelzésű származékát használtuk [de Wind és munkatársai, J. Virol., 64, 4691–4696 (1990)], amelyben az oligonukleotidot a gp63 génbe a 352-353. nukleotidok [a számozást lásd, Petrovskis és munkatársai, J. Virol., 60, 185–193 (1986), 5. ábra] közé inszertáltuk (lásd 1. ábra). A 149. jelzésű plazmidban a BglII-EcoRI fragmensnek a 322. jelzésű plazmid BglII-EcoRI fragmensével való helyettesítésével egy új plazmidot kaptunk, amelyben a gp50 gén 966. pozíciója és a gp63 gén 353. pozíciója közti nukleotidszekvenciát az 1. szekvenciával (azaz a mutagén oligonukleotid-szekvenciával) helyettesítettük. Ezt a plazmidot használtuk az átfedő vad típusú fragmensekkel együtt G5 sejtekben átfedő rekombinációs eljárással a vírus regenerálására. Az így kapott vírust D560-nak neveztük.

A D1200 törzs előállításához a 149. plazmidot BglII és EcoRI restrikciós enzimekkel emésztettük, és az így nyert nagyobbik fragmenst, miután a végeket

E. coli DNS-polimeráz I. Klenow-fragmensével kezeltük, T4 DNS-ligázzal körkörösé alakítottuk. Az így kapott plazmidban a gp50 gén 336. pozíciója és a gp63 gén 353. pozíciója közti nukleotidszekvenciát az AATTCTAGCCTA (2. szekvencia; vagyis a mutagén oligonukleotid-maradék) szekvenciával helyettesítettük. Ezt a plazmidot használtuk az átfedő vad típusú fragmensekkel együtt G5 sejtekben, átfedő rekombinációs eljárással a vírus regenerálására. Az így kapott vírust D1200 jelzéssel láttuk el.

A gp50 génben mutációt hordozó R122 és R332 mutánsok, valamint a gp50 és a gp63 génekben mutációt hordozó D560 és D1200 mutánsok képesek nem kiegészítő SK-6 sejteken plakkok létrehozására. Az SK-6 sejteken az R122 és R332 törzsek által létrehozott plakkok hasonló méretűek, mint a vad típusú NIA-3 szülői törzs által létrehozott plakkok. Az SK-6 sejteken a D560 és D1200 törzsek által létrehozott plakkok kisebb méretűek, ami a gp63 génnek a PRV replikációs ciklusában játszott szerepére utal.

Bár a sejtről sejtre való terjedés független a gp50-től, a gp50 mutáns vírusoktól nem vártuk, hogy jelentős mértékben szaporodjanak élő állatokban. A vírusok virulenciája általában a fertőzés elsődleges helyén való szaporodásnak és az utódvirionok a test egyéb részeire való szóródásának, valamint sokszorosan ismétlődő fertőzési körök révén létrejövő kiterjedt szaporodásának eredménye. Mivel a gp50 mutánsok csak az elsődleges fertőzés helyén képesek szaporodni, azt vártuk, hogy ezek a mutánsok nem lesznek virulensek. Ezenkívül kétséges volt, hogy ezek a mutánsok rendelkeznek-e immunogén hatással, mivel a gp50 önmagában nagymértékben immunogén hatású, amit az a megfigyelés bizonyított, hogy a gp50 képes malacokban védelemet létrehozó immunválasz kiváltására [Marchioli és munkatársai, J. Virol., 61, 3977–3982 (1987); Mukamoto és munkatársai, Vet. Microbiol., 29, 109–121 (1991); Riviere és munkatársai, J. Virol., 66, 3424–3434 (1992)]. A gp50 inaktiválása tehát nagymértékben csökkentheti a gp50, illetve gp50+gp63 mutánsok immunogén hatását. Az is váratlan felismerés volt, hogy a mutáns vírusok képesek a központi idegrendszer elérésére, mivel ez feltételezi a vírusoknak a fertőzött szövetről perifériás idegekre való átjutását, melyet a központi idegrendszerbe való szállítás követ. Amennyiben a vírus szinapszison keresztül való átjutásában szerepet játszik a szinapszist követő neuronok fertőző utódvírusokkal történő újrafertőzése [Lycke és munkatársai, J. Gen. Virol., 65, (1984); Card és munkatársai, J. Neurosci., 10, 1974–1994 (1990)], a mutáns vírusok központi idegrendszerbe való szállítását a szinapszisok meggátolhatják. Ez kizárhatja azt, hogy a vírus a központi idegrendszerbe jusson, és ily módon megakadályozhatja, hogy pusztító hatását kifejtsen az agyban.

Annak megállapítása céljából, hogy a gp50 mutáns vírusok képesek-e állati szövetekben szóródni, immunhisztokémiai módszerekkel sertésornyálkahártya-explantátumokban vizsgáltuk az R122 és R332 gp50 mutánsok, valamint a D560 és D1200 gp50+gp63 mutánsok replikációját. Ezenkívül egereket fertőztünk bőr

alá, illetve hasüregbe, annak megállapítására, hogy a vírusok in vivo szaporodnak-e és szóródnak-e. Eredményeink azt mutatták, hogy mindegyik mutáns képes sertés-ornyálkahártyában szaporodni.

Meglepetésünkre, a gp50 mutánsok és a gp50+gp63 mutánsok hasüregbe, illetve bőr alá való beoltást követően az egerek pusztulását okozták. Az R122 törzs virulenciája (a fertőzött állatok pusztulásáig eltelt idő átlagában kifejezve) csak mérsékelten csökkent a vad típusú NIA-3 törzssel összehasonlítva. A D560 és a D1200 törzsek virulenciája azonban sokkal nagyobb mértékben csökkent, ami a gp63-nak az egérre kifejtett virulenciában játszott szerepére utal. A fertőzött állatok pusztulását követő vizsgálat azt mutatta, hogy a mutánsok képesek voltak az agyban szaporodni. A hasüregbe oltott állatok szerveinek immunhisztokémiai vizsgálata szerint a vírus előszeretettel szaporodott a perifériás idegekben. Amikor az R122 törzset nem kiegészítő sejteken tenyésztettük, tehát nem rendelkezett gp50-nel, a hasüregen keresztül történő fertőzés sikertelen volt. Ez a megfigyelés arra utal, hogy gp50 szükséges az elsődleges fertőzéshez. Az a megfigyelés, hogy a fenotípusosan kiegészített PRV gII mutáns, (amely ugyancsak nem fertőzőképes utódokat hoz létre, azonban nem képes nem kiegészítő sejtvonalakon plakkokat képezni), egerekre teljesen ártalmatlan, arra utal, hogy az elsődleges fertőzést követően a sikeres vírusterjedés a sejtről sejtre való átviteltől függ. Az a tény, hogy a gp50, illetve a gp50+gp63 mutánsokkal fertőzött állatok egyikéből sem sikerült fertőző vírust izolálni, azt mutatja, hogy az élő állatokban ezen mutánsok által létrehozott utódvirionok nem fertőzőképesek.

Együttesen ezek az eredmények azt mutatják, hogy a gp50 szükséges az elsődleges fertőzéshez, azonban nem szükséges az azt követő replikációhoz és a vírus átviteléhez, ami arra utal, hogy in vivo a vírus terjedésének fő mechanizmusa a közvetlen sejtről sejtre való átvitel. Ezek az eredmények azt jelentik továbbá, hogy a vírus szinapszison keresztül való átjutása független a gp50-től, és nem a szinapszist követő neuronsejten kívüli virionokkal történő de novo fertőzésének következménye. Az a megfigyelés, hogy a gp50, illetve a gp50+gp63 mutánsokkal fertőzött állatok egyikéből sem sikerült fertőző vírust izolálni, azt mutatja, hogy élő állatokban a gp50 mutánsok által létrehozott utódvirionok nem fertőzőképesek. Ezen mutánsok szaporodása tehát a fertőzött/vaksinázott állatra korlátozódik. Egy gp50 mutáns alkalmazása Aujeszky-féle betegség elleni vakcina alapjául, illetve heterológ gének expresszáására szolgáló rekombináns hordozóvírusként rendkívül biztonságos vakcina előállítását teszi lehetővé, amely csak a vakcinázott állatban szaporodik és nem terjed más állatokra, tehát más fajokra sem. Továbbá, amennyiben a hordozóvírusban a heterológ gént a gp50 gén helyére inszertáljuk, a vad típusú vírussal történő rekombináció minden esetben nem fertőző rekombinánsok keletkezéséhez fog vezetni.

