

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-3932**
(22) Přihlášeno: **05.05.1998**
(30) Právo přednosti: **06.05.1997 EP 1997/97201343**
(40) Zveřejněno: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)
(47) Uděleno: **09.10.2006**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.11.2006**
(Věstník č. 11/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/NL1998/000251**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/050426**

(11) Číslo dokumentu:

297 371

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/08 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 9604010 A; GB 2 289 279 A; WO 9606619 A; WO 9221375 A.

J.J.M. Meulenberg et al.: "Posttranslational Processing and Identification of a Neutralization Domain of the GP4 Protein Encoded by ORF4 of Lelystad Virus.

(73) Majitel patentu:

Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, DE

(72) Původce:

Van Nieuwstadt Antonie Paul, Lelystad, NL
Langeveld Jan, Harderwijk, NL
Meulenberg Janneke, Amsterdam, NL

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS Praha a.s., Jivenská 1273/1, Praha 4, 14021

(54) Název vynálezu:

Peptid mající 5 až 15 aminokyselinových zbytků vyvolávající tvorbu protilátek, protilátka reaktivní s tímto peptidem a diagnostická testovací souprava

(57) Anotace:

Peptid mající 5 až 15 aminokyselinových zbytků, vyvolávající tvorbu protilátek, které reagují s alespoň dvěma různými PRRSV izoláty, obsahující aminokyselinovou sekvenci odvozenou od aminokyselinové sekvence odpovídající konzervovanému místu proteinu N PRRSV, přičemž aminosekvence odpovídající konzervovanému místu proteinu N PRRSV je vybrána ze skupiny skládající se z VNQLCQLLGA A VNQLCQMLGK. Protilátka reaktivní s tímto peptidem. Diagnostická testovací souprava pro detekci nebo identifikaci protilátek namířených proti PRRSV izolátů obsahující alespoň jeden uvedený peptid společně s vhodnými detekčními prostředky nebo diagnostická testovací souprava pro detekci nebo identifikaci protilátek namířených proti antigenům odvozených od PRRSV izolátů obsahující uvedenou protilátku společně s vhodnými detekčními prostředky.

CZ 297371 B6

Peptid mající 5 až 15 aminokyselinových zbytků vyvolávající tvorbu protilátek, protilátka reaktivní s tímto peptidem a diagnostická testovací souprava

Oblast techniky

5

Vynález se týká peptových sekvencí majících 5 až 15 aminokyselinových zbytků, které vyvolávají tvorbu protilátek, které reagují s PRRSV izoláty, protilátkou reaktivní s těmito peptidovými sekvencemi a začleněním zmíněných sekvencí do vakcín a diagnostických testů.

10

Dosavadní stav techniky

PRRS virus (PRRSV) je původcem onemocnění prasat, které se nyní nazývá reprodukční a respirační syndrom prasat (PRRS z anglického „porcine reproductive and respiratory syndrom“). Virus je původcem prasečího onemocnění, které je ve Spojených státech známo asi od roku 1987 a v Evropě od roku 1990. Nemoc byla zpočátku označována různými jmény jako jsou „mystery swine disease“, „swine infertility and respiratory syndrome“ a mnohá další. Také samotný virus byl známý pod mnoha jmény, například „Lelystad virus“ (LV) nebo SIRS virus, ale nyní je popisován převážně jako virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV). Virus u prasat způsobuje potraty a respirační obtíže. Poprvé byl izolován v Evropě v roce 1991 (EP patent 587780 a patent US 5 620 691) a v zápětí nato také ve Spojených státech a v mnoha dalších zemích světa. PRRSV je malý obalený virus jehož genom je tvořený pozitivním řetězcem RNA. Preferovaným hostitelem PRRSV jsou makrofágy. Kromě makrofágů může PRRSV růst také v buňkách linie CL261 a v dalších buněčných liniích klonovaných z opičích ledvinných buněk linie MA-104 (Benfield *et al.*, J. Vet. Diagn. Invest. 4, 127–133, 1992). Genom PRRSV, polyadenylovaná RNA o velikosti asi 15 kb, byl sekvenován v roce 1993 (Meulenberg *et al.*, Virology 192; 62–74, 1993). Nukleotidová sekvence, organizace genomu a replikační strategie ukazují, že PRRSV je příbuzný skupině malých obalených virů s genomem tvořeným pozitivním řetězcem RNA, souborně nazývané Arteriviry. Do této skupiny patří LDV („lactate dehydrogenase-elevating virus“), EAV (virus koňské artritidy) a SHFV (virus opičí hemoragické horečky). Všechny tyto viry mají podobnou organizaci genomu, replikační strategii, morfologii i aminokyselinovou sekvenci virových proteinů. Velikost genomu arterivirů se pohybuje v rozmezí od 12,5 do 15 kb a během replikace syntetizují arteriviry soubor šesti 3'překrývajících se subgenomických RNA. Tyto subgenomické RNA obsahují vedoucí sekvence odvozené od 5'konce virového genomu. ORF 1a a 1b obsahují přibližně dvě třetiny virového genomu a kódují RNA dependentní RNA polymerázu. Šest menších ORF, ORF 2 až 7, je lokalizováno na 3'konci virového genomu. ORF 2 až 6 kódují pravděpodobně obalové proteiny zatímco ORF 7 kóduje nukleokapsidový protein (Meulenberg *et al.*, Virology 206, 155–163, 1995).

PRRSV je prvním adenovirem, u kterého byla prokázána asociace všech šesti proteinů kódovaných ORF 2 až ORF 7 s virionem. 15 kDa protein N (kódovaný ORF 7) a 18 kDa integrální membránový protein M (ORF 6) nejsou N-glykosylované, zatímco 29–30 kDa protein GP₂ (ORF 2), 45–50 kDa protein GP₃ (ORF 3), 31–35 kDa protein GP₄ (ORF 4) a 25 kDa protein GP₅ (ORF 5) N-glykosylované jsou. Tyto proteiny byly detekovány také u extracelulárních virů a v lyzátech buněk infikovaných severoamerickým izolátem PRRSV, ATCC–VR2332, stejně jako dalšími izoláty PRRSV (jako jsou například CNCM 1–1140, ECACC V93070108, CNCM 1–1387, CNCM 1–1388, ATCC–VR2402, ATCC–VR2429, ATCC–VR2430, ATCC–VR2431, ATCC–VR2475, ATCC–VR2385 a mnohé další).

Již dříve jsme popsali izolaci a charakterizaci souboru PRRSV–specifických monoklonálních protilátek (MAb), které specificky reagují s GP₃, GP₄, M a N proteiny (van Nieuwstadt *et al.*, J. Virol. 70, 4767–4772, 1996). Překvapivě bylo zjištěno, že protilátky namířené proti GP₄ jsou neutralizující což předpokládá, že alespoň část proteinu je vystavena na povrchu virionu. Dále také většina MAb namířených proti proteinu N reagovala se všemi testovanými izoláty PRRSV.

PRRS sám o sobě je pro průmysl zpracování vepřového masa významným problémem téměř na celém světě. Zavlečení PRRSV do prasečího stáda působí těžké ekonomické ztráty. Diagnostické testování zaměřené proti PRRS je rozšířenou praktikou mnoha veterinárních pracovišť i laboratoří. Existuje celá řada diagnostických testů jako jsou například IPMA, IPT, IFA nebo ELISA, z nichž každý zahrnuje některý z detekčních systémů jako jsou konjugované enzymy nebo fluorochromy a další substráty využívající interakce mezi antigenem odvozeným od PRRSV a protilátkou namířenou proti PRRSV ke stanovení přítomnosti buď PRRSV antigenů, nebo protilátek proti PRRSV v biologickém vzorku odebraném testovanému zvířeti (například praseti). Biologickým vzorkem může být například krev, sérum, tkáň, tkáňové tekutiny, tekutiny získané výplachem, moč či výkaly. Antigeny a/nebo protilátky používané ve zmíněných diagnostických testech nebo soupravách pro diagnostiku PRRS jsou definovány pouze na základě svého původu nebo reaktivity s PRRSV. V zásadě je toto dostačující pro testovací metody, kde není explicitně vyžadována vysoká specifická nebo citlivost. Ovšem stále pokračující šíření PRRS zapříčinilo značný zájem ze strany průmyslu zpracování vepřového masa, a to nejen o diagnostiku, ale o eradikaci PRRS z celých stád nebo dokonce z celých oblastí, regionů či zemí, kde se prasata chovají. Jasným příkladem zmiňovaných potřeb průmyslu je navržený eradikační program týkající se PRRS v Dánsku. V případě potřeby kompletního vyhubení PRRS jsou nezbytné diagnostické testy vykazující vyšší specifická nebo citlivost, než jakou mají dosud používané testy.

