



(12) **PATENT**

(11) **342179**

(13) **B1**

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20076452	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.06.21 PCT/FR2006/001405
(22)	Inng.dag	2007.12.17	(85)	Videreføringsdag	2007.12.17
(24)	Løpedag	2006.06.21	(30)	Prioritet	2005.06.21, FR, 05 06275
(41)	Alm.tilgj	2008.03.07			
(45)	Meddelt	2018.04.09			
(73)	Innehaver	Institut National de la Recherche Agronomique, Etablissement Public à caractère scientifique et technologique 147, rue de l'Université, FR-75007 PARIS, Frankrike			
(72)	Oppfinner	Monique Leberre, 49, rue de Petit Pont, FR-78180 MONTIGNY-LE-BRETONNEUX, Frankrike Michel Bremont, 24bis, rue Babeuf, FR-94600 CHOISY-LE ROI, Frankrike			
(74)	Fullmektig	Coralie Moriette, 3, Avenue de Choisy, Appartement 2147, FR-75013 PARIS, Frankrike HÅMSØ PATENTBYRÅ AS, Postboks 171, 4301 SANDNES, Norge			

(54)	Benevnelse	cDNA construct of Salmonidae alphavirus
(56)	Anførte publikasjoner	US 2004258707 A1, SMERDOU et al; Non-viral amplification systems for gene transfer: vectors based on alphaviruses; Current opinion in molecular therapeutics, vol. 1, no. 2, 1999, p 244 - 251, ISSN 1464-8431, MCCORMICK et al; Introduction of replication-competent hepatitis C virus transcripts using a tetracycline-regulable baculovirus delivery system; Journal of general virology, vol. 85, no. 2, 2004, p. 429 - 439, ISSN 0022-1317
(57)	Sammendrag	

Det beskrives rekombinante DNA'er omfattende cDNA av genomisk RNA av et Salmonidae α -virus som foregås av en spacersekvens, under kontroll av en egnet promoter. Disse DNA'er er brukbare for å oppnå ekspresjonsvektorer, fremstilling av Salmonidae α -virus og for å oppnå vaksiner.

CDNA-KONSTRUKT AV SALMONIDAE A-VIRUS

Foreliggende oppfinnelse angår oppnåelsen av infeksjose cDNA'er av Salmonidae α -virus og bruken av disse cDNA'er.

α -virus er omhyllede, positiv-streng RNA-virus av Togaviridaefamilien.

5 To representanter for Salmonidae α -virus er i dag kjent: det sovende sykdomsvirus (Sleeping Disease Virus = SDV) som er patogen for ørret, og pankreassykdomsviruset (Pancrease Disease Virus = PDV) som er patogen for laks. Disse to virus som genetisk er meget nær hverandre, er tilskrevet α -virusfamilien på basis av likheten når det gjelder organiseringen av deres genom med den til de kjente α -virus, imidlertid viser deres nukleotidsekvens og også polypeptidsekvensen som
10 reduseres derfra, kun en lav grad av homologi med de andre α -virus (VILLOING et al., J. Virol. 74, 173-183, 2000; WESTON et al., Virology, 256, 188-195, 1999, WESTON et al., J. Virol. 76, 6155-63, 20002); de anses derfor å representere en α -virussubgruppe som er forskjellig fra mammal α -virus.

A-virusgenomet koder 2 polyproteiner: 5'-delen av den kodende sekvens som representerer rundt
15 to tredjedeler derav, koder et polyprotein som etter proteolytisk spalting gir de ikke-strukturelle proteiner (nsP), nsP1, nsP2, nsP3 og nsP4, involvert i reproduksjon av viruset; endetredjedelen av genomet koder et polyprotein hvis proteolytiske spalting gir de strukturelle proteiner (struk): kapsidprotein (C) og to konvoluttglykoproteiner (E3-E2 og 6K-E1). De kodende områder for nsP'er og struktene er separert av et ikke-kodende område som kalles skjøtområde (J). To ikke-kodende
20 områder er også til stede ved 5'- og 3'-endene av genomet. Dette genomet har også en hette på 5'-enden og en polyA-hale ved 3'-enden (STAUSS and STRAUSS, Microbiol. Rev., 58, 491-562, 1994).

