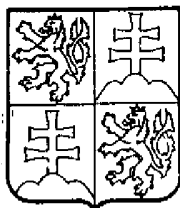


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 06.06.90

(32) 06.06.89

(31) 89/8930570

(33) EP

(21) 02806-90.W

(13) A3

5(51) C 07 K 13/00,
A 61 K 39/12,
G 01 N 33/569,
C 12 N 15/40,
C 12 Q 1/68,
1/70

(40) 12.11.91

(71) IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCH-MEDIZINISCHE PRO, Vídeň, AT

(72) Heinz Franz X. doc. dr., Wien, AT
Mandl Christian W. dr., Wien, AT
Kunz Christian prof. dr., Wien, AT
Dorner Friedrich prof. dr., Wien, AT
Bodemer Walter doc. dr., Wien, AT
Antonie Gerhard dr., Gross Enzersdorf, AT

(54) Peptidy a polypeptidy, vakcíny a nukleové kyseliny

(57) Řešení se týká nukleotidových řetězců a řetězců aminokyselin bílkoviny NS-1 západního subtypu viru TBE, který je původcem encefalitidy, přenášené klíšťaty. Řetězec byl odvozen na základě klonů cDNA. Bílkovinu NS-1 je možno použít jako složku vakcíny proti viru TBE, jako diagnostické reakční činidlo a pro další účely. Nukleovou kyselinu, která je kódem pro bílkovinu NS-1 je možno použít pro získání systému vhodného k expresi bílkoviny NS-1 nebo pro přípravu živé vakcíny.

PRO VYHRAŠČOVÁNÍ A OCHRANU PRÁV 11. III. 91	URAD PRO VYHRAŠČOVÁNÍ A OCHRANU PRÁV	011098	2006 10
--	---	--------	---------

Peptidy a polypeptidy, vakcíny a nukleové kyseliny

Oblast techniky

Vynález se týká peptidů, polypeptidů, vakcín a diagnostických látek pro západní podtyp viru TBE a nukleových kyselin a bílkovin, vhodných pro použití v těchto vakcínách a diagnostických činidlech.

Dosavadní stav techniky

Západní podtyp viru klíšťové encefalitidy (TBE) náleží do čeledi flaviviridae. Jde o RNA viry, opatřené kulovitým lipidovým obalem, jak bylo popsáno v Westaway a další, Intervirology 24, 183-192, 1985. Prototypem tohoto viru je virus žluté horečky. Všechny viry z této čeledi jsou serologicky příbuzné, jak je možno prokázat testy na inhibici hemaglutinace. Při zkřížené neutralizaci je však možno tuto čeleď rozdělit na několik podskupin na základě serologických komplexů, jak bylo popsáno v DeMadrid and Portefield, J. Gen. Virol. 23, 91-96, 1974. Tyto skupiny obsahují blíže příbuzné flaviviry na rozdíl od serologicky méně příbuzných virů. Virus TBE náleží do skupiny serokomplexu virů, přenášených klíšťat. Tato skupina zahrnuje rovněž viry nazývané Louping ill, Langat, Omsk (hemorhagická horečka), Kyasanur (lesní horečka) a Negishi.

Kmeny viru TBE je dále možno přiřadit k západnímu (evropskému) typu, který je přenášen primárně klíštětem Ixodes ricinus a k dálněvýchodnímu typu, jehož hlavním vektorem je Ixodes persulcatus (Clarke, 1964, Bull. WHO 31, 45-56).

Tato diferenciací na podtypy byla potvrzena kompetitivní RIA a mapováním peptidů při použití omezené proteolýzy odpovídajících strukturních glykoproteinů, jak bylo popsáno v Heinz a Kunz, 1981, J. Gen. Virol. 57, 263-274) a také analýzou antigenů při použití monoklonálních protilátek

(Heinz a další, Virology 126, 525-537, 1983).

Zralé částice viru obsahují pouze 3 strukturní bílkoviny nazývané E, C a M s přibližnou molekulovou hmotností 50 až 60 000, 15 000 a 7 000.

Genom flavivirů je tvořen RNA s jednoduchým řetězcem s přibližně 11 000 páry s pářitou mRNA s molekulovou hmotností 4×10^6 . Spolu s bílkovinou C tvoří tato RNA sferický nukleokapsid, který je obalen lipidovým obalem, spojeným s bílkovinou E i M. Pokusy s čištěnými přípravky bílkoviny E, získanými po solubilizaci viru pomocí smáčedel prokázaly, že bílkovina E představuje virový hemaglutinin, to znamená, že způsobuje hemaglutinaci určitých erythrocytů za příslušných podmínek, což po imunizaci vyvolá inhibici hemaglutinace, neutralizaci a vznik ochranných protilátek a tím i imunitu proti nákaze živým virulentním virem, jak bylo popsáno v Heinz a další, Infect. Immun. 33, 250-257, 1981.

Kromě těchto strukturních bílkovin bylo možno prokázat v buňkách, infikovaných flaviviry určité nestrukturní bílkoviny, specifické pro virus.

Organizace genomu flavivirů byla v poslední době stanovena cDNA-klonováním a analýzou řetězce virů žluté horečky, West Nile a Murray Valley encefalitidy (Rice a další, Science 229, 726-733, 1985, Dalgarno a další, J. Mol. Biol. 187, 309-323, 1986, Castle a další, Virology 147, 229-236, 1985, Castle a další, Virology 149, 10-26, 1986, Wengler a další, Virology 147, 264-274, 1985). Podle těchto analýz obsahuje RNA genomu flavivirů jednoduchý dlouhý otevřený řetězec, obsahující přibližně 11 000 nukleotidů, který je kódem pro všechny strukturní a nestrukturní bílkoviny.

Pořadí genů, stanovené pro virus YF a potvrzené pro několik dalších flavivirů je 5'; C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 3'. E a prM(M) označují strukturní bílkoviny, které lze nalézt v nezralých (C, prM, E) a ve zralých (C, M a E) částicích viru, kdežto zbytek genomu je kódem pro nestrukturní bílkoviny. Strukturní a nestrukturní bílkoviny byly

stanoveny v korelaci s odpovídajícími segmenty genomu na základě aminoterminální analýzy řetězce.

Je možno předpokládat, že translace virových bílkovin začíná na prvním kodonu AUG na 5' zakončení RNA a pokračuje až do stop kodonu na 3' zakončení RNA. Tvorba jednotlivých bílkovin je tedy provázena řadou specifických štěpných pochodů, jichž se účastní jak buněčné proteázy, tak proteázy, specifické pro virus.

Až dosud bylo zjištěno přibližně 60 různých flavivirů a přibližně 2/3 z nich se přenáší kousnutím infekčními arthropody, takže jsou nazývány také viry ARBO (arthropod-borne). Několik z nich je pathogenních pro člověka včetně viru žluté horečky, viru dengue, viru japonské encefalitidy nebo viry jiných encefalitid (Shope v "The Togaviruses, str. 47-82, Academic Press, New York, 1980).

Virus TBE je endemický v mnoha evropských státech, Rusku a Číně. Onemocnění je dobře dokumentováno v některých státech střední Evropy jako jsou Rakousko, Československo a Maďarsko a každoročně je hospitalizováno několik set nemocných, což představuje vážný zdravotní problém.

Onemocnění je možno účinně zabránit vakcinací pomocí vakciny, kterou je vysoce čištěný, formaldehydem inaktivovaný virus (Kunz a další, J. Med. Virol. 6, 103-109, 1980), který vyvolává imunologickou odpověď proti strukturním bílkovinám viru. Zásadní nevýhodou této vakciny je skutečnost, že je nutno zacházet s velkými objemy potenciálně nebezpečné suspenze viru v průběhu její výroby. Je proto nutné zachovávat rozsáhlá a nákladná bezpečnostní opatření.

Byly proto vyvíjeny snahy nalézt způsob výroby vakciny bez svrchu uvedených nevýhod. V EP 284 791 se tento problém řeší získáním molekuly DNA s obsahem DNA viru západního podtypu TBE, která je kódem pro alespoň část alespoň jednoho

typu strukturní bílkoviny, například ze skupiny bílkovin C, prM, M nebo E nebo západního podtypu viru TBE.

Tato molekula DNA odpovídá RNA s jednoduchým řetězcem západního podtypu viru TBE a bylo prokázáno, že je vhodná pro získání genetické informace při expresi polypeptidu, a to úplné bílkoviny C, prM, M nebo E západního podtypu viru TBE nebo části některé ze svrchu uvedených bílkovin. Takový polypeptid je možno užít k diagnostickým nebo léčebným účelům například při výrobě vakciny.

Analyza řetězce rovněž potvrdila, že existuje diferenciace proti dálněvýchodnímu podtypu. Aminokyseliny jednotlivých řetězců se od sebe liší až ve 14 % (v závislosti na bílkovině), jak bylo popsáno v publikaci Jamščikov a Pletnov, *Nucleic Acid Res.* 16, 7750 (1988).

Přestože vakcina na bázi jedné nebo většího počtu rekombinantních strukturních bílkovin, tak jak byla popsána v EP 284 791 může znamenat zlepšení ve srovnání s inaktivovaným neporušeným virem jako vakcinou z hlediska výroby, má jinak s uvedenou vakcinou stejné nevýhody, že totiž neobsahuje nestrukturní bílkoviny, které mohou přispívat k ochranné imunologické odpovědi.

Nestrukturní bílkoviny mají důležité funkce pro životní cyklus flavivirů, a to pro dozrávání, proteolytické pochody a pro replikaci RNA. Přestože bylo prokázáno, že jedna z nestrukturních bílkovin (NS 1) je u virů, odlišných od virů TBE schopna vyvolat ochrannou imunologickou odpověď (Schlessinger a další, *J. Gen. Virol.* 68 853-857 (1987), Zhang a další, *J. Virol.* 62, 3027-3031 (1988)) u pokusných zvířat, nebyly k dispozici žádné důkazy tohoto typu pro nestrukturní bílkoviny TBE.

Je známo, že subneutralizační koncentrace neutralizačních protilátek nebo jiných protilátek proti epitopům flavivirové bílkoviny E může zprostředkovat na protilátce závislé zlepšení infekitivity u buněk, nesoucích Fc-receptory (Portefield, Cardoso: "Concepts in viral Pathogenesis I", kapitola 17, str. 117), tento poznatek pomáhá objasnit pathogenetiku hemorrahgické horečky dengue a syndrom šoku, vyskytující se u této choroby (Halstead, Science 239, 476-481 1988). V některých případech proto může být výhodné se vyvarovat použití bílkoviny E flavivirů ve vakcínách nebo je dokonce možno použít NS 1 jako jedinou složku vakcíny a vůbec do vakcíny nevčleňovat strukturní bílkoviny.

Jedna z bílkovin NS-1 západního podtypu viru TBE byla v poslední době identifikována svým řetězcem. Tato bílkovina je vhodnou složkou vakcíny a je možno ji snadno získat použitím rekombinantní DNA.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je tedy peptid nebo polypeptid, který obsahuje alespoň část aminokyselinového řetězce bílkoviny NS-1 západního podtypu viru TBE.

V případě, že peptid nebo polypeptid obsahuje pouze část aminokyselinového řetězce bílkoviny je výhodné, aby šlo o imunogenní část. Avšak s výhodou má tento peptid nebo polypeptid řetězec aminokyselin, znázorněný na obr. 4.

Podstatu vynálezu také tvoří jakékoliv řetězce aminokyselin, které se liší od řetězce aminokyselin přírodního NS-1 mutací nebo transposicí, což spadá do běžných přirozených variací západního podtypu viru TBE. Tyto řetězce si však stále uchovávají podstatné vlastnosti (zvláště antigenní) nestrukturní bílkovina NS-1 západního podtypu viru TBE.

Přestože je výhodné získávat peptidy nebo polypeptidy podle vynálezu expresí příslušných nukleotidových řetězců, je také možno je izolovat nebo s výhodou syntetizovat chemickým způsobem. Peptidy nebo polypeptidy je tak možno získat v podstatě v čisté formě, prostě jiných látek, s nimiž jsou za přírodních podmínek obvykle smíseny.

Peptidy nebo polypeptidy podle vynálezu je možno užít jako takové nebo spolu s jednou nebo větším počtem pomocných látek jako diagnostická činidla a jako složky vakcín. S výhodou se tyto látky zpracovávají na prostředky pro použití v lékařství.

Vynález se rovněž týká vakciny, která obsahuje peptid nebo polypeptid podle vynálezu a jednu nebo větší počet pomocných složek, přijatelných z farmaceutického hlediska. Z těchto složek může jít o nosič nebo pomocnou látku pro peptid nebo polypeptid. Další vhodnou složkou je například pufr.

Nosičem pro vakcinu může být jakýkoliv vhodný nosič a může v případě potřeby obsahovat jednu nebo větší počet pomocných látek. Podle běžné praxe je možno všechny vakciny podle vynálezu sterilizovat.

Výhodným použitím vakcín s obsahem antigenních peptidů nebo polypeptidů je příprava specifických imunoglobulinů, například monoklonálních nebo polyklonálních protilátek, tyto látky je možno získávat známým způsobem. Tyto protilátky proti peptidům a polypeptidům rovněž tvoří součást podstaty vynálezu.

Jak již bylo svrchu uvedeno, je možno použít prostředek s obsahem jednoho nebo většího počtu peptidů nebo polypeptidů podle vynálezu jako diagnostické činidlo.

Vynález se rovněž týká nukleových kyselin, které jsou kódem pro peptidy nebo polypeptidy podle vynálezu.

Podstatou vynálezu jsou tedy rovněž nukleové kyseliny, které jsou kódem pro alespoň část bílkoviny NS-1 západního podtypu viru TBE. Tyto nukleové kyseliny, často rekombinantní, zejména rekombinantní DNA mohou být kódem pro celou nebo v podstatě celou bílkovinu NS-1 nebo pro její příslušnou část.

Tyto molekuly DNA a RNA jsou použitelné pro získání peptidů a polypeptidů podle vynálezů a také pro výrobu živých vakcín. Tyto řetězce DNA se s výhodou spojují s DNA viru Vaccinia, který se často užívá jako živá vakcína.

Kromě svého použití jako živé vakciny mají řetězce DNA a RNA své použití také jako sondy.

V současné době nejsou k dispozici žádné specifické látky pro léčbu nemocných s nákazou virem TBE. Existuje však několik potenciálních možností specifické interference s životním cyklem viru včetně postupů, které zahrnují použití nestrukturních bílkovin jako je replikace RNA, posttranslační proteolytické pochody a sestavování úplného viru. Nukleové kyseliny, které jsou kódem pro bílkovinu NS-1 nebo její část by mohly být pro tento účel rovněž použitelné. Kromě interference s funkcemi činnostmi virových bílkovin je také možno blokovat replikační pochody viru při použití protismyslné RNA.

Existuje řada cest pro přípravu molekuly DNA podle vynálezu. Jednou z možností získání molekuly DNA je postup, při němž se nejprve extrahuje RNA viru západního podtypu TBE a molekula RNA se čistí, načež se provede transkripce tohoto templátu RNA na molekulu DNA při použití reversní

transkriptázy. Další možností je chemicky syntetizovat molekulu DNA, jakmile byl zjištěn její řetězec.

Ve výhodném provedení zahrnuje vynález DNA, která hybridizuje s molekulami DNA podle prvního provedení a zejména s řetězcí DNA z obr. 3 a/nebo molekulou DNA, která je kódem pro bílkovinu z obr. 4 za vymezených podmínek, např. při selekci na alespoň 90% homologii řetězce nukleotidů. Molekuly DNA tohoto výhodného typu mohou stále ještě být kódem pro peptidy, vyvolávající jako odpověď tvorbu protilátek, mimoto jsou tyto molekuly DNA vhodné jako sondy.

V jednom z provedení vynálezu jde o nukleovou kyselinu, obsahující úplný řetězec genomu divokého západního podtypu viru TBE, který je kódem pro nestrukturní bílkovinu NS-1 a o molekuly DNA, odvozené od RNA genomu, které jsou kódem pro alespoň část uvedené bílkoviny. Molekuly DNA podle vynálezu mohou odpovídat nebo mohou být komplementární k RNA s jednoduchým řetězcem západního podtypu viru TBE a jsou vhodné pro získání genetické informace, týkající se exprese úplné bílkoviny NS-1 nebo její části nebo většího počtu jejích částí a jejich použití jako složky vakciny pro léčebné a diagnostické účely.