Očkování proti PRRS je další rozšířenou praktikou. Dosud se používá několik typů modifikovaných živých vakcín, ovšem jsou známy i neživé vakcíny. Ovšem obecným problémem živých vakcín, a tedy i živých PRRS vakcín, je tendence těchto vakcín rozšířit se i na neočkovaná zvířata, čímž namísto redukce detekovatelné infekce způsobí její rozšíření ve stádu a tak působí vzhledem k úplné eradikaci infekce kontraproduktivně. V případě použití „line marker“ vakcín, které jsou sérologicky odlišitelné od vakcín divokého typu, může být zmíněný problém z velké části redukován. Další nevýhodou je, že živé vakcíny mohou někdy u očkovaných prasat způsobit anafylaktickou reakci, neboť obsahují některé nedefinované antigenní složky. Je známo, že neživé vakcíny obecně indukují ochrannou odpověď u očkovaných prasat a mají i některé další výhody ke kterým patří například fakt, že nedochází k jejich šíření mezi zvířaty ve stádě. Nevýhodou neživých vakcín je že může být obtížné podat v jediné dávce dostatečné množství antigenu pro vyvolání měřitelné a ochranné imunitní odpovědi. Bylo by vhodné mít především neživé vakcíny schopné vyvolat měřitelnou neutralizující protilátkovou odpověď u prasat, neboť právě stanovení neutralizujících protilátek u očkovaných populací prasat může významně přispět k rozvoji poznání rozsahu ochrany prasečího stáda pomocí vakcinace. Navíc pokud se podaří připravit vakcínu s dostatečným množstvím odpovídajícího antigenu, znamená to, že vakcína obsahuje i další nedefinované antigeny v nedefinovaném množství, což může způsobit anafylaktickou reakci tak, jak byla popsána výše. S ohledem na výše uvedené skutečnosti by bylo výhodné vědět, které specifické místo na PRRSV je zahrnuto v procesu neutralizace. S pomocí takových znalostí by bylo možné navrhnout vhodnější vakcíny, zahrnující peptidové sekvence nezbytné pro vyvolání neutralizující reakce a tvorbu neutralizujících protilátek. Výhodou v současnosti používaných vakcín pocházejících z PRRSV izolátů ze Spojených států je, že takové vakcíny, ačkoliv vyvolávají úplnou ochrannou reakci proti Evropským izolátům PRRSV, se kterými také zkříženě reagují, obsahují dosud neidentifikované epitopy nebo antigenní místa pomocí kterých mohou být odlišeny od evropských izolátů PRRSV. Naopak živé vakcíny pocházející z PRRSV izolátů z Evropy, přestože jsou plně účinné proti imunologicky zkříženě reagujícím US izolátům PRRSV, obsahují podobné dosud neidentifikované epitopy nebo antigenní místa, pomocí kterých mohou být odlišeny od US izolátů PRRSV.

Pokud by byly dostupné sérologické testy, které by dokázaly rozlišit (na základě malých rozdílů v epitopech jednotlivých izolátů PRRSV) mezi prasaty buď očkovanými US vakcínou, nebo nakaženými evropským divokým typem PRRSV (očkovanými či nikoliv), nebo které by dokázaly rozlišit prasata, která jsou buď očkována evropskou vakcínou, nebo infikovaná US divokým typem PRRSV (ať již byla očkována či nikoliv), potom by mohly být vyvinuty značkové vakcíny a odpovídající diagnostické testy (zahrnující zmíněné diskriminující epitopy nebo antigenní místa), vykazující vyšší spolehlivost při použití v programech pro eradikaci PRRS. Například

v Dánsku by potom bylo možné očkovat vakcínou amerického původu a měřit soubor protilátek produkovaných dánskými vepři, namířených výhradně proti jedinečným epitopům evropského divokého typu PRRSV, které nevykazují žádnou zkříženou reaktivitu s US kmeny. To by umožnilo zcela jednoznačnou detekci a následné oddělení vepřů infikovaných divokým typem viru z dánských stád. V současnosti takový postup není možný v důsledku obecně široké imunologické zkřížené reaktivity mezi jednotlivými izoláty PRRSV. Je nesporné, že takové kombinované vakcinační a testovací programy budou základem pro celkovou eradikaci PRRS a že tyto programy mohou být použity i v dalších zemích, v případě potřeby s použitím vakcíny a/nebo diagnostického testu s odlišnými PRRSV antigenními místy.

Podstata vynálezu

Navrhovaný vynález se zabývá peptidovými sekvencemi PRRSV nesoucími antigenní místa umožňující zdokonalení vakcín, ať už jsou to oslabené živé vakcíny nebo neživé vakcíny nebo vakcíny připravené technikami rekombinantní DNA, a antigenní místa umožňující zdokonalení diagnostických metod a testů a přípravu nových diagnostických souprav. Sekvence, o kterých je známo že tvoří antigenní místo konkrétního izolátu, mohou být snadno osobou odborně zdatnou v oblasti navrhování a syntézy peptidů pozměněny například ve smyslu substituce jedné nebo více aminokyselin, a to při zachování antigenicity (která je definována například reaktivitou s polyklonálním sérem nebo monoklonálními protilátkami) a tudíž i funkčnosti antigenního místa. Například určitý aminokyselinový zbytek může být standardně nahrazen jiným zbytkem srovnatelné povahy, tj. například bazický zbytek jiným bazickým zbytkem, kyselý kyselým, objemná objemnou, hydrofobní jinou hydrofobní a hydrofilní jinou hydrofilní atd. I jiné záměny, méně konvenční ale více specifické, jsou možné v případě kdy zachovávají nebo dokonce zvyšují antigenicitu vybrané sekvence. Takové záměny mohou být uskutečněny například s pomocí PEPSCAN aminokyselinových substitucí nebo techniky mapování na základě aminokyselinových záměn (van Amerongen *et al.*, Peptide Research (1992) 5, 269–274). Krátce, aminokyselinové zbytky, které jsou součástí antigenních míst podle vynálezu, mohou být zaměňovány konvenčním způsobem nebo na základě mapování pomocí aminokyselinových záměn. Výsledná peptidová sekvence zůstává funkčně ekvivalentní původnímu antigennímu místu. Nově vložená aminokyselina může být buď D–, nebo L– aminokyselina. Imunogenicitu peptidových sekvencí podle vynálezu je navíc ještě zvýšena jejich spojením s adjuvans (například KLH), jaká jsou v oboru běžně používána. Dále může být imunogenicitu zmíněných peptidů zvýšena jejich spojováním (tandemové peptidy) nebo přípravou opakujících se sekvencí, polymerizací nebo cirkularizací. Ačkoliv bylo již dříve popsáno, že N–protein je imunogenní (Meulenberg (1995), J. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2, 652–656, GB 2 289 279 A) a že mezi N–proteiny evropských izolátů (LV) a US kmenů (VR2332) existují konzervované a nekonzervované oblasti (WO 96/04010), teprve nyní bylo poprvé popsáno které konzervované a nekonzervované oblasti jsou antigenní a které mohou být použity individuálně nebo v různých kombinacích jako antigeny pro imunizaci nebo pro diagnostické účely. Navíc zde bylo prokázáno, že se antigenní oblasti N–proteinu sestávají jak z lineárních, tak i z konformačně závislých epitopů.

Protein GP₄ je prvním strukturním proteinem PRRSV u kterého bylo prokázáno, že vyvolává tvorbu protilátek schopných neutralizovat virus. Byla identifikována specifická oblast dlouhá přibližně 40 aminokyselin a bylo zjištěno, že je-li vystavena na povrchu virionu, stává se cílem neutralizujících protilátek, které tak zabrání infekci buněk zmíněným virem. Je to překvapující nové zjištění, neboť dosud byl za nejdůležitější pro navázání viru na hostitelskou buňku považován protein GP5, hlavní strukturní protein PRRSV.

Vynález se zabývá hlavním antigenním místem, neutralizačním místem proteinu GP₄ PRRSV. Vynález se zabývá lokalizací hlavního neutralizačního místa, která je nezbytná pro navržení účinných značkovacích vakcín, které obsahují hlavní aminokyselinové sekvence a aminokyselinové sekvence sousedící s hlavní aminokyselinovou sekvencí PRRSV izolátů, které obsahují sekvenci neutralizačního místa na ORF4 proteinu PRRSV. Vnesení sekvencí pro určitá neutrali-

zační místa do různých typů vakcín umožňuje specificky indukovat tvorbu neutralizačních protilátěk u očkovaných prasat. Jsou připravovány neživé vakcíny obsahující neutralizační místo podle vynálezu, indukující měřitelnou produkci neutralizačních protilátěk. Neutralizační místo obsahují především sekvence PRRSV proteinu kódovaného ORF4 odpovídající aminokyselinovým sekvencím v pozicích 40 až 79 v PRRSV izolátu I-1102. Imunogenicitu vybraných peptidových sekvencí je dále zvýšena smísením peptidů s vhodným adjuvans nebo s dalšími v oboru známými nosiči. Takto získaná peptidová směs je použita jako očkovací látka. Ovšem vybrané peptidové sekvence obsahující neutralizační místo jsou také součástí vektorových vakcinačních systémů ve formě rekombinantních vektorů odvozených od heterologních virů nebo bakterií, nebo mohou být vybrané peptidové sekvence selektivně inkorporovány do virů nebo vakcín odvozených od PRRSV.

Předmětem navrhovaného vynálezu jsou dále aminokyselinové sekvence lokalizované v pozicích odpovídajících aminokyselinám 52 až 75 tvořící neutralizační místo se širokým spektrem reaktivity. Další neutralizační místa podle vynálezu mohou být nalezena mezi dalšími PRRSV izoláty ať již objevenými nebo těmi, které teprve budou popsány (viz například experimentální část popisu vynálezu). Pro člověka pracujícího v oblasti molekulární biologie je snadné porovnat sekvence obsahující neutralizační místo podle vynálezu s aminokyselinovou sekvencí proteinu kódovaného ORF4 z některého dalšího PRRSV izolátu.

Vynález se dále zabývá peptidovými sekvencemi PRRSV zlepšujícími diagnostické testy, ať již se jedná o testy přítomnosti antigenu, nebo o testy přítomnosti protilátěk. Vynález se zabývá nejrozličnějšími skupinami antigenních míst, které jsou použity buď samostatně, nebo v kombinaci s diagnostickými testy. Předmětem vynálezu jsou tedy diagnostické testy sloužící nejrozličnějším potřebám v oblasti diagnostiky a diferenciální diagnostiky. Reakce antigen–protilátka je vždy doprovázena i zkříženou reakcí epitop–paratop aminokyselinových sekvencí, které jsou dlouhé 5 až 15 aminokyselin. Aminokyselinové sekvence dlouhé 5 až 15 aminokyselin, které se částečně nebo úplně překrývají s hlavní sekvencí antigenního místa podle vynálezu jsou předmětem vynálezu jako sekvence vhodné pro diagnostické testy. Tyto peptidové sekvence se používají pro výběr nebo návrh antigenu nebo antigenní substance obsahující testovanou sekvenci. Dále jsou předmětem vynálezu také syntetické protilátky reagující s antigenními místy podle vynálezu. Zmíněná antigenní místa nebo příbuzné sekvence reagují se syntetickými protilátkami připravenými pomocí systémů jako jsou fágové knihovny nebo klonální selekce (těžkých řetězců) protilátěk, které tvoří protilátkám podobné molekuly, které mohou být snadno exprimovány v heterologních expresních systémech.

