

(19) C2 (11) 72433 (13) UA

(98) ТОВ "Городисський та Партнери", вул. Бориса Грінченка, 2, офіс 2, м. Київ, 01001
(85) 1999-06-01
(74) Пахаренко Антоніна Павлівна, (UA)
(45) [2005-03-15]
(43) [2000-08-15]
(24) 2005-03-15
(22) 1997-10-29
(12) null
(21) 99052951
(46) 2005-03-15

(86) 1997-10-29 PCT/NL97/00593

(30) 96203024.3 1996-10-30 EP

(54) СПОСІБ ГЕНЕРУВАННЯ ІНФЕКЦІЙНОГО КЛОНУ НА ОСНОВІ ГЕНОМУ РНК-ВІРУСУ З ПОЗИТИВНИМ ЛАНЦЮГОМ РОДИНИ І ARTERIVIRIDAE, МОЛЕКУЛА РЕКОМБІНАНТНОЇ НУКЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ, МОДИФІКОВАНИЙ РНК-ВІРУС, ВАКЦИНА, ЩО Й ОГО ВКЛЮЧАЄ, ТА КЛІТИНА, ІНФІКОВАНА ЦИМ ВІРУСОМ Translated By PlajИНФЕКЦИОННЫЕ КЛОНЫ РНК-ВИРУСОВ И В АКЦИНЫ, А ТАКЖЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ, РАЗРАБОТАННЫЕ НА ИХ ОСНОВЕ INFECTIOUS CLONES OF RNA-VIRUSES AND VACCINES, AND ALSO DIAGNOSTIC ANALYSES DEVELOPED ON THEIR BASE

(56) MEULENBERG et.al. "Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV", VIROLOGY, vol. 192, 1993, p. 62-72 з BOYER J.-C. et.al. "Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses", VIROLOGY, vol. 198, 1994, p. 415-426 з EP 0440219, A, 07.08.1991 2

(71)

(72) NL Меленберг Йоханна Якоба Марія NL Меленберг Йоханна Якоба Марія NL Меленберг Йоханна Якоба Марія NL Пол Йоханнес Марія Антоніус NL Пол Йоханнес Марія Антоніус NL Пол Йоханнес Марія Антоніус NL Бос-Де Рейтер Юді Норма Алетта NL Бос-Де Рейтер Юді Норма Алетта NL Бос-Де Рейтер Юді Норма Алетта

(73) DE БЕРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА ГМБХ DE Берингер Ингельхайм Ветмедика ГмбХ DE BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Изобретение касается способа генерирования инфекционного клона на основе генома РНК-вируса с положительной цепью семьи Arteriviridae, которая включает продуцирование рекомбинантной нуклеиновой кислоты указанного РНК-вируса и отбор инфекционных клонов путем трансфекции клетки-хозяина указанной рекомбинантной нуклеиновой кислотой, в результате чего указанное клетка-хозяин является не восприимчивой к инфицированию указанным вирусом. Настоящее изобретение, кроме того, касается молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которое включает упомянутый клон, модифицированных РНК-вирусов и вакцин на их основе.

Винахід стосується способу генерування інфекційного клону на основі геному РНК-вірусу з позитивним ланцюгом родини Arteriviridae, який включає продукування рекомбінантної нуклеїнової кислоти вказаного РНК-вірусу та відбір інфекційних клонів шляхом трансфекції клітини-хазяїна зазначеною рекомбінантною нуклеїновою кислотою, в результаті чого зазначена клітина-хазяїн є не сприйнятливою до інфікування зазначеним вірусом. Даний винахід, крім того, стосується молекул рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка включає згаданий клон, модифікованих РНК-вірусів і вакцин на їх основі.

The invention comprises a method for generating an infectious clone based on the genome of a positive strand RNA virus which has a genome of at least about 15 kb. The invention further comprises a method for generating an infectious clone based on the genome of an RNA virus, said method further comprising selecting infectious clones by transfecting a host cell with said recombinant nucleic acid whereby said host cell is in essence not susceptible to infection with said virus. The invention further provides modified RNA viruses and vaccines.

1. Спосіб генерування інфекційного клону на основі геному РНК-вірусу з позитивним ланцюгом родини Arteriviridae, який включає продукування рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що включає принаймні одну повнорозмірну ДНК-копію, або *in vitro*-транскрибовану РНК-копію вказаного РНК-вірусу з позитивним ланцюгом родини Arteriviridae і, крім того, включає відбір інфекційних клонів шляхом трансфекції клітини-хазяїна вказаною рекомбінантною нуклеїновою кислотою, в результаті чого вказана клітина-хазяїн є, по суті, не сприйнятливою до інфікування зазначеним вірусом.
2. Спосіб згідно з п. 1, де зазначеною клітиною-хазяїном є клітина ВНК-21.
3. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка включає інфекційний клон, отриманий способом згідно з п. 1 або 2.
4. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з п. 3, де вказаним вірусом є PRRSV.
5. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з п. 3 або 4, де послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує маркер вірулентності та/або серологічний маркер, є модифікованою.
6. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з п. 5, де послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує зазначений маркер, розташована усередині будь-якої із відкритих рамок зчитування, кодуючих структурні вірусні білки.
7. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з п.6, де одна з відкритих рамок зчитування являє собою ORC7 будь-якого вірусу з Arteriviridae.
8. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з п. 6 або 7, де одна з відкритих рамок зчитування замінена на ORC7 вірусу Arteriviridae.
9. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з будь-яким із пп. 3-8, в яку вставлена принаймні одна додаткова гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти.
10. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з п. 9, де вказана гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти кодує антиген.
11. Молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти згідно з будь-яким із пп. 3-10, де відкрита рамка зчитування є модифікованою .
12. Модифікований РНК-вірус, що включає рекомбінантну нуклеїнову кислоту згідно з будь-яким із пп. 3-11.
13. Вакцина, що включає модифікований РНК-вірус згідно з п. 12.
14. Клітина, інфікована модифікованим РНК-вірусом згідно з п. 13.

Даний винахід стосується області РНК-вірусів і інфекційних клонів, отриманих із РНК-вірусів. Крім того даний винахід стосується вакцин і діагностичних аналізів, розроблювальних шляхом використання і модифікації таких інфекційних клонів РНК-вірусів.

Технологія рекомбінантних ДНК являє собою надзвичайно різноманітні і потужні методи молекулярної біології, здійснювані за допомогою модифікації нуклеїнових кислот на рівні ДНК, і дозволяє аналізувати і модифікувати геноми на молекулярному рівні. Відповідно до цього, віруси, через малий розмір їх геному, є особливо відповідними для таких маніпуляцій. Однак, техніка рекомбінантних ДНК не може бути безпосередньо застосована до неретровірусних РНК-вірусів, оскільки реплікація цих вірусів не включає стадію проміжних ДНК. У випадку таких вірусів, перед застосуванням технології рекомбінантних ДНК, повинні бути розроблені інфекційні клони (наприклад, ДНК-копії або *in vitro*-транскрибовані РНК-копії або їх похідні), які можуть бути введені в геном цих вірусів для генерування модифікованого вірусу. Інфекційні клони можуть бути отримані за допомогою конструювання повнорозмірної (що має довжину геному) кДНК (це поняття використовується в даному описі в широкому значенні і включає ДНК-копію РНК, а не тільки ДНК-копію мРНК) досліджуваного вірусу, після чого інфекційний транскрипт синтезується *in vivo* у клітинах, трансфектованих повнорозмірною кДНК, але, при цьому, інфекційні транскрипти можуть бути також отримані шляхом *in vitro*-транскрипції з *in vitro*-лігованих фрагментів кДНК, які складають повний вірусний геном. В усіх випадках, транскрибована РНК несе всі модифікації, які були введені в кДНК, і може бути використана для подальшого переносу модифікованого таким чином вірусу.

Інфекційні кДНК-клони і інфекційні *in vitro*-транскрипти були генеровані для великої кількості РНК-вірусів із позитивним ланцюгом (див. огляд Boyer & Naenni, *Virology* 198, 415-426), які мають геном розміром аж до 12 т.п.о. або трохи більше. Довжина вірусного гена Pestiviruses на сьогоднішній день є найбільшим геномом РНК-вірусу з позитивним ланцюгом, із якого були отримані інфекційні клони (Moormann et al., *J.Vir.*70:763-770). Проблеми, пов'язані з довжиною вірусного геному, полягають не тільки у важкості одержання і збереження довгих і стабільних кДНК-клонів у бактеріях, але також і в інфекційності вихідного РНК-транскрипта, реплікація якого у клітині-хазяїні повинна бути здійснена без допомоги звичайно асоційованих вірусних білків, зв'язаних із реплікацією вірусу. Для досягнення успішного зараження, вірусні транскрипти повинні взаємодіяти з білками, які кодуються вірусом, цілком ймовірно, із вірусною репліказою і компонентами клітини-хазяїна, такими як, трансляційний комплекс; а тому структура вірусних транскриптів повинна, по можливості, найбільш точно імітувати структуру РНК-віриону. Додаткові проблеми можуть виникнути в зв'язку з тими РНК-вірусами з позитивним ланцюгом, які реплікуються згідно з механізмом субгеномної інформаційної РНК, транскрибованої з 3'-кінця геному і з тими РНК-вірусами з позитивним ланцюгом, які генеруються в процесі реплікації дефектних частинок, що інтерферують, таких як, "голі" капсиди або "порожні" вірусні частинки з оболонкою, які містять декілька структурних білків, і тільки частину геному. Присутність неповних фрагментів вірусної РНК або, наприклад, матриксних або нуклеокапсидних білків, які взаємодіють або інтерферують із транскрибуємою вірусною РНК або з реплікативною проміжною вірусною РНК, і руйнуючих її структуру, буде призводити до припинення синтезу повнорозмірного ланцюга РНК, і, тим самим, до продукування інфекційного вірусу, який містить повну геному РНК.

Лелістадський вірус (LV), називаний також вірусом репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PRRSV, довжина геному 15,2т.п.о.), є членом родини Arteriviridae, яка також включає вірус артрити коней (EAV, довжина геному 12,7т.п.о.), вірус підвищення рівня лактат-дегідрогенази (LDV, довжина геному, принаймні, 14,2т.п.о.), і вірус геморагічної лихоманки мавп (SHFV, довжина геному приблизно 15 т.п.о.) (Meulenberg et al., 1993a; Plagemann & Moennig, 1993).