Vynález se výslovně týká všech řetězců DNA, které se liší od molekul DNA, které odpovídají nebo jsou komplementární k přírodnímu řetězci RNA pro NS-1, ať již ke změně došlo degenrací genetického kódu a/nebo mutací a/nebo transposicí v rámci běžných přirozených variací západního podtypu viru TBE. Tyto řetězce jsou tedy stále ještě kódem pro bílkoviny, které mají základní vlastnosti (zejména základní antigenní vlastnosti) nestrukturní bílkoviny NS-1 západního podtypu viru TBE.

Ve výhodném provedení vynálezu je možno tyto řetězce DNA spojovat s dalšími řetězci DNA.

Tyto další řetězce mohou umožňovat replikaci a expresi molekuly DNA v buněčné struktuře. Nejdůležitější řetězce DNA k tomuto účelu jsou řetězce, které mají funkci promotoru nebo mohou být pomocnými řetězce, polyadenylačními signály, a signály pro štěpení. Tyto další řetězce je možno spojovat s molekulami FNA podle vynálezu standardními postupy.

Výhody, které jsou spojeny se svrchu uvedenými molekulami DNA platí rovněž stejným způsobem i pro molekuly RNA. Molekuly RNA podle vynálezu je možno získat izolací a čištěním RNA západního podtypu viru TBE nebo rekombinantním postupem při použití RNA/DNA. Podstatu vynálezu tvoří nejen molekuly RNA, které byly získány řištěním RNA západního podtypu viru TBE, nýbrž také molekuly RNA, které byly získány transkripcí izolované a čištěné RNA viru na DNA působením reversní transkriptázy s následnou transkripcí takto získané DNA zpět do RNA nebo transkripcí RNA, závislou na RNA.

Podstatu vynálezu netvoří pouze molekuly DNA a RNA, tak jak byly svrchu popsány, nýbrž také vektory, obsahující včleněnou molekulu DNA nebo RNA tohoto typu. Podstatu vynálezu tedy tvoří také vektory, a to vektory pro expresi nebo pro klonování, které obsahují řetězec nukleové kyseliny uvedeného typu. ~~Vektorem může být například plasmid, virus (na~~ příklad živočišný, jako Vaccinia, nebo fág) nebo kosmid. Jak je v oboru známo, tyto vektory obvykle obsahují řetězce, řídící replikaci a expresi včleněné RNA nebo DNA. Tyto řídící řetězce mohou obsahovat promotor a mimo jiné různé pomocné řetězce, usnadňující replikaci a/nebo expresi.

Podstatu vynálezu rovněž tvoří hostitelské buňky s obsahem svrchu uvedeného vektoru. Buňky mohou tvořit kulturu.

Vektory se s výhodou uchovávají v buněčné kultuře, v níž dochází k expresi polypeptidů, pro které jsou kódem řetězce DNA a RNA podle vynálezu, s výhodou jde o buněčnou kulturu savčích buněk. Při použití buněčné kultury savčích buněk je možno dosáhnout nejvýhodnějších podmínek pro expresi polypeptidu, který má být užit jako vakcína pro ochranu savců proti infekcím západním podtypem viru TBE.

Vynález bude nyní popsán pro lepší pochopení v souvislosti s přiloženými výkresy.

Na obr. 1 je znázorněna fotografie agarozového gelu, na němž byla provedena elektroforéza nerozštěpeného plasmidu BS 17-6 (dráha b), který obsahuje celý kódový řetězec pro bílkovinu NS-1. V dráze c je znázorněn tentýž plasmid po rozštěpení enzymem BamHI a obě dráhy a obsahují značení o velikosti 0,6 kb, 2 kb a 100 kb.

Na obr. 2. je znázorněn úplný nukleotidový řetězec včleněné části 17-6 v plasmidu BS 17-6.

Na obr. 3 je znázorněn řetězec RNA a řetězec aminokyselin, pro něž je tento řetězec kódem (17-6). Polohy jsou číslovány podle číslování v úplném genomu viru TBE.

Na obr. 4 je znázorněn řetězec aminokyselin bílkoviny NS-1, odvozené od klonu 17-6. Polohy jsou číslovány od první aminokyseliny bílkoviny NS-1.

Na obr. 5, který se týká obsahu příkladu 10 je znázorněn způsob klonování NS-1 v prokaryotickém vektoru pro expresi pUC19S.

Na obr. 6A a 6B, které se rovněž týkají obsahu příkladu 10 jsou znázorněny nukleotidové řetězce klonu pNS1387 na

5' a 3' zakončení. Včleněná část NS1 je zařazena ve správném sledu s bakteriálním genem lacZ. Exprese je pod řízením lac/Z operátoru/promotoru. Na obr. 6A je znázorněna obecná organizace uvedené konstrukce. Na obr. 6B jsou znázorněny řetězce DNA a bílkoviny. V této konstrukci má NS-1 40 přídatných nukleotidů, které odpovídají 14 aminokyselinám z genu lacZ s vazným řetězcem pUC19S na jeho 5'-zakončení. Na 3'-zakončení se nachází 27 přídatných nukleotidů, které nepatří k NS-1 (odpovídají 9 aminokyselinám). Polohy nukleotidů vzhledem ke genomu TBE (z obr.3) jsou označeny pomocí hvězdiček.

Na obr. 7A, který se týká příkladu 11 je znázorněna strategie klonování NS1 s autentickým 5'-signálním řetězcem v prokaryotickém vektoru pro expresi pUC19S.

Na obr. 7B, který se rovněž týká příkladu 11 jsou znázorněny nukleotidové řetězce klonu ptSNS1791 na 3' a na 5' zakončení. Včleněný řetězec NS1 je ve správném sledu s bakteriálním genem lacZ pro expresi pod řízením jeho promotorového systému. V části I je znázorněna obecně strategie konstrukce. V části II jsou znázorněny řetězce DNA a bílkoviny. V této konstrukci má NS1 celkem 39 přídatných nukleotidů, odpovídajících 13 aminokyselinám z genu lacZ a z vazného řetězce pUC19S na 5' zakončení. Na 3' zakončení se nachází ještě 30 nukleotidů, jejichž původ není v NS1 a které

odpovídají 10 aminokyselinám na 3'-zakončení. Polohy nukleotidů relativně ke genomu TBE jsou znázorněny hvězdičkou (TBE genom je na obr. 3).

Na obr. 8A, který se týká příkladu 12 je znázorněno klonování kódové oblasti NS1 ve vektoru pTKgptFlS pro rekombinaci s virem Vaccinia.

Na obr. 8B, který se týká rovněž příkladu 12 jsou znázorněny nukleotidové řetězce klonu pAPNS1338 na 5' a na 3' zakončení. NS1 obsahuje 19 přídavných nukleotidů, odpovídajících 7 aminokyselinám v očekávaném translačním produktu z polyvazné oblasti na 5'-zakončení, 30 přídavných nukleotidů odpovídajících 10 aminokyselinám na 3'-zakončení. Hvězdičkou jsou označeny polohy nukleotidů vzhledem ke genomu viru TBE (obr. 3).

Na obr. 9A a 9B, které se vztahují k příkladu 13 jsou znázorněny podrobnosti klonování NS1 a jeho putativního signálu reakcí s polymerázou (PCR). Na obr. 8A je znázorněna obecná strategie PCR, na obr. 8B řetězce chemicky syntetizovaných oligonukleotidů, užitých jako primery pro amplifikaci DNA. Hvězdičkou jsou označeny polohy nukleotidů v genomu viru podle obr. 3.

Na obr. 10, který se rovněž vztahuje k příkladu 13 je

znázorněn agarozový gel s fragmentem NS1, synthetizovaným pomocí PCR. Agarozový gel je obarven ethidiumbromidem. Detekce DNA se provádí v ultrafialovém světle. Šipka ukazuje fragment s délkou přibližně 1130 bp.

Na obr. 11, který se rovněž týká příkladu 13 je znázorněno klonování NS1 kódové oblasti s putativním signálním řetězcem po syntéze pomocí PCR do vektoru pSC11-OrthDELTA0 pro rekombinaci s virem vaccinia.

Na obr. 12, který se rovněž týká příkladu 13 jsou znázorněny řetězce klonu pSCSNS1444 na 3' a na 5' zakončení. Autentická kódová oblast NS1 včetně signálního řetězce má na svém očekávaném produktu translace 12 přidatných nukleotidů, odpovídajících 4 aminokyselinám z oblasti vazného řetězce na 5' zakončení. Dalších 47 nukleotidů (odpovídajících 16 aminokyselinám) se nachází na 3' zakončení. Hvězdičkou jsou označeny polohy nukleotidů v genomu viru TBE (obr. 3).

Na obr. 13, který se týká příkladu 13 je znázorněna analýza plasmidu pSCtSNS1444 štěpením příslušnými restrikními endonukleázami. Je znázorněna správná orientace včleněného řetězce NS1 do vektoru pSC11-Orth, rovněž je potvrzen rozměr fragmentů, odvozený od řetězce klonu 17-6.

Na obr. 14, který se týká příkladu 14 je znázorněno klonování NS1 včetně putativního signálního řetězce ve vektoru pTKgptF3s pro přenos a rekombinaci s virem vaccinia.

Na obr. 15, který se rovněž týká příkladu 14 je znázorněn nukleotidový řetězec plasmidu pTKtSNS1556 na 3' a 5' zakončení. V této konstrukci má NS1 navíc 24 nukleotidů, které odpovídají 8 aminokyselinám v příslušném produktu translace z vazného řetězce na 5' zakončení. Dalších 26 nukleotidů, které odpovídají 9 aminokyselinám se nachází na 3'-zakončení. Hvězdičkami je označena poloha nukleotidů v genomu viru TBE (obr.3).

Na obr. 16, který se týká příkladu 15, je znázorněna analýza southern blot pro NS1- rekombinanty viru vaccinia, varecNS1444 a varecNS1556. Buňky CV-1 byly infikovány rekombinantním virem vaccinia při 5 pfu/buňka. Dva dny po infekci byla čištěna celková buněčná DNA, materiál byl rozštěpen restriční endonukleázou HindIII a dělen na 1% agarozovém gelu. DNA byla přenesena na nitrocelulozový filtr a byla provedena hybridizace s radioaktivně značeným plasmidem pSCtNS1444 jako sondou pro detekci včleněného fragmentu NS1 a pro sousedící řetězce viru tk. Srovnáním rekombinantních kmenů varecNS11556-112, -124, -122 a varecNS1444-121 s divokým typem viru vaccinia (vzorek 4) byl prokázán očekávaný posun fragmentu, získaného štěpením HindIII směrem k vyšší molekulové hmotnosti. Pouze v případě varecNS1556-222 bylo možno prokázat malý pás, odpovídající w.t. fragmentu. To zna-

mená, že izolát plaku není homogenní. 1556-122 atd, jsou různé izoláty plaků z téhož rekombinačního pokusu po trojím čištění plaků. Jako kontroly a k označení velikosti fragmentů byly užity různé štěpné produkty plasmidu pSCt-SNS1444 (vzorky 6 a 7).

Na pbr. 17, který se týká příkladu 17 je znázorněn autoradiograf denaturačního SDS-gelu s rekombinantními viry varecNS1444 a varecNS1556, u nichž dochází k expresi bílkoviny NS1. Bílkovinu s očekávanou molekulovou hmotností je možno prokázat u těchto virů (mol. hmotnost 48 000), avšak nikoliv u divokého typu varec1342 (u něhož dochází k expresi odlišné bílkoviny v infikovaných buňkách. Velmi silný pás pro bílkovinu, který přechází přes značku 97 000 je β -galaktosidáza (molekulová hmotnost 116 000), k jejíž expresi dochází pod řízením promotoru P11 v rekombinantních kmenech varecNS1444 a varec1342, odvozených od pSC11-Orth.

Je možno připravit nukleovou kyselinu podle "vynálezu" a stanovit její řetězec následujícími obecnými postupy:

Především je možno získat RNA viru extrakcí z buněk, infikovaných západním podtypem viru TBE. Při použití RNA jako templátu je možno získat cDNA s dvojitým řetězcem, na příklad při použití reversní transkriptázy. Při použití rekombinantní techniky je možno tuto cDNA uložit do DNA vektoru, například do plasmidové DNA Escherichia coli, čímž se získá rekombinantní plasmid. Rekombinantní plasmidy je možno užít k transformaci příslušných hostitelských buněk, například E. coli, kmen HB101 pro amplifikaci plasmidů nebo pro expresi odpovídajících bílkovin. Jednotlivé kolonie s plasmidy, obsahujícími vloženou DNA je možno identifikovat postupem, který byl uveden v publikaci Birnboim a Doly, Nucleic Acids Research 7, 1195-1204, 1979. Řetězec baží

DNA, specifický pro západní subtyp viru, přítomný v rekombinantním plasmidu je možno prokázat postupy pro rychlé stanovení řetězce DNA, například při použití dideoxyřetězců.

Podrobněji je možno popsat způsob výroby cDNA, rekombinantních plasmidů, buněk, transformovaných těmito plasmidy a způsob stanovení nukleotidového řetězce takto:

Nejprve se získá z čuštěného západního subtypu viru TBE virová RNA. K tomuto účelu se virus pěstuje na primárních buňkách kuřecích embryí, koncentruje se pomocí ultraodstředivky a čistí ve dvou cyklech při odstředění pomocí sacharozového gradientu. Po solubilizaci bílkovin pomocí SDS za přítomnosti proteinázy K a inhibitoru RNázy, například tak, že se materiál inkubuje 1 hodinu při teplotě 37 °C se RNA extrahuje například fenolem a sráží ethanolem. Při použití této RNA jako templátu se pak získá DNA, komplementární s virovou RNA in vitro působením reversní transkriptázy, například z viru myeloblastózy ptáků, například způsobem podle publikace Gubler a Hofmann, Gene 25, 263-269, 1983. Při použití primerů, například hexanukleotidového typu, získaných z telecího brzlíku a jeho DNA se virová RNA inkubuje za příslušných podmínek, například podle příručky "cDNA synthesis system", Amersham, Velká Británie při použití reversní transkriptázy spolu s deoxyadenosintrifosfátem (dATP), deoxythymidintrifosfátem (dTTP), deoxyguanosintrifosfátem (dGTP) a deoxycytidintrifosfátem (dCTP) jako substrátem. Takto získaná hybridní cDNA.RNA se zpracovává působením RNázy H za přesně definovaných podmínek za vzniku vypuštěných úseků v RNA hybridní molekuly. Pak je možno účinně užít DNA-polymerázu I z E. coli k náhradě řetězce RNA při použití RNA s vypuštěnými úseky jako primeru. Takto získaná RNA s dvojitým řetězcem se deproteinizuje extrakcí směsí fenolu a chloroformu, vysráží ethanolem a zbývající fragmenty RNA se odstraní působením RNázy například v pufru TE 30 minut při teplotě 37 °C.

Klonování dsDNA se provádí například při použití syntetických vazných řetězců. K tomuto účelu se dsDNA zpracovává při použití Klenowova fragmentu DNA polymerázy I z *E. coli* za příslušných podmínek podle publikace Maniatis a další, *Molecular Cloning*, CSH 1982, aby bylo možno zajistit co největší množství klonovatelných zakončení, načež se provádí extrakce fenolem a deproteinizace. Pak se dsDNA inkubuje za vhodných podmínek s vaznými řetězci BamHI za přítomnosti DNA-ligázy. Reakční směs se nanese na 1% agarozový gel a z gelu se vyříznou cDNA s různou molekulovou hmotností a ty se pak dále čistí například elektroelucí. Na druhé straně se DNA plasmidu, který má být užit jako vektor, například plasmid Bluescript SK- z *E. coli* rozštěpí restriční endonukleázou BamHI a defosforyluje při použití bakteriální alkalické fosfatázy. Po rozštěpení cDNA enzymem BamHI se materiál smísí s vektorem, rovněž rozštěpeným enzymem BamHI a směs se inkubuje za příslušných podmínek pro umožnění hybridizace komplementárních přečnávajících řetězců na koncích obou molekul DNA a provádí se vazba působením T4-DNA-ligázy. Rekombinantní molekula DNA se užije k transformaci kompetentního kmene *E. coli*, například *E. coli* XL 1-blue. Rekombinanty, obsahující včleněnou část, specifickou pro virus se identifikují na základě barevné odlišnosti. Plasmidy se izolují podle publikace Birnboim a Doly, *Nucleic Acids Research* 7, 1195-1204, 1979 a rozměry včleněných částí se analyzují pomocí restričních enzymů při použití enzymu BamHI s následným dělením získaných fragmentů na 1% agarozovém gelu.