Jedna skupina látek, která je předmětem vynálezu, zahrnuje peptidovou sekvenci odpovídající zmíněnému neutralizačnímu místu tak, jak bylo popsáno výše. Diagnostické testy zahrnující toto místo a/nebo protilátky specificky reagující s tímto místem detekují u prasat přítomnost neutralizujících protilátěk.

Další skupina látek podle vynálezu zahrnuje konzervované antigenní místo proteinu N. V rámci konzervovaného antigenního místa je předmětem vynálezu hlavní aminokyselinová sekvence VNQLCQLLGA nebo VNQLCQMLGK. Diagnostické testy zahrnující toto místo a/nebo protilátky specificky reagující s tímto místem detekují u prasat přítomnost protilátěk které specificky reagují s většinou PRRSV izolátů. Předmětem vynálezu jsou dále diagnostické testy které využívají protilátky namířené proti konzervovanému místu, detekující PRRSV antigen. Takové testy umožňují diagnostikovat přítomnost PRRSV izolátů nezávisle na jejich původu.

Další skupina látek podle vynálezu zahrnuje nekonzervované diferencující antigenní místo proteinu N. Diagnostické testy zahrnující toto místo a/nebo protilátky specificky reagující s tímto místem detekují u prasat přítomnost protilátěk které specificky reagují s konkrétními PRRSV izoláty a tudíž například umožňují rozlišení očkovaných prasat od prasat infikovaných divokým typem PRRSV. Předmětem vynálezu jsou dále diagnostické testy které využívají protilátky namířené proti nekonzervovanému místu, detekující PRRSV antigen. Takové testy umožňují

diagnostikovat přítomnost konkrétních PRRSV izolátů. V rámci jednoho nekonzervovaného místa je předmětem vynálezu hlavní sekvence PRGGQAKKKK nebo PRGGQAKRKK nebo PRGGQAKKRK nebo GPGKKNKKKN nebo GPGKKNKKKT nebo GPGKKNRKKN nebo GPGKKFKKKN nebo GPGKKIKKKN nebo GPGQINKKIN. V rámci jiného nekonzervovaného

5 místa je předmětem vynálezu hlavní sekvence MAGKNQSQKK nebo MPNNNGKQTE nebo MPNNNGKQPK nebo MPNNNGKQQK nebo MPNNNGKQQN nebo MPNNNGKQQK nebo MPNNNGRQQK. Jak již bylo popsáno výše, není pro člověka zabývajícího se navrhováním a syntézou peptidů obtížné pozměnit uměle zmíněné sekvence GP₄ nebo N proteinu tak, aby byla zachována jejich antigenicita a tudíž i funkčnost.

10 Další skupina látek podle vynálezu zahrnuje konformační epitopy (které se navzájem mezi jednotlivými izoláty velmi liší), které se nacházejí v pozicích odpovídajících aminokyselinám 51 až 68 proteinu N u izolátu I-1102 (u tohoto izolátu se jedná o hlavní sekvenci PKPHFPLAAEDDIRHHL) nebo aminokyselinám 79 až asi 90 proteinu N (u izolátu I-1102 se

15 jedná o hlavní sekvenci SIQTAFNQGAGT) nebo aminokyselinám 111 až 124 proteinu N (u izolátu I-1102 se jedná o hlavní sekvenci HTVRLIRVTSTSAS).

Konzervovaná, nekonzervovaná, diferencující i konformační místa proteinu N, která jsou předmětem navrhovaného vynálezu, umožňují při použití v diagnostických testech zcela jedno-

20 značnou diagnostiku PRRSV infekcí. Byly připraveny testy které nevyužívají nekonzervované sekvence a tudíž zabraňují vzniku falešně negativních výsledků. Ovšem různá nekonzervovaná místa byla použita při přípravě diferenciačních testů, které mohou například rozlišovat mezi očkovanými prasaty a prasaty infikovanými divokým typem PRRSV. Jak již bylo řečeno, není pro molekulárního biologa obtížné porovnat sekvence obsahující konzervované, nekonzervované,

25 diferencující či konformační epitopy s aminokyselinovými sekvencemi proteinů kódovaných ORF7 některého dalšího PRRSV izolátu. Antigenní místa, která jsou předmětem navrhovaného vynálezu, jsou použita v nových souborech očkovací látka–diskriminační diagnostický test, určených pro použití v programech pro eradikaci PRRS.

30 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 MATERIÁL A METODY

35 Buňky a viry

Ter Huurne kmen PRRSV (CNCM I-1102) byl izolován v roce 1991 (*Wensvoort et al.*, 1991). Americký kmen PRRSV ATCC–VR2332 byl izolován o rok později *Benfield et al.* (1992). Kmen NL1 (Nizozemí, 1991) byl izolován v naší laboratoři, kmen NY2 (Velká Británie, 1991) laskavě poskytnul T. Drew, kmen DEN (Dánsko, 1992) laskavě poskytnul A. Botner, kmen LUX

40 (Lucembursko, 1992) laskavě poskytnul Losch, kmeny SPA1 a SPA2 (Španělsko, 1992) laskavě poskytl Shokouhi a Espuna resp. a kmen FRA (Francie, 1992) laskavě poskytnul Y. Leforban.

PRRSV a VR2332 byly pěstovány na CL2621 buňkách tak jak to bylo popsáno dříve (*van Nieuwstadt et al.*, 1996). Sedm odlišných evropských izolátů bylo pěstováno na prasečích

45 alveolárních makrofázích. Makrofágy byly pěstovány tak, jak to bylo popsáno dříve (*Wensvoort et al.*, 1991). BHK–21 buňky byly pěstovány na Dulbeccově základním minimálním médiu doplněném 5% fetálním hovězím sérem a antibiotiky. Pro účely transfekce byly BHK–21 buňky pěstovány na Glasgow základním minimálním médiu (GIBCO–BRL/Life Technologies Ltd.).

50 Antiséra

Prasečí anti–PRRSV sérum 21 a králíčí anti–peptidové sérum 698 a 700 byly použity již v dřívějších experimentech. Sérum 700 je namířeno proti aminokyselinám 106 až 122 (CLFYASEMSEKGFVIF) kódovaným ORF4 PRRSV a bylo získáno imunizací králíků. Přípra-

va a charakterizace monoklonálních protilátek byla popsána již dříve (van Nieuwstadt *et al.*, 1996). Hybridomy byly připraveny v pěti po sobě následujících fúzních experimentech a byly připraveny proti proteinu kódovanému ORF4 (MAb, 121.4, 122.1, 122.12, 122.20, 122.29, 122.30, 122.59, 122.66, 122.68, 122.70, 122.71, 126.1, 126.7, 130.7, 138.28) nebo proti proteinu kódovanému ORF7 (MAb 122.17, 125.1, 126.9, 126.15, 130.2, 130.4, 131.7, 138.22, WBE1, WBE4, WBE5, WBE6, SDOW17). Monoklonální protilátky WBE nám laskavě poskytl Dr. Drew, Weybridge, UK; MAb SDOW17 laskavě poskytl Dr. Benfield, South Dakota, US.