Нещодавно, Міжнародний комітет по таксономії вірусів вирішив включити цю родину в новий ряд вірусів, Nidovirales, разом із вірусами Coronaviridae (довжина геному 28-30т.п.о.) і Toroviridae (довжина геному від 26 до 28т.п.о.). Ряд Nidovirales являє собою РНК-віруси з оболонкою, які містять геном РНК із позитивним ланцюгом, і синтезують 3'-гніздову серію субгеномних РНК в процесі реплікації. Субгеномні РНК коронавірусів і артерівірусів містять лідерну послідовність, яка починається з 5'-кінця вірусного геному (Sraan et al., 1988; Plagemann & Moennig, 1993). Субгеномні РНК торовірусів не мають лідерної послідовності (Snijder & Horzinek, 1993). Відкриті рамки зчитування (ORF) 1a і 1b, які кодують РНК-залежну РНК-полімеразу, експресуються з геномною РНК, тоді як, більш дрібні ORF у 3' кінця геномів Nidovirales, які кодують структурні білки, експресуються із субгеномних мРНК.

PRRSV (лелістадський вірус) був уперше виділений у 1991 році Wensvoort et al, (1991) і було показано, що він є етнологічним агентом, який викликає нове невідоме захворювання, таке як, репродуктивно-респіраторний синдром свиней (PRRS), Основними симптомами захворювання є утруднення дихання у свиней і викидні у свиноматок. Хоча основні спалахи цього захворювання, які спостерігалися вперше в США в 1987р. і в Європі в 1991р., носили обмежений характер, цей вірус усе ще викликає економічні втрати в поголів'я свиней у США, Європі і Азії. PRRSV переважно розвивається в альвеолярних макрофагах легень (Wensvoort et al., 1991). Декілька клітинних ліній, таких як CL2621, і інші клітинні лінії, клоновані з клітинної лінії нирок мавп MA-104 (Benfield et al., 1992, Collins et al., 1992; Kim et al., 1993), також є сприйнятливі до цього вірусу. Деякі добре відомі штами PRRSV є доступними під реєстраційними номерами CNCM 1-1102,1-1140, 1-1387,1-1388, ECACC V93070108, або ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 і VR 2402. Геном PRRSV був цілком або частково секвенований (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, Murt-haugh et al., 1995), і цей геном, крім РНК-залежної РНК-полімерази (ORF 1a і 1b), кодує: шість структурних білків, із яких чотири оболонкових глікопротеїна позначені GP₂ (ORF2), GP₃ (ORF3), GP₄ (ORF4) і GP₅ (ORF5); неглікозилований мембранний білок M (ORF6); і нуклеокапсидний білок N (ORF7) (Meulenberg et al., 1995, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996). Імунологічна характеристика і нуклеотидне секвенування штамів EP і US PRRSV дозволили ідентифікувати серед штамів PRRSV невеликі антигенні різниці, локалізовані в структурних вірусних білках (Nelson et al., 1993; Wensvoort et al., 1992; Murtaugh et al., 1995).

Свині можуть бути інфіковані PRRSV шляхом ороназального введення. Вірус в легенях поглинається альвеолярними макрофагами легень, і реплікація вірусу PRRSV у цих клітинах завершується через 9 годин.

За 12 годин PRRSV із легень потрапляє в легеневі лімфатичні вузли, а через 3 дні він потрапляє в периферичні лімфовузли, кістковий мозок, і в селезінку. В цих ділянках, лише декілька ліній клітин давали позитивне забарвлення на вірусний антиген. Цей вірус є присутнім у крові протягом, принаймні, 21 дня, а часто і більш тривалий час. Через 7 днів, у крові виробляються антитіла проти PRRSV. Спільна присутність вірусу і антитіла в PRRSV-інфікованих свиней вказує на те, що, незважаючи на присутність антитіла, вірусна інфекція зберігається протягом тривалого періоду часу, хоча і на низькому рівні. Протягом, принаймні, 7 тижнів, популяція альвеолярних клітин у легенях відрізняється від популяції в нормальних легенях SPF.

Для інфікування свиней вірусом PRRSV ороназальним способом і продукування нормальної імунної відповіді у свиней потрібна присутність вірусної оболонки, яка, крім іншої дії, викликає продукування нейтралізуючих антитіл, спрямованих проти одного або декількох оболонкових білків; такі антитіла можуть робити вірус неінфекційним. Проте, після поглинання альвеолярними макрофагами, цей вірус також продукує "голі" капсиди, сконструйовані з РНК, інкапсулованої білками М та/або N, які іноді містять один із глікопротеїнів. Внутрішньоклітинна і позаклітинна присутність цих неповних вірусних частинок або (іноді) голих капсидів може бути продемонстрована за допомогою електронної мікроскопії. В деяких випадках, можуть бути виявлені голі капсиди без нуклеїнової кислоти, що міститься в них. Голі капсиди поширюються по організму з кровотоком, і поглинаються з крові макрофагами селезінки, лімфатичних вузлів і кісткового мозку. Ці "голі", але інфекційні вірусні капсиди не можуть бути нейтралізовані антитілами, вироблюваними організмом свині, чим і пояснюється персистенція вірусної інфекції в присутності антитіл. Таким чином, потомство макрофагів від інфікованих клітин кісткового мозку поширює вірусну інфекцію на нові ділянки організму тварин. Оскільки не всі клітини лінії диференціювання макрофагів кісткового мозку є інфікованими, то лише невелика кількість макрофагів у периферичних ділянках є інфікована і продукує вірус. Капсиди PRRSV, які складаються тільки з білків ОРС7, можуть бути утворені у відсутності інших вірусних білків, наприклад, шляхом інфікування макрофагів химерним веїгсорним вірусом "псевдорабівірус-ОРС7". Вірус PRV був підданий маніпуляції так, щоб він містив ОРС7-генетичну інформацію PRRSV. Через 18 годин після інфікування, цитоплазма інфікованих клітин містить велику кількість невеликих порожніх сферичних структур, які мають розмір нуклеокапсидів вірусу PRRS.

Таким чином даний винахід відноситься до інфекційного клону, який походить від вірусу з довжиною геному, що значно перевищує максимальну довжину геному РНК-вірусів із позитивним ланцюгом, із яких дотепер одержували інфекційні клони. В експериментальній частині даної заявки описано одержання інфекційного клону, на основі або клону, який походить, від вірусу PRRSV, із довжиною геному 15,2т.п.о., однак, такі клони можуть бути також отримані з вірусів LDV і SHFV, що також мають довжину геному від приблизно 15т.п.о., і з вірусу EAV, хоча довжина його геному значно менша/ а також із вірусів із більш довгим геномом, таких як, Coronaviridae або Toroviridae.

Даний винахід також стосується способу продукування інфекційних клонів, який дозволяє уникнути проблем, які виникають при синтезі вірусного ланцюга РНК, і зв'язаних із присутністю фрагментів неповної вірусної РНК, або наприклад, матриксних або нуклеокапсидних білків, які взаємодіють або інтерферують із РНК-транскриптом, які транскрибуються, або з реплікативною проміжною РНК, і руйнуючи її структуру, що перешкоджає синтезу повнорозмірного РНК-ланцюга, і, тим самим, продукуванню інфекційного вірусу. Даний винахід стосується способу генерування інфекційних клонів шляхом трансфекції клітин-хазяїв, які є, в основному, не сприйнятливими до інфікування вірусом дикого типу, рекомбінантною нуклеїновою кислотою, отриманою на основі геному зазначеного вірусу, із наступним "порятунком" потомства інфекційного вірусу з зазначеної клітини-хазяїна шляхом його пасивування на клітини або шляхом спільного культивування з клітинами, які є сприйнятливими до цього вірусу. В порівнянні з клітинами, які звичайно використовуються для реплікації досліджуваних вірусів, клітини, що є, в основному, не сприйнятливими, можуть бути лише злегка сприйнятливими, або зовсім не сприйнятливими до досліджуваного вірусу, але вони можуть бути абсолютно сприйнятливими до інших вірусних штамів. Даний винахід стосується способу продукування інфекційних клонів шляхом трансфекції клітин-хазяїв, які не є сприйнятливими до інфікування вірусом дикого типу, що дозволяє уникнути генерування голих капсидів або неповних вірусних частинок, які містять РНК-фрагменти і матриксні або нуклеокапсидні білки, які перешкоджають синтезу вірусного РНК-ланцюга. "Порятунком" інфекційного вірусу з трансфектованих таким чином клітин-хазяїв здійснюють шляхом пасивування на клітини, які є сприйнятливими до цього вірусу. В експериментальній частині описаний спосіб такого одержання інфекційного клону PRRSV, але цей спосіб може бути також застосований до інших РНК-вірусів із позитивним ланцюгом.

Даний винахід також передбачає можливість генерування модифікованого інфекційного клону шляхом застосування технології рекомбінантних ДНК. Такими модифікаціями можуть бути одиночні або множинні мутації, заміни, делеції або інсерції, або їх комбінації, які можуть бути здійснені з використанням технології рекомбінантних ДНК, відомої фахівцям. Таким чином, даний винахід стосується модифікованих РНК-вірусів, які можуть бути використані для дослідження РНК-вірусів і для виготовлення вакцин.

Даний винахід також стосується інфекційних клонів, які походять, наприклад, від Arteriviridae, такого як, PRRSV, який може бути використаний в якості моновакцини проти захворювання, що викликається вірусом, на основі якого був отриманий цей клон. Так, наприклад, інфекційний клон на основі PRRSV може бути використаний для дослідження маркерів вірулентності або серологічних маркерів PRRSV. Відомими серологічними маркерами PRRSV є, наприклад, маркери, локалізовані, наприклад, на будь-якому із структурних білків PRRSV, що кодуються ОРС2-7, але вони можуть бути також виявлені в білках, що кодуються ОРС 1a і 1b. Маркери вірулентності присутні в ОРС 1a і 1b, які кодують неструктурні білки PRRSV, але вони можуть бути також виявлені в білках, які кодуються ОРС2-7. Шляхом модифікації геному інфекційного клону, що стосується цих маркерів, можна одержати PRRSV, який не є або є значно менше вірулентним, ніж його батьківський штам, та/або цей штам модифікують шляхом делеції або введення серологічних маркерів так, щоб можна було здійснювати серологічну диференціацію між вакцинованими свинями і свинями, інфікованими вірусом дикого типу. Такі модифікації здійснюють, наприклад, із

використанням інфекційних клонів PRRSV, у яких нуклеотидну послідовність, яка кодує OPC7-білок N, замінюють OPC7-білком ATCC VR2332 або LDV.