Řetězec bazí v těchto včleněných úsecích se stanoví podle publikace Sanger a další, *PNAS USA* 74, 5463-5467, 1977. Získaný řetězec se analyzuje na homologii s již známými řetězci jiných flavivirů podle publikace Rice a další, *Science* 229, 726-733, 1985, Dalgarno a další, *J. Mol. Biol.* 187, 309-323, 1986, Castle a další, *Virology* 147, 227-236, 1985,

Castle a další, Virology 149, 10-26, 1986, Wengler a další, Virology 147, 264-274, 1985, Jamščikov a Pletněv, Nucleic Acids Research 16 7750, 1988 při použití počítačových programů pro stanovení uložení řetězce v celkovém řetězci genomu RNA. Na obr. 2 je znázorněn úplný nukleotidový řetězec a na obr. 3 odpovídající řetězec aminokyselin oblasti NS1 západního subtypu viru TBE.

Vynález poprvé poskytuje možnost získat nukleotidový řetězec genu, který je kódem pro bílkovinu NS1 západního subtypu viru TBE a v důsledku toho také objasňuje řetězec aminokyselin této bílkoviny.

Řetězec bazí na obr. 2 je výhodným příkladem DNA, která je kódem pro polypeptidy, charakteristické pro západní subtyp viru TBE, a to pro jeho bílkovinu NS1. Na základě degenerace genetického kódu může být kódovým řetězcem pro tentýž řetězec aminokyselin také triplet bazí, odlišných od bazí, uvedených na obr. 2.

Do oboru vynálezu spadají také řetězce, které jsou pozměněny mutací, transposicí nebo degradací, avšak přesto jsou kódem pro řetězec aminokyselin, který si uchovává základní antigenní vlastnosti bílkoviny NS1.

Mimoto se vynález netýká pouze přesného řetězce aminokyselin z obr. 3, který je pouze příkladem možného řetězce bílkoviny NS1 přírodního západního podtypu viru TBE. Je známou skutečností, že genomy virů RNA jsou podrobeny častějšími mutacím než genomy DNA virů nebo buněčných genů, a to vzhledem k většímu výskytu chyb v činnosti RNA polymeráz a nedostatkům kontrolních a řídicích mechanismů, jak bylo uvedeno v publikacích Holland a další, Science 215, 1577-1585, 1982, Reaney, Ann. Rev. Microbiol. 36, 47-73, 1982. V závislosti na vlastnostech viru mohou tyto mutace dát

vznik novým typů virů vzhledem k posunu antigenních vlastností, tak jako tomu bylo v případě chřipkového viru podle publikace Both a další, "Origin of Pandemic Influenza Viruses", W.G.Laver (ed.), Elsevier, 1983. Na druhé straně mohou být RNA viry antigenně stálejší za přírodních ekologických podmínek, pravděpodobně v důsledku přírodních funkčních omezení, která nedovolují rozsáhlejší strukturní změny v antigenně aktovních bílkovinách. Je však přesto zapotřebí brát v úvahu určitou míru variace, jak je možno prokázat srovnáním řetězců různých přírodních izolátů.

Toho je možno dosáhnout například tak, že se analyzuje řetězec RNA z různých izolátů při použití dideoxyřetězců na zakončeních a při použití syntetických oligonukleotidů jako primerů. Tyto řetězce se připraví podle prototypového řetězce izolátu z obr. 2.

Všechny řetězce, které mají ve srovnání s řetězcem prototypu drobné variace, například takové, které byly nalezeny v dalších přírodních izolátech západního subtypu viru TBE jsou do vynálezu zahrnuty. Tyto variace je možno získat také modifikací nukleové kyseliny in vitro. Vynález proto zahrnuje všechny řetězce, které hybridizují za omezených podmínek, například při selekci na alespoň 90% homologii řetězce s řetězcem podle vynálezu nebo jeho částí a které jsou s výhodou kódem pro bílkoviny nebo peptidy s podstatnými antigenními determinujícími vlastnostmi západního subtypu viru TBE, tj. jeho strukturních bílkovin.

Uložení nukleotidového řetězce, který je kódem pro bílkovinu, například pro NS1 do příslušného vektoru nebo vektorů a do hostitelské buňky k expresi této bílkoviny ve velkém množství je účinnou technologií pro studium struktury a biologických funkcí bílkovin. Systém, užitý k expresi vždy závisí na určitých vlastnostech molekuly, např. na posttranslační modifikaci zkoumané molekuly bílkoviny.

Expresi je možno uskutečnit v prokaryotickém nebo eukaryotickém buněčném systému. V případě glykoproteinů, jako jsou bílkoviny typu NS1 je k expresi vhodnější eukaryotická hostitelská buňka, protože tato buňka je lépe schopna provést glykosylaci.

Výhodným systémem pro expresi je virus vaccinia a buňky primátů, které rostou v kontinuální kultuře. Tímto způsobem je možno zajistit nebo napomoci zajištění správné posttranslační modifikace a vysoké úrovně syntézy.

Mimoto je zřejmé možno prokázat, že řídící řetězce viru vaccinia jsou schopny řídit syntézu téměř kterékoliv cizorodé bílkoviny buď při použití promotoru pro "pozdní fázi" nebo při použití "konstitutivního" promotoru, který je činný v průběhu časně i pozdní fáze replikace viru, jak bylo popsáno v Moss a Flexner, Ann. Rev. Immunol. 4, 305-324, 1987. Byly však podávány i zprávy o tom, že stálost cizorodých bílkovin, k jejichž expresi došlo v buňkách, infikovaných virem vaccinia je silně ovlivněna promotorem, který řídí expresi příslušného genu, jak bylo popsáno v Coupar a další, Eur. J. Immunol. 16, 1479, 1986 a Townsend a další, J. Exp. Med. 168, 1211-1224, 1988.

Konstrukce příslušného plasmidu pro expresi s obsahem řetězce, specifického pro NS1 vyžaduje extensivní manipulaci s DNA. Je nutno brát v úvahu, že NS1 je částí polyproteinu, který je posttranslačně zpracováván na jednotlivé bílkoviny proteázami viru a buňky, jak bylo popsáno v Mandl a další, Virology 173, 291-301, 1989. V průběhu přírodní virové infekce zahrnuje syntéza NS1 vnitřní signální řetězec na aminotermiálním zakončení. Signální řetězec směřuje vznikající polypeptidový řetězec do endoplasmatického retikula, což je nezbytné pro správnou posttranslační modifikaci, například pro glykosylaci. Aby bylo možno získat

správně zpracovaný produkt exprese je nutné, aby tento signální řetězec nebo heterologní signální řetězec byl zahrnut v rekombinantní molekule.

Mimoto vzhledem k tomu, že NSI je částí polyproteinu, neobsahuje kodony pro počátek ani stop kodon pro translaci. Tyto kodony je zapotřebí zajistit specifickou manipulací rekombinantní DNA.

Hydrofobní řetězec 5' a řetězec 3' jsou zařazeny v klonu 17-6 (obr. 3). Vzhledem k tomu, že nejsou k dispozici místa štěpení restrikcí endonukleázami, není možno přímo klonovat NSI s jejím " přírodním" signálním řetězcem ve vektoru pro včlenění. Z tohoto důvodu je možno syntetizovat například delší řetězec 1200 bp, obsahující signální řetězec NSI a řetězec pro úplnou bílkovinu NSI, například při použití polymeráza (PCR). Tato technika také umožňuje zařazení případných míst štěpení restrikcí endonukleázou na obou stranách amplifikované DNA a řetězců pro počátek a ukončení.

Specificky konstruovaný pár primerů pro amplifikaci dává vznik řetězci NSI, který má na každé straně místo působení restrikcí endonukleázy EcoRI. Při použití tohoto postupu je možné zaměnit autentický signální řetězec jakýmkoliv signálním řetězcem, přírodně se vyskytujícím nebo syntetickým signálním řetězcem, jak bylo popsáno v Heinje, NAR 14, 4683-4690, 1986.

Všechny plasmidy, specificky vyvinuté pro expresi molekuly je možno transponovat do viru vaccinia (kmen WR nebo oslabený derivát tohoto kmene) homologní rekombinací v hostitelské buňce, například v buňkách primátů CV-1. Experimentální postup pro získání rekombinantního viru vaccinia je znám a není jej proto nutno blíže popisovat (Mackett a další, JRL Press:DNA cloning II, Ed.DM Glover, 191-211,1985.

Vynález se rovněž týká syntézy molekul NS-1 v bakteriálním hostiteli. Glykoproteiny, k jejichž expresi došlo v bakteriální buňce obvykle nejsou glykosylovány stejným způsobem jako produkty, získané v eukaryotických buňkách. Přesto může být syntéza NS-1 i v neglykosylované formě užitečná pro různé účely. Jako příklad je možno uvést, že deriváty obalového glykoproteinu (gp) 160 HIV-1, k jejichž expresi došlo v bakteriální buňce podstatně přispěly k diagnostice HIV a experimentální vakcinaci.

Analogicky jako zkonstruovaný plasmid pro rekombinaci s virem vaccinia byl syntetizován také řetězec pro NS-1 včetně autentického signálního řetězce pomocí PCR a byl klonován například v plasmidu pUC-19. Je možné nahradit TBE signální řetězec prokaryotickým signálním řetězcem za účelem dosažení účinné sekrece molekul NS-1 z bakteriální buňky. Bakteriální signální řetězec totiž může zabránit agregaci NS-1 a tvorbě inkusních tělísek, která je pak nutno rozpustit pomocí smáčedel nebo jinými solubilizačními prostředky.

Kromě syntézy úplné bílkoviny NS-1 je možno tento experimentální postup aplikovat také na zkrácené formy molekuly NS-1. Tyto zkrácené molekuly je možno použít k vyvolání imunologické odpovědi, namířené proti specifickým místům bílkoviny. Tyto formy jsou rovněž cenným nástrojem pro tak zvanou "serologii, namířenou proti specifickým místům". Imunologicky relevantní epitopy v bílkovině NS-1 je možno včlenit do nosných molekul jako pomocné úseky (například částice HB jádra) nebo do imunostimulačního komplexu (ISCOM) podle publikace Morein a další, Immunology today 8 (11), 333-338, 1987.

Jakákoliv z molekul NS-1, syntetizovaných v prokaryotických a eukaryotických systémech pro expresi popsaných v

průběhu přihlášky představuje molekulu, vhodnou jako složka NS-1 vakciny, molekulu je možno užít jako takovou nebo vázanou na rekombinantní glykoprotein E viru TBE (EP 284791) nebo je možno tyto molekuly přidávat do existující vakciny s obsahem inaktivovaného viru TBE.

Mimoto může být analýza imunologické odpovědi proti těmto nestrukturním bílkovinám nebo jejich částem kritická pro porozumění pathogenicity viru TBE a dalších členů skupiny flavivirů.

Do genomu živých virů je rovněž možno zařadit cizorodé řetězce DNA nebo RNA, čímž vzniknou rekombinantní viry, které je možno užít jako živou vakcinu. Shrnutí této možnosti bylo popsáno v publikaci Mackett a Smisth, J. Gen. Virol. 67, 2067-2082, 1986.

Také kombinace různých genů, například odvozených od různých virů je možno zpracovat genetickou technologií tak, že je možno dosáhnout jejich exprese a použít pro vakcinaci (Perkus a další, Science, 229, 981-984, 1985). Vynález pro to zahrnuje jakékoliv kombinace řetězců, uvedených v průběhu přihlášky s dalšími řetězci, jako jsou geny, které jsou kódem pro odlišné bílkoviny nebo řetězce, které přispívají k expresi bílkovin jako jsou promotory, podpůrné řetězce, polyadenylační nebo štěpné signály.

Je známo, že k imunizačním nebo diagnostickým účelům není bezpodmínečně nutné použít úplnou přírodně se vyskytující bílkovinu (Lerner, Nature 299, 592-596, 1982, Arnon, TIBS 11, 521-524, 1986).

Bílkoviny nebo části bílkovin, jichž je možno užít jako vakcin nebo diagnostických činidel je možno získat rekombinantní svrchu popsanou technologií s použitím DNA, řetězce podle vynálezu je však rovněž možno užít k získání informací, které lze využít při syntéze oligopeptidů. O tomto

předmětu je k dispozici rozsáhlá literatura. Peptidy, syntetizované pomocí řetězců DNA byly připraveny a použity pro řadu účelů například pro biologické a imunologické studie, jak bylo popsáno v Lerner a další, Cell, 23, 309 až 310, 1981, Lerner, Nature 299, 592-596, 1982. Použití pro vakcinaci bylo popsáno v Shinnick a další, Ann. Rev. Microbiol. 37, 425-446, 1983, DiMarchi a další, Science 232, 639-641, 1986. Obecná příprava peptidů nebo kombinace peptidů je tedy známa.

Dále je známo použití nukleových kyselin a řetězců, získaných pomocí těchto kyselin pro přípravu hybridizačních sond, například pro použití při průkazu virové RNA u klíšťat nebo v krevním séru (Meinkoth a Wahl, Anal. Biochem 138, 267-284, 1984, Kulski a Norval, Arch. Virol. 83, 3-15, 1985). Tyto sondy je možno připravit buď technologií při použití rekombinantní DNA nebo chemickou syntézou oligonukleotidů na základě požadovaného řetězce.

Vanálek bude osvětlen následujícími příklady. Není-li výslovně uvedeno jinak, provádí se jednotlivé postupy způsobem, který je sám o sobě znám. Tyto postupy je možno nalézt v řadě standardních publikací včetně publikace "Sambrook, Fritsch a Maniatis " Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2. vydání), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Propagace a čištění viru TBE

10% suspenze viru ZBE ve formě infikovaných mozků infantilních myši byla užita k infekci primárních buněk kuřecích embryí ve jedné vrstvě, udržovaných na minimálním základním prostředí (MEM) s přísadou pufru 15 mM Hepes a 15 mM EPPS o pH 7,6. Po 40 hodinách inkubace při teplotě 37 °C byl supernatant vyčištěn odstředěním při 10 000 g po 30 minut při teplotě 4 °C a virus byl usazen ultraodstředěním při 50 000 g po dobu 3 hodiny při teplotě 4 °C. Pak byl virus znovu uveden do suspenze v příslušném objemu pufru TNA (0,05 M triethanolaminu, 0,1 M chloridu sodného o pH 8,0) a pak byl materiál podroben zonálnímu odstředění v sacharozovém gradientu 5 až 20 % hmotnostních při 17 777 g celkem 110 minut při teplotě 4 °C. Největší koncentrace viru byla pak stanovena sledováním gradientu při 254 nm, načez byl materiál znovu odstředěn ve 20 až 50% sacharozovém gradientu k dosažení rovnovážného stavu 18 hodin při teplotě 4 °C a při 15 000 g. Pak byl virus dialyzován proti pufru TAN při pH 8,0 k odstranění přebytku sacharózy.

Příklad 2

Příprava RNA viru

100 µg čištěného viru se zředí na 400 µl přidáním pufru pro reakci s proteinázou K (10 mM Tris o pH 7,8 a 5 mM EDTA, 0,5 % SDS). Proteináza K se přidá do konečné koncentrace 200 µg/ml a směs se hodinu inkubuje při teplotě 37 °C. Pak se roztok deproteinizuje tak, že se dvakrát ex-

trahuje stejným objemem (400 μ l) fenolu a pak ještě jednou chloroformem a isoamylalkoholem v poměru 24 : 1, pak se přidá 26 μ l 2M roztoku octanu sodného a RNA se vysráží přidáním 2,5 objemů ethanolu. Před dalším použitím se podíl RNA denaturuje glyoxalem a pak se podrobí elektroforéze na agarozovém gelu ke kontrole výtěžku a kvality získaného materiálu.