Plazmidové konstrukty

- 10 Dva oligonukleotidy lokalizované po směru transkripce (PRRSV13) a proti směru transkripce (PRRSV14) ORF4 byly již dříve použity pro amplifikaci a klonování ORF4 izolátu I-1102 do plazmidu pGEM-4Z. Pro klonování byla použita BamHI a HindIII restriční místa zabudovaná do oligonukleotidových primerů (Meulenberg *et al.*, 1995). Takto vzniklý konstrukt byl nazván pABV209. Dva oligonukleotidové primery lokalizované v podobných pozicích vzhledem k in-
- 15 ciačnímu kodonu (PRRSV4) a terminačnímu kodonu (PRRSV5) ORF4 VR2332 izolátu byly použity pro amplifikaci ORF4 z VR2332 metodou RT-PCR tak, jak to bylo popsáno v dřívějších studiích. PCR produkty byly opracovány BamHI restričním enzymem a částečně také HindIII enzymem (částečně z toho důvodu, že ORF4 z VR2332 obsahuje interní HindIII místo) a klonová-
20 ný do pGEM-4Z plazmidu za vzniku konstrukt pABV270. Rekombinantní DNA techniky byly použity v podstatě tak jak byly popsány v Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Ny, 1989). Nukleotidová sekvence ORF4 z VR2332 v pABV270, stanovená pomocí automatického DNA sekvenátoru (Applied Biosystems) byla shodná s publikovanou sekvencí (Murtaugh *et al.*, Arch. Virol. 140; 1451–1460, 1995).
- 25 Následně byly ORF4 z I-1102 a VR2332 přeneseny do Semliki Forest virus expresního vektoru pSFV1. pABV209 a pABV270 byly štěpeny restričními enzymy BamHI a HindIII (jen částečně v případě pABV270), ORF fragmenty byly opracovány Klenowovým fragmentem DNA polymerázy (Pharmacia) za vzniku tupých konců a takto opracovaná DNA byla ligována do SmaI místa pSFV1, defosforylovaného telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Pharmacia). Plazmidy nesoucí ORF4 I-1102 (pABV265) a VR2332 (pABV271) ve správné orientaci byly dále testová-
30 ný na expresi GP₄ proteinu. Dále byly z I-1102 a VR2332 připraveny čtyři různé chimérní ORF4 geny. Nukleotidová sekvence ORF4 genu kódující aminokyseliny 1 až 39 GP₄ VR2332 byla amplifikována pomocí oligonukleotidů PRRSV4 a PRRSV6 z plazmidu pABV270. Takto získaný fragment byl opracován enzymy BamHI a SacII. Takto upravený fragment byl zaligován
35 do pABV209 vektoru rozštěpeného BamHI a SacII restričními enzymy a za vzniku „in frame“ fúze (tj. fúze bez porušení čtecího rámce) mezi aminokyselinami 1 až 39 proteinu GP₄ VR2332 a aminokyselinami 40 až 183 proteinu GP₄ I-1102 v plazmidu pABV306. Nukleotidová sekvence ORF4 genu kódující aminokyseliny 1 až 75 GP₄ VR2332 byla amplifikována pomocí oligo-
40 nukleotidů PRRSV4 a PRRSV9 (viz. tabulka 2). tento fragment byl opracován restričními enzymy KpnI a BamHI. Nukleotidová sekvence ORF4 genu kódující aminokyseliny 80 až 183 proteinu GP₄ z I-1102 izolátu byla amplifikována pomocí oligonukleotidových primerů PRRSV46 a PRRSV14 a vzniklý fragment byl opracován restričními enzymy KpnI a BamHI. Oba fragmenty byly společně zaligovány do vektoru pGEM-4Z opracovaného enzymy BamHI a HindIII za vzniku plazmidu pABV308. Stejným způsobem byl připraven komplementární konstrukt pABV314 obsahující nukleotidovou sekvenci kódující aminokyseliny 1 až 79 GP₄ proteinu
45 z I-1102 amplifikovanou z primerů PRRSV13 a PRRSV57 spojenou ligací s fragmentem kódujícím aminokyseliny 76 až 178 VR2332, připraveným amplifikací z primerů PRRSV10 a PRRSV5 ve vektoru pGEM-4Z. Čtvrtý chimérní konstrukt byl tvořen fragmentem kódujícím aminokyseliny 40 až 79 PRRSV GP₄ proteinu fúzovaným s fragmenty kódujícími aminokyseliny
50 1 až 39 a aminokyseliny 76 až 178 VR2332 GP₄ proteinu. Toho bylo dosaženo ligací BamHI/SacII ORF4 fragmentu pABV270 a SacII/HindIII ORF4 fragmentu pABV314 s pGEM-4Z opracovaným BamHI a HindIII. Výsledný plazmid byl nazván pABV325. Správnost sekvence plazmidů pABV306, pABV308, pABV314 a pABV325 byla ověřena sekvenací oligonukleotidů. Chimérní ORF4 geny byly přeneseny z pABV306, pABV308, pABV314 a pABV325 do PSFVI,

tak, jak to bylo popsáno výše v případě ORF4 genů z VR2332 a PRRSV. Výsledkem byly plazmidy pABV296, pABV305, pABV321 a pABV326 resp. (obr. 3).

Dva oligonukleotidy lokalizované proti směru transkripce (LV108; 5'-GGAGTGGTTAACCTC-
 5 GTCAAGTATGGCCGGTAAAAACCAGAGCC-3') a po směru transkripce (LV112; 5'-
 CCATTCACCTGACTGTTTAATTAAGTGCACCCCT GA-3') ORF7 byly použity pro amplifi-
 kaci a klonování ORF7 genu do plazmidu pGEM-T za vzniku pABV341. Sekvence a pozice
 těchto a i dalších oligonukleotidů, použitých pro amplifikaci fragmentů ORF7, jsou uvedeny
 v tabulce 1. Další čtyři chimérické konstrukty byly připraveny mutagenézou pomocí PCR. Sekvence
 10 kódující aminokyseliny 25 až 26 a 28 až 30 (místo B; obrázek 3) byly nahrazeny odpovídajícími
 sekvencemi EAV N proteinu. Této změny bylo dosaženo PCR amplifikací ORF7 z primerů
 LV108 a LV134 (5'-TGGGGAATGGCCAGCCAGTCAATGACCTGTGCCGGATGTTTG-
 GTGCAATGATAAAGTCC-3'). Mutantní DNA fragmenty byly s pomocí MscI a PaeI restrikt-
 15 ních míst vneseny do pABV431 za vzniku pABV455. Oblast ORF7 kódující aminokyseliny 51 až
 67 byla nahrazena odpovídající oblastí LDV ORF7. Plazmid pABV431 byl štěpen enzymy
 EcoNI a ClaI a byl ligován s PCR fragmentem vzniklým amplifikací z primerů LV98 (5'-
 CCAGCAACCTAGGGGAGGACAGGCCAAAAAGAAAAAGCAGCCGAAGCTACATTTTC
 CCATGGCTGGTCCATCTGAC-3') a LV99 (5'-CGTCTGGATCGATTGCAAGCAGAGGG-
 AGCGTTCAGTCTGGGTGAGGACGTGCCGGAGGTCAGATGGACCAGCC-3') a opracova-
 20 ným stejnými restriktčními enzymy. Vzniklý plazmid byl nazván pABV463. Oblast ORF7 kódu-
 jící aminokyseliny 80 až 90 byla nahrazena odpovídajícím úsekem LDV ORF7 genu. ORF7 gen
 LV byl mutován pomocí PCR s použitím primerů LV101 (5'-GCTTGCAGGCGCCCGTGA-
 CGCTTTTCAATCAAGGCGGAGGACAGGCGTTCGCTTTCATCCA-3') a LV112. Získaný
 fragment byl opracován enzymy NarI a PaeI a byl ligován do vektoru pABV431 štěpeného ClaI a
 25 PaeI. Vzniklý plazmid byl nazván pABV453. Konečně oblast kódující C-terminální část proteinu
 N (aminokyseliny 111 až 128) byla nahrazena sekvencí kódující odpovídající aminokyseliny v N
 proteinu LDV. Gen ORF7 byl amplifikován z primerů LV108 a LV102 (5'-ATGTCCCGGGC-
 TAAGCGGCGGAGGAATTAGCAGAAGCGTTAATCAGGCGCTGTGTAGCAGCAACCGG-
 CAG-3') a klonován do vektoru pGEM-T. Vzniklý konstrukt byl nazván pABV456. Divoký typ
 30 ORF7 genu i mutované ORF7 geny byly z vektorů pABV431, pABV453, pABV455 a pABV463
 vystřiženy pomocí enzymu PaeI (tupé konce) a HpaI z vektoru pABV456 pomocí enzymů HpaI a
 SmaI. Získané geny byly následně vloženy do defosforylovaného SmaI místa expresního vektoru
 pSFVI (Semliki forest virus). Plazmidy pABV470, pABV460, pABV462, pABV518 a pABV471
 nesoucí odpovídající ORF7 geny ve správné orientaci byly dále testovány na expresi N proteinu.
 35 In vitro transkripce a transfekce SFV ORF7 RNA byla provedena stejně jako to bylo popsáno
 výše pro SFV-ORF4 konstrukty.

ORF4 geny sedmi různých evropských izolátů byly klonovány následujícím způsobem: makro-
 fágy byly infikovány NL1, NY2, DEN, FRA, SPA1, SPA2 a LUX a RNA byla izolována tak jak
 40 to popsal Meulenberg *et al.*, (1993). ORF4 geny byly amplifikovány pomocí RT-PCR z oligo-
 nukleotidových primerů PRRSV13 a PRRSV14 a klonovány pomocí BamHI a HindIII do
 pGEM-4Z. Pro každý kmen byla stanovena sekvence ORF4 genu dvou nezávislých klonů
 pocházejících z nezávislých PCR reakcí. Proteinové sekvence odvozené z nukleotidových sek-
 45 vencí byly zpracovány programem pro mnohonásobné porovnání sekvencí CLUSTAL PCGene
 (Intelligenetics Tm).

In vitro transkripce a transfekce SFV-ORF4 RNA.

Plazmidy pSFV obsahující různé ORF4 konstrukty byly linearizovány štěpením SpeI a transkri-
 bovány *in vitro*. Syntetizovaná RNA byla transfekcí vnesena do BHK-21 buněk. Transfekce byla
 50 provedena v 15 mm jamkách na destičce s dvacetičtyřmi jamkami s použitím lipofectinu. Buňky
 byly fixovány ledovým 50% (v/v) methanolem v acetonu a GP₄ protein exprimovaný různými
 ORF4 konstrukty byl značen monoklonálními protilátkami metodou IPMA (immunoperoxidase
 monolayer assay). ORF4 expresní produkty byly analyzovány imunoprecipitací. 10⁷ BHK-21
 buněk bylo transfekováno 10 µg *in vitro* transkribované SFV-ORF4 RNA. Transfekce byla

provedena elektroporací. Poté byly buňky vysety do tří 35 mm jamek šesti jamkové kultivační destičky a 18 hodin po transfekci byly buňky značeny.

Metoda pepsan

5 Komplettní soubor překrývajících se nonapeptidů nebo dodekapeptidů byl syntetizován z aminokyselin odvozených od sekvence ORF4 nebo ORF7 PRRSV (popis viz Meulenberg *et al.* 1993). Syntézu peptidů na pevné fázi na polyethylénových tyčinkách a imunologické testování metodou ELISA (enzymelinked immunosorbent assay) jsme prováděli přesně podle zavedené metody PEPSCAN (Geysen *et al.*, PNAS 81, 3998–4002, 1984).