I Salmonidae α -virusene konserveres denne genomiske organisering: hovedforskjellene med genomet for de andre α -virus er, i tillegg til den lave homologi for den kodende sekvens, størrelsen
25 av 5'- og 3'-ikke-kodende områder som er kortere i Salmonidae α -virusene.

Patologiene som forårsakes av SDV og PDV, utgjør i dag et økende problem for lakseoppdrett. Disse virus er nå blitt endemiske i Europa og har dukket opp på det nordamerikanske kontinent.

Metoden for å beskytte Salmonidae mot disse virale midler ligger i bruken av vaksiner. Immuniseringen kan gjennomføres på forskjellige måter, avhengig av spesier og alder hos den fisk som skal immuniseres. Den kan for eksempel gjennomføres ved balneasjon. Denne immuniseringsvei som er meget effektiv og relativt rimelig, er den valgte metode for immunisering med levende, svekkede virus. Immuniseringen kan også gjennomføres ved injeksjon av levende, svekkende virus eller av inaktiverte virus. Selv om det er mer kostbart enn immunisering ved balneasjon, kan denne metode benyttes for immunisering av fisk på 10 gram eller mer og er således spesielt egnet for immunisering av spesier som sjørøret eller laks. Fortrinnsvis er det også mulig å kombinere en primær immunisering ved balneasjon i nærvær av levende, svekkede virus med en boosterimmunisering ved injeksjon av levende, svekkende virus eller inaktiverte virus.

Fra US2004/258707 er det kjent en ekspresjonsvektor av et Salmonidae α -virus. Disse vektorene kan brukes til å forebygge eller behandle en sykdom eller infeksjon ved å hemme et gen tilknyttet sykdommen eller infeksjonen.

Smerdou et al.: Non-viral amplification systems for gene transfer: vectors based on alphaviruses; Current opinion in molecular therapeutics, vol. 1, no. 2, 1999, p. 244 - 251, ISSN 1464-8431, beskriver en α -virusvektor som omfatter en promotor T7 eller SP6 for rekombinant ekspresjon av gener av interesse. Disse vektorene kan brukes til levering av gener som nakent RNA eller DNA.

McCormick et al.: Introduction of replication-competent hepatitis C virus transcripts using a tetracycline-regulable baculovirus delivery system; Journal of general virology, vol. 85, no. 2, 2004, beskriver et avgivelsessystem for baculovirus som muliggjør tetracyklinregulert ekspresjon av pollavledet hepatitt C-virustranskripter, og relaterer seg til bruken av et hammerhode-ribozym som en spacer for å muliggjøre innføring av baculovirusvektorer som inneholder HCV.

Manipulering av genomet av RNA-virus, og særlig for å generere svekkede stammer, krever tilgjengeligheten av et infeksiosøst cDNA-system, det vil si av en fullstendig DNA-kopi av RNA-genomet til disse virus (rundt 12 000 baser), i stand til å kunne transkriberes i en vertscelle for å generere en viral RNA som kan reprodusere i denne celle.

Konvensjonelt og for å fremstille en infeksiosø cDNA for α -virus blir cDNA av det komplette, virale genom fusert ved 5'-enden til en SP6- eller T7-promotersekvens som klones inn i et plasmid. Dette plasmidkonstrukt spaltes ved 3'-enden med et restriksjonsenzym og benyttes så i et *in vitro* transkripsjonssystem for å syntetisere en genomisk RNA ved bruk av SP6- eller T7-RNA-polymerase. Denne RNA transfekteres inn i celler sensitive mot det angjeldende virus. Etter noen dager blir nydannet virus frigitt til kultursupernatanten. Det har således vært mulig å oppnå infeksiose cDNA'er for et stort antall α -virus, for eksempel for SV (Sindbis virus; RICE et al., J. Virol, 61, 3809-3819, 1987), SFV (Semliki Forest Virus; LILJESTROM et al., J. Virol, 65, 4107-4113, 1991), VEE-viruset (venezuelisk equinecefalittvirus; DAVIS et al., Virology, 171, 189-204, 1989) og EEE-viruset (østlig equinecefalittvirus; SCHOEPP et al., Virology, 302, 299-309, 2002).