Даний винахід також стосується інфекційних клонів, наприклад, клонів, які походять від вірусів Arteriviridae, таких як, PRRSV, які можуть бути використані в якості системи доставки або в якості вірусної векторної вакцини для широкого ряду антигенів. В таких клонах присутні гетерологічні послідовності нуклеїнових кислот, які не відповідають патогенній послідовності досліджуваного вірусу. Ці гетерологічні послідовності нуклеїнових кислот можуть, наприклад, походити від послідовностей, які кодують будь-який обраний антиген. Таким антигеном є білок або пептид, який може індукувати імунітет проти патогена. Оскільки цей вірус інфікує макрофаги, і клітини лінії диференціювання макрофагів у кістковому мозку поширюють антиген-вміщуючий вірус через своє клітинне потомство, то ця вірусна векторна вакцина інфікує клітини, які є центральними стосовно імунної системи, і може презентувати антигени для подальшого процесування. Векторна вірусна вакцина інфікує антигенпрезентуючі клітини подібно дендритним макрофагам або клітинам Купфера або іншим клітинам імунної системи, і може здійснювати це як (неповністю) вірусна частинка з оболонкою або як гола капсидна частинка. Оскільки інфікування голим капсидом або неповною вірусною частинкою забезпечує персистентну інфекцію, то імунологічний бустер-ефект буде викликати тривалий (через безперервну стимуляцію на низькому рівні) імунітет проти патогенів, із яких були відібрані антигени. Цей вірус може бути використаний в якості антигену-носія шляхом введення інформації для епітопів інших патогенних мікроорганізмів або речовин. Деякі з таких векторних вакцинних вірусів, що несуть чужорідну епітопну інформацію, можуть бути змішані і введені одночасно. Це дозволяє забезпечувати активний імунітет проти декількох різних антигенів одного патогена, або активний імунітет проти декількох різних патогенів.

Даний винахід також стосується інфекційних клонів, наприклад, отриманих від вірусу Arteriviridae, такого як, PRRSV, який може бути використаний в якості вакцини подвійного призначення. Так, наприклад, інфекційний клон на основі PRRSV може бути використаний для створення вакцини з метою захисту від PRRSV і від іншого патогена, просто шляхом розробки векторної вакцини разом із розробкою одноцільової вакцини спрямованої проти PRRS. Спеціальна вакцина подвійного призначення може бути розроблена так, щоб вона забезпечувала захист проти респіраторного захворювання у свиней шляхом введення в PRRS-вакцини антигенів, які походять від будь-яких інших респіраторних патогенів широкого ряду, які, як відомо, інфікують свиней.

Даний винахід також стосується вакцин, як одного призначення, так і подвійного призначення або до векторних вакцин, які є безпечними в тому значенні, що вони не можуть впливати на навколишнє середовище. Безпека вакцини (яка не впливає на навколишнє середовище) може бути забезпечена шляхом видалення інформації, яка відноситься до вірусних білків, і яка є необхідною для продукування інфекційного вірусу з оболонкою. Цей вірус повинен розмножуватися в клітинній лінії, яка конститутивно експресує зазначений білок. Вірус, який реплікується в цій комплементарній клітинній лінії, має повну оболонку, і здатний інфікувати макрофаги у свиней. Після одного циклу реплікації, вірусне потомство, що не містить інформації для білка оболонки, більше не здатне інфікувати інші клітини, на відміну від вірусу з оболонкою. Інфікування макрофагів, які знаходяться в організмі ще можливо під дією голого капсиду або неповної вірусної частинки.

Даний винахід також стосується вірусних антигенів і білків, які можуть бути зібрані з клітинних культур, інфікованих модифікованими РНК-вірусами даного винаходу. Такі антигени можуть бути використані для діагностичних аналізів, таких як, ELISA або діагностичних аналізів іншого типу, відомих експерту в даній області. Ці аналізи можуть бути використані у вигляді незалежних тестів для первинної діагностики або у вигляді супровідних тестів, застосовуваних для популяцій тварин, які були вакциновані ідентифікувальною або маркерною вакциною, отриманою на основі РНК-вірусів даного винаходу.

Експериментальна частина

Продуктування кДНК-клонів, із яких інфекційні РНК можуть бути транскрибовані *in vitro*, стало головним інструментом для молекулярно-генетичних аналізів вірусів, які містять РНК із позитивним ланцюгом. Ця технологія може застосовуватися до вірусів, які містять РНК із позитивним ланцюгом, і РНК-геном яких може функціонувати як мРНК і ініціювати повний цикл інфікування після його введення в клітини-хазяїни. Для ряду вірусів були описані інфекційні клони, що полегшило дослідження з генної експресії, реплікації, функціонуванню вірусних білків, і рекомбінації РНК-вірусів (див. огляд Воуег & Наєппі, 1994). Крім того, ці клони можуть бути використані для розробки нових вірусних векторів і вакцин. Інфекційний кДНК-клон для Arterivirus не був описаний дотепер. У даній заявці описане продуктування інфекційного клону PRRSV і його перше застосування для одержання химерних вірусів PRRSV.

Матеріали і методи Клітини і віруси

Штам Ter Huurte PRRSV (або LV) {депонований у CNCM, Париж, під номером доступу 1-1102} був виділений у 1991р. (Wensvoort et al., 1991), і культивований у первинних альвеолярних макрофагах або в клітинах CL2621. У цьому дослідженні використовували пасаж 6 штама Ter Huurte (TH), а також похідний штам LV4.2.1, який був адаптований для росту на клітинах CL2621 шляхом серійного пасивування. Альвеолярні макрофаги підтримували - на ростовому середовищі RPMI-1640 (Flow), а клітини CL2621 підтримували на мінімальному підтримуючому середовищі Хенкса (Gibco BRL/Life Technologies). Клітини ВНК21 підтримували на мінімальному підтримуючому середовищі Дульбекко. Для експериментів по трансфекції, клітини ВНК-21 культивували на мінімальному підтримуючому середовищі Глазго (Gibco BRL/Life Technologies) відповідно до методу Liljestrom і Garoff(1993).

Виділення вірусних РНК

Внутрішньоклітинну РНК виділяли з альвеолярних макрофагів або клітин CL2621, через 24 години після інфікування вірусом PRRSV при множинності зараження 1, як описано раніше (Meulenber et al., 1993a). Для виділення геномної РНК віриону, віриони були очищені на градієнтах сахарози як описано Nieuwsstadi et al. (1996) і ресуспендовані в TNE (0,01M Трис-НСІ, рН 7,2, 0,1M NaCl, 1mM EDTA). 1мл протеїназного буфера К (100mM Трис-НСІ, рН 7,2, 25mM EDTA, 300mM NaCl, 2% (мас/об.) ДСН) і 0,4мг протеїнази К (Boehringer Mannheim) додавали до 1мл очищених вірионів PRRSV (10^8 TCID₅₀). Цю реакційну суміш інкубували при 37°C

протягом 30 хвилин. РНК екстрагували один раз сумішшю фенолу і хлороформу (1:1), і осаджували етанолом. РНК зберігали в етанолі при – 20°C. Одну десяту частину цього препарату використовували в реакціях зворотної транскрипції (RT).

Клонування 5'- і 3'-кінців геному PRRSV

5'-кінець вірусного геному PRRSV клонували з використанням модифікованого методу одноланцюгового лігування в одноланцюгову кДНК (SLIC; Edwards et al., 1991). Одну десяту частину віриону РНК, отриману як описано вище, використовували в реакції RT з праймером 11U113 (5'-TACAGGTGCCTGATCCAAAGA 3'), комплементарним нуклеотидам 1232-1251 геному. Реакцію RT здійснювали в кінцевому об'ємі 20мкл, як було описано раніше (Meulenberg et al., 1993b). Потім 2мкл 6М NaOH додавали до RT-реакційної суміші, і РНК гідролізували протягом 30 хвилин при 37°C. Одноланцюгову кДНК очищали з використанням набору Boehringer Mannheim для високого ступеня очищення PCR-продукту. Очищену кДНК осаджували етанолом, ресуспендували в TE, і лігували з якрним праймером ALG3

(5'-CACGAATTCATATCGATTCTGGATCCTTC 3'). Цей праймер містить EcoRI-, ClaI, і BamHI-сайти, а його 3'-кінець модифікований аміно-блокувальною групою для попередження самолігування. Одноланцюговий кДНК-продукт був лігований із 4пмоль ALG3 у 50мм Трис-НСІ (рН 8,0), 10мм МпСІ₂, 10мкг/мл BSA, 25% ПЕГ, 1,0мм гексамінхпориду кобальту, 40мкМ АТР, і 0,5мкл (10од.) РНК-лігази Т4 (New England Biolabs), протягом ночі при кімнатній температурі. Одну третину реакційної суміші для лігування використовували в якості матриці для PCR із використанням праймерів LV69 (5'-AGGTCGTCGACGGGCCCGTGAT-CGGGTACC-3') і ALG4 (5'-GAAGGATCCAGAATCGATAG). Праймер LV69 комплементарний нуклеотидам 594-615 геному LV, а праймер ALG4 комплементарний якрному праймеру ALG3. Умови PCR були описані Meulenberg et al., (1993b), і отриманий продукт був гідролізований ферментами EcoRI і Sail і клонований у рGEM-4Z. Аналогічну стратегію використовували для клонування 5'-кінців LV-геному з внутрішньоклітинної РНК LV. З цих експериментів було використано 10мкг повної клітинної РНК, виділеної з клітин CL2621, інфікованих LV. 5'-кДНК-клони секвенували, і один клон, рABV387, який містить подовження у 10 нуклеотидах, у порівнянні з опублікованою послідовністю PRRSV (Meulenberg et al., 1993a), використовували для проведення наступних експериментів.

3' кінець кДНК-кпону, який містить довгий poly (A)-хвіст, конструювали за допомогою зворотної транскрипції РНК LV із використанням праймера LV76 (5'-TCTAGGAATTCTAGACGATCG(T)3'), який містить EcoRI-, XbaI-, і PvuII-сайти. Після реакції зворотної транскрипції проводили PCR із використанням праймера LV75 (5'-TCTAGGAATTCTAGACGATCGT-3'), який ідентичний праймеру LV76, за винятком poly(T)-хвоста; і праймера 39U70R (5'-GGAGTGGHAACCTCGTCAA-3'), значенневого праймера, відповідного нуклеотидам 14566-14585 геному LV і який містить HpaI-сайт. Отримані PCR-продукти гідролізували ферментами HpaI і EcoRI і клонували в кДНК-клон рABV39, рестриктований тими ж ферментами (фіг.1). Два клони кДНК, які містять poly(A)-хвіст із 45A (рABV382) і 109A (рABV392) і правильну геномну кДНК-послідовність, як було оцінено за допомогою олігонуклеотидного секвенування, використовували для конструювання повнорозмірного геномного кДНК-кyonu.