10

Výsledky

Již dříve jsme popsali soubor neutralizujících monoklonálních protilátek reagujících s 31 až 35 kDa proteinem PRRSV nazvaným GP₄ a soubor monoklonálních protilátek reagujících při testování metodou Western immunoblot s proteinem N. Bylo prokázáno že GP₄ je strukturální glykoprotein kódovaný ORF4 a N je protein nukleokapsidy kódovaný ORF7. V imunoprecipitačních pokusech s GP₄ specifickými monoklonálními protilátkami putoval GP₄ protein z lyzátů buněk infikovaných PRRSV jako oddělený pruh o velikosti 28 kDa spolu s nepatrnou skvrnou o něco větší zdánlivé molekulové hmotnosti. Monoklonální protilátky imunoprecipitovaly difúzní (glykosylovaný) GP₄ protein veliký asi 31 kDa z extracelulárního média PRRSV infikovaných buněk ale nikoliv z extracelulárního média falešně infikovaných buněk.

20

Identifikace neutralizující domény GP₄

Již dříve bylo popsáno, že monoklonální protilátky specifické pro GP₄ protein rozeznávaly I-1102, ale nikoliv US izolát VR2332 (van Nieuwstadt *et al.*, 1996). Abychom mohli identifikovat doménu GP₄ proteinu vážící neutralizující monoklonální protilátky, připravili jsme fúzní proteiny sestávající se z částí GP₄ proteinu I-1102 a VR2332. Tyto proteiny byly exprimovány s použitím SFV (Semliki forest virus) expresního systému vyvinutého Liljestrom *et al.* (Biotechnol, 9, 1356–1362, 1991). Nejprve byl do pSFV1 klonován ORF4 z I-1102 izolátu za vzniku plazmidu pABV265 (obr. 1). RNA získaná transkripcí z pABV265 byla transfekcí vnesena do BHK-21 buněk a 24 hodin po transfekci byly buňky pozitivně značeny souborem 15 neutralizujících monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky nereagovaly s BHK-21 buňkami nesoucími pSFV1-RNA. Rekombinantní GP₄ protein byl imunoprecipitován monoklonální protilátkou Mab 126.1 z BHK-21 buněk značených L-[³⁵S]-methioninem, transfektovaných pABV265 RNA. Tento protein měl stejnou velikost jako původní GP₄ protein syntetizovaný CL2621 buňkami infikovanými I-1102 a také obsahoval PNGaseF a EndoH citlivé N-glykany. Také GP₄ protein VR2332 byl klonován do pSFV1, ale tento protein nebyl po expresi v BHK-21 buňkách rozpoznán monoklonálními protilátkami (obr. 1). Aby bylo možné ještě blíže určit oblast GP₄ proteinu rozpoznávanou monoklonálními protilátkami, byly připraveny čtyři chimérické ORF4 geny z I-1102 a VR2332 a vneseny do SFV1 vektoru (obr. 1). RNA získaná transkripcí z plazmidů pABV296, pABV30S, pABV321 a pABV326 byla vnesena transfekcí do BHK-21 buněk. Reaktivita exprimovaných proteinů s GP₄ specifickými Mab byla testována metodou IPMA. Výsledek reakce se všemi 15 Mab byl identický, což dokazuje, že všechny tyto monoklonální protilátky byly namířeny proti oblasti GP₄ proteinu velké 40 aminokyselin. Produkt exprese pABV326, který obsahoval aminokyseliny 40 až 79 odvozené od GP₄ proteinu CNCM I-1102 izolátu a celý zbytek sekvence GP₄ proteinu odvozený od GP₄ proteinu VR2332, byl stále ještě rozpoznáván celým souborem monoklonálních protilátek. Abychom se ujistili, že byly různé GP₄ proteiny, především ty, které nebyly rozpoznány monoklonálními protilátkami, v BHK-21 buňkách správně exprimovány, byly tyto proteiny z lyzátu BHK-21 buněk transfektovaných RNA připravenou *in vitro* transkripcí z plazmidů pABV265, pABV271, pABV296, pABV30S, pABV321 a pABV326 imunoprecipitovány. Proteiny byly imunoprecipitovány prasečím anti-PRRSV sérem 21, Mab 126.1 a anti-peptidovými séry 698 a 700. Sérum 700 je namířeno proti aminokyselinám 106–122 PRRSV GP₄ proteinu izolátu CNCN I-1102, tj. proti sekvenci která je s výjimkou aminokyseliny 121 identická s odpovídající sekvencí GP₄ proteinu izolátu ATCC-VR2332. Proto byly sérum 700 imunoprecipitovány všechny GP₄

50

proteiny. Zmíněné GP₄ proteiny byly při analýze na SDS–PAGE co do velikosti nerozeznatelné. Výjimku tvořily GP₄ proteiny exprimované pABV305 a pABV271, které se pohybovaly nepatrně rychleji. To je pravděpodobně způsobeno delecí čtyř aminokyselin u izolátu VR2332 oproti sekvenci I–1102. K této delecí dochází mezi aminokyselinami 62 až 64 (obr. 3). Kompletní soubor GP₄ specifických monoklonálních protilátek rozpoznával GP₄ proteiny exprimované z plazmidů pABV265, pABV296, pABV321, pABV326, ale nikoliv proteiny exprimované z plazmidů pABV305 a pABV271, což jen potvrdilo výsledky získané metodou IPMA (obr. 3). Sérum 698 vykazovalo stejný reakční profil jako monoklonální protilátka. Sérum 698 je namířeno proti aminokyselinám 62 až 77 GP₄ proteinu PRRSV, které jsou lokalizovány v nově popsané neutralizační doméně GP₄ proteinu. Tato oblast je u VR2332 GP₄ proteinu velice heterogenní, a proto nebyly produkty získané expresí genů nesoucích v této oblasti VR2332 sekvenci sérem 698 rozpoznány. Ovšem neutralizující polyklonální prasečí sérum rozpoznává I–1102 GP₄ protein stejně jako chiméřní GP₄ proteiny i VR2332 GP₄ protein, což naznačuje, že toto sérum obsahuje celou řadu neutralizujících protilátek, které jsou namířeny proti neutralizačnímu místu GP₄ proteinu, tvořenému aminokyselinami 40 až 79.

PEPSCAN ORF4 a ORF7 proteinů

Vzhledem k tomu že při testování metodou western blot reagovalo s GP₄ proteinem všech 15 monoklonálních protilátek, předpokládali jsme, že tyto protilátky rozpoznávají lineární epitop v oblasti spojující aminokyselinami 40 až 79 proteinu GP₄ z izolátu I–1102. Pro další mapování oblasti vážící monoklonální protilátky byla použita metoda PEPSCAN s použitím překrývajících se nonapeptidů nebo dodekapeptidů z této oblasti. Peptidy byly považovány za představitele antigenního místa, pokud vrcholy v takovém souboru opakovaně dosahovaly více než dvojnásobných hodnot v porovnání s pozadím. MAb 122–29, 122–30, 122–66, 122–71, 130–7 a 138–28 reagovaly pozitivně s jedním specifickým antigenním místem tvořeným aminokyselinami 59 až 67 (SAAQEKISF) (obr. 2). MAb 122–12 reagovala s tímto antigenním místem jen slabě, zatímco zbývajících 7 monoklonálních protilátek vykazovalo při PEPSCAN analýze negativní výsledky. Polyklonální prasečí sérum zmíněné místo při PEPSCAN analýze také identifikovalo. Neutralizující sérum 21, odebrané v šestém týdnu po infekci prasete 21 PRRSV, vykazovalo s tímto místem i přilehlými oblastmi silnou a širokou reaktivitu. Také neutralizující polyklonální prasečí séra (va12 a va14), odebraná 54. den po očkování PRV–ORF4 virovým vektorem a při porážce 30 dní po vyvolání reakce v 54. dnu s PRRSV, reagovala s neutralizačním místem identifikovaným metodou PEPSCAN silně a v nejširším spektru případů.

U izolátu I–1102 obsahuje základní sekvence neutralizačního místa aminokyselinovou sekvenci SAAQEKISF lokalizovanou v oblasti aa 59 až 67. U dalších izolátů je tato základní sekvence lokalizována v místě a nebo v blízkosti místa odpovídajícího pozici zmíněných aminokyselin. Jedná se o aminokyselinovou sekvenci odpovídající neutralizačnímu místu GP₄ proteinu, obsahující například sekvence jako SAAQEEISF, nebo STAQENISF, nebo STAQENIPF, nebo SEESQSVT, nebo SASEAIR, nebo SASEAFR, nebo PAPEAFR, nebo SAFETFR, nebo STSEAFR, ale předpokládáme, že další izoláty PRRSV nesou odpovídající, ale nepatrně odlišné základní sekvence neutralizačního místa, lokalizované v a nebo v blízkosti aminokyselinové sekvence odpovídající aminokyselinám 59–67 ORF4 PRRSV izolátu I–1102. Zmíněná sekvence může být také snadno, při zachování antigenicity a tím i funkčnosti základní sekvence, osobou odborně zdatnou v oblasti navrhování a tím i funkčnosti základní sekvence, osobou odborně zdatnou v oblasti navrhování a syntézy peptidů uměle změněna. Také, jak bylo zcela zjevně demonstrováno mnohem širší reaktivitou neutralizujícího polyklonálního séra v PEPSCAN testech, aminokyselinové sekvence různých izolátů PRRSV obsahující základní aminokyselinovou sekvenci a sekvence přilehlé k této základní sekvenci navíc tvoří neutralizační místa na ORF4 proteinu. Neutralizační místo tvoří především sekvence lokalizované v pozicích odpovídajících aminokyselinám 40 až 79 (obr. 1). A znovu, zmíněná sekvence může být snadno, při zachování antigenicity a tím i funkčnosti základní sekvence, osobou odborně zdatnou v oblasti navrhování a syntézy peptidů uměle změněna. Vezmeme-li v úvahu širokou reaktivitu polyklonálního neutralizujícího séra va12 nebo séra va14 (obr. 2), je zřejmé že aminokyselinové

sekvence lokalizované v pozicích odpovídajících aminokyselinám 52 až 75 ještě specifitěji tvoří široce reaktivní neutralizační místo.