Příklad 3

Syntéza cDNA s dvojitým řetězcem

5 μ g RNA, vysrážené ethanolem se znovu uvede do suspenze ve 40 μ l pufru pro syntézu prvního řetězce (Amersham, UK) s obsahem 5 μ g náhodně volených oligonukleotidových primerů, směs se zahřeje na 70 °C na 1 minutu a pak se nechá pomalu zchladnout na teplotu místnosti. Pak se přidají všechny čtři deoxynukleotidtrifosfáty do konečné koncentrace 1 mM. Mimoto se ke směsi přidá 5 jednotek inhibitoru ribonukleázy z lidské placenty a 10 μ Ci α -³²P dCTP. Syntéze prvního řetězce se zahájí přidáním 100 jednotek reversní transkriptázy (Amersham) a reakce se nechá probíhat 2 hodiny při teplotě 42 °C. Pak se reakční směs uloží do ledu a reakční složky pro tvorbu druhého řetězce se přidají v tomto pořadí: 93,5 μ l pufru pro syntézu druhého řetězce (Amersham, UK), 4 jednotky ribonukleázy H, 23 jednotek DNA-polymerázy z E. coli a voda do konečného objemu 250 μ l. Syntéze druhého řetězce se provádí následnou inkubací při 12 °C a při 22 °C (dvě hodiny pokaždé) a pak se zastaví zahřátím roztoku na 20 minu na teplotu 70 °C. Pak se cDNA s dvojitým řetězcem rozštěpí působením 10 jednotek T4 DNA-polymerázy 30 minut při teplotě 37 °C pro vznik vhodných zakončení. Pak se cDNA čistí extrakcí fenolem a chloroformem a vysráží dvěma objemy ethanolu.

Příklad 4

Vazba pomocí vazných řetězců

Syntetické 5'-fosforylované vazné řetězce BamHI (New England Biolabs) se přidávají k cDNA a reakce se nechá probíhat přes noc při teplotě 12 °C. Reakční směs obsahovala v konečném objemu 200 μ l pufru pro uskutečnění vazby (50 mM tris o pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP) přibližně 1 μ g cDNA, 1 μ g vazné DNA a 1 μ l T4 DNA-ligázy (New England Biolabs).

Příklad 5

Fracionace cDNA podle velikosti

cDNA byla frakcionována na 1% agarozovém gelu. France s různou velikostí byly z gelu vyříznuty a DNA byla extrahována z agarozy elektroelucí v analytickém zařízení pro tenot účel (IBI) podle pokynů výrobce. Přeso, že množství DNA bylo velmi malé, takže je bylo jen s obtížemi možno prokázat barvením ethidiumbromidem, bylo možno extrakci snadno sledovat vzhledem k radioaktivnímu značení DNA. ~~Frakcionační stupeň je tedy prostředkem pro získání~~ velkých fragmentů cDNA vhodných pro selektivní klonování a také umožňuje cDNA úplně oddelit od nenavázaných vazných řetězců.

Příklad 6

Klonování v bakteriálním plasmidu

cDNA byla rozštěpena působením 10 jednotek restrikční endonukleázy BamHI, reakce trvala 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po extrakci fenolem a chloroformem byla DNA vysrážena 2 objemy ethanolu a znovu uvedena do suspenze v malém objemu vo-

dy. Pak bylo 20 až 30 ng cDNA smíseno s 50 ng fagemidu Bluescript SK- (Stratagene), který byl linearizován rozštěpením enzymem BamHI (výraz Bluescript je obchodní značka). Tyto dvě složky byly na sebe navázány působením T4 DNA-ligázy v 10 μ l svrchu uvedeného pufru pro vazbu přes noc při 16 °C. Následujícího rána byla směs zahřáta na 5 minut na 65 °C, zředěna 100 x vodou a užita k transformaci buněk E. coli XL1 (Blue). Kompetentní bakterie byly získány od firmy Stratagene a transformovány ve 3 μ l zředěné smasi pro vazbu přesně podle návodu výrobce. Bakterie byly naneseny na LB agarové plotny s obsahem ampicilinu, tetracyklinu, IPTG a X-Gal.

Příklad 7

Identifikace fagemidů s obsahem včleněného řetězce

V systému Bluescript nabývají fagemidy se včleněným řetězcem bílého zbarvení bakteriálních kolonií, kdežto navzájem vázané fagemidy poskytují modře zbarvené kolonie. Tyto bílé kolonie byly izolovány a použity k naočkování 2 ml prostředí LB s obsahem ampicilinu a byly pěstovány přes noc při 37 °C na třepěčce při 220 otáčkách za minutu. Následujícího dne byl rychle připraven plasmid standardním způsobem při použití varu podle publikace Birnboim a Doly, Nucleic Acids Research 7, 1195-1204, 1979. Plasmidy byly rozštěpeny restriční enzymem BamHI a analyzovány na 1% agrozovém gelu. Jeden z klonů, který byl tímto způsobem identifikován byl fagomid BS 17-6, který nese včleněnou část, specifickou pro virus, v délce přibližně 21000 bp. Na obr. 1 je znázorněn na 1% agrozovém gelu takto připravený plasmid BD 17-6 jak v cirkulární formě, tak ve formě po rozštěpení enzymem BamHI.

Příklad 8

Analyza řetězce včleněné části v klonu BS 17-6

DNA s jednoduchým řetězcem klonu BS 17-6 byla připravena přidáním pomocného fágu VCS (Stratagene) v poměru 20 : 1 k exponenciálně rostoucí kultuře Bakterií E. coli XL1(Blue) s obsahem BS 17-6. Směs se energicky míchá 16 hodin při teplotě 37 °C a pak ze supernatantu čistí ssDNA známým způsobem. DNA s jednoduchým řetězcem se analyzuje v celé oblasti včleněné části postupem podle publikace Sanger a další, PNAS USA 74, 5463-5467, 1977 při použití enzymu Sequanázy (United States Biochemicals) a reakčních činidel, dodaných výrobcem. (Výraz Sequenáza je obchodní název). Oligonukleotidy, specifické pro virus a pro vektor byly užity jako primery pro analýzu řetězce. Úplný řetězec včleněné části 17-6 je znázorněn na obr. 2.

Příklad 9

Odvození řetězce aminokyselin bílkoviny NS1

Translace nukleotidového řetězce klonu BS 17-6 ve všech směrech objevila pouze jedinou možnost správné translace delšího řetězce. Řetězec aminokyselin, odvozený tímto způsobem, byl srovnáván s řetězcem pro další flaviviry které byly uvedeny v publikacích Rice a další, Science 229, 726-733, 1985, Coia a další, J. Gen. Virol. 69, 1-21, 1988, Chambers a další, Virology 169, 100 až 109, 1989. Pro tyto analýzy byl užit software Beckman MICROGENIE (verze 4,0) na IBM osobním počítači. Výraz MICROGENIE je obchodní název. Analýza prokázala, že klon 17-6 obsahuje úplný kódový řetězec pro bílkovinu NS-1 a části kódového řetězce pro bílkovinu E a NS2A, které ohraničují gen NS1 proti genomu flaviviru.

Na obr. 3 je znázorněn řetězec RNA a řetězec aminokyselin, pro které je tento řetězec kódem, odvozený od klonu 17-6. Aminoterminální zakončení NS1 je patrně uvolněno buněčnou signalázou, karboxyterminální zakončení enzymem, podobným signaláze. Delší forma bílkoviny NS1, která obsahuje také aminoterminální zakončení bílkoviny NS2A byla pozorována Masonem a dalšími (Virology 158, 361-372, 1987). Karboxyterminální formu této bílkoviny NS1 je možno uvolnit pro virus specifickou proteázou nebo buněčnou signalázou podle publikace Rice a další, Science 229, 726-733, 1985. Aminoterminální zakončení a tři možná karboxyterminální zakončení jsou znázorněna na obr. 3. Karboxyterminální zakončení, uvolněná enzymem, podobným signaláze (Chambers a další, Virology 169, 100-109, 1988) je popsáno jako "COOH-Terminus 1", karboxyterminální zakončení, které je pravděpodobně tvořeno pro virus specifickou proteázou je označeno "COOH-Terminus 2" a potenciální karboxyterminální zakončení, uvolněné buněčnou signalázou je znázorněno jako "COOH-Terminus 3". Čísla poloh, uvedená na obr. 3 odpovídají plné délce genomu viru TBE.

Na obr. 4 je znázorněn řetězec aminokyselin bílkoviny NS1, odvozený od řetězce klonu 17-6. Možná COOH-terminální zakončení jsou označena stejně jako na obr. 3. Číselné označení polohy je počítáno od první aminokyseliny bílkoviny NS1. Na obr. 4 je rovněž znázorněno umístění tří potenciálních míst pro N-glykosylaci, která jsou přítomna v bílkovině NS1 viru.

Příklad 10

Klonování oblasti, která je kódem pro NS1 v prokaryotickém vektoru pro expresi

Nukleotidový řetězec, který je kódem pro bílkovinu NS1 se podrobí subklonování z klonu 17-6 do plasmidu

pUC19S. Vektor pUC19S je derivát plasmidu pUC19, který obsahuje stop-vazný řetězec s obsahem stop kodonu TAG ve všech třech řetězcích, klonovaných v místě štěpení BamHI. Řetězec pro NS1, který obsahuje malou část řetězce pro bílkovinu NS2a na svém 3'-terminálním zakončení se vyjme působením restriční endonukleázy CfoI a zakončení se upraví působením S1-nukleázy. Vektor pUC19S pro klonování se linearizuje v polyvazné oblasti působením Sall a zakončení se vyplní T4-DNA-polymerázou (obr. 5). Vazba vektoru a včleněného řetězce dává vznik místu působení enzymu Sall a tím se váže řetězec pro bílkovinu NS1 na gen lacZ ve správném pořadí (Obr. 6A a 6B). Na 3'-terminálním zakončení je řetězec pro bílkovinu NS1 ohraničen prokaryotickými stop-signály pro transkripci a translaci, které jsou obsaženy ve vektoru, plasmid je označen pNS1387.

Příklad 11

Klonování kódomé oblasti pro NS1 včetně 5'-proximálního zakončení hydrofobního signálního řetězce při použití PCR

Aby bylo možno konstruovat indukovatelný prokaryotický plasmid pro expresi s obsahem kódomé oblasti pro NS1 včetně autentického signálního řetězce byl přenesen fragment plasmidu pSCtSNS1444 po štěpení enzymem Sall (Příklad 13) do plasmidu pUC19S, čímž byl získán klon ptSNS1682. Aby bylo možno uložit gen pro NS1 do správné polohy vzhledem ke genu lacZ byl klon ptSNS1682 rozštěpen enzymem HindIII, zakončení byla upravena pomocí S1-nukleázy a znovu navázána za vzniku klonu ptSNS1791 s vypuštěnými 4 nukleotidy, jak je znázorněno na obr. 7a a 7b.

Příklad 12

Konstrukce plasmidu pro rekombinaci ve viru vaccinia: řetězec pro bílkovinu NS1 pod řízením promotoru VV-pl1(L)

Kódová oblast pro bílkovinu NS1, například z příkladu 10 se podrobí subklonování v místě štěpení enzymem Sall plasmidu pTKgptFls (Falkner G.F. a Moss B., J. Virol 62, 1849-1854, 1988). Řetězec pro NS1 se uloží ve správném smyslu vzhledem ke kodonu ATG pro počátek translace ve vektoru. Translační stop signál je rovněž obsažen ve vektoru. Polyvazná oblast vektoru je příčinou přidání 7 aminokyselin na 5'-zakončení a 10 aminokyselin na 3'-zakončení. Strategie klonování a hraniční oblasti bílkoviny jsou znázorněny na obr. 8a a 8b. Plasmid byl označen pAPNS1338.

Příklad 13

Konstrukce plasmidu pro rekombinaci ve viru vaccinia: řetězec pro bílkovinu NS1 s přírodním signálním řetězcem pod řízením promotoru VV-p7.5(E/L)

Řetězec nukleotidů s obsahem kódové oblasti pro bílkovinu NS1 s jejím signálním řetězcem se syntetizuje pomocí PCR při použití klonu 17-6 jako templátu. Chemicky se syntetizují dva oligonukleotidy se štěpnými místy pro restrikční endonukleázy EcoRI a Sall na 5'-zakončení a Sall a HpaI na 3'-zakončení, tyto oligonukleotidy se užijí jako primery při PCR (obr. 9A a 9B). Amplifikovaný fragment NS1 se čistí na agarozovém gelu (obr. 10) po štěpení Sall a pak se klonuje v místě štěpení Sall vektoru pSC11-Orth po malých modifikacích. Plasmid pSC11-Orth byl uložen ve veřejné sbírce D.S.M., Braunschweig, SRN pod číslem DSM 5734 dne 15. ledně 1990. Strategie klonování a řetězce na 3'- a 5'-zakončení nové konstrukce jsou uvedeny na obr. 11 a 12. Analýza restrikčních fragmentů klonu na agarozovém gelu potvrzuje správnou orientaci včleněné části, jak je zřejmé z obr. 13. Plasmid byl označen pSCTSNS1444.

Příklad 14

Konstrukce plasmidu pro rekombinaci ve viru vaccinia:

Řetězec pro bílkovinu NS1 s původním signálním řetězcem
pod řízením promotoru VV-pl1(L)

Plasmid pTKtSNS1556 je výsledkem subklonování řetězce pro NS1 z klonu pSCtSNS1444 ve vektoru pTKgptF3s (Falkner a Moss, J. Virol. 62, 1849-1854, 1988). Řetězec pro NS1 se vyjme při použití enzymu SalI a včlení se do místa štěpení enzymem SalI v plasmidu pTKgptF3s. Strategie klonování a řetězec nukleotidů pro plasmid pTKtSNS1556 je znázorněn na obr. 14 a 15.

Všechny plasmidy se pěstují při použití selekce ampicilinem v množství 100 μ g/ml v E. coli, kmenech DK1, BH101 nebo JM jako v hostiteli (JM105, JM83).

Příklad 15

Vytvoření rekombinantů viru vaccinia pro expresi bílkoviny NS1

Rekombinantní viry se získají standardním způsobem (Mackett M., Smith G. a Moss B.: DNA Cloning: A Practical Approach, str. 191-121, ed. D.M. Glover, Oxford: IRL Press).

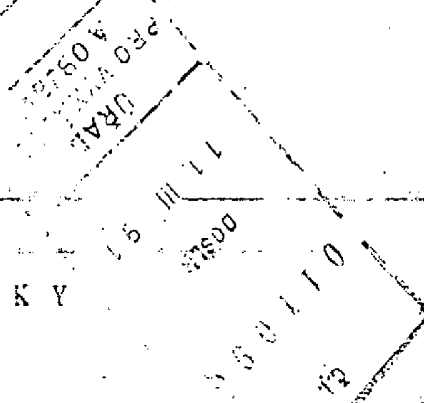
DNA plasmidu pSCtSNS1444 a plasmidu pTKtSNS1556 se podrobí transfekci v buňkách CV-1, infikovaných virem vaccinia, divokým typem. Rekombinant varecNS1444, odvozený od plasmidu pSC11-Orth se podrobí selekci na BuDR v buňkách 143tk. Rekombinant varecNS1556, odvozený od pTKgptFs se izoluje selekcí gpt v buňkách CV-1. Všechny rekombinanty byly čištěny třikrát ve formě plaků. Správná organizace rekombinantů byla zjištěna analýzou Southern blot (Obr. 16).

Příklad 16

Exprese bílkoviny NS1 v buňkách CV-1, infikovaných rekombinanty viru vaccinia

Buňky CV-1 se infikují rekombinanty varecNS1444 a varec NS1556 viru vaccinia. Dva dny po infekci se buňky označí methioninem, značeným ^{35}S po dobu 4 hodin. Bílkoviny se oddělí na 12% SDS-polyakrylamidovém gelu s denaturačním účinkem a identifikují autoradiograficky. Pás bílkoviny, odpovídající očekávané molekulové hmotnosti přibližně 48 888 je možno oddělit. Tento pás není obsažen v buňkách divokého typu viru nebo v rekombinantech viru typu varec 1342, jak je znázorněno na obr. 17.

2806390



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Peptid nebo polypeptid, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň část řetězce aminokyselin bílkoviny NS-1 západního subtypu viru TBE.

2. Peptid nebo polypeptid podle nároku 1, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje řetězec aminokyselin, znázorněný na obr. 4.

3. Bílkovina NS-1 západního subtypu viru TBE.

4. Bílkovina nebo polypeptid, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje řetězec aminokyselin, který se liší od řetězce přírodní bílkoviny NS-1 na základě mutace a/nebo transposice v rámci běžných variací západního subtypu viru TBE.

5. Bílkovina, peptid nebo polypeptid podle nároků 1 až 4 pro použití v lékařství.

6. Vakcína, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje peptid, polypeptid nebo bílkovinu podle nároků 1 až 4 a jednu nebo větší počet dalších složek, přijatelných z farmaceutického hlediska.

7. Diagnostické činidlo, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje peptid, polypeptid nebo bílkovinu podle nároků 1 až 4.

8. Nukleová kyselina, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že je kódem pro peptid, polypeptid nebo bílkovinu podle nároků 1 až 4.