A gp50 mutáns R122 jelzésű törzssel vakcinázott malacokban, amikor azokat a virulens vad típusú NIA-3 törzssel fertőztük, teljes védelem létrejöttét tapasztaltuk az Aujeszky-féle betegség klinikai tüneteivel szemben. A gp50+gp63 mutáns D560 és D1200 tör-

zsekkel vakcinázott malacokban rövid ideig tartó láz és gyarapodáselmaradás lépett fel, azonban a NIA-3-fertőzést követően nem jelentkeztek idegrendszeri tünetek. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a csupán sejtről sejtre való terjedéssel szóródni képes PRV-mutánsok még nagymértékben immunogén hatásúak. Ezenkívül ezek az eredmények mutatták ki először, hogy a gp50 expresszáása, amely a leginkább immunogén hatású PRV-proteinek egyike (lásd fent), nem szükséges malacokban az Aujeszky-féle betegség elleni hatékony védelem létrehozásához. Ez az eredmény váratlanul ért bennünket.

A találmány szerinti álveszettségvírus- (Aujeszky-féle betegség) fertőzések megelőzésére vagy terjedésének megakadályozására szolgáló vakcina aktív összetevőként olyan PRV-t tartalmaz, amely a vírusburokban gp50-et tartalmaz, és a fent ismertetettek szerint működésképtelenné tett gp50 génnel rendelkezik. Tartalmaz továbbá olyan szokásos összetevőket, mint például megfelelő hordozóanyagok, tetszés szerinti stabilizátorok, adjuvánsok, oldószeresek, emulgeálóanyagok stb. A vakcina különböző módokon adagolható, például bőrbe, bőr alá, izomba, vénába, illetve orron át. Az orron át történő adagolás előnyös. A vakcina multivalens vakcina előállítására céljából tartalmazhat egyéb, más betegségekkel kapcsolatos immunogén hatású anyagokat is.

Abban az esetben, ha a gp50 PRV-mutánsot vírusvektorok alkalmazásával, az a gp50 gént tartalmazó mutáción kívül, előnyösen a gp50 génbe inszertálva, egyéb kórokozókól származó genetikai információt is tartalmaz, például vírusokból, mint például sertéskolera- (sertésláz-) vírus, parvovírus, a fertőző gyomor-bél hurut vírusa, fertőző sertésvetélés és légzőszervi tünetegyüttes (PEARS vagy a titokzatos sertésmegbetegedés MSD, PRRS, illetve SIRS), sertéslégzőszervi megbetegedést okozó koronavírus (PRCV), endémiás sertéshasmenés-vírus és influenzavírus, valamint baktériumokból, mint például *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Treponema hyodysenteria*, *Escherichia coli*, valamint *Leptospira*, *Mycoplasma* fajokból, mint például *M. hyopneumoniae* és *M. lyorhinis*. Kórokozókól származó nukleinsavszekvenciáknak PRV szubgenomális fragmenseibe való klónozására, és ezt követően ezeknek a PRV genomjába való beépítésére szolgáló eljárások ismertek a gyakorlatban. Ennek egy példáját ismertetik van Zijl és munkatársai [J. Virol., 62, 2191-2195 (1988)].

Míg a gp50 PRV-mutánsok képesek sejtről sejtre való terjedésre, az 1. típusú herpes simplex vírus (HSV-1), valamint az 1. típusú szarvasmarha-herpeszvírus (BHV-1) megfelelő homológ géneiben létrejött mutációk olyan vírusmutánsokat eredményeznek, amelyek nem képesek sejtről sejtre való terjedésre [Ligas és Johnson, J. Virol., 62, 1486-1494 (1988); Fehler és munkatársai, J. Virol., 66, 831-839 (1992)]. Ez azt jelenti, hogy egyrészt a PRV gp50 génjének működése, másrészt a HSV-1 gD génjének, illetve a BHV-1 gIV génjének működése eltér. Rekombináns DNS-eljárások alkalmazásával fennáll a lehetősége a HSV-1, a BHV-1, va-

lamint egyéb herpeszvírusok módosításának oly módon, hogy azok hasonlóképpen a PRV gp50 mutánsokhoz képesek legyenek sejtről sejtre való terjedésre anélkül, hogy fertőzőképes utódok keletkezzenek. Ez az eljárás számos biztonságosan alkalmazható herpeszvírus- (hor-
5 dozó-) vakcina előállításához vezethet, melyek sok állati és emberi megbetegedés eradikációját és terjedésének megakadályozását tehetik lehetővé.

Az ábrák rövid leírása

1. *ábra*: A PRV-genom egy részének fizikai térképe. A nyilak a transzláció korai befejezését jelző kodonokat jelzik, melyeket linker inszertálásával végzett mutagenézissel hoztunk létre a pN3HB plazmid, valamint az R122, az R332, az M102, és az M105 jelzésű megfelelő vírusmutánsok gp50 génjében és a gp63 génjében [Peeters és munkatársai, J. Virol., 66, 894–905 (1992); de Wind és munkatársai, J. Virol., 64, 4691–4696 (1990)]. A vízszintes irányú csíkok a D560 és D1200 mutánsokban található deléciók helyét és kiterjedését mutatják. A felső vonal a PRV-genomnak a gp50-et folyamatosan expresszáló G5 sejtekben található BstXI-StuI fragmensét mutatja [Peeters és munkatársai, J. Virol., 66, 894–905 (1992)].

2. *ábra*: A sertéskolera-vírus E1 génjét, valamint a humán cytomegalovírus erősítő/promoter génjét tartalmazó pEVhis13HCVE1 plazmid, melyet egy heterológ gént tartalmazó gp50 mutáns PRV előállítására használtunk (lásd 6. példa).

3. *ábra*: A PRV-genom egy részében, a deletált gp50 gén helyén, a sertéskolera-vírus E1 génjét, valamint a humán cytomegalovírus erősítő/promoter génjét tartalmazó pBP53E1 plazmid, melyet egy heterológ gént tartalmazó gp50 mutáns PRV előállítására használtunk (lásd 6. példa).

A találmány szerinti megoldást a következő példák szemléltetik.

1. példa

A NIA-3 PRV törzs gp50 génjének klónozása és gp50-et expresszáló sejtvonalak előállítása

Mindegyik alkalmazott rekombináns DNS-eljárást ismert technikák szerint végeztük [Maniatis és munkatársai, Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (1982)]. A pEVhis14 plazmidot a pSV2his plazmidból [Hartman és Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8047–8051 (1988)] állítottuk elő az EcoRI-BamHI fragmensnek egy olyan fragmensevel való helyettesítésével, amelyben a humán cytomegalovírus (hCMV) közvetlen korai erősítő/promoter szekvenciáját [Bernard és munkatársai, EMBO J., 6, 133–138 (1987)] egy, mindhárom olvasási keretben befejezést jelző kodont és poliadenilációs helyet tartalmazó szintetikus oligonukleotid követ. A pEVhis10 plazmidot a pEVhis14 plazmidból állítottuk elő a hCMV erősítő/promoter szekvenciáját tartalmazó BamHI fragmens deletálásával. A PRV gp50 génjét egy (gp50 promotert nem tartalmazó) BstXI-StuI fragmenseként klónoztuk a pEVhis14 plazmidba, a hCMV promotertől 3'-irányban található EcoRV hasítási helyre, így kap-

tuk a pEVhis14gp50 plazmidot. Az átfedő szubgenomiális PRV-fragmenseket tartalmazó c-179, c-27 és c-443 kozmidok, valamint egy pBR322-származék HindIII hasítási helyén a PRV HindIII-B fragmensét tartalmazó pN3HB plazmid előállítása és jellemzése ismeretes [van Zijl és munkatársai, J. Virol., 65, 2761–2765 (1988)]. Leírták a gp50-expresszálas inaktiválását linker inszertálásával a pN3HB gp50 génjének két különböző helyére (R1 és 322 inszertálások) [de Wind és munkatársai, J. Virol., 64, 4691–4696 (1990)].

SK-6 sejteket transzfektáltunk elektroporációs eljárással a pEVhis14gp50 plazmiddal. Az SK-6 sejteket tripszines kezeléssel összegyűjtöttük, egyszer foszfát-pufferes fiziológiás sóoldattal (PBS) szobahőmérsékleten mostuk, majd 2×10^7 sejt/ml töménységben jég-hideg PBS-ben szuszpendáltuk. Tíz mikrogramm pEVhis14gp50 plazmidot adtunk 0,5 ml sejthez, amelyet egy steril, eldobható elektroporációs küvetében (0,4 cm belső elektródátávolság; BioRad Laboratories) 0 °C-on tartottunk, és egy BioRad GenePulser készülékben, 25 mikrofard kapacitás mellett, 1000 V feszültséget alkalmaztunk. A sejteket 15 percig, 0 °C-on állni hagytuk, majd egy 50 ml tápfolyadékot tartalmazó 75 cm³ térfogatú palackba vittük át, és egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt követően a transzfektált sejteket tripszinnel kezeltük, és több hígításban, 2,5 mmol/l hisztidinolt tartalmazó 100 mm átmérőjű Petri-csészékbe oltottuk. A tápfolyadékot 3-4 naponként cseréltük, amíg a kolóniák világosan kivehetőkké nem váltak (7–10 nap). Különálló kolóniákat gyűjtöttünk, és azokat sejtenyészítő mikrolemezekre tenyésztettük. A gp50-expresszálas egy egyrétegű immunperoxidázvizsgálattal és egy G50N2 jelzésű monoklonális ellenanyag felhasználásával, radioimmunprecipitációs eljárással határoztuk meg, és egy radioimmunprecipitációs vizsgálat szerint gp50-et nagy mennyiségben expresszáló sejt vonalat G5-nek neveztünk el [Peeters és munkatársai, J. Virol., 66, 894–905 (1992)].