Når det gjelder Salmonidae α -virus, svikter imidlertid forsøk på å generere en infeksjons cDNA ved bruk av denne vei.

Foreliggende oppfinnere har funnet at dette problemet kan løses ved å innføre en vilkårlig ytterligere sekvens som virker som en spacer mellom SP6- eller T7-promoterene og starten av det virale genom. Addisjonen av denne sekvensen gjør det mulig å generere *in vitro* en genomisk RNA som, ved transfeksjon inn i fiskeceller, tillater syntesen av de ikke-strukturelle proteiner.

For å generere en infeksjons RNA har oppfinnerne erstattet den vilkårlige sekvens som virker som spacer, med en hammerhoderibozymsekvens. De har observert at den RNA som er neosyntetisert fra dette konstrukt, nøyaktig spaltes ved det første nukleotid av den genomiske RNA av α -viruset. Den RNA som oppnås på denne måte, har evnen til å syntetisere nsP-proteinene som skal repliseres, for å tillate syntesen av en subgenomisk RNA som koder de strukturelle proteiner, og til slutt å kunne innkapsles for å generere infeksjøs, virale neopartikler.

Foreliggende oppfinnere har også benyttet dette konstrukt for innskyting av en heterolog sekvens under kontrollen av den subgenomiske promoter av SDV. De har observert at denne sekvens uttrykkes i cellene som er infisert med konstruktet, og at det virale genom omfattende denne sekvens kan innkapsles normalt i de virale partikler.

Et formål med oppfinnelsen er en rekombinant DNA som er avledet fra genomet av et Salmonidae α -virus og som omfatter:

- en transkripsjonspromoter, og
- nedstrøms promoteren og under transkripsjonell kontroll derav en spacersekvens på minst 5 nukleotider og fortrinnsvis fra 10 til 100 nukleotider;
- cDNA'et av den genomiske RNA av et Salmonidae α -virus.

Transkripsjonspromoterene kan være en hvilken som helst promoter som gjenkjennes av en RNA-polymerase som uttrykkes i vertscellen. Den kan for eksempel være en bakteriofagpromoter som T7-promoterene, T3-promoterene eller SP6-promoterene; i dette tilfellet må den rekombinante DNA ifølge oppfinnelsen benyttes i kombinasjon med et konstrukt som uttrykker en RNA-polymerase som gjenkjenner denne promoter.

En promoter som gjenkjennes av en endogen RNA-polymerase hos vertscellen og særlig av RNA-polymerase II, kan også benyttes. Den kan være en viral promoter, for eksempel en av de som vanligvis benyttes for ekspresjonen av heterologe gener i mammalceller, som CMV-(cytomegalovirus-)promoterene, RSV-(Rous Sarcoma Virus-)promoterene, den SV40 tidlige promoter, MoMLV-(Moloney Murine Leukemia Virus-)promoterene, og så videre; den kan også være en eukaryotisk promoter, for eksempel en fiskepromoter som den som er beskrevet av ALONSO et al. (Vaccine, 21, 1591-1600, 2003).

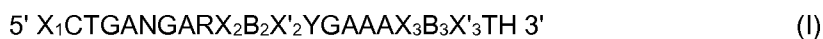
Funksjonen for spacersekvensen er å bringe i avstand promoteren fra starten av α -virusgenomet;

dens sekvens er derfor ikke vesentlig for implementeringen av oppfinnelsen. Hva angår lengden, har oppfinnerne observert at en sekvens på 6 nukleotider kan gi tilstrekkelig avstand. Generelt vil det være foretrukket å benytte en lengre sekvens på rundt 10 til 100 nukleotider og særlig 50 til 100 nukleotider.

5 Meget fordelaktig benyttes det en spacersekvens som tillater innskyting av et hammerhoderibozym ved 5'-enden av den genomiske RNA.