9. Živá vakcina, v y z n a č u j í c í s e t í m., že obsahuje nukleovou kyselinu podle bodu 8.

10. Sonda, v y z n a č u j í c í s e t í m., že obsahuje nukleovou kyselinu podle nároku 8.

11. Nukleová kyselina, v y z n a č u j í c í s e t í m., že hybridizuje s řetězcem DNA, znázorněným na obr. 3.

12. Nukleová kyselina, v y z n a č u j í c í s e t í m., že o b s a h u j e ř e t ě z e c z n á r o k u 8.

13. Nukleová kyselina, v y z n a č u j í c í s e t í m., že její řetězec se liší od řetězce molekuly DNA, které odpovídají nebo jsou komplementární s přírodním řetězcem RNA pro bílkovinu NS-1 v důsledku degenerace genetického kódu a/nebo mutace a/nebo transposice v rámci běžných variací západního subtypu viru TBE.

14. Nukleová kyselina podle nároků 8 až 13, v y z n a č u j í c í s e t í m., že je vázána na další řetězec nukleových kyselin.

15. Nukleová kyselina podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m., že jde o DNA, přičemž přídatné řetězce umožňují replikaci a expresi molekuly DNA v buněčné kultuře a s výhodou obsahují řetězce, které mají funkci promotoru, podpůrného řetězce, polyadenylačního signálu a/nebo signálu pro štěpení.

16. Vektor, například plasmid, virus nebo fág, v y z n a č u j í c í s e t í m., že obsahuje nukleovou kyselinu podle nároků 8 až 15.

17. Vektor podle nároku 16, v y z n a ě u j í c í
s e t í m , ž e je odvozen od viru vaccinia.

18. Vektor podle nároku 16, v y z n a ě u j í c í
s e t í m , ž e je odvozen od bakteriálního plasmidu.

19. Hostitelská buňka, v y z n a ě u j í c í s e
t í m , ž e obsahuje vektor podle nároku 16, 17 nebo 18.

20. Kultura buněk, v y z n a ě u j í c í s e
t í m , ž e obsahuje hostitelské buňky podle nároku 19.

21. Kultura buněk podle nároku 20, v y z n a ě u j í -
c í s e t í m , ž e jde o buněčnou kulturu savších
buněk.

Zastupuje:

2000 11

17-6

GGATCCCACT	10	CAGGGCAGTG	20	GCACATGAT	30	CTCCAGATGT	40	GAACGTGGCC	50	ATGCTGATAA	60
CCTAGGGTCA	70	GTCCCGTCAC	80	CGTGTACCCTA	90	GAGGTCTACA	100	CTTGACCCGG	110	TACGACTATT	120
CGCCAAACCC	130	AACAATTGAA	140	AACAATGGAG	150	GTGGCTTCAT	160	AGAGATGCAG	170	CTGCCCCCAG	180
GGGATTAACAT	190	CATCTATGTT	200	GGGGAAGTGA	210	GTCAATCAATG	220	GTCCCAAAAA	230	GGGAGCAGCA	240
CCCTATTGTA	250	GTAGATACAA	260	CCCCCTGACT	270	CAGTAGTTAC	280	CAAGGTTTTT	290	CCCTCGTCGT	300
TCGGAAGGGT	310	TTTCCAAAAG	320	ACCAAGAAAAG	330	GCATAGAAAAG	340	ACTGACAGTG	350	ATAGGAGAGC	360
AGCCTTCCCA	370	AAAGGTTTTT	380	TGGTTCCTTC	390	CGTATCTTTC	400	TGACTGTTCAC	410	TATCCTCTCG	420
ACGCCCTGGGA	430	CTTCGGTTCT	440	GCTGGAGGCT	450	TTCGTAGTTTC	460	AATTGGGAAG	470	GCGGTACATA	480
TGCGGACCCCT	490	GAAGCCAAAG	500	CGACCTCCGA	510	AAGACTCAAG	520	TTAACCCCTTC	530	CGCCATGTAT	540
CGGTCCTTGG	550	TGGCGCTTTC	560	AACAGCATCT	570	TCGGGGGAGT	580	GGGTTTCTA	590	CCAAAACTTT	600
GCCAGGAACC	610	ACCGCGAAAG	620	TTGTCTGAGA	630	AGCCCCCTCA	640	CCCCAAAGAT	650	GCTTTTGAAA	660
TATTAGGAGT	670	GGCATTGGCT	680	TGGTTGGGCC	690	TGAACATGAG	700	AAACCCCTACA	710	ATGTCCATGA	720
ATAATCCTCA	730	CCGTAAACCGA	740	ACCAACCCCGG	750	ACTGTACTC	760	TTTGGAATGT	770	TACAGGTACT	780
GCTTCTCTCT	790	GGCTGGAGGT	800	CTGTCTCTTG	810	CCATGACCCCT	820	TGGAGTGGGG	830	GCGATGTGTA	840
CGAAAGAGAA	850	CCGACCTCCA	860	GACCAGAACC	870	GGTACTGGGA	880	ACCTCACCCTC	890	CGCCTACAAAC	900

Obs 2(11)

11 0202

490 GTTGGCTGT GGACACGGAA CGAATGGAGC TCCGGCTGTGG CGAGGGCCTG GTGCTGTGA 540
CAACGGGACA CCTGTGCTT GCTTACCTCG AGCGACACCC GCTCCCGGAC CAGCACACCT
550 GAGAGTCTC AGAATGGTAT GACAATTATG CCTACTACCC GGAGACACCG GGGGCCCTTG 600
CTCTCCAGAG TCTTACCATA CTGTTAATAC GGATGATGGG CCTCTGTGGC CCCC GGGAAC
610 CATCAGCCAT AAAGGAGACA TTGAGGAGG GAAGCTGTGG TGTAGTCCCC CAGAACAGGC 660
GTAGTCGGTA TTTCCTCTGT AAACCTCTCC CTTCGACACC ACATCAGGGG GTCTGTGCG
670 TCGAGATGGC CATGTGAGAG AGCTCGGTCA CAGAGCTGAA TTGGCTCTG GCGGAAGGG 720
AGCTCTACCG GTACACCTCT TCGAGCCAGT GTCTCGACTT AAACCGAGAC CGCCTTCCCC
730 AGGCAATCT CACAGTGTG GTGACAAGT TTGACCCCGAC TGACTACCGA GTGTGTGTC 780
TCCGTTAGA GTGTACCAC CACCTGTTC AACTGGGGTG ACTGATGGCT CCACACACAGG
790 CTGGTTACT GAAAAAAGGA AAGGACATTA AAGTCTCCTG GAAAGCTGG GGCATTCAA 840
GACCAATGA CTTTTCCT TTCCTGTATT TTCAGAGGAC CTTTCGACC CCGGTAAGTT
850 TGATCTGGAG CATCCTGAG GCCCCCCGCTC GCTTCATGTT GGGCAGCGAA GGACAAAGTG 900
ACTAGACCTC GTAAGACTC CGGGGGGAG CGAAGTACCA CCGGTGCTT CCTGTTTAC
910 AGTGTCCTT AGAGAGACGG AAGACAGGTG TTTTCACGGT GGCAGAAATC GGGGTGCGC 960
TCACAGGGGA TCTCTCTGCC TTCTGTCCAC AAAAGTGCCA CCGTCTTAAG CCCC AACCGG
970 TGAGAACAAG GGTCTCTCTG GATTCAGAC AGGAACCAAC ACATGAGTGT GACACAGGAG 1020
ACTCTTGTTC CCAGAAGAAC CTAAGTCTG TCCTTGTTG TGTACTCACA CTGTGTCCTC

0022(111)

ORAI
PRO
409151

01108
00510
11.11.01

2006-11

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TGATGGAGC TGCAGTCAAG AACGGCATGG CAATCCACAC AGATCAAAGT CTGTGATGA
ACTACCCTCG ACGTCAGTTC TTGCCGTACC GTTAGGTGTG TCTAGTTTCA GAGACCTACT
1090 1100 1110 1120 1130 1140
GATCAATGAA AAATGACACA GGCACCTACA TAGTTGAAGT TTTGGTCACT GACCTGAGGA
CTAGTTACTT TTACTGTGT CCGTGAATGT ATCAACTTGA AAACCAGTGA CTGACTCCT
1150 1160 1170 1180 1190 1200
ACTGCTCATG GCCTGCTAGC CACACTATCG ATAATGCTGA CGTGGTGGAC TCAGAGTTAT
TGACGAGTAC CGGACGATCG GTGTGATAGC TATTACGACT GCACCACCTG AGTCTCAATA
1210 1220 1230 1240 1250 1260
TCCTTCCGGC GAGCCTGGCA GGACCCAGAT CCTGTGACAA CAGGATACCT GGCATATTCAG
AGGAAGGCCG CTCGGACCGT CCTGGGTCTA GGACCATGTT GTCTATGGA CCGATTAAGTC
1270 1280 1290 1300 1310 1320
AACAGGTGAA AGGGCCATGG AAGTACACGC CTATCCGTGT TATCAGAGAG GACTGTCCCG
TTGTCCACTT TCCCGGTACC TTCAATGTGGC GATAGGCACA ATAGTCTCTC CTCACAGGCC
1330 1340 1350 1360 1370 1380
GCACGACCGT TACCATCAAC GCCAAGTGTG ACAAAAGAGG AGCATCTGTG AGCAGTACCA
CGTGTGCA ATGTAAGTTG CCGTTCACAC TGTTTCTCC TCGTAGACAC TCCATCATGTT
1390 1400 1410 1420 1430 1440
CAGAGAGTGG CAAGTTATC CCAGAATGTT GCTGCCGAGC GTGCACAATG CCACCAAGTGA
GTCTCTCACC GTTCCAATAG GGTCTTACCA CGACGGCTCG CACGTGTTAC GGTGGTCACT
1450 1460 1470 1480 1490 1500
CGTTCGCGAC TGGAACTGAT TGCTGTATG CCATGGAAT ACGGCCAGTC CATGACCAGG
GCAAGGCCCTG ACCTGACTA ACGACCATAC GGTACCTTAA TGCCGGTCAAG GTACTGTTCC
1510 1520 1530 1540 1550 1560
GGGGGCTGT TCGCTCAATG GTGGTTGCGG ACAACGGTGA ATTACTTAGT GAGGAGGAG
CCCCCGAACA AGCGAGTTAC CACCAACGCC TGTTCGCACT TAATGAATCA CTCCTCCTC

ORA 2(III).

PROB. 11.11.91

11.11.91

2806-90

1570	1580	1590	1600	1610	1620
TCCCGGAAT	AGTGGCATTG	TTTGTGCTCC	TTGAATACAT	CATCCGTAGG	AGGCCCTCCA
AGGGGCCTTA	TCACCGTAAC	AAACACCAGG	AACTTAATGA	GTAGGCATCC	TCCGGGAGGT
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CGGGAACGAC	GGTTGTGTGG	GGGGGTATCG	TCGTTCTCCG	TCTGCTTGTC	ACCGGGATGG
GCCCTTGCTG	CCAACACACC	CCCCCATAGC	AGCAAGAGCG	AGACGAACAG	TGGCCCTACC
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TCAGGATAGA	GAGCCTGGTG	CGCTATGTGG	TGGCAGTGGG	GATCACATTC	CACCTTGAGC
AGTCCTATCT	CTCGGACCAC	GCGATACACC	ACCGTCACCC	CTAGTGTAAG	GTTGGAACCTCG
1750	1760	1770	1780	1790	1800
TGGGGCCAGA	GATCGTGGCC	TTGATGCTAC	TCCAGGCTGT	GTTTGAAGCTG	ACGGTGGGTT
ACCCCGGTCT	CTAGCACCGG	AACTACGATG	AGGTCCGACA	CAAACTCGAC	TCCCAACCCAA
1810	1820	1830	1840	1850	1860
TGCTCAGCGC	ATTTCGATTG	CGCAGAAGCC	TCACCGTCCG	AGAGATGTGT	ACCACCTACT
ACGAGTCGCG	TAAACGTAAC	GCGTCTTCGG	AGTGGCAGGC	TCTCTACCAC	TGGTGATGA
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TTCTTTTGT	GGTCCTGGAA	TTGGGGCTGC	CGGGTGGGAG	CCTTGAGGAG	TTCCTGAAAT
AAGAAAAACA	CCAGGACCTT	AACCCCGACG	GCCCACGCTC	GGAACCTCCTC	AAAGACCTTTA
1930	1940	1950			
GGGGTGATGC	ACTGGCCATG	GGGGCGCCCG	GGATCC		
CCCCACTACG	TGACCGGTAC	CCCCCGCGCG	CCTAGG		

ORR. 2(IV).

ORR
PROV
109275

11 III 91

011095

44

TBE(RNA)

1973 3916

2002	2032
AUC CCA GUC AGG GCA GUG GCA CAU GGA UCU CCA GAU GUG AAC GUG GCC AUG CUG AUA ACG	
Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly Ser Pro Asp Val Asn Val Ala Met Leu Ile Thr	
2062	2092
CCA AAC CCA ACA AUU GAA AAC AAU GGA GGU GGC UUC AUA GAG AUG CAG CUG CCC CCA GGG	
Pro Asn Pro Thr Ile Glu Asn Asn Gly Gly Phe Ile Glu Met Gln Leu Pro Pro Gly	
2122	2152
GAU AAC AUC AUC UAU GUU GGG GAA CUG AGU CAU CAA UGG UUC CAA AAA GGG AGC AGC AUC	
Asp Asn Ile Ile Tyr Val Gly Glu Leu Ser His Gln Trp Phe Gln Lys Gly Ser Ser Ile	
2182	2212
GGA AGG GUU UUC CAA AAG ACC AAG AAA GGC AUA GAA AGA CUG ACA GUG AUA GGA GAG CAC	
Gly Arg Val Phe Gln Lys Thr Lys Lys Gly Ile Glu Arg Leu Thr Val Ile Gly Glu His	
2242	2272
GCC UGG GAC UUC GGU UCU GCU GGA GGC UUU CUG AGU UCA AUU GGG AAG GCG GUA CAU ACG	
Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ala Gly Gly Phe Leu Ser Ser Ile Gly Lys Ala Val His Thr	
2302	2332
GUC CUU GGU GGC GCU UUC AAC AGC AUC UUC GGG GGA GUG GGG UUU CUA CCA AAA CUU UUA	
Val Leu Gly Gly Ala Phe Asn Ser Ile Phe Gly Gly Val Gly Phe Leu Pro Lys Leu Leu	
2362	2392
UUA GGA GUG GCA UUG GCU UGG UUG GGC CUG AAC AUG AGA AAC CCU ACA AUG UCC AUG AGC	
Leu Gly Val Ala Leu Ala Trp Leu Gly Leu Asn Met Arg Asn Pro Thr Met Ser Met Ser	
2422	2452
UUU CUC UUG GCU GGA GGU CUG GUC UUG GCC AUG ACC CUU GGA GUG GGG GCG	NH2- →
Phe Leu Leu Ala Gly Gly Leu Val Leu Ala Met Thr Leu Gly Val Gly Ala	GAU GUU GGU Asp Val Gly
2482	2512
UGC GCU GUG GAC ACG GAA CGA AUG GAG CUC CGC UGU GGC GAG GGC CUG GUC GUG UGG AGA	
Cys Ala Val Asp Thr Glu Arg Met Glu Leu Arg Cys Gly Glu Gly Leu Val Val Trp Arg	
2542	2572
GAG GUC UCA GAA UGG UAU GAC AAU UAU GCC UAC UAC CCG GAG ACA CCG GGG GCC CUU GCA	
Glu Val Ser Glu Trp Tyr Asp Asn Tyr Ala Tyr Tyr Pro Glu Thr Pro Gly Ala Leu Ala	
2602	2632
UCA GCC AUA AAG GAG ACA GUU GAG GAG GGA AGC UGU GGU GUA GUC CCC CAG AAC AGG CUC	
Ser Ala Ile Lys Glu Thr Phe Glu Glu Gly Ser Cys Gly Val Val Pro Gln Asn Arg Leu	

OBAR. 3(i).