2. példa

Mutáns vírusok előállítása

Az R122 és R332 mutáns vírusokat átfedő fragmensek között végbemenő rekombinációs eljárással állítottuk elő G5 sejtekben, átfedő vad típusú PRV-szekvenciákat tartalmazó három kozmid [c-179, c-27, és c-443; lásd van Zijl és munkatársai, J. Virol., 65, 2761–2765 (1988)] segítségével, valamint az RI, illetve a 322. jelzésű pN3HB-származékok [de Wind és munkatársai, J. Virol., 64, 4691–4696 (1990)], melyek a gp50 génben a 366-367., illetve a 996-997. nukleotidok között található 5'-TAGGCTAGAATTCTAG-CCTA-3' szekvenciájú mutagén oligonukleotidot (1. szekvencia) tartalmazó HindIII-B fragmensének felhasználásával (lásd 1. ábra). A vírus eredetű DNS-fragmenseket a plazmidból EcoRI-emésztéssel (a kozmidok esetében), illetve HindIII-emésztéssel (az RI és 322. klónok esetében) szabadítottuk ki, és azokat nem választottuk el a vektorszekvenciáktól. Transzfektált sejt vonalat elektroporációs eljárással (lásd fent) a BioRad GenePulser és Capacitance Extender készülék

felhasználásával, 250 V, illetve 960 mikrofarad kapacitás mellett. A sejteket 6 rekeszű lemezekre oltottuk, és 37 °C-on, 3 óráig tartó inkubálást követően a tápfolyadékot 2% borjúszerűmot és 1% metil-cellulózt tartalmazó Earle-féle minimális esszenciális tápfolyadékkal cseréltük ki, majd a lemezeket a plakkok megjelenéséig (2-3 nap) 37 °C-on inkubáltuk.

A D560 törzs előállításához a 149. plazmid [a pN3HB plazmidnak a gp63 génben a 352-353. nukleotidok között a mutagén oligonukleotidot tartalmazó származéka; de Wind és munkatársai, *J. Virol.*, 64, 4691-4696 (1990); a számozást lásd: Petrovski és munkatársai, *J. Virol.*, 60, 185-193 (1986), 5. ábra] BglII-EcoRI fragmensét a 322. plazmid BglII-EcoRI fragmensével cseréltük ki (lásd 1. ábra). Az így kapott plazmidot, amelyben a gp50 gén 966. pozíciója és a gp63 gén 353. pozíciója közti nukleotidszekvenciát a TAGGCTAGAATTCTAGCCTA szekvenciával (lásd 1. szekvencia; azaz a mutagén oligonukleotid-szekvenciájával) helyettesítettük, használtuk az átfedő vad típusú fragmensekkel együtt, G5 sejtekben, a fent ismertettek szerint átfedő rekombinációs eljárással a vírus regenerálására.

A D1200 plazmid előállításához a 149. plazmidot BglII és EcoRI enzimekkel emésztettük, és az így kapott nagyobbik fragmenst tompa végek előállítása céljából *E. coli* DNS-polimeráz I enzim Klenow-fragmensével kezeltük, majd önmagával ligáltuk. A kapott plazmidot, amelyben a gp50 gén a 336. pozíciója és a gp63 gén 353. pozíciója közti nukleotidszekvenciát az AATTCTAGCCTA szekvenciával (lásd 2. szekvencia; azaz a mutagén oligonukleotid-maradékával) helyettesítettük, használtuk az átfedő vad típusú fragmensekkel együtt, a fent ismertettek szerint G5 sejtekben, átfedő rekombinációs eljárással a vírus regenerálására.

3. példa

A gp50, valamint a gp50+gp63 mutánsok replikációja sertésoronyákhártya-explantátumokban

Annak megállapítása céljából, hogy ezek a mutánsok szintén képesek-e állati szövetekben való terjedésre, sertésoronyákhártya-explantátumokat használtunk. Ezek az explantátumok természetes kombinációi a hámsejteknek és a sztrómát alkotó kötőszöveti sejteknek, és korábban kimutatták, hogy ilyen explantátumok fertőzése nagymértékben hasonlít az oronyákhártya fertőzéséhez [Pol és munkatársai, *Res. Vet., Sci.*, 50, 45-53 (1991)]. Explantátumokat fertőztünk a vad típusú NIA-3 PRV törzsszel, a gp50 génben inszertált linkert tartalmazó R122 és R332 mutánsokkal, valamint a gp50+gp63 deléciós mutáns D1200 és D560 törzsekkel.

A fertőzött nyálkahártya-explantátumoknak a fertőzést követően 24 órával, nyúlban termelt anti-PRV-szérummal [Pol és munkatársai, *Res. Vet., Sci.*, 50, 45-53 (1991)] végzett immunhisztokémiai vizsgálata azt mutatta, hogy a vad típusú NIA-3 vírus a hámsejtek nagy kiterjedésű területére szóródott. Hasonló eredményeket kaptunk az R122 és R332 gp50 mutánsokkal, valamint a D1200 és a D560 gp50+gp63 mutánsokkal.

24 órás inkubálást követően a vírusreplikáció csaknem kizárólag a hámsejtekre korlátozódott. Mindegyik törzs képes volt azonban hosszabb inkubációs idő elteltével az alsóbb kötőszöveti sejtek fertőzésére. Nyúlban termelt anti-PRV-szérummal és monoklonális ellenanyagokkal (gp50-re fajlagos G4ON2-vel) végzett differenciáló immunfestési eljárás igazolta, hogy a gp50 mutáns, illetve a gp50+gp63 mutánsok nem expresszáltak gp50-et. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy a gp50 sertés-oronyákhártyában a vírus terjedéséhez nem szükséges.

4. példa

A gp50, valamint a gp50+gp63 mutánsok virulenciája egerekben

a) A gp50+gp63 mentes mutánsok egerekben letálisak

Az a megfigyelés, hogy a gp50 mutánsok képesek voltak szövetexplantátumokban való szaporodásra és terjedésre, arra utalt, hogy azok képesek élő állatokban is szaporodni és terjedni. Kísérleti állatokként egereket választottunk, mivel azok nagymértékben fogékonyak herpeszvírusokkal való fertőzésre, és kiterjedten használták őket modellállatként a virulencia és az idegek mentén való terjedés tanulmányozására [Fraser és Ramachandran, *J. Comp. Path.*, 79, 435-444 (1969); Cook és Stevens, *Infect Immun.*, 7, 272-288 (1973); Field és Hill, *J. Gen. Virol.*, 23, 145-157 (1974); Field és Hill, *J. Gen. Virol.*, 26, 145-148 (1975); Kristenson és munkatársai, *Brain Res.*, 69, 189-201 (1978); Platt és munkatársai, *Arch. Virol.*, 63, 107-114 (1980); Dix és munkatársai, *Infect. Immun.*, 40, 103-112 (1983)]. Az első kísérletben az R122 és R332 jelzése linker inszerciós mutánsok helyett a D560 és D1200 jelzésű gp50+gp63 deléciós mutánsokat használtuk, hogy az inokulumban vad típusú revertánsok előfordulási lehetőségét kizárjuk. Ilyen revertánsok a kiegészítő sejtvonalon jelen levő vírusszekvenciák és a vírusgenom között létrejövő homológ rekombináció révén keletkezhetnek a linker inszerciós mutánsok törzstenyészetében [Cai és munkatársai, *J. Virol.*, 62, 2596-2604 (1988); Peeters és munkatársai, *J. Virol.*, 66, 894-905 (1992); Peeters és munkatársai, *J. Virol.*, 66, 3388-3892 (1992)]. Mivel a D560 és D1200 jelzésű gp50+gp63 deléciós törzsek 3'-végén található szekvenciák a G5 kiegészítő sejtekben nem rendelkeznek homológ megfelelővel (1. ábra), ezen mutánsoknak a G5 kiegészítő sejtekben végbemenő replikációja során vad típusú revertánsok nem jöhetnek létre.