Hammerhoderibozymmer er små ribozymmer (generelt på rundt 40 til 80 nukleotider) som har felles en sekundær struktur bestående av 3 helikser hvis størrelse og sekvens kan variere, forbundet med en bevart sentral kjerne som er vesentlig for den katalytiske aktivitet (RUFFNER et al., Bio-
10 chemistry, 29, 10695-10702, 1990).

Sekvensen som tillater innføring av et hammerhoderibozym på 5'-enden av den genomiske RNA av et Salmonidae α -virus, er definert ved den generelle formel (I):



der A, T, G og C har deres vanlige betydning; H er C, T eller A; Y er A eller G; R er C eller T; N er
15 A, T, G eller C; X_1 er et oligonukleotid på minst 3 nukleotider, fortrinnsvis fra 6 til 10 nukleotider, med en sekvens komplementær til den til 5'-enden av genomet av nevnte α -virus; X_2 er et oligo-
nukleotid på minst 3 nukleotider og særlig fra 3 til 5 nukleotider, med en hvilken som helst sekvens; B_2 betyr et oligonukleotid med 4 eller 5 nukleotider, med en hvilken som helst sekvens; X'_2 betyr et
20 oligonukleotid som er komplementært til X_2 ; X_3 betyr et oligonukleotid på minst 2 nukleotider og
særlig 6 til 10 nukleotider, med en hvilken som helst sekvens; B_3 betyr et oligonukleotid med 4 til 5
nukleotider, med en hvilken som helst sekvens; X'_3 betyr et oligonukleotid som er komplementært
til X_3 .

For å sikre korrekt terminering av α -virus RNA'et når det benyttes en bakteriofagpromoter, vil det rekombinante DNA ifølge oppfinnelsen også konvensjonelt omfatte transkripsjonsterminatoren som
25 tilsvarer den benyttede promoter. Når det benyttes en promoter som gjenkjennes av en endogen
RNA-polymerase i vertscellen, benyttes en polyA-hale fusert til 3'-enden av det virale genom.

De rekombinante DNA'er ifølge oppfinnelsen kan lett konstrueres fra den cDNA som oppnås ved
reverstranskripsjon av den genomiske RNA av det valgte Salmonidae α -virus. Hvis ønskelig kan
forskjellige modifikasjoner foretas på denne cDNA i henhold til den bruk som tilsiktes for den re-
30 kombinante DNA ifølge oppfinnelsen. Denne kan for eksempel involvere innføring av ett eller flere
restriksjonssteder, deleksjon av deler av det virale genom og særlig deler som ikke kreves for dens
reproduksjon (for eksempel alle eller en del av området som koder de strukturelle proteiner), dupli-
seringen av virale sekvenser, innføringen av heterologe sekvenser, og så videre. Det kan også
involvere mutasjoner hvis effekter på egenskapene hos disse α -virus, for eksempel på deres infeks-
35 sive kapasitet, deres patogenisitet av deres antigenisitet, er ønskelig å teste.

Uttrykkene "cDNA av den genomiske RNA av et Salmonidae α -virus" eller "cDNA av et Salmonidae α -virus" som benyttet her, skal tolkes til å omfatte både den cDNA som oppnås ved revers-transkripsjon av den genomiske RNA av nevnte α -virus, og den cDNA som er modifisert som antyd det ovenfor.

- 5 Foreliggende oppfinnelse gjør det således mulig å gjennomføre manipulering av Salmonidae α -virusgenomet med henblikk på forskjellige applikasjoner, og å fremstille, i store mengder og reproduserbart, de således oppnådde Salmonidae α -virus.