Аналіз послідовності

Олігонуклеотидні послідовності визначали з використанням набору для секвенування PRISM™ Ready Reaction Dye Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit і автоматичного секвенатору Applied Biosystems.

Конструювання повнорозмірних геномних кДНК-клонів PRRSV

кДНК-кпони, генеровані раніше для визначення нуклеотидної послідовності геному LV (Meulenberg et al., 1993a), лігували разом у відповідних рестрикційних сайтах, вказаних на фіг.1. Плазмиду рABV254 конструювали з клонів рABV 25, 11, 12 і 100, і використовували в попередньому дослідженні (den Boon et al., 1996). Стандартні процедури клонування здійснювали як описано Sambrook і ін. (1989). В результаті були отримані три плазмиди, які містять кДНК-послідовності LV, які перекриваються, у висококопійній плазміді рGEM-4Z. Плазмиди рABV331 і рABV369 склалися з нуклеотидів 5-6015 геному LV. В серії з 6 незалежних кДНК-клонів, які були секвеновані в цій області, була виявлена різниця в нуклеотидах положення 3462 у відношенні 1:1. Ця різниця в нуклеотидах призводила до заміни амінокислоти в положенні 1084 у OPC 1A (Leu замість Pro). Оскільки неможливо було передбачити вплив цієї амінокислоти на інфекційність, то був також клонований Leu-кодуєчий кДНК-фрагмент у рABV331 шляхом заміни в EcoPV-(нуклеотид 3403) і SacII-(нуклеотид 3605) сайті, що призводило до одержання плазмиди рABV369. Плазміда рABV384 складається з нуклеотидів 5168-9825 геному LV. Оскільки поки не існує відповідного кДНК-кyonu, який перекривався б з плазмідами рABV20 і рABVS, і який можна було б, у кінцевому рахунку лігувати з кДНК-послідовностями рABV331 і рABV369, то були генеровані два нових кДНК-фрагменти за допомогою RT-PCR. В одній PCR використовували значенневий праймер LV59 (5'-TCGGAATCTAGATCTCACGTGGTGCAGCTGCTG 3'), що відповідає нуклеотидам 5169-5186, і антизначенневий праймер 61U303 (5'-OATCAACACCTGTGCAGACC 3'), комплементарний нуклеотидам 6078-6097. В іншій PCR використовували значенневий праймер 61U526R (5'-TTCTTCTCT-GGCGCATGAT 3'), що відповідає нуклеотидам 5936-5955, і праймер LV60 (5'-GTACTGGTACCGGATCCGTGAGGATGTTGC 3'), комплементарний нуклеотидам 6727-6745. Ці два PCR-фрагменти лігували разом у рABV20 із використанням XbaI-сайта, введеного в LV59, внутрішнього AroI-сайта (нуклеотиди 6006), і BamHI-сайта в нуклеотиді 6740, який був також введений у праймер LV60. Новий кДНК-фрагмент був цілком секвенований і не містив ніякої мутації, яка призводила б до різниці в амінокислотах у порівнянні з опублікованою послідовністю (Meulenberg et al., 1993a). Плазміда рABV368 включала нуклеотиди 8274-13720 геному PRRSV. Оскільки додаткове лігування кДНК-фрагментів у рGEM-4Z призводило до одержання нестабільних клонів, то вставки рABV331/369, рABV384 і рABV368 лігували з 5'- і 3' кДНК-фрагментами в рOK12 (Viera & Messing, 1991). Передбачалося, що плазмідний вектор є більш відповідним для клонування чужорідних послідовностей кДНК великого розміру, оскільки він є більш низькокопійним, ніж рGEM-4Z. Плазмиди переносили в штам DH5α E.coli, культивованій при 32°C в присутності 15мкг/мл канаміцину для збереження, по Можливості, низької кількості копій. Спочатку, кДНК-фрагменти рABV382 ((A)₄₅) і рABV392 ((A)₁₀₉) вирізали шляхом гідролізу ферментом EcoRI, і цей сайт модифікували полімеразою Кленова

(Pharmacia) для затуплення кінців із наступним гідролізом ферментом BamHI. Ці фрагменти клонували в рОК12, пдролізували ферментами BamHI і FspI, де останній сайт був також модифікований для затуплення кінців, і одержували рABV394 і рABV395. Аналогічним способом був видалений промотор РНК-полімерази Т7, присутній у рОК1. Після цього, кДНК-фрагменти рABV368 і рBV384 лігували з 3' кінцем кДНК-кітонів з використанням BclI-сайта (нуклеотид 13394), ScaI-сайта (нуклеотид 8657) і BamHI- і BglII-сайтів у фланкуючих або векторних послідовностях. В результаті цього були отримані плазміді рABV401 і рABV402 (фіг.1).

5'-кДНК-клон, який містить промотор РНК-полімерази Т7, безпосередньо лігований із 5'-кінцем геному LV, ампліфікували за допомогою PCR із рABV387 з використанням праймерів LV83 (5'-GAATTCAGTAGTTAATACGACTCACTA-TAGATGATGTGTAGGGTATTCC 3') і LV69. LV83 складається з (у напрямку 5'→3') EcoRI- і SpeI-сайта, промоторної послідовності РНК-полімерази Т7, проте G для ініціації транскрипції, і нуклеотидів 1-19 геному LV. PCR-фрагмент клонували в EcoRI- і SalI-сайт рОК12, в результаті чого одержували плазміді рABV396. Правильність послідовності рABV396 оцінювали шляхом олігонуклеотидного секвенування. Потім, кДНК-фрагменти LV плазміді рABV331 і рABV369 вирізали ферментами ApaI і BamHI, і лігували в рABV396, гідролізовану ферментами ApaI і BamHI. І нарешті, отримані 5'-кДНК-фрагменти клонували в рABV401 і рABV402 із використанням SpeI-сайта, розташованого вище промотора РНК-полімерази Т7, і унікального PmlI-сайта в положенні 5168 вірусного геному. Таким чином, кДНК-клони, які мають довжину, рівну довжині геному, були отримані як клони, що відповідають вірусам, подібним батьківському штаму, і химерним вірусам, які містять чужорідні рамки зчитування.

Продуктування мутантних вірусів, які містять PacI- та/або SwaI-сайти Для введення унікального PacI-сайта в кДНК-клон геномної довжини безпосередньо нижче гена ORC7, обидва нуклеотиди Т і А в положеннях 14987 і 14988 заміняли на нуклеотид А в реакції PCR із використанням значенневого праймера LV108 (5'-GGAGTGGTTMCCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAAAACCAGA-GCC 3') з антизначенневим праймером LV112 (5'-CCATTACCTGACTGTTTAAATTAACCTTGCACCCTGA 3'), і значенневого праймера LV111 (5'-TCAGGGTGCAAGTTAATTAACAGTCAGGTGAATGG 3')/C LV75. Аналогічно, унікальний SwaI-сайт створювали шляхом заміни G в положенні 14980 на Т, а Т в положенні 14985 на А з допомогою PCR із використанням праймерів LV108 і LV110 (5'-GCTGACTGTCAATTTAAATTGACACCCTGAC 3') і праймерів LV109 (5'-GTCAGGGTGCAATTTAAATTGACAGTCAGG 3') і LV111. PCR-фрагменти лігували в рABV395 з використанням створених PacI- і SwaI-сайтів, і фланкуючих HpaI- і XbaI-сайтів, в результаті чого одержували плазміді рABV427 і рABV426, відповідно. Потім цей фрагмент вбудовували в плазміді рABV414 з використанням тих же самих унікальних HpaI- і XbaI-сайтів, в результаті чого одержували плазміді рABV437 і рABV442 (див. фіг.4). Для детекції мутації маркерів у вірусі, виділеному з транскриптів рABV437 і рABV422, РНК виділяли із супернатантів альвеолярних макрофагів інфікованих свиней. Цю РНК використовували в PCR із зворотною транскриптазою для ампліфікації фрагмента, який має приблизно 0,6т.п.о. (який простягається від нуклеотиду 14576 до poly(A)-хвоста різної довжини) з використанням праймерів LV76, LV75 і 39U70R. Присутність генетичного маркера детектували шляхом гідролізу PCR-фрагментів ферментами PacI або SwaI.

In vitro-транскрипція і трансфекція РНК

Плазміді рABV414, рABV416, які містять повнорозмірний геномний кДНК-фрагмент LV, лінеаризували ферментом PvuI, і цей фрагмент був розташований безпосередньо нижче poly (A) хвоста. Плазміді рABV296, яка складалася з ORC4 у експресувальному векторі вірусу лісів Семлікі рSFVI (Meulenberg et al., 1997), лінеаризували ферментом SpeI, і ця плазміді слугувала в якості контролю в експериментах по in vitro-транскрипції і трансфекції. Лінеаризовані плазміді осаджували етанолом, і 1,5мкг цих плазмід використовували для in vitro-транскрипції РНК-полімерази Т7 (плазміді рABV414, рABV416) або РНК-полімерази Sp6 (рABV296) у відповідності із способами, описаними для SFV Liljestrom & Garoff (1991 і 1993). In vitro-транскрибовану РНК осаджували ізопропанолом, промивали 70% етанолом, і берегли при -20°C аж до її використання. Клітини ВНК-21 висівали в лунки М6 (приблизно 10⁶ клітин/лунку), і трансфekuвали 2,5 мікрофамми РНК, змішаними з 10мкл ліпофектину в оптимальній кількості, як описано Liljestrom & Garoff (1993). Альтернативно, РНК вводили в клітини ВНК-21 шляхом електропорації. У цьому випадку, 10мкг in vitro-транскрибованої РНК або 10мкг внутрішньоклітинної РНК LV трансфekuвали приблизно в 10⁷ клітин ВНК-21 з використанням умов електропорації, описаних Liljestrom & Garoff (16). Середовище збирали через 24 години після трансфекції, і переносили в клітини CL2621 для "порятунку" інфекційного вірусу. Трансфekuвані і інфіковані клітини тестували на експресію LV-специфічних білків за допомогою імунопероксидазного аналізу моношару клітин (IPMA), в основному, як описано Wensvoort і ін. (1986). Моноклональні антитіла (Mabs) 122,13, 122,59, 122,9 і 122,17, спрямовані проти білків GP₃, GP₄, M і N (van Nieuwstadt et al., 1996), були використані для забарвлення в IPMA.