Öt-öt darab 6-8 hetes korú nőtény BALB/c egeret (Charles River, Suldzfeld, Németország) fertőztünk a NIA-3, a D560, a D1200 törzsekkel, valamint a gp63 mutáns M105 törzsszel a nyakon, a bőr alá 10⁵ plakk-képző egységet adagolva. A NIA-3 törzsszel beoltott egerekben az Aujeszky-féle betegség súlyos tünetei jelentkeztek, úgymint heves vakaródzás a hátsó lábakkal, „arcmosás”, valamint bénulás, és a fertőzést követően körülbelül 70 órával ezek az egerek elhullottak. Az M105 törzsszel fertőzött egerekben nem jelentkezett heves viszketés, azonban meggömbült háttal

és megnövekedett légzésszámmal elkülönülve ültek. Az állatok a fertőzést követően körülbelül 90 órával hullottak el. A D560 és a D1200 törzsekkel fertőzött egerekben hasonló tünetek jelentkeztek, mint az M105 törzssel fertőzött állatokban. Apatikussá váltak és a moribund állapot beállta előtt, amely néha 42 óráig eltartott, bénulás lépett fel náluk, majd az állatok a fertőzést követő, körülbelül 130–140 óra elteltével elpusztultak (lásd 1. táblázat, 1. kísérlet). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a gp50+gp63 nullmutások még letális hatásúak az egerekre. Virulenciájuk azonban a vad típusú vírussal vagy egy gp63 mutáns vírussal összehasonlítva jelentősen csökkent.

b) A gp50+gp63 nullmutások képesek a központi idegrendszer elérésére és abban való szaporodásra

Mivel a gp63, illetve a gp50+gp63 mutánsokkal fertőzött egerekben az idegrendszeri tünetek sokkal kevésbé voltak nyilvánvalóak, mint a NIA-3 törzssel fertőzött egerekben, a fertőzött állatok agyát immunhisztokémiai eljárással vírus jelenlétére vizsgáltuk. A fertőzött egerek agyából és a szerveiből kriosztáttal készített metszeteket fixáltuk, és az előbbieken ismertetettek szerint immunhisztokémiai vizsgálatnak vetettük alá [Pol és munkatársai, *Microb. Path.*, 7, 361–371 (1989)]. Amikor első ellenanyagként gp50 elleni monoklonális ellenanyagokat használtunk, a második inkubálásnál kecskében termelt, peroxidázzal konjugált egér elleni immunglobulin G ellenanyagot használtunk [Peeters és munkatársai, *J. Virol.*, 66, 894–905 (1992)].

Meglepetésünkre, a D1200 és a D560 törzsekkel fertőzött egerek agyából készült metszetekben nagy mennyiségű fertőzött neuront figyeltünk meg, míg a NIA-3 vagy az M105 törzsekkel fertőzött egerek agyából készült metszetekben csak kis mennyiségű fertőzött neuront találtunk. A D1200 és a D560 törzsekkel fertőzött állatok agyában található vírusok nem expresszáltak gp50-et, amint azt nyúlban termelt anti-PRV-szérummal [Pol és munkatársai, *Res. Vet. Sci.*, 50, 45–53 (1991)] végzett differenciáló immunfestési eljárással megállapítottuk. Amikor az agykból vírust izoláltunk és azokat SK-6 sejteken titráltuk, a NIA-3 és az M105 törzsekkel fertőzött állatokból könnyen sikerült fertőzőképes vírust nyernünk, azonban a D560 és D1200 törzsekkel fertőzött állatokból ez nem sikerült (1. táblázat, 1. kísérlet). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a gp50+gp63 nullmutások nem képesek fertőzőképes utódokat termelni, de képesek a központi idegrendszert elérni és abban szaporodni.

c) A gp50 nullmutások nagymértékben virulensek

Bár a gp63 nem szükséges a vírus szaporodásához [Petrovskis és munkatársai, *J. Virol.*, 60, 1166–1169 (1986)], a G5 kiegészítő sejteken, illetve a nem kiegészítő SK-6 sejteken a gp50+gp63 mutások által képzett plakkok lényegesen kisebbek voltak, mint a gp50 mutások által képzett plakkok. Ezenkívül a gp63-ról kimutatták, hogy malacokban szerepet játszik a virulenciában [Kimman és munkatársai, *J. Gen. Virol.*, 73, 243–251 (1992)]. Mivel a fenti eredmények arra utalnak, hogy a gp50 mutások sokkal virulensebbek, mint a gp50+gp63 mutások, a gp50 mutások virulenciáját

is meg akartuk vizsgálni egerekben. Ahhoz viszont, hogy a gp50 mutánsokat egerek fertőzésére használhasuk, teljesen meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy az inokulum nem tartalmaz vad típusú revertánsokat (lásd fent). Vad típusú revertánsoktól látszólag mentes, fenotípusosan kiegészített R122 vírustenyészetet készítettünk oly módon, hogy G5 sejtekben termelt egyetlen R122 plakkal SK-6 sejteket fertőztünk. A fertőzött SK-6 sejtekből vírus-DNS-t izoláltunk, és azzal egy réteg G5 sejttenyészetet transzfektáltunk, (ami nagymértékben csökkentette a PRV-kioltás hatékonyságát) [Peeters és munkatársai, *J. Virol.*, 66, 894–905 (1992)]. A transzfektált sejtekből SK-6 sejteken való titrálás alapján milliliterenként $2,1 \times 10^7$ plakk-képző egységet (pfu/ml) tartalmazó vírustenyészetet készítettünk. Ezt a tenyészetet R122⁺-nak neveztük annak jelölésére, hogy fenotípusosan kiegészített vírusról van szó. gp50-et nem tartalmazó vírustenyészetet állítottunk elő oly módon, hogy SK-6 sejteket 200 mikroliter ($4,2 \times 10^6$ pfu) higítatlan R122⁺ törzstenyészetrel fertőztünk. Az így nyert tenyészet, amelyet annak jelzésére, hogy az nem kiegészítő sejtől származik R122⁻-nak neveztünk, milliliterenként 150 plakk-képző egységet tartalmazott. Amikor azonban gp50 elleni monoklonális ellenanyaggal [Peeters és munkatársai, *J. Virol.*, 66, 894–905 (1992)] immunperoxidázzal festést végeztünk, ezek a plakkok gp50 negatívnak bizonyultak. Az eredmények arra mutattak, hogy a vírustörzstenyészet nem tartalmaz vad típusú vírust, de tartalmaz néhány fertőző vírusrészcskét. Lehetséges, hogy ezek a részecskék abból az inokulumból (R122⁺) származtak, amelyet az R122⁻ tenyészet előállítására használtunk. Másik lehetőség szerint az utódvirionok képesek lehetnek a fertőző R122⁺ virionok által az SK-6 sejtek plazmamembránjában lerakott gp50 beépítésére. Egy másik lehetőség, hogy a gp50-et nem tartalmazó virionok endocitózissal kerülnek a sejtbe, [Campadelli-Fiume és munkatársai, *J. Virol.*, 62, 159–167 (1988)], néhány esetben elkerülik a lebontást és produktív fertőzést hoznak létre. Az R122⁺ és R122⁻ törzstenyészetek fizikai titerét elektronmikroszkóp segítségével határoztuk meg, belső standardként latexgyöngyök (91 nanométer átmérőjű gyöngyök; Serva) felhasználásával.

Az R122⁺ törzs virulenciájának vizsgálatán felül megvizsgáltuk azt is, hogy a különböző vírusok virulenciája függ-e a fertőzés módjától. Öt-öt egérből álló csoportokat oltottunk a NIA-3, az M105, az R122⁺ és a D1200 törzsekkel, 10^5 plakk-képző egységgel, bőr alá, illetve a hasüregbe adott injekcióval. Az R122⁺ törzssel fertőzött egerekben az Aujeszky-féle betegség tünetei fejlődtek ki (lásd fent), amelyek hasonlóak voltak a NIA-3 törzssel fertőzött állatokban megfigyeltékhez. Az első tünetek a NIA-3 törzssel bőr alá injektálva fertőzött állatokban a fertőzést követően körülbelül 34–40 óra múlva, az R122⁺ törzssel bőr alá injektálva fertőzött állatokban a fertőzést követően körülbelül 42 óra múlva váltak nyilvánvalóvá. Az állatok a fertőzést követően 56, illetve 68 órával pusztultak el (1. táblázat, 2. kísérlet). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a gp50 mutáns R122⁺ törzs nagymértékben virulens ege-

rekben és sokkal virulensebb, mint a gp50+gp63 mutáns D1200 vagy a gp63 mutáns M105 törzsek. A NIA-3, az R122+ és az M105 törzsek hasüregbe való injektálása esetében átlagosan 10–13 órával hosszabb idő telt el az elhullásig, mint a bőr alá történő injektálás után. Amikor a D1200 törzset hasüregbe injektáltuk, az elhullásig eltelt átlagos időtartam körülbelül 25 órával rövidebb volt, mint a bőr alá történő injektálás esetében (1. táblázat, 2. kísérlet). A tünetek és a klinikai jelek mindegyik vizsgált törzs esetében függetlenek voltak a fertőzés módjától. Tehát a fertőzés időbeli lefolyása különbözik ugyan, de mindkét beoltási mód letális fertőzést eredményez. A 2. kísérletben használt mindegyik állat agyából készült metszetekben sikerült vírust kimutatnunk immunhisztokémiai eljárással (1. táblázat). Ebben az esetben is a D1200 törzssel fertőzött állatok agyában a víruszaporodás sokkal kiterjedtebb volt, mint a NIA-3, az R122+ vagy az M105 törzsekkel fertőzött állatokéban.