Monoklonální protilátky namířené proti ORF7 proteinu reagovaly v testu PEPSCAN ve čtyřech různých skupinách: skupina A (4), B (2), C (3) a D (1). Skupina 1 (D) (ve které byly mezi jinými MAb 122.17, 130.3, 130.4, 131.7, WBE1, WBE4, WBE6, SDOW17 obsahující konzervovaná i nekonzervovaná reaktivní místa) reagovala s konformačním epitopem, který nebyl metodou PEPSCAB detekován. Skupina 2 (B) (ve které byly mezi jinými MAb 125.1, 126.9, NS95 a NS99, reagující se všemi testovanými PRRSV izoláty a tudíž rozeznávající konzervované antigenní místo) rozeznává základní sekvenci VNQLCQLLGA (nacházející se u izolátu I-1102 v pozici 22 až 32) nebo sekvenci VNQLCQMLGK. Skupina 3 (C) (ve které byla mezi jinými MAb 126.15 a reagující především s evropskými izoláty PRRSV a tudíž rozpoznávající diferen-
ciační antigenní místo) rozpoznává základní sekvenci PRGGQAKKKK (nacházející se u izolátu I-1102 v pozici 41 až 50) nebo PRGGQAKRKK nebo PRGGQAKKRK nebo GPGKKNKKKN nebo GPGKKNKKKT nebo GPGKKNRKKN nebo GPGKKFKKKN nebo GPGKKIKKKN nebo GPGQINKKIN. Skupina 4 (A) (ve které byla mezi jiným MAb 138.22 a reagující především s evropskými izoláty PRRSV a tudíž rozpoznávající diferen-
ciační antigenní místo) rozpoznává základní sekvenci MAGKNQSQKK (nacházející se u izolátu I-1102 v pozici 1 až 10) nebo MPNNNGKQTE nebo MPNNNGKQPK nebo MPNNNGKQQK nebo MPNNNGKQQN nebo MPNNNGKQQK nebo MPNNNGRQQK. Zmíněná antigenní místa mohou být snadno, při zachování antigenicity a tím i funkčnosti výše zmíněných antigenních míst proteinu N, osobou odborně zdatnou v oblasti navrhování a syntézy peptidů uměle změněna. Přestože skupina 1 netvoří lineární epitopy, porovnání PRRSV aminokyselinových sekvencí s LDV aminokyselinovými sekvencemi ukazuje, že se v pozicích odpovídajících aminokyselinám 51 až 68 izolátu I-1102 (u izolátu I-1102 je to sekvence PKPHFPLAAEDDIRHHL) nebo aminokyselinám 79 až 90 (u izolátu I-1102 je to sekvence SIQTAFNQAGT) nebo amino-
kyselina 111 až 124 (u izolátu I-1102 je to sekvence HTVRLIRVTSTSAS) nacházejí konfor-
mační epitopy. Zmíněná konformační antigenní místa mohou být snadno, při zachování anti-
genicity a tím i funkčnosti výše zmíněných antigenních míst proteinu N, osobou odborně zdatnou v oblasti navrhování a syntézy peptidů uměle změněna, především s přihlédnutím k poznatkům získaným porovnáváním sekvencí PRRSV izolátů se sekvencemi N proteinů jiných zástupců Arteriviridae. To bylo potvrzeno expresí chimérních LDV/PRRSV ORF7 proteinů v SFV expresním systému (postup byl stejný jako v případě ORF4) a stanovením reaktivity výsledných produktů s monoklonálními protilátkami ze skupiny 1.

Chimérní proteiny N

Doména D byla dále mapována pomocí konstruktů ORF7 exprimujících chimérní proteiny N. Vzhledem k tomu, že 6 z 10 monoklonálních protilátek namířených proti doméně D rozeznávalo jak evropské, tak i severoamerické izoláty PRRSV, byly oblasti N proteinu, nejvíce konzervované mezi LV a severoamerickým izolátem VR2332 (obr. 4) mutovány. Nukleotidová sekvence kódující aminokyseliny 51 až 67, 80 až 90 a 111 až 128 byla nahrazena sekvencí kódující odpovídající aminokyseliny LDV (obr. 4). Pro úplnost bylo místo B (aminokyseliny 25 až 30), které je u evropských i severoamerických izolátů také konzervováno, mutováno. Vzhledem k tomu, že se aminokyselinová sekvence LV proteinu N v místě B velmi podobná amino-
kyselinové sekvenci LDV proteinu N, byla tato oblast LV proteinu N nahrazena oblastí kódující odpovídající aminokyseliny v N proteinu EAV (obr. 4). Mutované i divoké proteiny N byly exprimovány v BHK-21 buňkách (Semliki forest virus expresní systém) a byly testovány metodou IPMA s použitím N-specifických monoklonálních protilátek. D-specifické monoklo-
nální protilátky reagovaly shodně (tabulka 1). Jejich vazba byla narušena mutacemi mezi aminokyselinami 51 až 67 a 80 až 90, ale nikoliv mutacemi mezi aminokyselinami 111 až 128 nebo 25 až 30 (místo B). Jak jsme očekávali, proteiny N nesoucí mezi aminokyselinami 51-67 a 80-90 LDV sekvenci byly stále ještě značeny protilátkami proti místům A, B a C. Ovšem množství barvených buněk a intenzita zbarvení byla nižší, než jaká byla pozorována u divokého typu proteinu N a u proteinu N mutovaného v oblasti mezi aminokyselinami 25 až 30 (místo B) nebo v oblasti mezi aminokyselinami 111-128 (tabulka 1). To bylo pravděpodobně způsobeno

nižší úrovní exprese proteinu N mutovaného mezi aminokyselinami 51–67 a 80–90, neboť i v případě kdy byla stejná množství transkriptů translatována *in vitro*, byly získané výtěžky zmíněných proteinů v porovnání s ostatními N proteiny nižší (data nejsou zobrazena). Jak jsme očekávali, proteiny N nesoucí v místě B EAV sekvence nebyly monoklonálními protilátkami proti místu B rozpoznány (pepscan analýza), ale byly rozpoznány monoklonálními protilátkami proti místům A, C a proti doméně D. Z těchto dat vyplývá, že epitopy patřící do domény D jsou závislé na konformaci a jsou tvořeny (zčásti) aminokyselinami 51–67 a 80–90.

Sekvenční analýza GP₄ proteinu z různých PRRSV kmenů

Aby bylo možné analyzovat, je-li hlavní neutralizační antigenní místo, rozpoznávané GP₄-specifickými protilátkami, mezi jednotlivými izoláty PRRSV konzervované, byla testována reaktivita a neutralizující aktivita monoklonálních protilátek na sedmi různých evropských kmenech. Výsledky ukázaly, že zmíněné protilátky rozpoznávají a neutralizují nizozemský kmen NL1 a anglický kmen NY, ale nikoliv dánský izolát DEN, dva španělské kmeny SPA1 a SPA2, francouzský izolát FRA a kmen LUX izolovaný v Lucembursku. Z toho důvodu nás zajímala aminokyselinová sekvence zmíněných izolátů v oblasti GP₄ proteinu, ve které se nachází neutralizační místo. ORF4 byly klonovány metodou RT-PCR s použitím primerů odvozených od PRRSV sekvence a klonované úseky DNA byly osekvcovány. Aminokyselinové sekvence GP₄ proteinů zmíněných izolátů, odvozené od stanovené nukleotidové sekvence, byly identické se sekvencí GP₄ kmene I-1102 z 86 až 97 %. Porovnání zmíněných aminokyselinových sekvencí ukázalo, že neutralizační místo (aminokyseliny 40 až 79) je mnohem více divergentní než zbývající části proteinu. V této oblasti se lišily především aminokyselinové sekvence izolátů DAN, SPA1, SPA2 a FRA. Tento poznatek je ve shodě se zjištěním, že tyto kmeny nejsou neutralizovány I-1102 specifickými monoklonálními protilátkami a dále potvrdil, že tato oblast není mezi evropskými izoláty příliš konzervovaná. Další vysoce heterogenní oblast byla nalezena na N-konci GP₄ proteinu. Porovnáním aminokyselinové sekvence PRRSV GP₄ proteinu a GP₄ proteinu z VR2332 a z dalších severoamerických kmenů ukázalo, že také americké izoláty jsou v oblasti neutralizačního místa GP₄ proteinu heterogenní. Porovnáním aminokyselinových sekvencí bylo zjištěno, že neutralizační místo severoamerických izolátů je v porovnání s evropskými kmeny kratší (výsledkem porovnání sekvencí je mezera v neutralizační oblasti sekvence amerických izolátů) (obr. 3), což je v dobré shodě se zjištěním, že žádný ze zmíněných izolátů není rozpoznáván použitými monoklonálními protilátkami. Celkově byla mezi americkými izoláty pozorována vyšší diverzita než mezi evropskými kmeny.

To je ve shodě s vlastnostmi, charakteristickými pro typický virový obal, reprezentovanými například aminokyselinovou sekvencí GP₄ proteinu. Potenciál neutralizačního místa, využitelný pro přípravu vakcíny, má, vzhledem k heterogenitě neutralizačních míst, velký význam. Porovnáním aminokyselinových sekvencí GP₄ proteinů různých evropských kmenů bylo zjištěno, že neutralizační místa vykazují mnohem vyšší variabilitu než ostatní části proteinu, což předpokládá, že tato místa jsou citlivá k imunoselekcí. Porovnání sekvencí neutralizačních míst evropských a severoamerických izolátů ukázalo, že severoamerické kmeny mají v porovnání s evropskými v sekvenci mezeru velkou 4 aminokyseliny, což znovu ilustruje obrovskou variabilitu v aminokyselinové sekvenci nově identifikovaného neutralizačního místa PRRSV.