Foreliggende oppfinnelse gjør det mulig særlig å konstruere, fra Salmonidae α -virus, ekspresjonsvektorer med struktur tilsvarende de som allerede er konstruert fra andre α -virus (for en oversikt
10 henvises det for eksempel til FROLOV et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11371-11377, 1996). Disse ekspresjonsvektorer kan være av to hovedtyper:

- vektorer som er i stand til reproduksjon, av ekspresjon av den heterologiske sekvens som er innskutt, og å bli innkapslet for å gi nye, virale partikler. Disse vektorer oppnås generelt fra det komplette genom av et α -virus ved innføring i den sistnevnte av den heterologe sekvens av interesse under kontroll av en kopi av den subgenomiske promoter;
15
- vektorer i stand til reproduksjon og ekspresjon av den heterologe sekvens som er innskutt deri, men ikke i stand til å produsere nye, virale partikler. Disse vektorer oppnås generelt ved å erstatte området av α -virusgenomet som koder de strukturelle proteiner med den heterologe sekvens av interesse. Innkapslingen av viruset kan kun skje hvis de strukturelle
20 proteiner tilveiebringes i trans i vertscellene, for eksempel på grunn av innføring i cellene av hjelpervektorer som uttrykker disse proteiner, eller på grunn av bruken som vertsceller av cellelinjer som stabilt transformeres med ekspresjonskassetter som uttrykker disse proteiner.

Rekombinante DNA'er ifølge oppfinnelsen kan således benyttes for ekspresjonen av en heterolog
25 sekvens av interesse under kontrollen av en subgenomisk promoter av et Salmonidae α -virus. I dette tilfellet inneholder Salmonidae α -virus cDNA-innskuddet en eller flere ekspresjonskassetter, der hver av hvilke inneholder: en kopi av nevnte subgenomiske promoter og nedstrøms av nevnte subgenomiske promoter og under den transkripsjonelle kontroll derav en heterolog sekvens som det er ønskelig å uttrykke, eller et kloningssete for innskuddet av denne sekvens.

30 Den subgenomiske promoter av α -virus gjenkjennes av nsP-komplekset og kontrollerer transkripsjonen av genene som koder de strukturelle proteiner. I Salmonidae α -virus er denne promoter lokalisert i området av genomet som omfatter enden av sekvensen som koder nsp4, og skjøteområdet (når det gjelder SDV), er denne promoter lokalisert i området tilsvarende nukleotidene 7686-7846 av genomet, omfattende de minst 124 nukleotider av sekvensen som koder nsp4, og skjøte-
35 området).

Den heterologe sekvens kan være en sekvens som koder et protein av interesse eller også en

sekvens som transkriberes inn i en RNA av interesse, for eksempel en antisense RNA eller en interfererende RNA.

Et formål med oppfinnelsen er også en fremgangsmåte for å oppnå en RNA av et Salmonidae α -virus som karakteriseres ved at den omfatter innføringen av et konstrukt ifølge oppfinnelsen i en
5 egnet vertscelle og dyrking av vertscellen.

Vertscellene som kan benyttes innen oppfinnelsens kontekst er fortrinnsvis fiskeceller; som ikke begrensede eksempler kan nevnes BF-2 (ATCC CCL-91)-, CHSE214 (ATCC CCL55)- eller RTG-2 (ATCC CRL-1681)-celler. Hvis nødvendig blir disse celler transformert, transient eller stabilt, med et konstrukt som uttrykker en RNA-polymerase som gjenkjenner promoteren som benyttes for
10 konstruksjonen av den rekombinante DNA ifølge oppfinnelsen.

Formålet med oppfinnelsen er også en fremgangsmåte for oppnåelse av en Salmonidae α -virus RNA-replikon som karakteriseres ved at den omfatter innføringen i en egnet vertscelle av et rekombinant DNA ifølge oppfinnelsen hvori spacersekvensen er en hammerhoderibozymsekvens som definert i den generelle formel (I), og dyrking av vertscellen.

15 Uttrykket: "RNA-replikon" definerer her et RNA-molekyl som er i stand til å reprodusere autonomt i en vertscelle.

For fremstillingen av rekombinante α -virus er det nødvendig at alle de strukturelle proteiner som kreves for innkapsling, også uttrykkes i vertscellen. Denne ekspresjon kan gjennomføres i cis (all den genetiske informasjon som kreves for ekspresjonen av disse proteiner bæres av α -virus RNA-replikonet), eller også i trans (α -virus RNA-replikonet bærer ikke all den genetiske informasjon som
20 kreves for ekspresjon av disse proteiner, og den genetiske informasjon som mangler, tilveiebringes av vertscellen).