d) A vírusreplikáció elsősorban a fertőzött szervek perifériás idegeiben megy végbe

Amikor szervmetszeteket vizsgáltunk immunhisztokémiai eljárással vírusantigének jelenlétére nézve, vírusantigéneket csak a hasüregben át fertőzött állatokban tudtunk kimutatni. Vírust mutattunk ki a májban, lépben, vesében, bélben és mellékvesében, de nem mutattunk ki vírust a tüdőkből. A vírusfertőzés a szervekben csaknem kizárólag az idegrostokra korlátozódott. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a PRV előszeretettel az idegszövetet fertőzi és abban szaporodik, és amint azt korábban kimutatták [Cook és Stevens, *Infect. Immun.*, 7, 272–288 (1973); Field és Hill, *J. Gen. Virol.*, 23, 145–157 (1974); Field és Hill, *J. Gen. Virol.*, 26,

145–148 (1975); McCracken és munkatársai, *J. Gen. Virol.*, 20, 17–28 (1973); Strack és Loewy, *J. Neurosci.*, 10, 2139–2147 (1990); Card és munkatársai, *J. Neurosci.*, 10, 1974–1994 (1990)] a vírus retrográd axonális transzport révén kerül a szervekből a központi idegrendszerbe. Az a megfigyelés, hogy a gp50 nullmutások hatékonyan eléri a központi idegrendszert, azt jelenti, hogy a neuronális szállítási folyamat független a gp50 jelenlététől.

A NIA-3 és az M105 törzsekkel hasüregen át fertőzött állatok szerveinek kivonatából fertőzőképes vírusokat izoláltunk. Várakozásunknak megfelelően, az R122+ és a D1200 törzsekkel fertőzött állatokból nem sikerült fertőzőképes vírust izolálnunk, ami arra utal, hogy ezeknek a vírusoknak az utódai nem fertőzőképesek. Meglepetésünkre, a NIA-3 törzssel bőr alá injektálva fertőzött állatoknál a szervkivonatok titrálásával 5 esetből háromban sikerült fertőző vírust kimutatni (1. táblázat, 2. kísérlet). Ez jelentheti azt, hogy a vírus anterográd módon szállítódott a központi idegrendszerből ezekbe a szervekbe. Az, hogy az M105 törzssel bőr alá injektálva fertőzött egerek szerveiből nem sikerült fertőző vírust kimutatnunk, valószínűleg azzal magyarázható, hogy ennek a vírusnak a transzportja késleltetett volt.

e) Az *in vivo* elsődleges fertőzés létrejöttéhez gp50 szükséges

Az általunk kapott *in vitro* eredmények, amelyek azt mutatták, hogy a gp50 szükséges a penetrációhoz, azonban nem szükséges a sejtről sejtre való terjedéshez [Peeters és munkatársai, *J. Virol.*, 66, 894–905 (1992)] azt sugallták, hogy ugyanez érvényes az *in vivo* fertőzésre is.

1. táblázat

Különböző PRV vírusokkal fertőzött egerekben az elhullásig eltelt átlagos időtartam, és a víruskimutatás eredménye

Példa	Virustörzs	Genotípus	Adagolás módja	Elhullásig eltelt átlagos időtartam (óra) (+/- S. D.)	Vírus jelenléte			
					(immunhisztokémia)		(vírusizolálás)	
					agy	szervek	agy	szervek
1.	NIA-3	vad típus	sc. ^a	70,8 +/- 12,9	+	n.d. ^b	+	n.d.
	M105	gp63 ⁻	sc.	91,2 +/- 18,2	+	n.d.	+	n.d.
	D560	gp50 ⁻ gp63 ⁻	sc.	132,2 +/- 28,6	++	n.d.	-	n.d.
	D1200	gp50 ⁻ gp63 ⁻	sc.	141,4 +/- 22,4	++	n.d.	-	n.d.
2.	NIA-3	vad típus	sc.	55,6 +/- 6,8	+	-	n.d.	+(3/5)
	R122 ⁺	gp50 ⁻	sc.	67,9 +/- 6,8	+	-	n.d.	-
	M105	gp63 ⁻	sc.	78,6 +/- 18,7	+	-	n.d.	-
	D1200	gp50 ⁻ gp63 ⁻	sc.	160,0 +/- 20,4	++	-	n.d.	-
	NIA-3	vad típus	ip. ^c	67,3 +/- 9,0	+	+ ^d	n.d.	+
	R122 ⁺	gp50 ⁻	ip.	77,7 +/- 5,6	+	+ ^d	n.d.	-
	M105	gp63 ⁻	ip.	91,6 +/- 15,6	+	+ ^d	n.d.	+
	D1200	gp50 ⁻ gp63 ⁻	ip.	134,8 +/- 27,0	++	+ ^d	n.d.	-

1. táblázat (folytatás)

Példa	Vírus törzs	Genotípus	Adagolás módja	Elhullásig eltelt átlagos időtartam (óra) (+/- S. D.)	Vírus jelenléte			
					(immunhisztokémia)		(vírusizolálás)	
					agy	szervek	agy	szervek
3.	R122+	gp50-	sc.	60,0 +/- 4,2	+	n.d.	n.d.	n.d.
	R122-	gp50-	sc.	4 x ∞, 1 x 84	+	n.d.	n.d.	n.d.
	B145	gII-	sc.	∞	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	R122+	gp50-	ip.	85,2 +/- 5,0	+	n.d.	n.d.	n.d.
	R122-	gp50-	ip.	∞	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B145	gII-	ip.	∞	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

a: szubkután.

b: nincs meghatározva.

c: intraperitoneális.

d: perifériás idegekbe.

Bár annak a lehetősége, hogy a gp50 in vivo nem szükséges a penetrációhoz, igen valószínű, a forma kedvéért igazolnunk kellett, hogy ebben az esetben a gp50 az elsődleges fertőzéshez is szükséges. A gp50 szerepének vizsgálatára egy nem kiegészítő SK-6 sejteken tenyésztett R122 tenyészetet használtunk, amely így nem tartalmazott gp50-et (R122-; lásd fent). Mivel 10⁵ plakk-képző egység R122+ megfelel 3,3 x 10⁶ tulajdonképpen részecskének, ugyanennyi R122- részecskét használtunk az egerek beoltására. Várakozásunknak megfelelően, mindegyik R122+ törzssel hasüregbe vagy bőr alá injektálva fertőzött egér elpusztult (1. táblázat, 3. kísérlet). Azonban az R122- törzssel fertőzött egerek közül hasüregbe való fertőzést követően mindegyik túlélte, míg a bőr alá injektálva fertőzött állatok közül ötből egy elhullott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a gp50-nek a vírusborítékban való jelenléte szükséges az állatok sikeres fertőzéséhez.

Az R122- törzssel való fertőzést követően elhullott állatok vizsgálata szerint vírus volt kimutatható az agyban, ami arra utal, hogy az inokulumban még fertőzőképes vírus volt jelen. Amikor az inokulumot nem kiegészítő SK-6 sejteken duplikátumban titráltuk, 9, illetve 16 plakkot találtunk. Ezeket a plakkokat immunhisztokémiai vizsgálat szerint gp50 mutánsok alkották. Ezeknek a fertőző virionoknak a lehetséges eredetét a fentiekben tárgyaltuk. Mivel a NIA-3 PRV törzs LD₅₀ (az a dózis, ami az állatok felének elhullásához vezet) értéke hasüregi fertőzésnél körülbelül 70 plakk-képző egység, lehetséges, hogy az R122- inokulumban jelen levő fertőző vírusrészecskék tehetőek felelőssé az egyetlen elpusztult állat letális fertőzéséért.

f) A fertőzőképes utódok létrehozására nem képes, így sejtről sejtre való terjedés révén való szóródásra képtelen vírus nem virulens egérre

A korábbiakban kimutattuk, hogy a gp50 nullmutánsokhoz hasonlóan, a gII vagy a gH nullmutáns PRV törzseket nem kiegészítő sejtvonalakban való tenyésztése nem fertőzőképes utódvírusok termelődését eredményez-

te [Peeters és munkatársai, J. Virol., 66, 894-905 (1992); Peeters és munkatársai, J. Virol., 66, 3388-3892 (1992)]. Azonban eltérően a gp50 mutánsoktól, a gII és a gH mutánsok nem kiegészítő sejteken nem voltak képesek plakkokat képezni. Ez arra utal, hogy a gII és a gH a vírus sejtről sejtre való terjedéséhez szükséges. Annak megállapítására, hogy a sejtről sejtre való terjedés in vivo is előfeltétele-e a sikeres vírusszóródásnak, a B145 jelzésű, fenotípusosan kiegészített PRVgII mutáns törzssel [Peeters és munkatársai, J. Virol., 66, 894-905 (1992)] egereket fertőztünk. Amikor a B145 vírus 10⁵ plakk-képző egységével hasüregbe, illetve bőr alá injektálva fertőztünk egereket, egyik állatban sem jelentkezett az Aujeszky-féle betegség semmiféle tünete (1. táblázat, 3. kísérlet). Ez az eredmény arra utal, hogy egy olyan vírus, amely nem képes fertőzőképes utódok előállítására, és képtelen sejtről sejtre való terjedés révén szóródni, nem virulens egerekre.