2662 2692
GAG AUG GCC AUG UGG AGA AGC UCG GUC ACA GAG CUG AAU UUG GCU CUG GCG GAA GGG GAG
Glu Met Ala Met Trp Arg Ser Ser Val Thr Glu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Glu Gly Glu

2722 2752
GCA AAU CUC ACA GUG GUG GUG GAC AAG UUU GAC CCC ACU GAC UAC CGA GGU GGU GUC CCU
Ala Asn Leu Thr Val Val Val Asp Lys Phe Asp Pro Thr Asp Tyr Arg Gly Gly Val Pro

2782 2812
GGU UUA CUG AAA AAA GGA AAG GAC AUA AAA GUC UCC UGG AAA AGC UGG GGC CAU UCA AUG
Gly Leu Leu Lys Lys Gly Lys Asp Ile Lys Val Ser Trp Lys Ser Trp Gly His Ser Met

2842 2872
AUC UGG AGC AUU CCU GAG GCC CCC CGU CGC UUC AUG GUG GGC ACG GAA GGA CAA AGU GAG
Ile Trp Ser Ile Pro Glu Ala Pro Arg Arg Phe Met Val Gly Thr Glu Gly Gln Ser Glu

2902 2932
UGU CCC CUA GAG AGA CGG AAG ACA GGU GUU UUC ACG GUG GCA GAA UUC GGG GUU GGC CUG
Cys Pro Leu Gln Arg Arg Lys Thr Gly Val Phe Thr Val Ala Glu Phe Gly Val Gly Leu

2962 2992
AGA ACA AAG GUC UUC UUG GAU UUC AGA CAG GAA CCA ACA CAU GAG UGU GAC ACA GGA GUG
Arg Thr Lys Val Phe Leu Asp Phe Arg Gln Glu Pro Thr His Glu Cys Asp Thr Gly Val

3022 3052
AUG GGA GCU GCA GUC AAG AAC GGC AUG GCA AUC CAC ACA GAU CAA AGU CUC UGG AUG AGA
Met Gly Ala Ala Val Lys Asn Gly Met Ala Ile His Thr Asp Gln Ser Leu Trp Met Arg

3082 3112
UCA AUG AAA AAU GAC ACA GGC ACU UAC AUA GUU GAA CUU UUG GUC ACU GAC CUG AGG AAC
Ser Met Lys Asn Asp Thr Gly Thr Tyr Ile Val Glu Leu Leu Val Thr Asp Leu Arg Asn

3142 3172
UGC UCA UGG CCU GCU AGC CAC ACU AUC GAU AAU GCU GAC GUG GUG GAC UCA GAG UUA UUC
Cys Ser Trp Pro Ala Ser His Thr Ile Asp Asn Ala Asp Val Val Asp Ser Glu Leu Phe

3202 3232
CUU CCG GGG AGC CUG GCA GGA CCC AGA UCC UGG UAC AAC AGG AUA CCU GGC UAU UCA GAA
Leu Pro Ala Ser Leu Ala Gly Pro Arg Ser Trp Tyr Asn Arg Ile Pro Gly Tyr Ser Glu

3262 3292
CAG GUG AAA GGG CCA UGG AAG UAC ACG CCU AUC CGU GUU AUC AGA GAG GAG UGU CCC GGC
Gln Val Lys Gly Pro Trp Lys Tyr Thr Pro Ile Arg Val Ile Arg Glu Glu Cys Pro Gly

08R.3(ii).

3322 3352
ACG ACC GUU ACC AUC AAC GCC AAG UGU GAC AAA AGA GGA GCA UCU GUG AGG AGU ACC ACA
Thr Thr Val Thr Ile Asn Ala Lys Cys Asp Lys Arg Gly Ala Ser Val Arg Ser Thr Thr

3382 3412
GAG AGU GGC AAG GUU AUC CCA GAA UGG UGC UGC CGA GCG UGC ACA AUG CCA CCA GUG ACG
Glu Ser Gly Lys Val Ile Pro Glu Trp Cys Cys Arg Ala Cys Thr Met Pro Pro Val Thr

3442 3472
UUC CGG ACU GGA ACU GAU UGC UGG UAU GCC AUG GAA AUA CGG CCA GUC CAU GAC CAG GGG
Phe Arg Thr Gly Thr Asp Cys Trp Tyr Ala Met Glu Ile Arg Pro Val His Asp Glu Gly

3502 3532
GGG CUU GUU CGC UCA AUG GUG GUU GCG GAC AAC GGU GAA UUA CUU AGU GAG GGA GGA GUC
Gly Leu Val Arg Ser Met Val Val Ala Asp Asn Gly Glu Leu Leu Ser Glu Gly Gly Val

3562 3592
CCC GGA AUA GUG GCA UUG UUU GUG GUC CUU GAA UAC AUC AUC CGU AGG AGG CCC UCC ACG
Pro Gly Ile Val Ala Leu Phe Val Val Leu Glu Tyr Ile Ile Arg Arg Arg Pro Ser Thr

3622 3652
GGA ACG ACG GUU GUG UGG GGG GGU AUC GUC GUU CUC GCU CUG CUU GUC ACC GGG AUG GUC
Gly Thr Thr Val Val Trp Gly Gly Ile Val Val Leu Ala Leu Leu Val Thr Gly Met Val

3682 3712
AGG AUA GAG AGC CUG GUG CGC UAU GUG GUG GCA GUG GGG AUC ACA UUC CAC CUU GAG CUG
Arg Ile Glu Ser Leu Val Arg Tyr Val Val Val Val Gly Ile Thr Phe His Leu Glu Leu

3742 3772
GGG CCA GAG AUC GUG GCC UUG AUG CUA CUC CAG GCU GUG UUU GAG CUG AGG GUG GGU UUG
Gly Pro Glu Ile Val Ala Leu Met Leu Leu Glu Ala Val Phe Glu Leu Arg Val Gly Leu

3802 3832
CUC AGC GCA UUU GCA UUG CGC AGA AGC CUC ACC GUC CGA GAG AUG GUG ACC ACC UAC UUU
Leu Ser Ala Phe Ala Leu Arg Arg Ser Leu Thr Val Arg Glu Met Val Thr Thr Tyr Phe

3862 3892
CUU UUG CUG GUC CUG GAA UUG GGG CUG CCG GGU GCG AGC CUU GAG GAG UUC UGG AAA UGG
Leu Leu Leu Val Leu Glu Leu Gly Leu Pro Gly Ala Ser Leu Glu Glu Phe Trp Lys Trp

GGU GAU GCA CUG GCC AUG GGG GCG
Gly Asp Ala Leu Ala Met Gly Ala

OBR 3(iii).

TBE-NS1

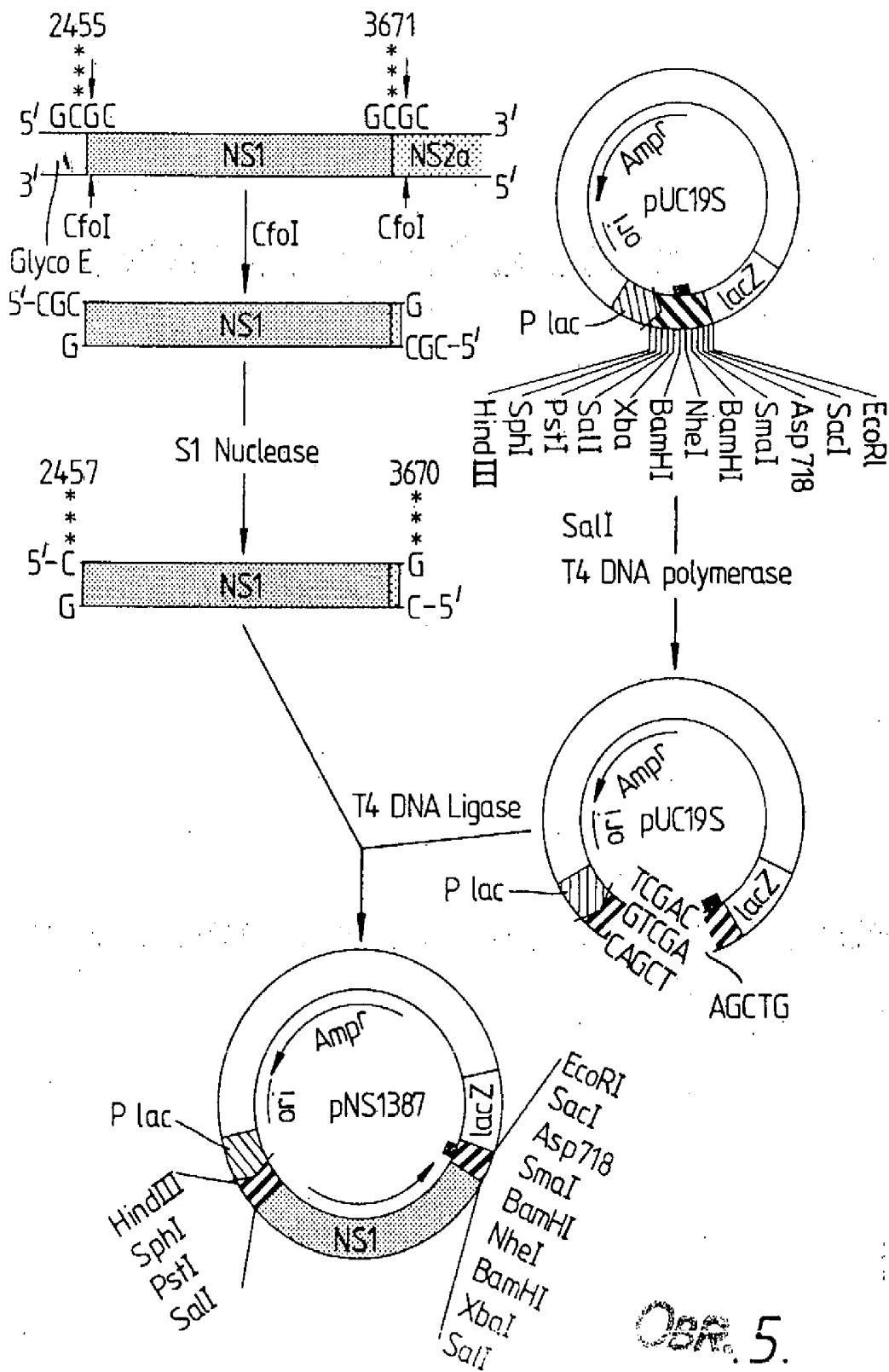
10	20
Asp Val Gly Cys Ala Val Asp Thr Glu Arg Met Glu Leu Arg Cys Gly Glu Gly Leu Val	
30	40
Val Trp Arg Glu Val Ser Glu Trp Tyr Asp Asn Tyr Ala Tyr Tyr Pro Glu Thr Pro Gly	
50	60
Ala Leu Ala Ser Ala Ile Lys Glu Thr Phe Glu Glu Gly Ser Cys Gly Val Val Pro Gln	
70	80
Asn Arg Leu Glu Met Ala Met Trp Arg Ser Ser Val Thr Glu Leu Asn Leu Ala Leu Ala	
90	100
Glu Gly Glu Ala <u>Asn Leu Thr</u> Val Val Val Asp Lys Phe Asp Pro Thr Asp Tyr Arg Gly	
110	120
Gly Val Pro Gly Leu Leu Lys Lys Gly Lys Asp Ile Lys Val Ser Trp Lys Ser Trp Gly	
130	140
His Ser Met Ile Trp Ser Ile Pro Glu Ala Pro Arg Arg Phe Met Val Gly Thr Glu Gly	
150	160
Gln Ser Glu Cys Pro Leu Glu Arg Arg Lys Thr Gly Val Phe Thr Val Ala Glu Phe Gly	
170	180
Val Gly Leu Arg Thr Lys Val Phe Leu Asp Phe Arg Gln Glu Pro Thr His Glu Cys Asp	
190	200
Thr Gly Val Met Gly Ala Ala Val Lys Asn Gly Met Ala Ile His Thr Asp Gln Ser Leu	
210	220
Trp Met Arg Ser Met Lys <u>Asn Asp Thr</u> Gly Thr Tyr Ile Val Glu Leu Leu Val Thr Asp	

OBR 4(i).

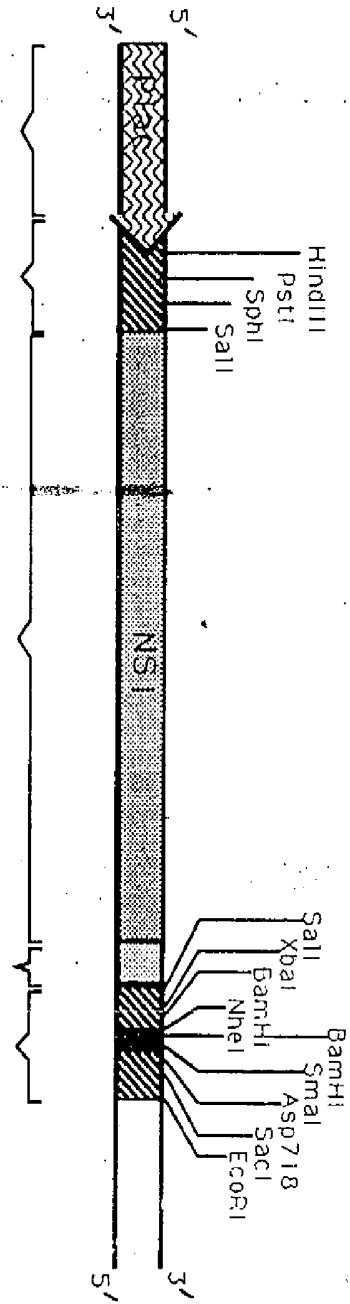
230 240
 Leu Arg Asn Cys Ser Trp Pro Ala Ser His Thr Ile Asp Asn Ala Asp Val Val Asp Ser
 250 260
 Glu Leu Phe Leu Pro Ala Ser Leu Ala Gly Pro Arg Ser Trp Tyr Asn Arg Ile Pro Gly
 270 280
 Tyr Ser Glu Glu Val Lys Gly Pro Trp Lys Tyr Thr Pro Ile Arg Val Ile Arg Glu Glu
 290 300
 Cys Pro Gly Thr Thr Val Thr Ile Asn Ala Lys Cys Asp Lys Arg Gly Ala Ser Val Arg
 310 320
 Ser Thr Thr Glu Ser Gly Lys Val Ile Pro Glu Trp Cys Cys Arg Ala Cys Thr Met Pro
 330 340
 Pro Val Thr Phe Arg Thr Gly Thr Asp Cys Trp Tyr Ala Met Glu Ile Arg Pro Val His
 350 360
 Asp Glu Gly Gly Leu Val Arg Ser Met Val Val Ala] Asp Asn Gly Glu Leu Leu Ser Glu
 370 380
 Gly Gly Val Pro Gly Ile Val Ala Leu Phe Val Val Leu Glu Tyr Ile Ile Arg Arg Arg
 390 400
 Pro Ser Thr Gly Thr Thr Val Val Trp Gly Gly Ile Val Val Leu Ala Leu Leu Val Thr
 410
 Gly Met Val Arg Ile Glu Ser Leu Val Arg Tyr Val Val Ala]

ORD 4(ii).