Результати

Реконструювання 5'-кінцевої послідовності геномної РНКLV

Хоча інфекційність in vitro транскрибованих РНК із зрізаними 5'-кінцями була описана в літературі (Davis et al., 1989, Klump et al., 1990), проте, в основному, варто визнати, що для одержання інфекційних клонів необхідна повна вірусна послідовність, що включає самі крайні 5'- і 3'-кінці. Для клонування 5'-кінця геному LV використовували модифікований метод одноланцюгового лігування в одноланцюгову кДНК (SLIC; Edwards et al., 1991). Внутрішньоклітинну РНК, виділену з клітин CL2621, інфікованих LV і РНК LV, виділену з очищених вірионів, піддавали зворотній транскрипції з використанням праймера LV69, комплементарного 5'-кінцю ORC 1A. Продукт першого ланцюга кДНК лігували з якірним праймером ALG3, 3'-кінець якого блокували щоб уникнути самолігування. Ліговані продукти ампліфікували за допомогою PCR і клонували. Дванадцять клонів, які походять від внутрішньоклітинної РНК LV, і отриманих в результаті проведення двох незалежних PCR, і чотирнадцять клонів, які походять від РНК віриону, і отриманих в результаті проведення двох незалежних PCR, були секвеновані. З цих 26 кДНК-клонів, 22 клони містили подовження у 10 нуклеотидів (5' ATGATGTGTA 3') і порівнянні з кДНК-послідовністю, опублікованою раніше (Meulenberg et al., 1993), а в 4 клонах були відсутні від одного до трьох нуклеотидів у 5'-кінця цієї додаткової послідовності (таблиця 1). Цей факт наводить на думку, що зазначені десять нуклеотидів являють собою самий крайній 5'-кінець геному LV, а

тому ці нуклеотиди були включені у кДНК-клон геномної довжини.

Конструювання кДНК-клонів LV, що мають довжину, рівну довжині геному

Для конструювання кДНК-клонів LV, що має довжину, рівну довжині геному, кДНК, які були виділені і секвеновані раніше (Meulenberg et al., 1993a), приєднували в загальних рестрикційних ферментних сайтах у відповідності із стратегією, проілюстрованою на фіг.1. Крім того, для складання кДНК-клонів геномної довжини були сконструйовані нові кДНК-фрагменти. Один кДНК-фрагмент, який охоплює нуклеотиди 5168-6740, був створений за допомогою RT-PCR з метою лігування кДНК-послідовностей із клонів рABV5 і рABV20. Промотор РНК-полімерази T7 для *in vitro*-транскрипції був приєднаний безпосередньо до 5'-кінця геному LV за допомогою PCR, і цей новий кДНК-фрагмент, клонований у рABV396, вставляли в кДНК клон з геномною довжиною. Повторне секвеновання нуклеотидів 3420-3725 на шести нових і незалежних кДНК-клонах вказувало на те, що амінокислоти 1084 у OPC1a, Leu і Pro, присутні у співвідношенні 1:1. Оскільки неможливо передбачити вплив цих амінокислот на інфекційність РНК, транскрибованої з кінцевого кДНК-клонів геномної довжини, то для конструювання цього клону були використані обидва з них. На 3'-кінці були використані два різних кДНК-клони. Спочатку був виділений 3'-кінець кДНК-клонів, які містять poly (A)-хвости максимально з 20 A (Meulenberg et al., 1993a). Проте, виходячи з даних досліджень по визначенню довжини poly(A)-хвостів родинних вірусів, таких як, LDV (Chen et al., 1994), передбачалося, що цілий poly(A)-хвіст значно довший. Тому були отримані нові 3'-кінцеві кДНК-клони з використанням праймера LV76, який містить подовження із 40 залишків A. Ці кДНК-клони секвеновали, в результаті чого було виявлено, що вони містять подовження з 40-109 залишків A. Для одержання кДНК-клонів геномної довжини використовували кДНК-клон, який містить найбільш довгий poly(A)-хвіст (109 залишків A; рABV392). Оскільки довгі гомополімерні хвости можуть перешкоджати реплікації плазмідів в *E.coli* (Deng & Wu, 1981), то для використання в наступних стадіях клонування, був також відібраний другий клон, рABV382, який містить 45 залишків A. Проведені раніше спостереження показали, що збереження кДНК-клонів геномної довжини у висококопійних плазмідах сприяє акумуляції мутацій або розподілів, які призводять до втрати інфекційності транскриптів, синтезованих із цих клонів (Lai et al., 1991, Rice et al., 1987, Sumiyoshi et al., 1992). При спробі лігувати більш великі фрагменти кДНК клонів 331/339, 384 і 368 рABV у 5'- і 3'-кінці в рGEM-4Z спостерігалася також нестабільність плазмідів, а тому, ці клони, у кінцевому рахунку, були з'єднані один з одним у низькокопійному векторі рOK12 (Viera & Messing, 1991). В результаті цього були отримані кДНК-клони геномної довжини рABV414/415 і 416, які можуть бути стабільно розмножені в *E.coli* у використовуваних умовах культивування. Будь-якої різниці в стабільності кДНК-клонів геномної довжини, що містять 45 або 109 залишків A, не спостерігалось.

Інфекційність РНК LV

LV зростає переважно у свинячих альвеолярних макрофагах. Дотепер, клітинна лінія CL2621 або інші клони, які походять від клітинних ліній нирки мавпи MA104, являють собою лінії, які, як було вказано, поширюють LV (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992; Kim et al., 1993). Отже, клітини CL2621 були використані з метою визначення оптимальних умов для трансфекції РНК LV. РНК, виділену із LV-інфікованих клітин CL2621, трансфekuвали в клітини CL2621 у різних дозах із застосуванням різних методів, таких як, методи з використанням ліпофектину, ліпофектаміну, DEAE-декстрану, і електропорація. Клітини скринували на цитопатичну дію і наявність бляшок через 7 днів після трансфекції, але ці ознаки інфекційного вірусу не були виявлені. Крім того, LV-специфічні антигени не могли бути детектовані в IPMA з використанням LV-специфічних Mab. РНК, транскрибована *in vitro* із рABV296, була використана в цих експериментах в якості контролю. Плазмід рABV296 складається з гена OPC4, кодуєчого GP₄, і вбудованого у експресувальний вектор рSFV1 (Meulenberg et al., 1997). Ефективність трансфекції РНК рABV296 тестували шляхом забарвлення трансфekuваних клітин у IPMA із використанням GP₄, - специфічних Mab. Найбільш висока ефективність трансфекції, отримана для 0,01% позитивних клітин CL2621, була досягнута шляхом електропорації, тоді як, 80-90% позитивних клітин одержували з використанням умов, аналогічних тим, які були використані для клітин ВНК-21. Ці результати вказують на те, що клітини CL2621 не придатні для експериментів по трансфекції, тоді як клітини ВНК-21 (не сприйнятливі до інфікування вірусом дикого типу) зненацька виявилися дуже відповідними для цієї мети. Тому для тесту на інфекційність РНК LV були використані клітини ВНК-21. 2мкг РНК, виділених із клітин IV-інфікованих CL2621, трансфekuвали приблизно в 10⁶ клітин ВНК-21 із використанням ліпофектину відповідно до умов, описаних для SFV (Lijestrom & Garoff, 1993). Через двадцять чотири години після трансфекції, клітини забарвлювали LV-специфічними Mab 122.17, спрямованими проти білка N вірусу LV. Приблизно 3-10 окремих клітин давали позитивне забарвлення, але інфекційних центрів або бляшок, які, як передбачалося, передаються від клітини до клітини, не спостерігалось. Трансфекція контрольних РНК, транскрибованих із рABV296 з використанням цих умов, призводила до одержання 60-70% позитивних клітин ВНК-21. Супернатант клітин ВНК-21, трансфekuваних внутрішньоклітинною РНК LV і РНК рABV296, переносили на клітини CL2621. Через 3-4 дня, бляшки спостерігалися в клітинах, які були інкубовані із супернатантом від клітин ВНК-21, трансфekuваних внутрішньоклітинною РНК LV, але не спостерігалися в клітинах, які були інкубовані з супернатантом від клітин ВНК-21, трансфekuваних РНК рABV296. Бляшки були позитивно забарвлені LV-специфічними таб у IPMA.

Аналогічні результати були отримані у випадку використання РНК, виділеної з очищених віріонів LV. Крім того, кількість позитивно забарвлених штамів клітин зростала в 2-4 рази у тому випадку, коли клітини були трансфekuвані шляхом електропорації. Ці дані вказують на те, що вірус LV не інфікує клітини ВНК-21, оскільки в них, цілком ймовірно, відсутній рецептор для LV. Проте, після введення геномної РНК в клітини ВНК-21, продукувалися нові інфекційні вірусні частинки, які виділялися в середовище. І знову, повторне інфікування вже трансфekuваних клітин ВНК-21 цими частинками, що є "голими" капсидами або частинками з повною або неповною оболонкою, виявилось неможливим.