Neutralizační místo GP₄ proteinu popsané zde, je prvním takovým místem identifikovaným u Lelystad viru. V případě dalších dvou arterivirů, EAV a LDV, byly izolovány neutralizující monoklonální protilátky a, které byly všechny namířeny proti G₁/VP3 proteinu, kódovanému ORF5 (Deregt *et al.*, 1994; Glaser *et al.*, 1995; Balasuriya *et al.*, 1995; Harty and Plagemann, 1988). Mapováním pomocí mutantů necitlivých k neutralizaci byla určena poloha neutralizačního místa EAV. Toto místo je tvořeno specifickými aminokyselinami ve vnější doméně G₁.

Podobně byla analyzována sekvence ORF7 proteinu PRRSV (obr. 4). Tato analýza opět potvrdila velkou variabilitu v aminokyselinové sekvenci nově identifikovaných antigenně konzervovaných i nekonzervovaných míst PRRSV. V této části projektu byla identifikována čtyři různá antigenní místa nacházející se na proteinu N PRRSV. Tři místa, nazvaná A, B a C, jsou tvořena lineárními

epitopy a nachází se mezi aminokyselinami 2–12, 25–30 a 40–46 resp. Na rozdíl od nich čtvrté místo, nazvané doména D, obsahuje konformačně závislé epitopy, které jsou (alespoň z části) tvořeny aminokyselinami 51–67 a 80–90. Místa A a C nesou epitopy, které jsou konzervované mezi evropskými, ale nikoliv mezi americkými izoláty PRRSV, místo B obsahuje epitopy konzervované jak mezi evropskými, tak mezi americkými izoláty a místo D obsahuje konzervované i nekonzervované epitopy jak u evropských, tak i severoamerických izolátů PRRSV. Konzervovaná místa proteinu N popsaná výše jsou pro vývoj diagnostických testů určených pro jednoznačnou diagnózu PRRSV infekcí velmi důležitá. Tyto testy by se měly vyhnout využití nekonzervovaných míst a tudíž by měly zabránit vzniku falešně negativních výsledků. Kromě toho je znalost různých nekonzervovaných míst obrovskou výhodou při vývoji diferenciacních testů, které například dokáží rozlišit mezi očkovanými prasaty a prasaty infikovanými divokým typem PRRSV.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1: Schematické znázornění proteinů G exprimovaných v pSFV1 a jejich reaktivita s GP₄ specifickými monoklonálními protilátkami. Vyznačeny jsou také názvy plazmidů nesoucích jednotlivé ORF4 geny. Prázdné obdélníky představují aminokyselinové sekvence odvozené od proteinu G kódovaného ORF4 PRRSV, černě jsou vyznačeny aminokyselinové sekvence odvozené od proteinu G kódovaného ORF4 VR2332. Pořadová čísla aminokyselin jsou vyznačena nad odpovídajícími obdélníky. Geny byly nejprve vneseny do plazmidu pGEM–4Z, a teprve poté byly přeneseny do pSFV1, jak bylo podrobněji popsáno v kapitole „materiál a metody“. Kompletní soubor 14 GP₄–specifických monoklonálních protilátek reagoval s různými konstrukty v IPMA testu identicky a reaktivita jednotlivých konstruktů je na obrázku vyznačena symboly + (pozitivní) nebo – (negativní).

Obrázek 2: Pepscan analýza GP₄–specifických monoklonálních protilátek a polyklonálního séra s překrývajícími se 12–merními peptidy reprezentujícími aminokyselinu 12 až 94 proteinu GP₄. Výsledky získané s protilátkami 130.7 a 138.28, které rozeznávají po sobě jdoucí peptidy, jsou znázorněny na obr. 2A. Další 5 monoklonálních protilátek (122.29, 122.30, 122.66, 122.71 a 138.28) vykazovalo obdobnou specifitu. Výsledky pokusů s polyklonálním sérem, získaným ze dvou prasat před imunizací (va12–0 a va14–0), po imunizaci vektorem odvozeným od pseudo-viru vztekliny, exprimující ORF4 (va12–54 a va14–54) a po následné expozici PRRSV (va12–sl a va14–sl) jsou znázorněny na obrázcích 2A a 2B. Výsledky pokusu s polyvalentním prasečím anti–LV sérem 21 (va21) jsou na obrázku 2D. Na obrázcích jsou vyznačeny aminokyselinové sekvence reaktivních peptidů, nejčastěji se vyskytující aminokyselinové zbytky jsou uvedeny v rámečku.

Obrázek 3: Porovnání aminokyselinových sekvencí GP₄ (A) a N (B) proteinů z různých PRRSV kmenů. Zobrazeny jsou pouze aminokyseliny, které se liší od sekvence I–1102, která je znázorněna v prvním řádku. Základní aminokyselinová sekvence, která je při pepscan analýze rozpoznávána monoklonálními protilátkami a/nebo polyklonálním sérem je potvrzena.

Obrázek 4: Lokalizace antigen–vazebných míst v sekvenci proteinu N a porovnání sekvence N proteinu LV se sekvencí N proteinu severoamerického izolátu VR2332 a LDV. Antigen–vazebná místa A, B, a C a doména D jsou znázorněny stínováním. Místa A, B a C byla identifikována pepscan analýzou, doména D byla identifikována na základě konstrukce a analýzy chimérních N proteinů. Aminokyselinové sekvence LV, které byly za účelem mapování domény D nahrazeny odpovídajícími aminokyselinovými sekvencemi LDV jsou potvrzeny. Aminokyseliny proteinu N EAV, které byly vloženy mezi aminokyseliny 25–30 za účelem mutace místa B, jsou zobrazeny pod sekvencí LDV. Identické aminokyseliny jsou spojeny vertikálními úsečkami.

Tabulka 1

Značení chimérních proteinů N, exprimovaných vektorem SFV (Semliki forest virus) v BHK-21 buňkách, metodou IPMA.

Plazmid	Mutace	Značení MAb metodou IPMA			
		138.22	125.1/126.9/NS95/NS99	126.15	122.15/130.2/130.4/131.7/131.9/WBE1/WBE4/WBE5/WBE6/SDOW17
		A	B	C	D
pABV470	–	+++	+++	++	+++
pABV462	25–30	+++	–	++	+++
pABV518	51–67	++	++	+	–
pABV460	80–90	++	++	+	–
pABV471	111–124	+++	+++	++	+++

5

Tabulka 2

Sekvence primerů použitých pro PCR za účelem klonování ORF4 genů LV a VR2332 a chimérních ORF4 genů do plazmidových vektorů pGEM-4Za pSFV1.

Název	Sekvence*	Vložené restrikční místo
LV13	5' GGCAATTGGATCCATTGGA 3'	BamHI
LV14	5' AGAAGCAAGCTTGCAGGAGTC 3'	HindIII
LV46	5' GCCGTCGGTACCCCTCAGTACAT 3'	KpnI
LV57	5' ATGTACTGAGGGGTACCGACGGC 3'	KpnI
PRRSV4	5' GGCAATTGGATCCACCTAGAATGGC 3'	BamHI
PRRSV5	5' GCGAGCAAGCTTCCGCGGTCAAGCATTTCT 3'	HindIII
PRRSV6	5' CTTGCCGCCCGGTGGTGTG 3'	SacII
PRRSV9	5' ACAGCTGGTACCTATCGCCGTACGGCACTGA 3'	KpnI
PRRSV10	5' GCGATAGGTACCCCTGTGTATGTTACCAT 3'	KpnI

* Podtržené nukleotidy v těchto primerech byly vzhledem k původním sekvencím mutovány tak, aby vznikla restrikční místa nebo přesahující sekvence a aby bylo zabráněno v primerech jsou vyznačena proložení.

10

15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Peptid mající 5 až 15 aminokyselinových zbytků vyvolávající tvorbu protilátek, které reagují s alespoň dvěma různými PRRSV izoláty, obsahující aminokyselinovou sekvenci odvozenou od aminokyselinové sekvence odpovídající konzervovanému místu proteinu N PRRSV, přičemž aminosekvence odpovídající konzervovanému místu proteinu N PRRSV je vybraná ze skupiny skládající se z VNQLCQLLGA A VNQLCQMLGK.

20

2. Protilátka reaktivní s peptidem podle nároku 1.

25

3. Diagnostická testovací souprava pro detekci nebo identifikaci protilátek namířených proti PRRSV izolátům, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň jeden peptid podle nároku 1 společně s vhodnými detekčními prostředky.

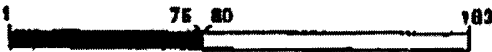
30

4. Diagnostická testovací souprava pro detekci nebo identifikaci protilátek namířených proti antigenům odvozených od PRRSV izolátů, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje protilátku podle nároku 2 společně s vhodnými detekčními prostředky.