5. példa

gp50, valamint gp50+gp63 mutánsok virulenciája és immunogenitása sertésekben

A mutáns törzsek virulenciájának és immunogenitásának vizsgálatára malacokat oltottunk az R122+, a D560, és a D1200 törzsekkel. A vad típusú M209 és a gp63 mutáns M102 törzsek (1. ábra) [Kimman és munkatársai, J. Gen. Virol., 73, 243-251 (1992)] kontrollként szolgáltak. Az immunizálást virulens NIA-3 PRV törzssel való fertőzés követte.

4-6 hetes malacokból álló öt csoportot (a Central Veterinary Institute fajlagos kórokozótól mentes tenyészetéből származó holland lapály malacokat) fertőztünk orron át a vírus 10⁵ plakk-képző egységével, a belégzés folyamán mindegyik orrlyukba lassan 0,5 ml víruszuszpenziót adagolva. A vakcinázást követően négy héttel a malacokat orron át, a virulens NIA-3 PRV törzs 10⁵ plakk-képző egységével fertőztük. A malacokat napon-ta kétszer megfigyeltük a klinikai jelekre nézve, és napon-ta mértük a végbélhőmérsékletet. Az állatokat heten-

te háromszor lemértük. Mindegyik malac esetében meghatároztuk a gyarapodás leállítását mutató napok számát, a lázat és az idegrendszeri tüneteket. A gyarapodás elmaradásának időszakát a fertőzés napján mért testtömeg visszanyeréséhez szükséges napok számában adtuk meg. Lázat abban az esetben állapítottunk meg, ha a végbélben mért hőmérséklet meghaladta a 40 °C-ot. Az idegrendszeri tünetekként viszketést, ataxiát, bénulást, remegést, és görcsöket jegyeztünk fel.

A vad típusú M209 törzssel fertőzött malacokban az Aujeszky-féle betegség tipikus tünetei jelentkeztek, úgymint láz, étvágytalanság, gyarapodás elmaradása és idegrendszeri tünetek, például ataxia és bénulás (2. táblázat). Az R122+ és M102 mutánsoknál rövid ideig tartó láz és a gyarapodás elmaradása lépett fel, idegrendszeri tünetek azonban nem jelentkeztek. A D560 és D1200 mutánsok nem váltottak ki semmilyen idegrendszeri tünetet, és nem okoztak lázat vagy gyarapodáselmaradást. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a D560 és a D1200 gp50+gp63 mutánsok teljesen avirulensek malacokra, míg az R122+ gp50 mutáns és az M102 gp63 mutáns összehasonlítva a vad típusú PRV-vel nagymértékben csökkent virulenciával rendelkezik.

Az R122+ és az M102 törzsekkel vakcinázott malacoknál a NIA-3 törzssel végzett, felülfertőzést célzó oltást követően nem lépett fel láz vagy gyarapodás elmaradása, és nem jelentkezett semmilyen klinikai tünet (3. táblázat). A D560 és D1200 törzsekkel vakcinázott malacoknál rövid ideig tartó láz és gyarapodáselmaradás lépett fel, idegrendszeri tünetek azonban nem jelentkeztek, bár az állatok néhány napig leverték voltak, és két

malac hányt. A nem vakcinázott kontrollcsoportba tartozó malacoknál az Aujeszky-féle betegsége jellemző súlyos tünetek jelentkeztek, valamint viszonylag hosszú ideig tartó lázas időszakokat és gyarapodáselmaradást észleltünk; két malac elpusztult (3. táblázat). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az R122+ gp50 mutáns és az M102 gp63 mutáns vakcinázott malacokban teljes védettség jött létre az Aujeszky-féle betegség klinikai tüneteivel szemben, míg a D560 és a D1200 gp50+gp63 mutánsokkal vakcinázott malacokban részleges védettség jött létre az Aujeszky-féle betegség klinikai tüneteivel szemben.

2. táblázat

Malacok immunizálása különböző PRV törzsekkel+

Immunizálás	Láz*	Gyarapodás-elmaradás*	Klinikai tünetek
M209 (n=3)	5,3 +/- 0,6	8,3 +/- 7,3	++
M102 (n=4)**	2,4 +/- 1,5	2,4 +/- 2,2	-
R122 (n=5)	3,8 +/- 1,6	0,8 +/- 1,8	-
D560 (n=5)	0	0	-
D1200 (n=5)	0	0	-

+ : a kísérlet során nem hullott el malac.

* : napok átlagos száma (+/- S. D.).

** : egy malac elpusztult, valószínűleg a vérvételt követő trauma következtében.

++ : neurológiai tünetek, úgymint ataxia, görcs, bénulás.

3. táblázat

Vakcinázott malacok védettsége NIA-3 törzssel való fertőzéssel szemben

Immunizálás	Elhullás	Láz*	Gyarapodáselmaradás*	Klinikai tünetek
- (n=6)	2	6,8 +/- 0,5	10,3 +/- 7,1	++
M102 (n=4)	0	0	0	-
R122+ (n=5)	0	0	0	-
D560 (n=5)	0	2,6 +/- 1,3	4,6 +/- 6,5	+/-
D1200 (n=5)	0	3,6 +/- 1,1	1,4 +/- 3,1	+/-

* : napok átlagos száma (+/- S. D.).

++ : neurológiai tünetek, úgymint ataxia, görcs, bénulás.

+/- : bágyadság (néha hányás, lásd a szöveget).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PRV gp50 génje szükséges a vírus fertőzőképességéhez (penetrációjához), azonban nem szükséges a sejtről sejtre való átviteléhez. Fenotípusosan kiegészített gp50 mutánsok és gp50+gp63 mutánsok képesek a fertőzött állatokban szaporodni és terjedni. A fertőzött sejtekből kiszabaduló utódvírusok azonban nem fertőzőképesek, és így a fertőzött állatok nem képesek fertőző vírus ürítésére. Ez a sajátság, a PRV széles gazdaszervezet-spektrumával és azzal a képességével, hogy nagy mennyiségű idegen DNS befogadására képes, a PRV gp50 mutánsokat Aujeszky-féle betegség és egyéb állati megbetege-

dések elleni biztonságos (hordozó-) vakcinák előállítására alkalmazható ideális jelölteké teszi.

6. példa

Sertéskolera-vírus E1 borítékglikoproteinjét expresszáló gp50 deléciós mutáns előállítása

Annak vizsgálatára, hogy egy gp50 deléciós mutáns felhasználható-e heterológ gének expresszálására szolgáló vektorvírusként, a NIA-3 PRV törzs gp50 génjét a sertéskolera-vírusnak (HChV=klasszikus sertésláz) a hCMV promotor transzkripció ellenőrzése alatt működő E1 génjét tartalmazó DNS-fragmensével helyettesített-

tük. A PRV különösen rövid (Us) régiójából egy Scal-DraI fragmenst [a Scal hasítási hely a gX gén 317–322. pozíciójában található; a nukleotidszekvencia számozását, lásd: Rea és munkatársai, *J. Virol.*, 54, 21–29 (1985); a DraI hasítási hely a gp63 és a gI gének között az 1181–1186. pozícióban található; a nukleotidszekvencia számozását, lásd: Petrovskis és munkatársai, *J. Virol.*, 60, 185–193 (1986)] klónoztunk a pUC19M (Clontech) tompa végűvé alakított NdeI hasítási helyére. Adott helyre fajlagos in vitro mutagenézissel (Transformer-készlet, Clontech) egyedi restriktióenzim-felismerő helyeket hoztunk létre közvetlenül a gp50 gént megelőzően és a gp50 gént követően. Az 5'-AGGTTCCATACACTAGTCCGCCAGCGCCATGC-3' (3. szekvencia) és az 5'-CCCGTCCGTAGCCTAGGCA-GTACCGGCGTCG-3' (4. szekvencia) mutagén primerek felhasználásával a SpeI (ACTAGT), valamint az AvrII (CCTAGG) restriktióenzimek számára szolgáló felismerőszekvenciákat hoztunk létre a (-17)-(-12), illetve az 1210–1215. pozíciókban [a gp50 gén nukleotidszekvenciájának számozását lásd: Petrovskis és munkatársai, *J. Virol.*, 59, 216–223 (1986)]. A gp50 gént a plazmid-DNS-nek SpeI és AvrII enzimekkel való emésztésével deletáltuk, és egy olyan szintetikus SpeI-AvrII DNS-fragmensenl helyettesítettük, amely felismerőszekvenciákat tartalmazott az EcoRI, az EcoRV és a HindIII restriktióenzimek számára (a szintetikus DNS-fragmenst két, olyan egyszálú oligonukleotid egyenlő mólnyi mennyiségének összekapcsolásával nyertük, melyek az alábbi szekvenciával rendelkeztek: 5'-CTAGTGA-ATTCGATATCAAGCTTC-3' (5. szekvencia), illetve 5'-CTAGGAAGCTTGATATCGAATTCA-3' (6. szekvencia). Ezután egy, a gp50 deléciót hordozó NcoI-PstI fragmenst [a NcoI hasítási hely a gX gén 883–888. pozíciójában található, a nukleotidszekvencia számozását lásd: Rea és munkatársai, *J. Virol.*, 54, 21–29 (1985); a PstI hasítási hely a gp63 gén 439–444. pozíciójában található, a nukleotidszekvencia számozását lásd: Petrovskis és munkatársai, *J. Virol.*, 60, 185–193 (1986)] a pGEM5Zf(+) plazmidba (Promega) klónoztuk, miután az utóbbi plazmidot NcoI és PstI enzimekkel emésztettük. Az így kapott plazmidot pBP53-nak neveztük.