In vitro-синтез інфекційної РНК

Оскільки клітини ВНК-21 є, в принципі, не сприйнятливими до PRRSV дикого типу, і особливо відповідними для "порятунку" вірусу від внутрішньоклітинної РНК LV, на відміну від сприйнятливих клітин CL2621, то клітини ВНК-21 були використані для тесту, проведеного з метою визначення, чи є РНК, транскрибована з кДНК-клонів

геномної довжини, інфекційною. Плазмиди pABV414/416 були лінеаризовані ферментом PvuI і транскрибовані *in vitro* з використанням РНК-полімерази T7. PvuI-сайт був локалізований безпосередньо нижче poly(A)-хвоста, так, що транскрибована РНК містила 2 невірусних нуклеотиди в 3'-кінця (фіг.2). Крім того, транскрипти повинні містити невірусний G у 5'-кінця, який є сайтом ініціації транскрипції РНК-полімерази T7. Приблизно 2,5мкг *in vitro*-транскрибованої РНК трансфekuвали в клітини ВНК-21 разом з 2мкг внутрішньоклітинної РНК LV, використовуюваної в якості позитивного контролю для наступного "порятунку" вірусу в клітинах CL2621 і РНК pABV296, використовуюваної в якості позитивного контролю для трансфекції РНК у клітини ВНК-21, і в якості негативного контролю для наступного "порятунку" вірусу в клітинах CL2621. Через 24 години після трансфекції, супернатант клітин збирали, і клітини фіксували і забарвлювали в IPMA з використанням N-специфічних Mab 122,17. У лунках з клітинами ВНК-21, які були трансфekuвані внутрішньоклітинною РНК LV, спостерігалось лише декілька позитивних клітин, тоді як в лунках з клітинами ВНК-21, які були трансфekuвані РНК, транскрибованою з pABV414/416, спостерігалось 800-2700 позитивних клітин. Для того, щоб перевірити, чи виділяється інфекційний вірус із клітин, для інфікування клітин CL2621 використовували супернатанти. Бляшки продукувалися у культурах CL2621, які були інфіковані супернатантом від клітин ВНК-21, трансфekuваних внутрішньоклітинною РНК LV і транскриптами pABV414/415. Наявність бляшок, забарвлених позитивно в IPMA з використанням моноклональних антитіл проти білків N, M, GP4 і GP3, дає підставу припустити, що всі ці білки були експресовані належним чином. В культурах CL2621, інкубованих із супернатантом від клітин ВНК-21, трансфekuваних РНК, транскрибованою з pABV296, ні бляшок, ні забарвлення не спостерігалось. Тому, ці результати ясно свідчать про те, що трансфекція РНК, транскрибованою з повнорозмірних геномних кДНК-клонів pABV414 і pABV416, у клітини ВНК-21 призводить до продукування і вивільнення інфекційного LV. Більш того, у випадку, коли транскрипти pABV414 і pABV416 трансфekuвані в клітини ВНК-21 шляхом електропорації, а не з використанням ліпофектину, то спостерігалось 2-4-кратне збільшення клітин, які позитивно забарвлюються LV-специфічними Mab. Титр рекомбінантних вірусів у супернатанті від цих підданих електропорації клітин ВНК-21 складав приблизно 10^5 TCID₅₀/мл. Криві росту інфекційного вірусу, що реплікуються, порівнювали з кривими росту для Тег Нурме і LV4.2.1:

Характеристики росту "врятованого" вірусу

Попередні експерименти по трансфекції і інфікуванню дозволили припустити, що врятовані рекомбінантні віруси, позначені VABV414 і VABV416, інфікують і зростають однаково добре у свинячих альвеолярних макрофагах, тоді як, на клітинах CL2621, вони зростають повільніше, ніж вірус, врятований із клітин ВНК-21, трансфekuваних внутрішньоклітинною РНК LV. Цю внутрішньоклітинну РНК LV виділяли з клітин CL2621, інфікованих LV4.2.1, які були адаптовані для росту на CL2621. Для більш ретельного дослідження здатності до росту VABV414 і VABV416, для клітин CL2621 і для свинячих альвеолярних макрофагів були побудовані криві росту, і ці криві порівнювали з кривими росту для LV дикого типу, що був лише пасажований на свинячі альвеолярні макрофаги (ТН), і з кривими росту для вірусу LV4.2.1, культивованого на клітинах CL2621. Швидкості росту цих двох рекомбінантних вірусів не відрізнялися один від одного, і ці віруси розвивалися однаково добре незалежно від того, чи походять вони безпосередньо від ВНК-21, або вони були, крім того, пасажовані на свинячі альвеолярні макрофаги (фіг.3). Титри (7,1-7,9 TCID₅₀/мл) у свинячих альвеолярних макрофагах досягали пікових значень через 32 години після інфікування, тоді як титри в CL2621 зростали повільніше, і не досягали пікових значень навіть через 96 годин після інфікування. ТН-вірус мав такі ж характеристики росту, як і рекомбінанти. На противагу цьому, CL2621 адаптований вірус LV4.2.1 зростає на клітинах CL2621 швидше, ніж віруси vABV414, vABV416 і ТН (фіг.3). В цілому, ці результати свідчать про те, що характеристики росту рекомбінантних вірусів аналогічні характеристикам росту вірусу ТН. Цього треба було очікувати, оскільки кДНК-послідовність, яка була використана для конструювання інфекційних клонів, була отримана від батьківського "не адаптованого" вірусу ТН.

Введення генетичного маркера в інфекційний клон LV

Для демонстрації того, що кДНК-клон геномної довжини може бути використаний для продукування мутантних вірусів LV, унікальні PacI- і SwaI-сайти були введені безпосередньо нижче гена OPC7 за допомогою PCR-спрямованого мутагенезу (фіг.4). У тому випадку, коли РНК, транскрибовану з повнорозмірного геномного кДНК-клетки pABV437, який містить PacI-сайт, і кДНК-клон pABV442, який містить SwaI-сайт, трансфekuвали в клітини ВНК-21, і супернатант від цих клітин переносили на свинячі альвеолярні макрофаги і клітини CL2621 через 24 години після трансфекції, то продукувався інфекційний вірус. Врятовані віруси VABV437 і vVABV442 мали характеристики росту у свинячих альвеолярних макрофагах і в клітинах CL2621, аналогічні характеристикам росту батьківського вірусу VABV414 (дані не наводяться). Специфічна область приблизно в 0,6т.п.о. (нуклеотиди 14576 - poly(A)-хвіст) була ампліфікована за допомогою зворотної транскрипції і PCR вірусної РНК, виділеної із супернатанту свинячих альвеолярних макрофагів, інфікованих VABV414 і VABV416. Гідроліз ферментом PacI показав, що цей рестрикційний сайт дійсно є присутнім у фрагменті, який походить від VABV437, але відсутній у фрагменті, який походить від VABV414. Аналогічним чином була продемонстрована присутність SwaI-сайта в VABV442 (дані не наводяться). Таким чином, можна виключити можливість забруднення вірусом дикого типу, що підтверджує ідентичність vABV437 і vABV442.

Обговорення

Сучасна технологія рекомбінантних ДНК дає можливість аналізувати і модифікувати геноми на молекулярному рівні, і, тим самим, більш глибоко вивчити їх організацію і експресію. У випадку РНК-вірусів, для цього потрібно створення кДНК-клонів геномної довжини, із яких можуть бути синтезовані інфекційні транскрипти. У більшості випадків, попередньою умовою для конструювання інфекційних клонів є ідентифікація послідовностей на кінцях відповідного вірусного геному, що, мабуть, мають вирішальне значення для реплікації вірусної РНК. У попередньому дослідженні було показано, що LV містить poly (A) -хвіст у 3'-кінця (Meulenberget al., 1993a). У даній роботі була точно визначена послідовність 5'-кінця геному LV. Хоча було описано декілька способів визначення 5'-кінця геномної вірусної РНК або мРНК, проте, більшість із цих способів мають істотні обмеження. У випадку флавівірусів і пестівірусів був використаний спосіб, який заснований на циркуляризації геномної РНК. Проте, цей спосіб вимагає проведення додаткових аналізів для

визначення границі між 5'- і 3'-кінцями геному. Метод швидкої 5-ампліфікації кінців кДНК (5' RACE) заснований на додаванні гомополімерного хвоста під дією термінальної дезоксирибонуклеотид-трансферази (TdT) до першого ланцюга кДНК. Проте, ця реакція приєднання хвоста не є досить ефективною, і крім того, цей спосіб вимагає додаткових аналізів, оскільки неможливо зробити висновок про те, чи представляє перший нуклеотид хвоста вірусну послідовність, або він є вже частиною ферментативно доданого хвоста. У даному дослідженні була визначена сама крайня частина 5'-хвоста вірусного геному шляхом лігування олігонуклеотиду, який має конкретно певну послідовність, із продуктом подовження першого ланцюга праймера, і шляхом ампліфікації за допомогою PCR. Подовження в 10 нуклеотидів (ATGATGTGTA) у порівнянні з опублікованою послідовністю було виявлено у декількох незалежних клонах, і тому було зроблене припущення, що вони являють собою найбільш крайні 5'-кінцеві нуклеотиди вірусного геному. Усе це разом дає лідерну послідовність у 221 нуклеотидів, які по своїй довжині аналогічні лідерній послідовності EAV (207 нуклеотидів; den Boon et al., 1991), SHFV (208 нуклеотидів Zeng et al., 1995), але є більш довгими, ніж лідерна послідовність LDV (155 нуклеотидів; Chen et al., 1994). Проте, не існує будь-якої гомології між лідерними послідовностями цих артерівірусів.

Найбільш крайня ділянка 5'-кінця була введена в кДНК геномної довжини для створення інфекційного клону. Головні проблеми, які виникають при генеруванні інфекційних клонів, зв'язані зі стабільністю вірусних послідовностей при клонуванні в бактерії, а також при генеруванні правильних 5'- і 3'-кінців. Хоча початкові спроби складання кДНК-клону геномної довжини в rGEM-4Z виявилися невдалими, проте, геномний кДНК-фрагмент із довжиною в 15207 нуклеотидів від LV залишався стабільним у низькокопійній плазміді рОК12 і дотепер, поки не вдалося генерувати найбільш довгий інфекційний клон РНК-вірусу з позитивним ланцюгом. Транскрипти кДНК-клонів геномної довжини містили 5'-кеп-структуру і додатковий невірусний G на 5'-кінці і невірусні CG на 3'-кінці, але ці подовження не елімінували їх інфекційності. Декілька проведених досліджень виявили зниження початкової інфекційності РНК, транскрибованих із повнорозмірних кДНК-клонів, що було обумовлено додатковими не автентичними послідовностями або на 54 або на 3'-кінці або неповним утворенням кеп-структури. Транскрипти повнорозмірної кДНК LV, у якій були відсутні кеп-структури, були не інфекційними. Оскільки інфекційність транскриптів інфекційних кДНК-клонів майже завжди тестували в клітинних лініях, які є сприйнятливими до вірусу, ми не могли продемонструвати інфекційність транскриптів від кДНК-клонів геномної довжини або РНК LV, виділеної з клітин CL2621 шляхом трансфекції цих РНК у клітини CL2621. Це було обумовлено недостатньою ефективністю трансфекції в клітинах CL2621, в результаті чого синтез ланцюга вірусної РНК утруднюється, мабуть, через взаємодію з неповними РНК-фрагментами або капсидними білками в результаті повторного інфікування клітин CL2621 дефектними інтерферувальними частинками такими як, "голі" капсиди, які містять тільки фрагменти вірусного геному. Проте, трансфекція транскриптів від повнорозмірних кДНК-клонів і внутрішньоклітинної РНК LV у клітини ВНК-21 призводила до продукування і вивільнення інфекційного вірусу, який може бути "врятований" у клітинах CL2621. Повторного інфікування клітин ВНК-21 "голими" капсидами не відбувається, а тому перешкоди для синтезу повнорозмірної вірусної РНК не виникає. Специфічна інфекційність складає приблизно 400-1500 позитивних клітин на один мкг у *in vitro*-транскрибованої РНК, тоді як, для одного мкг внутрішньоклітинної РНК LV було отримано 2-5 позитивних клітин. Проте, ці специфічні інфекційності не можуть дорівнюватися, оскільки геному РНК LV представляє дуже невелика фракція внутрішньоклітинної РНК, виділеної з LV-інфікованих клітин CL2621. Крім того, кількість геномної РНК, виділеної з вірионів, які були використані для трансфекції, було занадто мало для проведення точної кількісної оцінки.