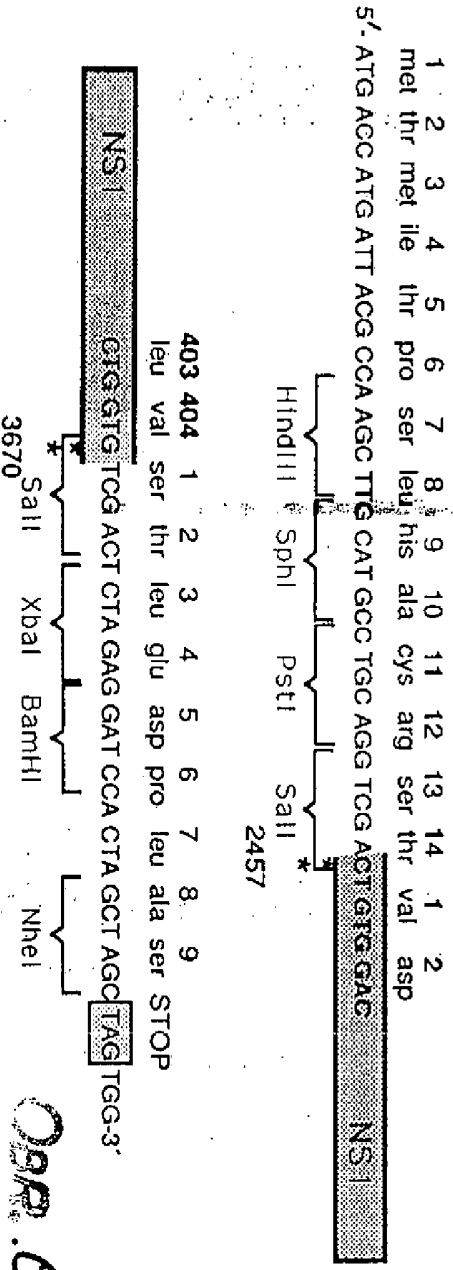
REC'D
ADVISORY
FOR THE
SECRET
1-1-11-1
1950
60110
19

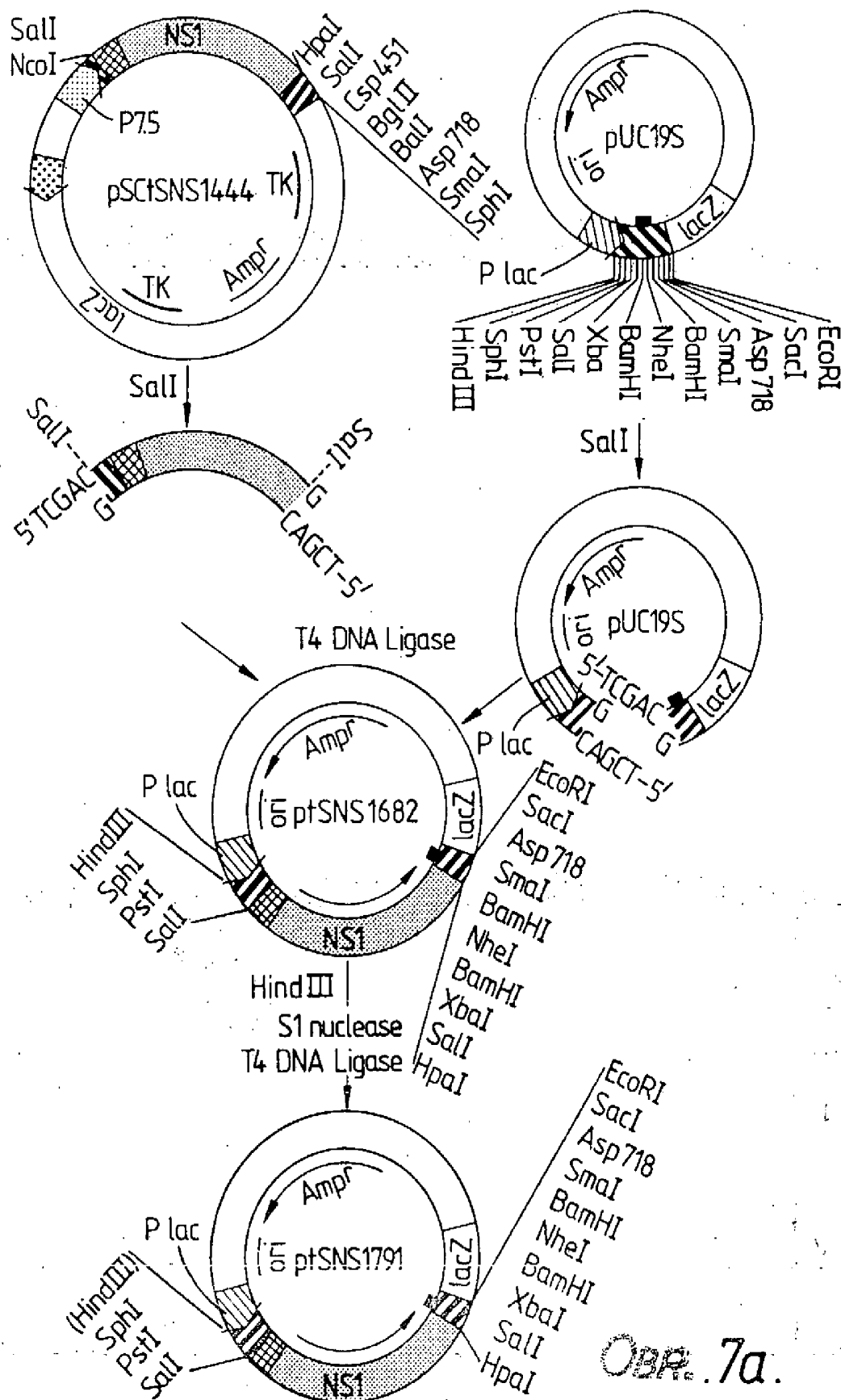


a)

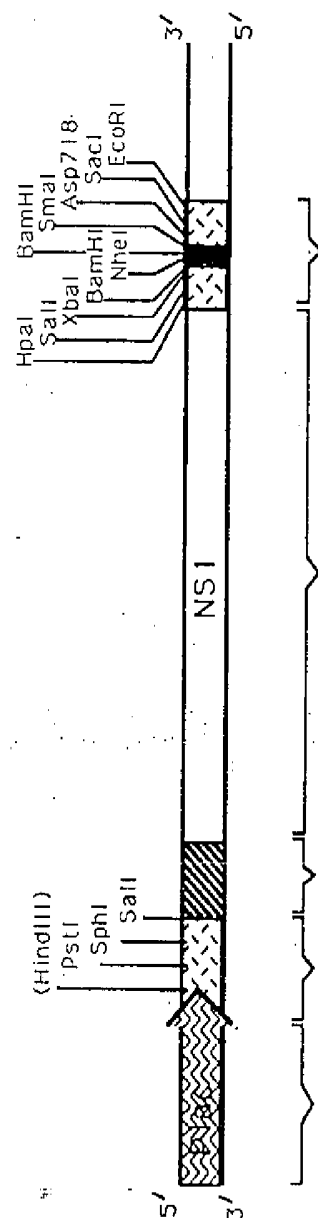


b)





OBR. 7a.



II)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 1 2 3 4
met thr met ile thr pro cys met pro ala gly arg leu asn pro thr met

5'-ATG ACC ATG ATT ACG CCA TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTG **AAC CCT ACA ATG NSI**

SphI PstI SalI * *
2372

345 346 347 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
val val ala val asn val asp ser arg gly ser thr ser

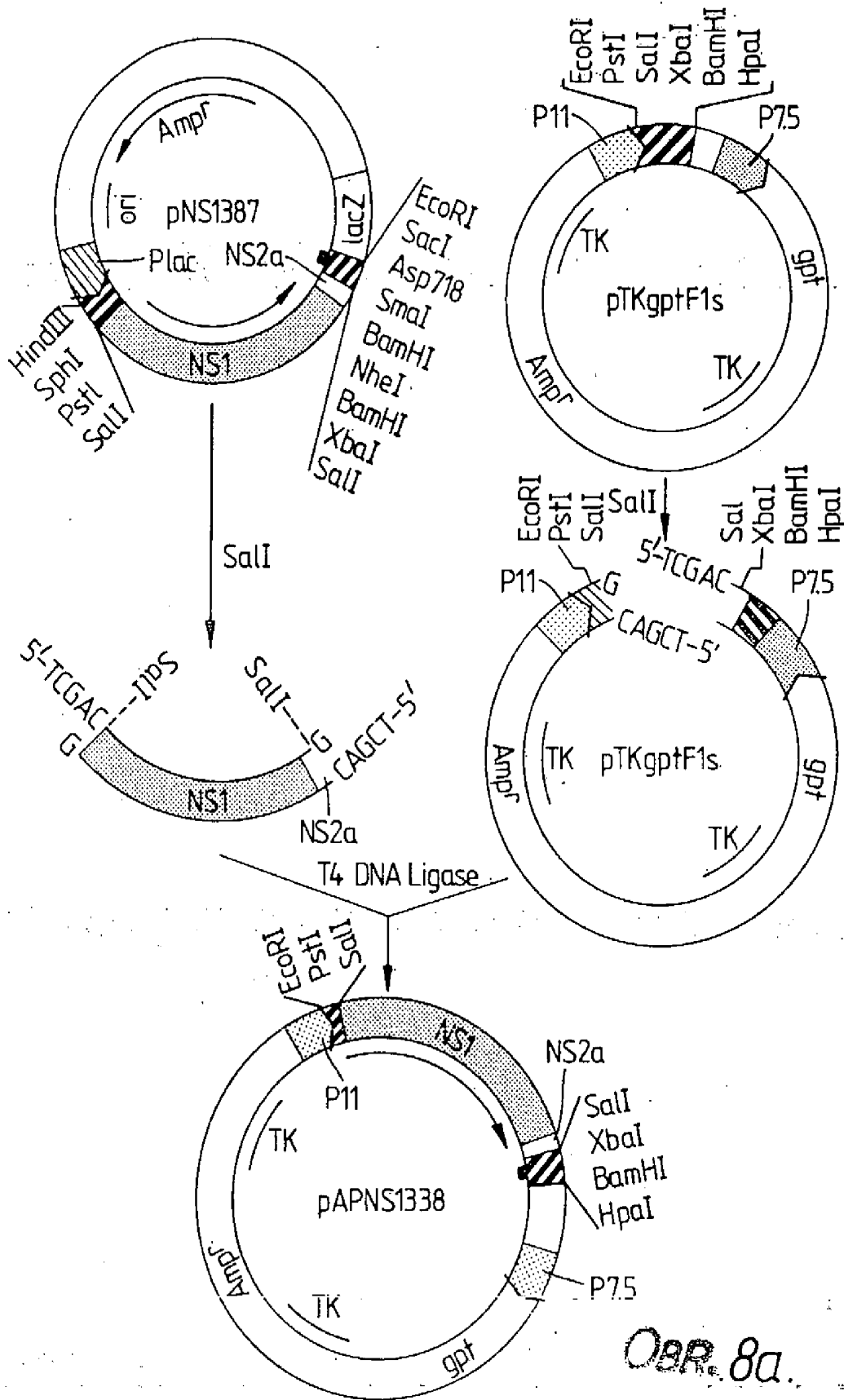
NSI GTG GTT GCG GTT AAC GTC GAC TCT AGA GGA TCC ACT AGC **CTA GCT AG-3'**

HpaI SalI XbaI BamHI NheI
3499

ORR 7b.

0800
11 11 11
P8000
P8000
P8000

2806-90



PAIR
 10804
 10804
 10804

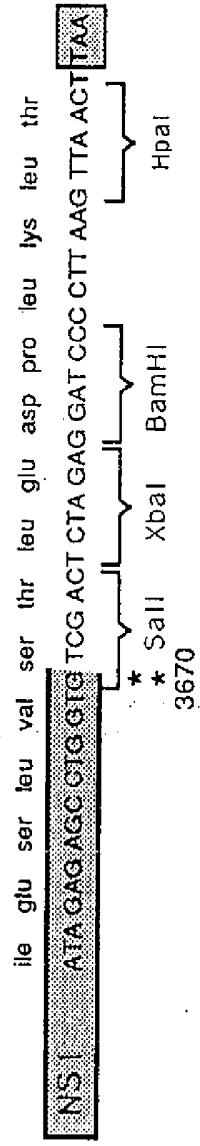
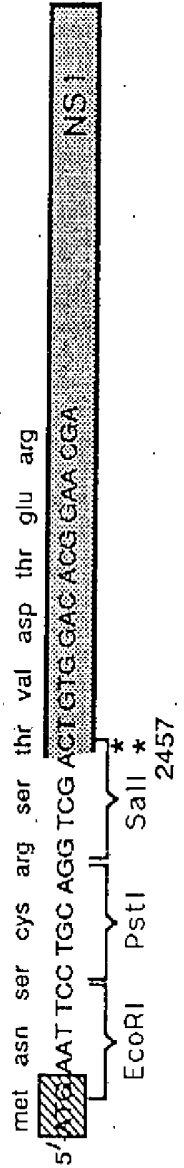
10804

10804

10804

OBR. 8a.

2006-70



Page 8b.

DATE
PROCESSED
LABORATORY

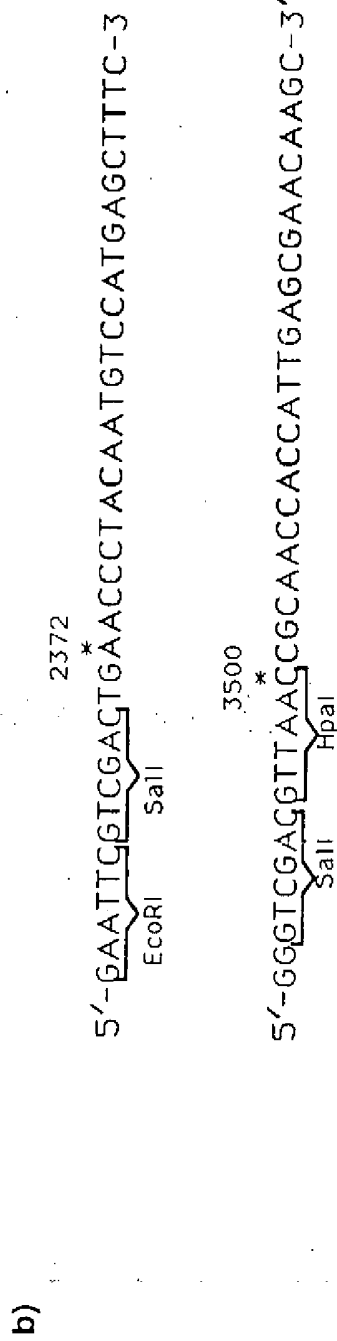
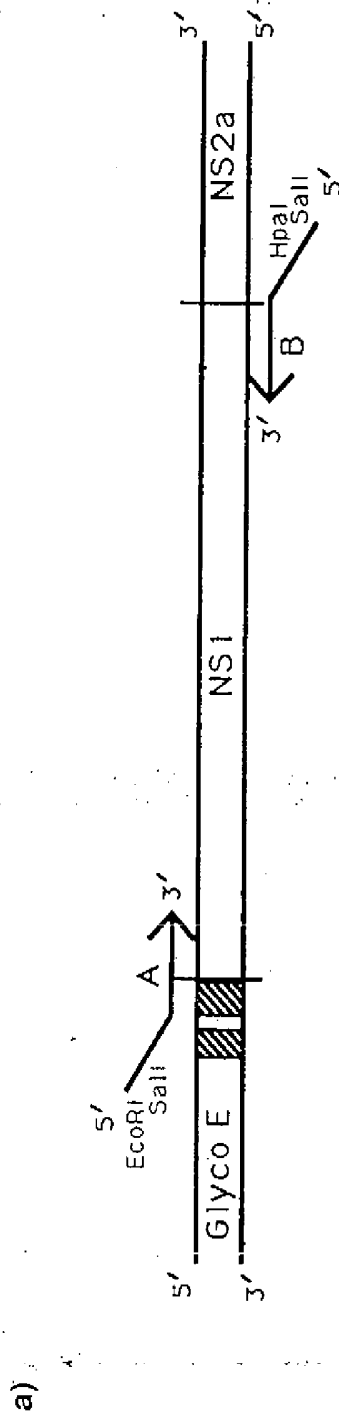
11 III 91

00000

0-14-0

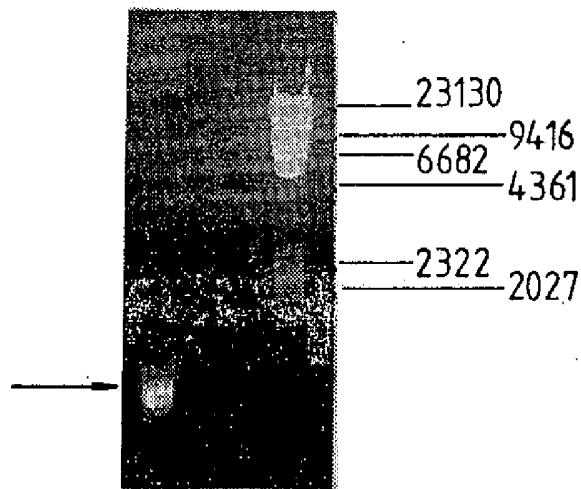
12

989.



01499

2806-90



OBR.10.