A HChV E1 génje a Brescia nevű HChV törzsből [Moormann és munkatársai, *Virology*, 127, 184–198 (1990)] származott. A gént egy DsaI-EcoRV fragmenként klónoztuk [a DsaI enzimmel hasított oldalt *E. coli* DNS-polimeráz I. Klenow-fragmensével feltöltöttük; a nukleotidszekvencia számozását lásd: Moormann és munkatársai, *Virology*, 177, 184–198 (1990)] a pEVhis13 plazmid EcoRI (*E. coli* DNS-polimeráz I. Klenow-fragmensével feltöltött), valamint EcoRV hasítási helyei közé. Az utóbbi plazmid a pSV2his plazmid egy olyan származéka [Hartman és Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8047–8051 (1988)], amely tartalmazza a hCMV promotert, melyet egy ATG kezdőkövet, tartalmaz több egyedi restriktióenzim hasítási helyet és mindegyik olvasási keretben transzlációs befejezőkodonokat (Peeters és munkatársai, *J. Virol.*, 66, 894–905 (1992); ugyancsak lásd az 1. példát]. Az így kapott plazmidban a fuzionált E1 gén a pEVhis13 plazmid

kezdőkodonjával azonos olvasási keretbe esik. Ezt a plazmidot pEVhis13HCVE1-nek neveztük (2. ábra). Miután a pEVhis13HCVE1 plazmidot HpaI és PstI enzimekkel emésztettük, egy a hCMV promotert, az E1 gént, valamint a transzlációs befejezőkodonokat tartalmazó fragmenst izoláltunk. A HpaI-PstI fragmenst tompa végűvé alakítása céljából T4 DNS-polimerázzal kezeltük, majd a pBP53 plazmid EcoRV hasítási helyére klónoztuk. Egy plazmidot izoláltunk, amelyben a fragmens olyan orientációban inszertálódott, hogy abban az E1 gén transzkripciójának iránya azonos volt a pBP53 plazmidban található gX és gp63 gének transzkripciójának irányával, és azt pBP53E1-nek neveztük (3. ábra).

Annak ellenőrzésére, hogy az E1 gén klónozása megfelelő módon történt-e, G5 sejtekben vizsgáltuk az E1 átmeneti expresszálását. A sejteket pBP53E1, illetve pEVhis13HCVE1 plazmidokkal transzfektáltuk lipofektin (GIBCO BRL) felhasználásával. Két nap elteltével az egyrétegű sejtenyészeteket fixáltuk, és az E1 expresszálását a HChV E1 glikoproteinre fajlagos 3. és 4. jelzésű, tompa-peroxidázzal konjugált monoklonális ellenanyagok [Wenvoort, *J. Gen. Virol.*, 70, 2685–2876 (1989)] felhasználásával, immunfestési eljárással vizsgáltuk. A pBP53E1 plazmiddal transzfektált sejtekben az E1 expresszálás világosan kivehető volt, és a festődés még sokkal intenzívebb volt, mint a pEVhis13HCVE1 plazmiddal transzfektált sejtekben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a pBP53E1 plazmidkörnyezetben a PRV-szekvenciákkal határolt E1 hatékonyan expresszálódott.

A pBP53E1 plazmidot PvuII és PstI enzimekkel emésztettük, és a NIA-3 PRV törzsből származó vírus-DNS-sel együtt, lipofektin felhasználásával G5 sejtekbe transzfektáltuk. Két nap elteltével, amikor a plakkok világosan kivehetőek voltak, az egyrétegű sejtenyészeteket fixáltuk, és az átmeneti expressziós vizsgálatban fent ismertetettek szerint immunfestési eljárással vizsgáltuk. A festődött plakkok jelenléte azt mutatta, hogy az E1 gén homológ rekombináció révén átkerült a vírusgenomba, és az E1 gént a rekombináns vírusok expresszálják. Rekombináns vírusok izolálása céljából a transzfekciós kísérletet megismételtük, és 400 különálló plakkot izoláltunk. E1-et expresszáló rekombinánsok azonosítása céljából az izolátumok egy részét SK-6 sejteket tartalmazó mikrolemezekre vittük át. Kétnapos inkubálást követően a plakkok kivehetőek voltak, ekkor a fertőzött egyrétegű sejtenyészeteket fixáltuk, és immunfestési eljárással E1 expresszálásra nézve vizsgáltuk. Végül az eredeti izolátumokból olyan E1-et expresszáló rekombináns vírus plakk tisztítottunk, amely SK-6 sejteken festődött plakkokat eredményezett.

Kimutattuk, hogy egy, a HChV E1 génjét expresszáló rekombináns PRV vakcinatörzs HChV vírussal való felülfertőző oltást követően a malacokat megvédi a klasszikus sertésláz jelentkezésétől [van Zijl és munkatársai, *J. Virol.*, 65, 2761–2765 (1991)]. Az előzők alapján, a fent ismertetett nem fertőzőképes, E1-expresszáló gp50 deléciós mutáns ugyancsak képes malacokban klasszikus sertésláz ellen védelemet létrehozó immunválasz kiváltására.

<i>SZEKVENCIALISTA</i>	
Információk az 1. szekvenciához:	
Szekvenciajellemzők:	
Típus: nukleotid	
Hossz: 20 bázis	
Szálszám: egyszeres	
Forrás: szintetikus	
Szekvencia leírása: 1. szekvencia:	
TAGGCTAGAATTCTAGCCTA	20
Információk a 2. szekvenciához:	
Szekvenciajellemzők:	
Típus: nukleotid	
Hossz: 12 bázis	
Szálszám: egyszeres	
Forrás: szintetikus	
Szekvencia leírása: 2. szekvencia:	
AATTCTAGCCTA	12
Információk a 3. szekvenciához:	
Szekvenciajellemzők:	
Típus: nukleotid	
Hossz: 33	
Szálszám: egyszeres	
Forrás: szintetikus	
Szekvencia leírása: 3. szekvencia:	
AGGTTCCCATACACTAGTCCGCCAGCGCCATGC	33
Információk a 4. szekvenciához:	
Szekvenciajellemzők:	
Típus: nukleotid	
Hossz: 32	
Szálszám: egyszeres	
Forrás: szintetikus	
Szekvencia leírása: 4. szekvencia:	
CCCGGTCCGTAGCCTAGGCAGTACCGGCGTCG	32
Információk az 5. szekvenciához:	
Szekvenciajellemzők:	
Típus: nukleotid	
Hossz: 24	
Szálszám: egyszeres	
Forrás: szintetikus	
Szekvencia leírása: 5. szekvencia:	
CTAGTGAATTCGATATCAAGCTTC	24
Információk a 6. szekvenciához:	
Szekvenciajellemzők:	
Típus: nukleotid	
Hossz: 24	
Szálszám: egyszeres	
Forrás: szintetikus	
Szekvencia leírása: 6. szekvencia:	
CTAGGAAGCTTGATATCGAATTCA	24

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Pseudorabies vírus olyan gp50 mutánsának alkalmazása, amelyek csak vírus indukálta, sejtről sejtre való átvitelrel képesek terjedni, és nem fertőzőképes utódvirionokat hoznak létre, *azzal jellemezve*, hogy a gp50 glikoproteint tartalmazó, és a gp50 génben a funkcionális gp50 protein expresszálsát megakadályozó 55 60

mutációval rendelkező vírust emberi és állati megbetegedések elleni vakcinák előállítására alkalmazzuk.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy Aujeszky-féle betegség elleni vakcina előállítására alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás Aujeszky-féle betegségtől eltérő állati megbetegedések elleni vektorvakcina előállítására, *azzal jellemezve*, hogy olyan mutáns

alkalmazunk, amely legalább egy, más kórokozóból származó antigént vagy annak részét kódoló gént tartalmaz.