Крім того, клітини ВНК-21 оцінювали на продукування антигену в IPMA з використанням LV-специфічних Mab, що необов'язково корелює з продукуванням інфекційного вірусу. Це очевидно з того факту, що супернатант клітин ВНК-21, трансфєкованих 2мкг внутрішньоклітинної РНК LV, містив більш високі титри бляшкоутворюючих одиниць оцінених для клітин CL2621, ніж супернатант від клітин ВНК-21, трансфєкованих 2,5мкг транскрипту повнорозмірних кДНК-клонів. Хоча раніше, для ряду вірусів було показано, що довжина *poly(A)*-хвоста впливає на інфекційність вірусних транскриптів (Holy & Abouhaid&r, 1993; Sarow, 1989), проте, ми не спостерігали якоїсь різниці в інфекційності між транскриптами від геномних кДНК-клонів, які містять хвіст із 45 або 109 залишків. Можливо, що хвіст із залишків 45A, в основному, являє собою граничну довжину, нижче якої стабільність відповідних транскриптів змінюється. У цьому клоні була виявлена різниця в амінокислоті 1084 у OPC1a, яка дає Pro і Leu у співвідношенні 1:1. Ця амінокислота не впливає на інфекційність, оскільки транскрипти повнорозмірних кДНК-клонів, які містять цей кодон Leu або Pro, не виявляють будь-якої різниці у інфекційності клітин ВНК-21.

Інфекційний клон геномної довжини використовували для генерування химерного вірусу, що експресує нуклеокапсидний білок PRRSV штама ATCC VR2332. Крім того, інфекційний клон геномної довжини використовували для генерування химерного вірусу, що експресує нуклеокапсидний білок мишиного вірусу LDV. Химерні віруси можна відрізнити від батьківських вірусів за допомогою використання штам-специфічних Mab, оскільки вони не забарвлюються моноклональними антитілами, які специфічно реагують із білком N (OPC7) штаму Ter Huurne PRRSV. Крім того, химерний вірус, у якому білок N вірусу PRRSV замінений на білок N вірусу LDV, не реагує з антитілами свиней-конвалесцентів, які реагують із білком N PRRSV. Оскільки всі PRRSV-інфіковані свині виробляють антитіла, спрямовані проти білка N PRRSV, то химерні віруси можуть бути використані у майбутньому для розробки нових "живих" вакцин проти PRRSV, і крім того, вони можуть бути використані в якості векторної системи, яка специфічно спрямована на свою нову клітину-хазяїна, альвеолярний макрофаг легень. У цьому зв'язку слід зазначити, що початкові спроби забезпечити імунітет з використанням "вбитого" вірусу або рекомбінантних субодиниць, виявилися невдалими. Єдиною ефективною вакциною проти PRRS, що є на сьогоднішній день, є модифікована "жива" вакцина, отримана на основі штаму US (Gorgusa et al., 1995). Проте, свиней, вакцинованих цим модифікованим "живим" продуктом, неможливо відрізнити від свиней, інфікованих вірусом дикої типу. Тому, інфекційний клон PRRSV був включений у так названу маркерну вакцину за допомогою сайт-направленого мутагенезу геному, так, щоб вакцинованих свиней можна було відрізнити від свиней, заражених вірусом дикої типу, виходячи з різниць у їх сироваткових

антитілах.

Інфекційний клон LV, описаний у даній заявці, є найбільш довгим інфекційним клоном, який коли-небудь, був отриманий від РНК-вірусу з позитивним ланцюгом і є першим у родині артерівірусів. Генерування цього інфекційного клону з PRRSV відкриває нові можливості для вивчення патогенезу, кола хазяїв (тропізму), а також реплікації і транскрипції цього вірусу. Артерівіруси і коронавіруси мають загальний специфічний механізм транскрипції, називаний також транскрипцією за участю лідерної послідовності в якості затравки, де зазначений механізм передбачає генерування так названої "гніздової" серії субгеномних РНК, які містять загальну 5'-лідерну послідовність (Sraan et al., 1988; Plagemann & Meppig, 1991). Транскрипція за участю лідерної послідовності в якості затравки є складним процесом, що ще цілком не вивчений. Дослідження вірусологів, що спеціалізуються в області коронавірусів, спрямовані на виявлення розглянутого механізму транскрипції за участю лідерної послідовності в якості затравки, обмежені аналізами і сайт-направленим мутагенезом кДНК дефектних інтферувальних РНК, оскільки великий розмір геному (28-30 т.п.о.) утруднює конструювання інфекційного клону. Інфекційний клон від PRRSV може бути використаний в якості системи-моделі для вивчення і виявлення невідомого механізму транскрипції і реплікації артерівірусів і коронавірусів.

Інфекційні клони, які походять від PRRSV, можуть бути також використані в якості системи доставки або векторного вакцинного вірусу для чужорідних антигенів, введених у геном-PRRSV, оскільки цей вірус інфікує макрофаги і клітини лінії диференціювання макрофагів у кістковому мозку, а також інші клітини імунної системи, і сприяє розподілу антиген-вміщуючого вірусу по клітинах їх потомства. У конкретному прикладі антигенів, які містять фрагменти білка ОРС7 або білка N Arteriviruses або PRRSV, ці антигени будуть (понад) експресуватися на зовнішній поверхні клітинної мембрани інфікованої клітини, і тим самим ще більш підсилювати імунну відповідь. Такий імунологічний бустер-ефект буде продукувати Тривалий (завдяки постійній стимуляції на низькому рівні) імунітет проти патогенів. Можна використовувати вірус в якості антигену-носія при збиранні інформації для епітопів інших патогенних організмів або речовин. Декілька модифікованих вірусів PRRS, які несуть чужорідну епітопну інформацію, можуть бути змішані і введені Одночасно. Це забезпечує активний імунітет проти декількох різних епітопів одного патогена, або активний імунітет проти декількох різних патогенів. Безпека вакцин на основі модифікованого PRRSV (таких, які не забруднюють навколишнє середовище) може бути забезпечена шляхом видалення інформації, що стосується тих вірусних білків, які необхідні для продукування інфекційного вірусу з оболонкою. Цей вірус повинний бути розмножений у клітинній лінії, яка конститутивно експресує цей білок оболонки. Вірус, який реплікується в цій комплементарній клітинній лінії, має цілу оболонку і здатний інфікувати макрофаги у свиней. Після одного циклу реплікації, потомствений вірус, у якого відсутня інформація, що стосується білка оболонки, більше не здатний інфікувати інші клітини у відмінність від вірусу з цілою оболонкою. Інфікування макрофагів у даному організмі все ще можливе за допомогою голого капсиду. Таким чином, ця вакцина буде зберігатися у вакцинованій тварині, і не буде поширюватися на інших тварин.

Напису до малюнків

Фіг.1. Конструювання кДНК-клонів LV геномної довжини. Верхня частина (А) ілюструє злиття кДНК-клонів, які були попередньо секвензовані (Meulenberg et al., 1993a) у рGEM-4Z. Зазначено число використовуваних рABV-клонів і рестрикційних сайтів. Чорні блоки представляють ті частини кДНК-клонів, які були ; злиті в наступній стадії клонування. Світло-сірі блоки, позначені RT, являють собою кДНК-клони, генеровані за допомогою RT-PCR, а темно-сірий блок являє собою новий кДНК-клон, генерований за допомогою PCR. Нижня частина (В) ілюструє складання більш великих кДНК-клонів рABV331/369, рABV384 і рABV368 із 5-кінцевим клоном рABV396, що містить промотор РНК-полімерази Т7, і 3'-кінцевим клоном рABV395, який містить poly(A)-хвіст, у низькокопійному векторі рОК12. Також зазначені рестрикційні сайти усередині і поза сайту множинного клонування рОК12. Далі представлені сайти рестрикції ендонуклеазою: A, ApaI; Ap, ApoI; Y, BamHI; Bg, BglII; Bs, BspEI; Bc, BclI; E, EcoRI; Ec, EcoRV; H, HindIII; K, KpnI; N, NarI; Nc, NcoI; S, Sad I; Sp, SpeI; Sa, Sall; Sc, Seal; P, PstI; Pm, PmlI; X, XbaI; Xh, XhoI.

Фіг.2. Кінцеві послідовності клонованої повнорозмірної кДНК LV і інфекційної РНК, транскрибованої з цього кДНК-клонів. кДНК-клони геномної довжини лінеаризували ферментом PvuI і транскрибували в присутності синтетичного кеп-аналогу m⁷G(5')ppp(5')G із РНК-полімеразою Т7. Отримана РНК повинна містити один додатковий нуклеотид (G) у 5'-кінця і два додаткових нуклеотиди (GC) у 3' кінця. Стрілки в РНК відповідають 5'- і 3'-кінцевим нуклеотидам, що відповідає автентичній РНК-послідовності LV.

Фіг.3. Криві росту ТН вірусу LV дикого типу і LV4.2.1 і рекомбінантні віруси vABN/414 і VABV416 в альвеолярних макрофагах свиней (А) і клітинах CL2621 (В). Рекомбінантні віруси VABV414 і VABV416, продуковані в клітинах ВНК-21, були використані або безпосередньо (ВНК), або після розмноження в альвеолярних макрофагах свиней (РАМ). Вірус ТН одержували в альвеолярних макрофагах свиней (РАМ), а LV4.2.1 одержували в клітинах CL2621 (CL). Клітинні культури інфікували зазначеними вірусами при множинності зараження 0,05 і збирали в зазначені інтервали часу. Титри вірусу (TCID₅₀/мл) визначали для альвеолярних макрофагів свиней або клітин CL2621 шляхом титрування в кінцевій точці.