PRC
VCSJ
PRC
ORAD

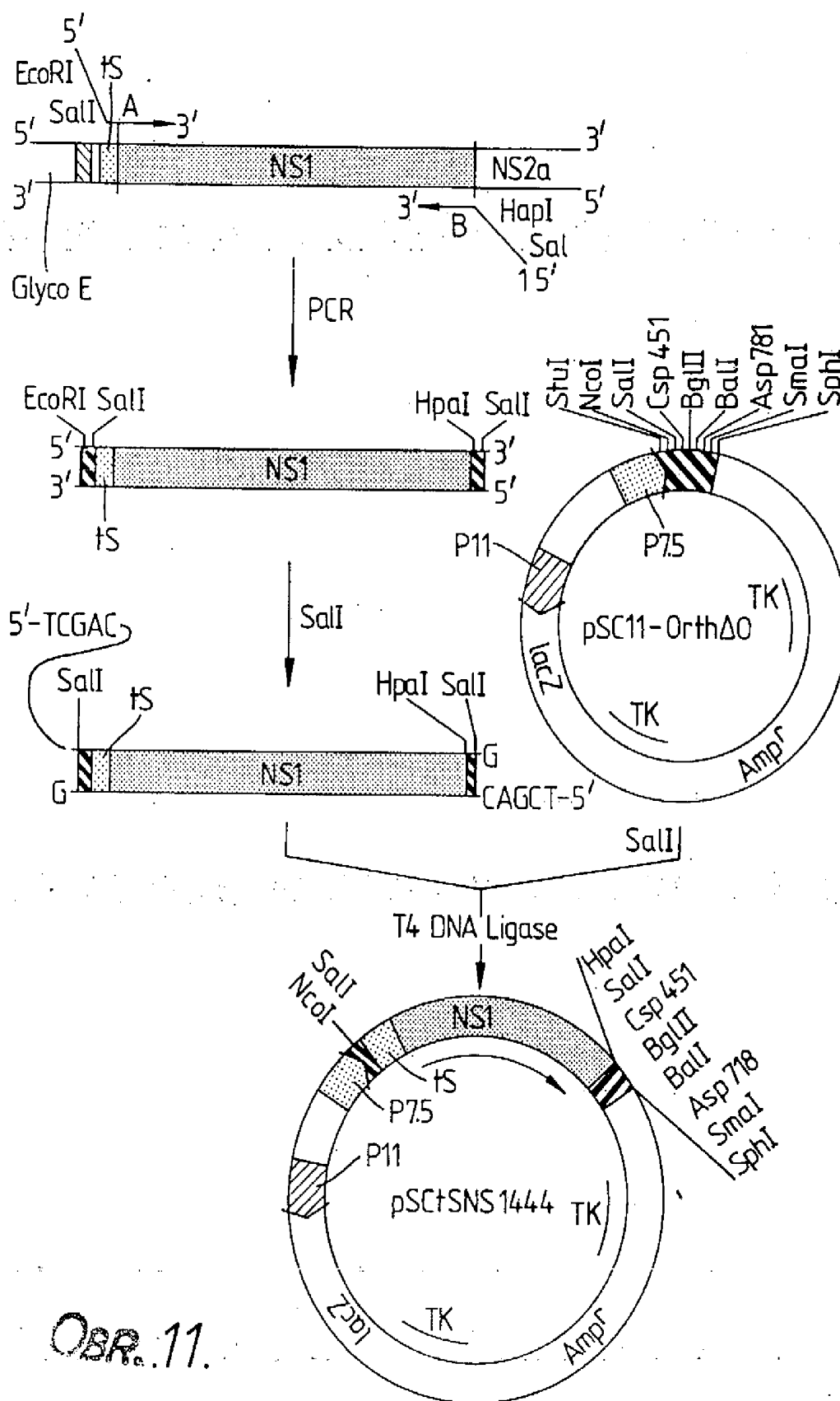
11 III 11

00519

011010

69

2806-90



OBR. 11.

DATE
TIME
PAGE
NO.

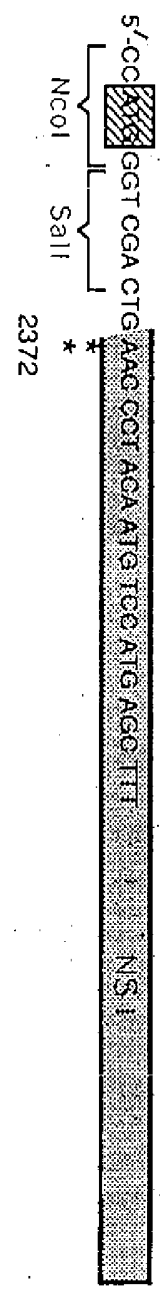
1000

1000

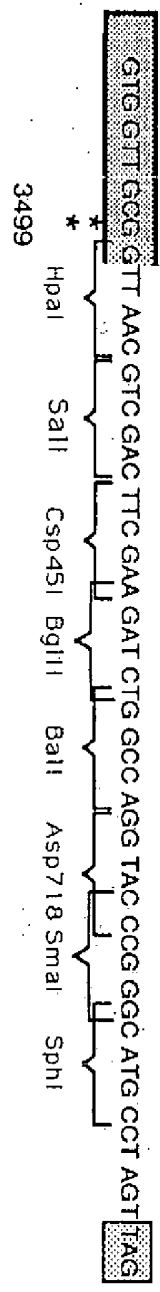
1000

011050
 11 MAR 91
 0451
 ORAD
 PROYNAL
 A08J87
 P&H

met gly arg leu asn pro thr met ser met ser phe

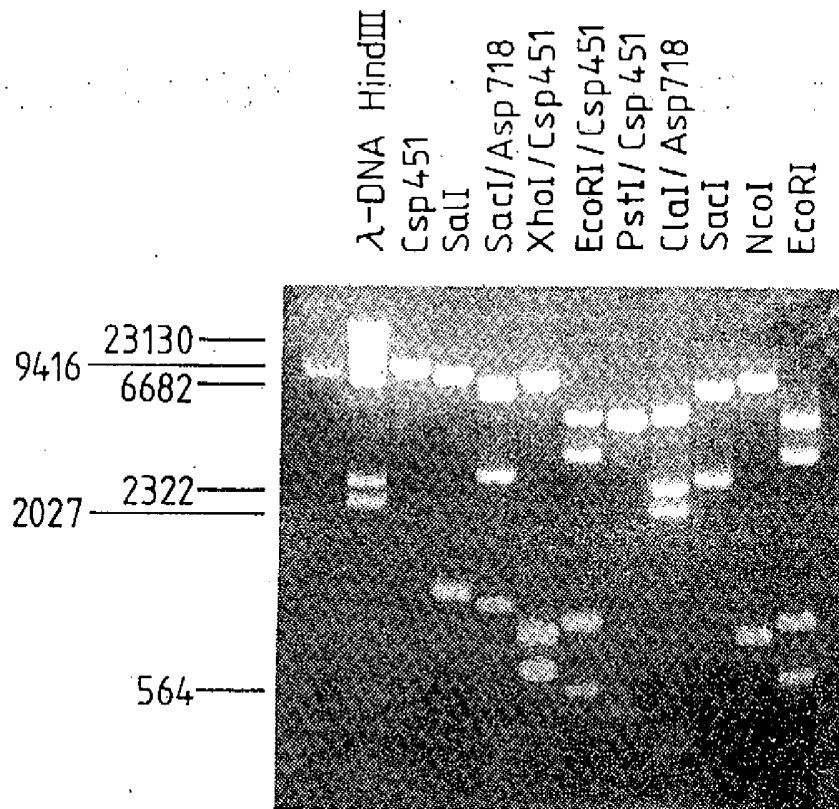


val val ala val asn val asp phe glu asp leu ala arg tyr pro gly met pro ser



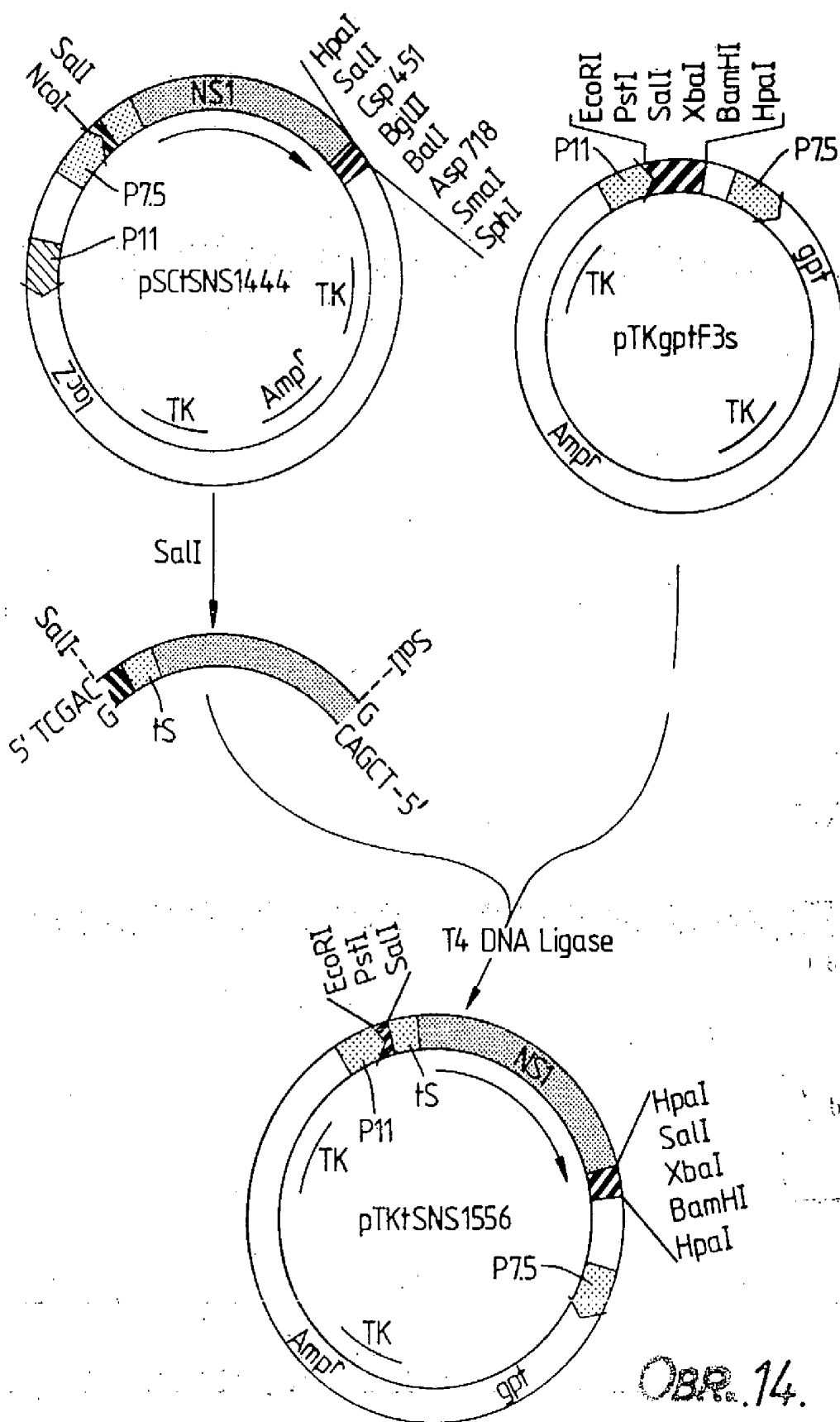
ORP 12.

2806-90



OBR. 13.

PAID
A0830
PROV. 11
GRAE
11 III 51
00815
011030
12



7/84
A 0815
080 084
URAC
1 1 1 1
0800
5 6 1 1 0
Tg

met gly ile pro ala gly arg leu asn pro thr met ser met ser phe

5' ATG GGA ATT CCT GCA GGT CGA CTG AAC CCT ACA ATG TCG ATG AGC TTT NS1

EcoRI PstI Sall 2372

val arg ser met val val ala val asn val asp ser arg gly ser pro

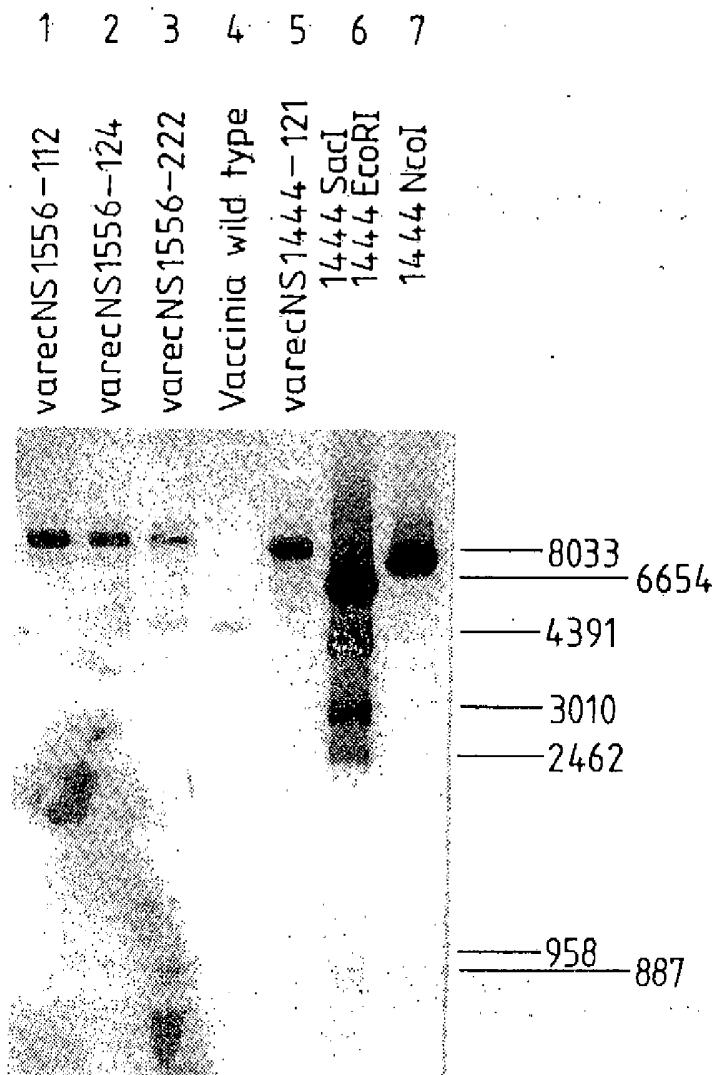
NS1 GTT CGC TCA ATG GTG GTT GCG GTT AAC GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCT TAA GTT AAC

* HpaI Sall XbaI BamHI HpaI 3500

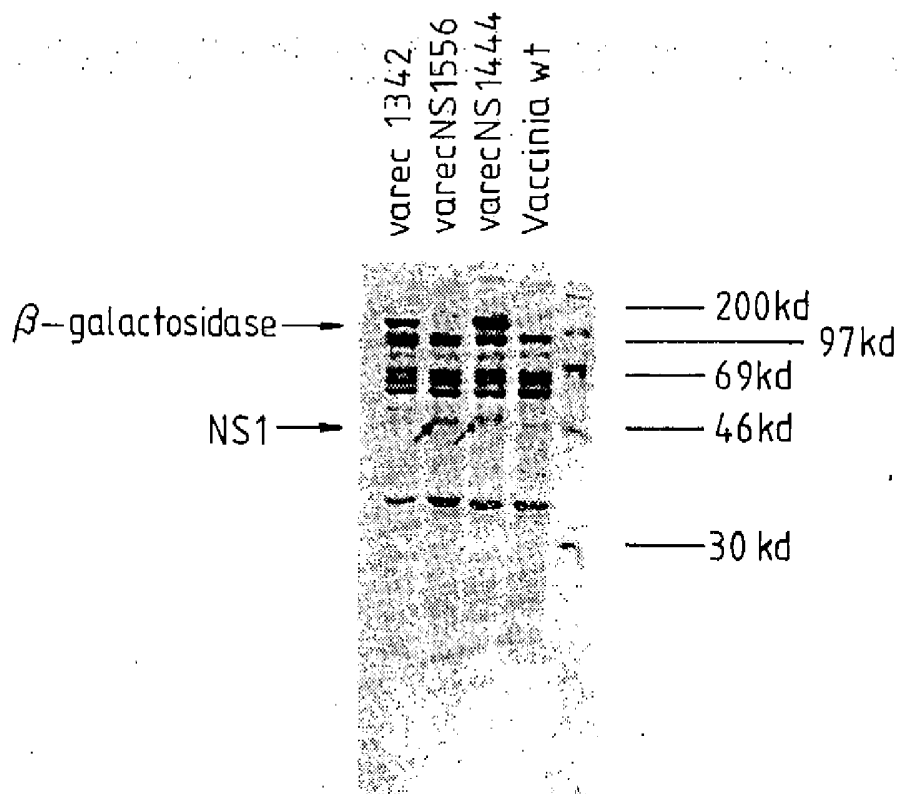
Over 15.

01/10/80	08/10/80	11/10/80	12/10/80
PROV. 10/80	PROV. 10/80	PROV. 10/80	PROV. 10/80
PROV. 10/80	PROV. 10/80	PROV. 10/80	PROV. 10/80

2006 10



OBR. 16.



OBR. 17.