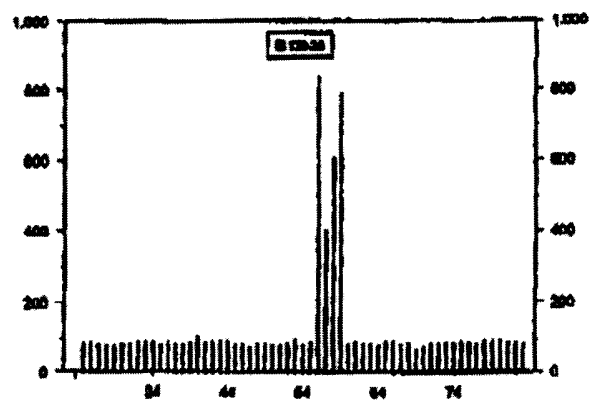
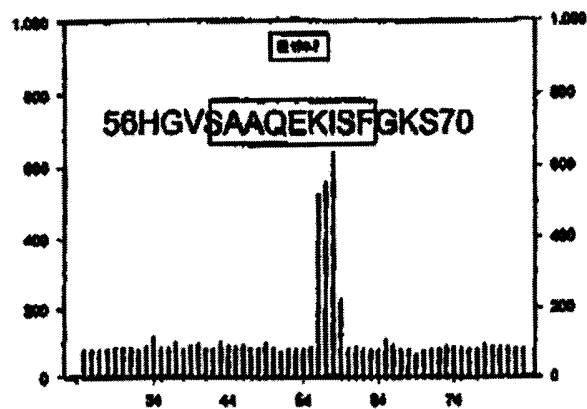
35

9 výkresů

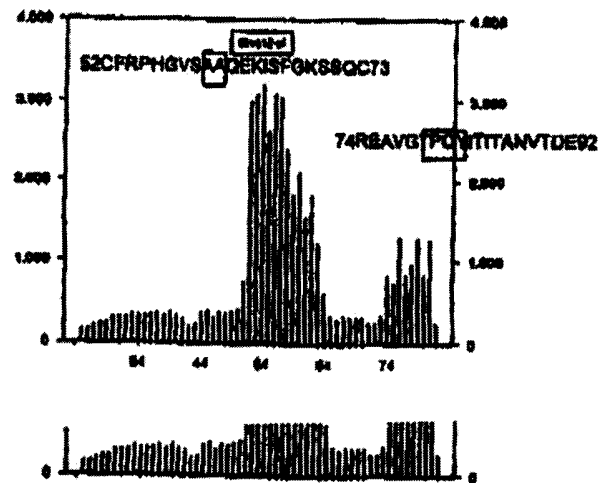
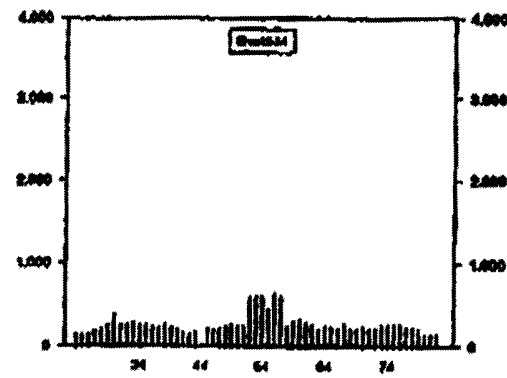
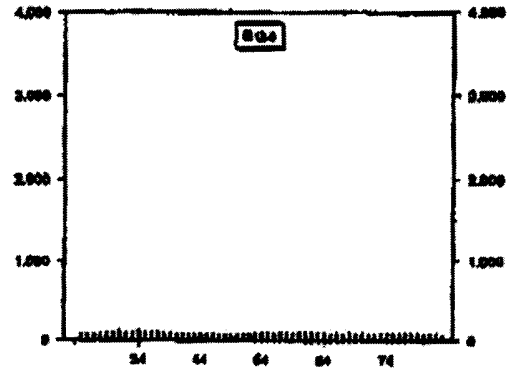
OBRÁZEK 1

pGEM	pSFV1		reaktivita s MAb
pABV208	pABV266		+
pABV306	pABV296		+
pABV308	pABV305		-
pABV314	pABV321		+
pABV326	pABV326		+
pABV270	pABV271		-

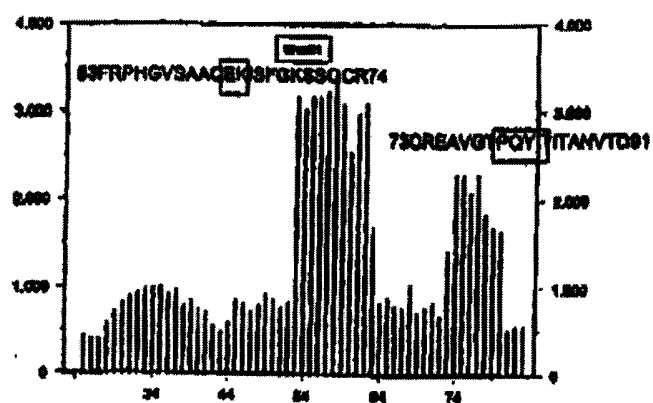
OBRÁZEK 2A



OBRÁZEK 2B



OBRÁZEK 2D



OBRÁZEK 3A: Porovnání aminokyselinových sekvencí GP₄ jednotlivých PRRSV izolátů

I-1102-4	MAAATLFFLAGAQHIMVSEAFACKPCFSTHLSDIETNTTAAAGFMVLQDI	50
NL1-4		50
NY2-4	L	50
PRRSV10-4	L	50
LUX-4	L	50
SPA1-4	I S F	50
FRA-4	I L F	50
DEN-4	I L L	50
VR2332-4	SSL L V FKCLL Q SS A K S A	50
IA1-4	SL L V FKCLL Q SS A K S A E	50
KS1-4	SL LMV FKCLL Q SS A K SSV	50
MN1-4	SL LMV FKCLL Q SS A K S A	50
IA6-4	SL L V FKCLL Q SS A K S A	50
IL1-4	SL L V FKCFV Q SS A K S A	50
NE1-4	SSL LMV FKCLL Q SS A K N A E	50
SG1-4	SL L V FKCLL Q NQ SS E K G A E	50
VR2385-4	SL L V FKCLL Q SS K G A	50
KY1-4	SL LMV FKCLL Q SS A K S A	50
MO1-4	SL LMV FERLL Q SS A K G A E	50
** .. * .. * .. * .. * .. * .. * .. * .. * .. *		
I-1102-4	NCFRPHGVSAAOEKISFGKSSQCREAVGITPOYITITANVTDESILYNADL	100
NL1-4		100
NY2-4		100
PRRSV10-4		100
LUX-4	L R E	100
SPA1-4	L T M P P I	100
FRA-4	L T N P I	100
DEN-4	T A A EESQSVT M P I H	100
VR2332-4	S L HRDSASE----AIR IP T I V V N HSS	96
IA-4	S L HRDSASE----AIR VP T I V N HSS	96
KS1-4	S L HRDSASE----AIR VP T I V N HSS	96
MN1-4	S L HRDSASE----AIR IP A I V N HSS	96
IA6-4	S L HRDSASE----AIR P T I V N HSS	96
IL1-4	S L HRDSASE----AIR IP T I V N HSS	96
NE1-4	S L HRDPAPE----A R IP T I V N HSS	96
SG1-4	S L HRDPAPE----AIR VP T I V SV N HSS	96
VR2385-4	S L HRDSASE----AIR VP T I V V N HSS	96
KY1-4	S L HRDSASE----T R VP T I V V N HSS	96
MO1-4	S L HRDETSE----APR VP T I V V N HSS	96
* .. * .. * .. * .. * .. * .. * .. * .. *		

OBRÁZEK 3A: pokračování

I-1102-4										146SACLFPYASEMSEKGFKVIFGNVSGVVSBACVNFTDYVAHVTOHTQQH	150
NLI-4											150
NYZ-4											150
PFRSVI9-4											150
LIX-4											150
GPAI-4											150
FRA-4											150
DEN-4											150
VR2J32-4	S	V	I AV	S Q KEF -RS							145
IAI-4	S	E V I AV	S Q REF -RS								145
KSI-4	S	E V I AV	S Q REF -RS								145
NNI-4	S	E V I AV	S Q REF -RS								145
IAG-4	S	V IAV	S Q KES -RS								145
ILX-4	S	E V I AV	S Q REF -RS								145
MEL-4	S	V I AV	S Q KEF -RS								145
BGI-4	S	V I AV	S Q KEF -RS								145
VR2JB5-4	S	V I AV	S Q KEY -RS								145
KYL-4	S	V AV	S Q IKEF -PS								145
MOI-4	S	V AV	S Q IKEF -RS								145

I-1102-4	LVIDHIRLLHFLTPSAMRMATTIACLFALLAI						183
ML1-4							183
NY2-4							183
PRRSV10-4							183
LUX-4							183
GPA1-4	T						183
FRA-4	T						183
DEN-4	A						183
VR2332-4	V	V	M	ET	VL		178
IA1-4	MV	V	M	ET	VL		178
KS1-4	MV	V	M	ET	VL		178
MM1-4	MV	V	M	ET	FL	G	178
IA6-4	V	V	M	ET	VL		178
IL1-4	V	V	M	ET	VL		178
NR1-4	V	V	M	ET	VL	F	178
SG1-4	V	V	M	ET	VL		178
VR2385-4	V	V	M	ET	VL	T	178
KY1-4	V	V	F	I	ET	VL	G --- 175
NO1-4	V	V	I	ET	FL	G	--- 175

OBRÁZEK 3B: Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinu N z různých PRRSV izolátů

[illegible]

OBRÁZEK 4

		A	B	C	
VR2332	MPNNNGKOTEEK----	KGDGOPVNOLCOMLGKIIAQONQSRGKGPQKKN			45
LV	MAGKNOSQKKKSTAPMGNGOPVNOICOLLGAMIKSQ---	ROQERGGGA			46
LDV	M-----SONKCKSGQNKGANQ---	QLNQLINALLRNAGQNKKGK----	Q		37
		D RMP			
		D	D		
VR2332	KKKNPCKPHFPLATEDDVREHFTPSERQCLSGIOTAFNOGAGTCTLSDS				95
LV	KCKCKPKPHFPLAEEDEEHHLTQTERSLCQSTQTERKGGAGTASLSSS				96
LDV	KCKCKPKLHFPMAGPSDLRHYMTPEVQMCRSSLYTLENQGGGOCTLVDS				87
VR2332	GRISYTVFSLPTHHTVRLIRVTASPSA----			123	
LV	GKVSFOVEFMLEVAHCVRLIRVTSTASOGAS			128	
LDV	GGINFIVSFMLPTHATVRLINASANSAA----			115	

 Konec dokumentu