4. Vakcina állati megbetegedés megelőzésére és/vagy terjedésének megakadályozására, *azzal jellemezve*, hogy gp50 glikoproteint tartalmazó Pseudorabies vírust tartalmaz, amely gp50 génben a funkcionális gp50 protein expresszálását megakadályozó mutációval rendelkezik.

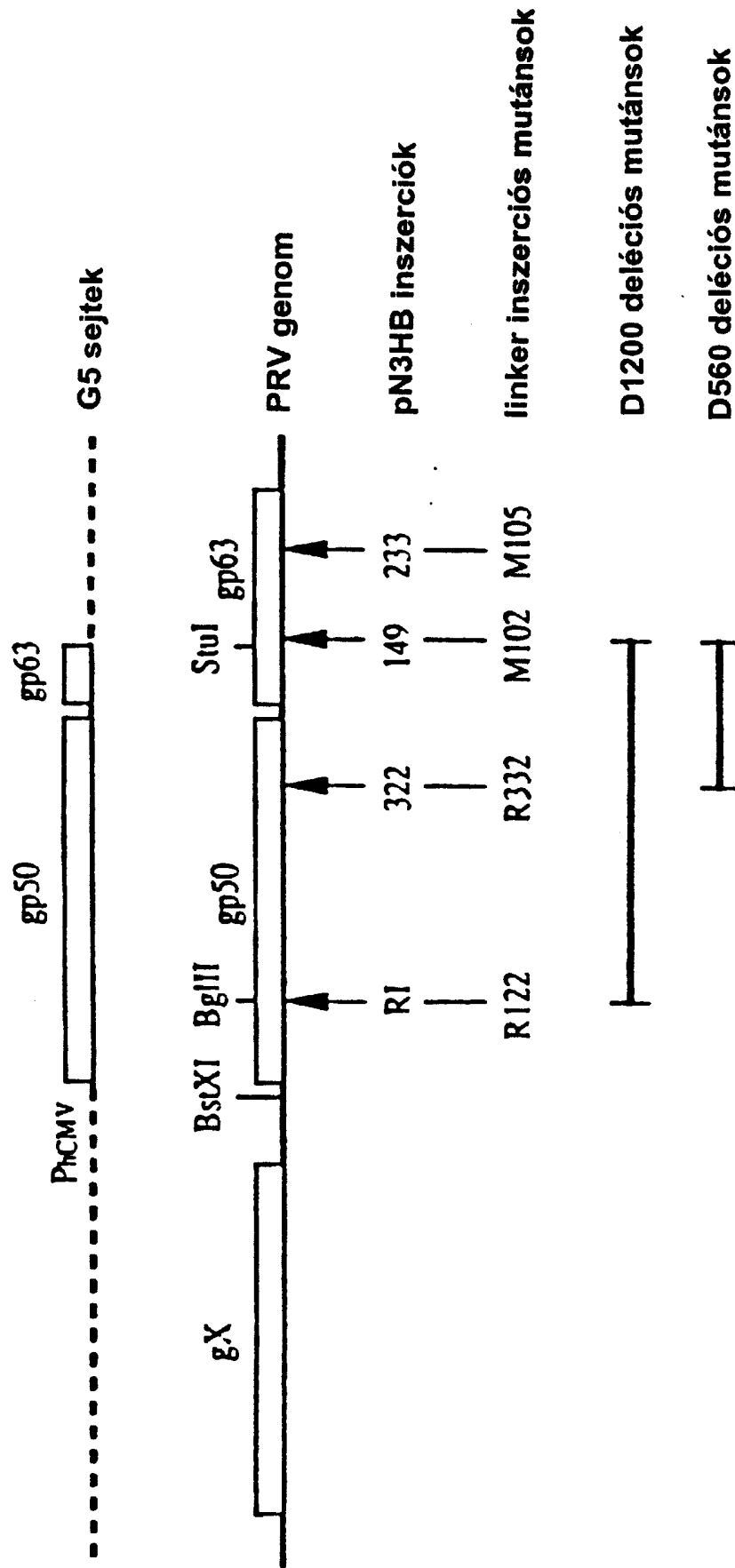
5. A 4. igénypont szerinti vakcina Aujeszky-féle betegség megelőzésére és/vagy terjedésének megakadályozására, *azzal jellemezve*, hogy a mutáció egy deléción.

6. A 4. igénypont szerinti vakcina legalább egy állati megbetegedés megelőzésére és/vagy terjedésének

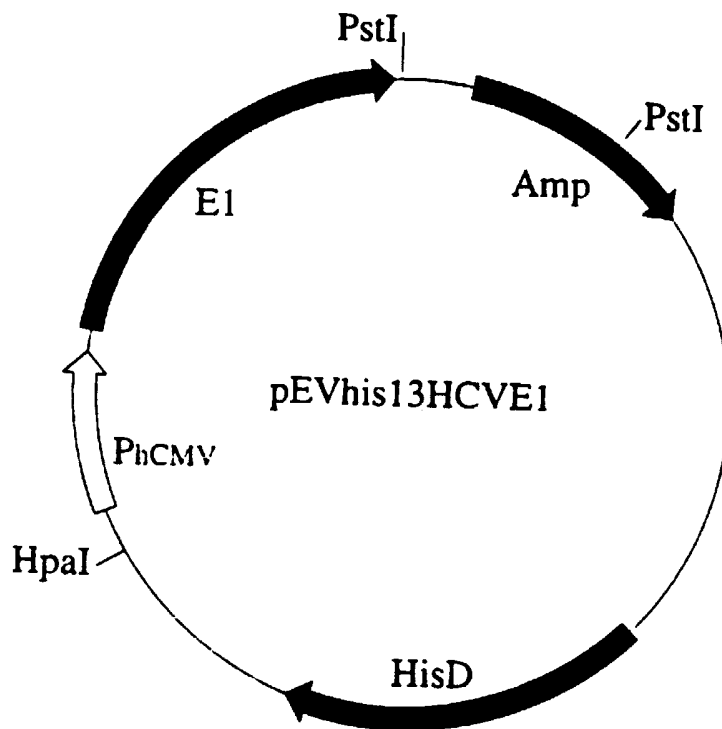
megakadályozására, *azzal jellemezve*, hogy a mutáció egy, az állati megbetegedésnek megfelelő, antigént kódoló heterológ gént tartalmazó inszerción.

7. A 4. igénypont szerinti vakcina legalább egy állati megbetegedés megelőzésére és/vagy terjedésének megakadályozására, *azzal jellemezve*, hogy a Pseudorabies vírus a gp50 génjének mutációja mellett egy, az állati megbetegedésnek megfelelő antigént kódoló heterológ gént tartalmaz.

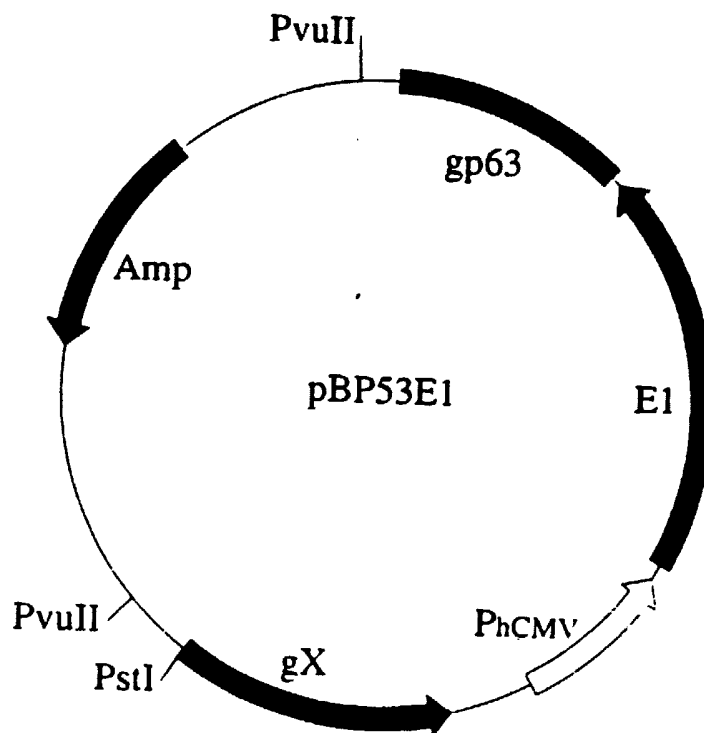
8. A 4–7. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, *azzal jellemezve*, hogy a Pseudorabies vírus legalább még egy mutációt tartalmaz egy másik génjében, előnyösen a gp63 vagy a gI génjében.



1. ábra



2. ábra



3. ábra