Фіг.4. Введення унікальних PacI- і SwaI-сайтів в інфекційний кДНК-клон LV. PacI- і SwaI-сайти створювали за допомогою PCR-спрямованого мутагенезу, як докладно описано в главі "Матеріали і методи". кДНК-фрагменти, які містять PacI- і SwaI-сайти, були замінені в рABV414 із використанням її унікальних HbaI- і XbaI-сайтів, які зазначені. В результаті були отримані рABV437 і рABV442 відповідно.

ЛІТЕРАТУРА

Benfield, D.A., E. Nelson, E. Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D.E., and Chladek, D.W.. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome virus (Isolate ATCC-VR2332) J. Vet. Diagn. Invest. 4,127-133.

Boyer, J., and Haenni, A. (1994) Infectious transcripts and cDNA clones of RMA viruses. Virology, 198, 415-426.

Chen, Z, Faaberg, K.S., and Plagemann, P.G.W. (1994) Determination of the 5' end of the lactate dehydrogenase-elevating-virus genome by two independent approaches. J. Gen. Virol. 75, 925-930.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, J.I., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M.,

- McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (Isolate ATCC-VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. of Vet. Diagn. Invest.* 4, 117-126.
- Conzelmann, K.K., Visser, I., van Woensel, P., and Tiel, H.J. (1993). Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. *Virology* 193, 329-339.
- den Boon, J.A., Paaberg, K.S., Meulenber, J.J.M., Wassenaar, A.L.M., Plagemann, P.G.W., Gorbalenya, A.E., and -Snijder, E.J. (1995) Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORP1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. *J. Virol.* 69:4500-4505.
- Davis, N.L., Willis, L.V., Smith, J.F., and Johnson, R.E. (1989). In vitro synthesis of infectious Venezuelan equine encephalitis virus RNA of an insect virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 63-66.
- Deng, R., and Wu, R. (1981). An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 4173-4188.
- Edwards, J.B.D.M., Delort, J., and Mallet, J. (1991) Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs; A new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 5227-5232.
- Gorcyca, D., Schlesinger, K., Chladek, D., et al., (1995) *Proc. Am. Assoc. of Swine Pract.*, Ohama, NE, 1-22.
- Holy, S., and Abouhaidar, M.G. (1993). Production of infectious in vitro transcripts from a full-length clover yellow mosaic virus cDNA clone. *J. Gen. Virol.*, 74, 781-784.
- Kirn, H.S., Kwang, J., and Yoon, I.Y. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a homogeneous subpopulation of MA-1D4 cell line. *Arch. Viro.* 133, 477-483.
- Klump, W.M., Bergmann, I., Muller, B.C., Ameis, D., and Kandolf, R. (1990) Complete nucleotide sequence of infectious coxsackievirus B3 cDNA: Two initial 5'uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 64, 1573-1583.
- Lai, C.J., Zhao, B., Hori, H., and Bray, M. (1991) Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5139-5143.
- Liljestrom, P. and Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnol.* 9, 1356-1361.
- Liljestrom, P., and Garoff, H. (1993) Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors, p.16.xx.1-16.xx.00 In: *Current protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl (Eds.). Greene Publishing associates and Wiley interscience, New York.
- Meulenber, J.J.M., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.L.J.M., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G., and Moormann, R.J.M. (1993a). Leiystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) is related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62, 74.
- Meulenber, J.J.M., de Meijer, E.J., and Moormann, R.J.M. (1993b). Subgenomic RNAs of Leiystad virus contain a conserved junction sequence. *J. of Gen. Viro.* 74, 1697-1701.
- Meulenber, J.J.M., Petersen-den Besten, A., de Kluyver, E.P., Moormann, R.J.M., Wensvoort, G (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Leiystad virus. *Virology* 206, 155-163.
- Meulenber, J.J.M., and Petersen-den Besten (1996) Identification and characterization of a sixth structural protein of Leiystad virus: The glycoprotein GP; encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. *Virology*, in press.
- Meulenber et al., 1997
- Murtaugh, M.P., Elam, M.R., and Kakach (1995) Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Leiystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.*, 140, 1451-1460.
- Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E., and Benfield, D.A. (1993). Differentiation of United states and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. of Clin. Microbio.* 31, 3184-3189.
- Plagemann, P.G.W., and Moennig, V. (1991). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv. in Virus. Res.* 41, 99-192.
- Rice, C.M., Levis, R., Strauss, J.H., and Huang, H.V. (1987). Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones: mapping of lethal mutations, rescue of a temperature-sensitive marker, and in-vitro mutagenesis to generate defined mutants. *J. Virol.*, 61, 3809-3819.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor NY.
- Samow, P. (1989) Role of 3'end sequences in infectivity of polio-virus transcripts made in vitro. *J. Virol.*, 63, 467-470.
- Snijder, E.J., and Horzinek, M.C. (1993). Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *J. Gen. Virol.*, 74, 2305-2316.
- Spaan, W.J.M., Cavanagh, D., and Horzinek, M.C. (1988) Coronaviruses: Structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* 69, 2939-2952.
- Sumiyoshi, H., Hoke, C.H., and Trent, D.W. (1992). Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J. Virol.*, 66, 5425-5431.
- van Nieuwstadt, A.P., Meulenber, J.J.M., van Essen-Zandbergen, A., Petersen-den Besten, A., Bende, R.J., Moormann, R.J.M., and Wensvoort, G. (1996). Proteins encoded by ORFs 3 and 4 of the genome of Leiystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J. Virol.*, 70, 4767-4772.
- Viera, J., and Messing, J. (1991) New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene*, 100, 189-194.
- Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Luitze, E.A., de Besten, A., Harris, L, Collins, J.E., Christianson, W.T., and Chladek, D. (1992) Antigenic comparison of Leiyfad virus and swine infertility and respiratory (SIRS) virus. *J. Vet Diagn. Invest.* 4, 134-138.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M., and Van Zaane, D. (1986) Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* 12, 101-108.

Wensvoort, G., Terpstra, C, Pol, J.M.A., Ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C, van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, P., Broekhuijsen, J.M., Moonen, P.L.J.M., Zetstra, T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., de Jong, M.F., van 't Veld, P., Greenland, G.J.R., van Gennep, J.A., Voets, M.Th., Verheijden, J.H.M., and Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Leystad virus. *Vet. Quart.* 13, 121-130.

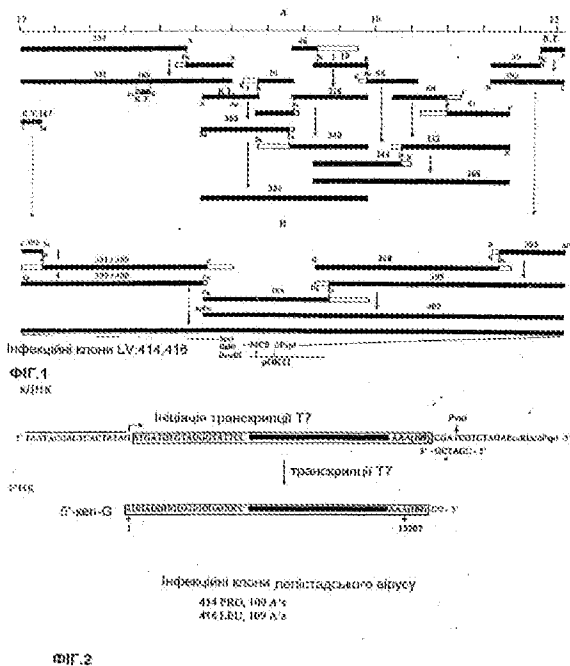
Zeng, L, Godeny, E.K., Methven, S.L, and Brinton, M.A (1995) Analysis of simian hemorrhagic fever virus (SHFV) subgenomic RNAs, junction sequences and 5" leader. *Virology* 207, 543-548.

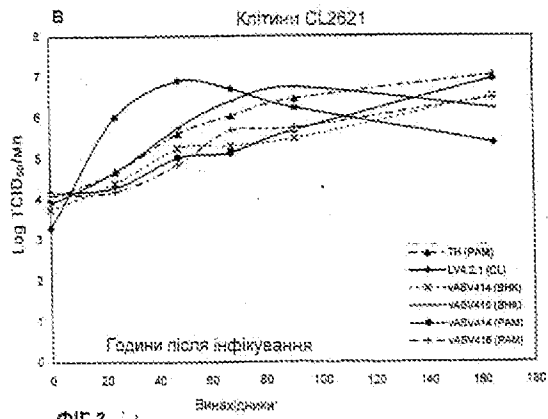
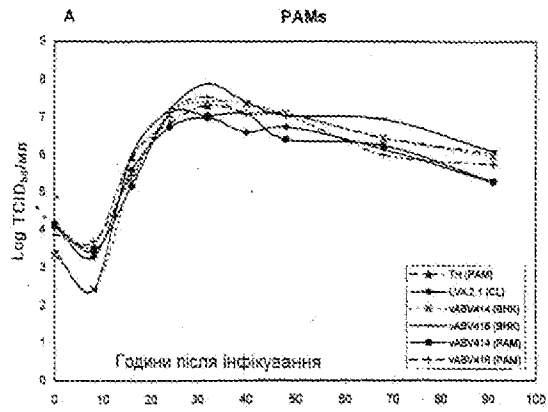
Таблиця 1

Нуклеотидна послідовність 5'-кінцевих клонів LV

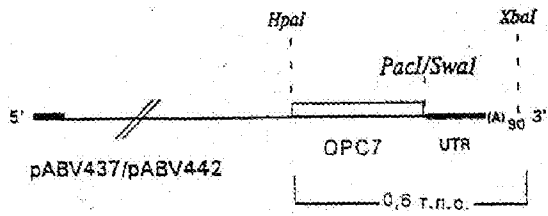
Послідовність 1)	№ клонів
ATGATGTGTAGGG.....	22
TGATGTGTAGGG.....	1
GATGTGTAGGG.....	2
ATGTGTAGGG.....	1

1) Підкреслені нуклеотиди являють собою додаткові послідовності, що не були виявлені в кДНК-клоні, і не були виділені і секвенвані раніше (Meulenberg et al., 1993a).





ФІГ.3



ФІГ.4