Hvis den rekombinante DNA ifølge oppfinnelsen inneholder all den genetiske informasjon som kreves for innkapsling, kan RNA-replikonet som produseres, innkapsles i vertscellen for derved å gi
25 rekombinante Salmonidae α -virus som er i stand til å penetrere inn i andre celler, å reprodusere deres genom, og å bli innkapslet i nevnte celler autonomt. Slike virus er her definert som "infeksiøse virus".

Hvis det rekombinante DNA ifølge oppfinnelsen ikke inneholder all den genetiske informasjon som kreves for innkapsling (særlig hvis den mangler alle eller en del av området som koder de strukturelle proteiner), kan RNA-replikonet som fremstilles, ikke innkapsles i vertscellen hvis ikke cellene i
30 trans tilveiebringer den genetiske informasjon for komplementering av den defektive innkapslingsfunksjon (for eksempel hvis den er transformert, transient eller stabilt, med et konstrukt som uttrykker de manglende, strukturelle proteiner). I det sistnevnte tilfellet kan rekombinante Salmonidae α -virus produseres i denne vertscelle. De er i stand til å penetrere inn i andre celler og å reprodusere
35 deres genom i cellene men kan bli innkapslet der kun hvis, på samme måte som initialvertscellen,

nevnte celler kan transkomplementere den defektive innkapslingsfunksjon. Slike virus er her definert som "abortive virus".

Gjenstanden for oppfinnelsen er også transkriptene og også de svekkede Salmonidae α -virus RNA-replikonene og de infeksjøs eller abortive svekkede rekombinante Salmonidae α -virus som kan oppnås, som beskrevet ovenfor, fra de rekombinante DNA'er i henhold til oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter mer spesielt RNA-replikonene og de rekombinante Salmonidae α -virus som kan oppnås fra de rekombinante DNA'er i henhold til oppfinnelsen hvori en eller flere modifikasjoner er innført som antydnet ovenfor, inn i α -virusets cDNA.

De rekombinante ekspresjons-DNA'er, RNA-ekspresjonsreplikonene og de rekombinante ekspresjons Salmonidae α -virus ifølge oppfinnelsen kan benyttes for å oppnå vaksiner, for eksempel for å oppnå svekkede eller inaktiverede Salmonidae α -virus-vaksinestammer.

En gjenstand for oppfinnelsen er også vaksinene omfattende et rekombinant DNA, en RNA-replikon eller et rekombinant Salmonidae α -virus i henhold til oppfinnelsen, eller som kan oppnås derfra. Disse vaksiner kan benyttes særlig for beskyttelse av Salmonidae mot α -virusinfeksjoner.

Foreliggende oppfinnelse vil forstås tydeligere ut fra den ytterligere beskrivelse som følger og som henviser til ikke-begrensede eksempler som illustrerer oppnåelsen av en rekombinant DNA, av RNA-replikoner og av rekombinante virus ifølge oppfinnelsen, fra SDV.

Eksempler

Virus og celler

Virusene som benyttes i eksemplene som følger stammer fra S49P stammen av SDV, og er beskrevet tidligere (CASTRIC et al., Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 17, 27-30, 1997).

Disse virus formeres på monosjikt kulturer av BF-2-celler, dyrkes ved 10 °C i Eagles minimum es-sensielle medium (EMEM, Sigma FRANKRIKE) som er bufret til pH 7,4 med Tris-HCl og supplert med 10 % fœtalkalveserum. For å oppnå et bedre utbytte under transfeksjonene er BF-2 cellene som benyttes, avledet fra subkloner valgt på basis av deres evne til effektivt å kunne transfekteres.

Denne seleksjon ble gjennomfœrt som følger:

BF-2-celler ble dyrket i en 96-brønners plate i en mengde av en celle per brønn. Etter en måned ble 24 av de således oppnådde kloner valgt vilkårlig og forsterket i to 12-brønners plater. Hver av disse kloner ble transfektert med et testplasmid (pcDNA3-G), oppnådd ved innskyting av sekvensen som koder glykoprotein G av VHSV-viruset (viral hemorragisk septicaemiavirus) i vektoren pcDNA3 (Invitrogen), nedstrøms CMV-promoter og T7-promoter. Effektiviteten for transfek-

sjonen ble bestemt ved evaluering av nivået av ekspresjonen av glykoprotein G under kontrollen av CMV-promoteren, ved immunofluorescens, ved bruk av et antistoff rettet mot dette protein.

De elleve kloner hvori fluorescensen var sterkest ble valgt og forsterket. Hver av disse kloner ble testet igjen som antydnet ovenfor med henblikk på evnen til å kunne transfekteres med pcDNA3-G, men denne gang etter forutgående infeksjon med vTF7-3 (FUERST et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986), og ved evaluering av ekspresjonsnivået av glykoprotein G under kontrollen av T7 promoteren. Til slutt ble 5 kloner valgt med henblikk på evnen til smitte med vTF7-3 kombinert med evnen til effektivt å kunne transfekteres.

Forsterkningsprimere:

10 Sekvensene for primerne som benyttes i eksemplene som følger er antydnet i tabell I.

Tabell 1

Primer	Sekvens (5'-3')"	Restriksjons- sete	SEQ ID NR.:
P1	CCGAATTCGTTAAATCCAAAAGCATACATATATCAATGATGC	<i>EcoRI</i>	1
P2	CCCGGGGCGGCCCAAGGTCGAGAACTGAGTTG	<i>SmaI</i>	2
P3	CCCGGGGAGGAGTGACCGACTACTGCGTGAAGAAG	<i>SmaI</i>	3
P4	GGTCTAGAGTATGATGCAGAAAATATTAAGG	<i>XbaI</i>	4
P5	CCTCTAGACCAACCATGTTTCCCATGCAATTCACC	<i>XbaI</i>	5
P6	CCGCGGCCCGCATTGAAAATTTAAAAACCAATAGATGACTCA	<i>NotI</i>	6
5'RIBO	GGATCCTGGATTTATCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAC- TATAGGAAAGGAATTCCTATAGTCGATAAATCCAAAAGC	<i>BamHI</i>	7
3'RIBO	GCCGGCGGAAGGGTTAGCTGTGAGATTTTGCATCATTGA- TATATGTATGCTTTTGGATTTATCGACTATAGGAATTCCTT	<i>NaeI</i>	8
5'SanDI	CCTCGTCAGCGGGACCCATAATGCC	<i>SanDI</i>	9
3'? XbaI- Bsp1	CCGCTGAGCGGTTGGTTGAGAGTATGATGC	<i>Bsp1</i>	10
5'GFP	CCAACCGCTGAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGG	<i>Bsp1</i>	11
3'GFP	GTGGCTAACGGCAGGTGATTCACGCTTAAGCTCGA- GATCTGAGTCCG	-	12
5'nsp4	GCGTGAATCACCTGCCGTTAGCCACAATGGCGATGG- CCACGCTCG	-	13

Primer	Sekvens (5'-3')"	Restriksjonssete	SEQ ID NR.:
3'Jun	CCATGCTGAGCGGTTGGTTGAGAGTATGATGC	<i>Blp1</i>	14
nsP4-F	GGCGGCTTCCTGTTACTCGACACGG	-	15
5'Pro-GFP	ATCGATGAACGATATCGGCCGCCGCTACACGCTATGGCG	<i>EcoV</i>	16
3'Pro-GFP	CCGGAATGCTAGCTTAAGCTCGAGATCTGAGTCCG	<i>NheI</i>	17
3'UTR	CGAGCTTAAGCTAGCATTCCGGTATACAAATCGC	<i>NheI</i>	18
T7t	GGCTAGGTCGGCGGCCGCAAAAAACCCCTCAAGACCCG	<i>NosI</i>	19
GSP1	CCGCCGAGTCGCTCCAGTTGGCG	-	20
GSP2	CGGGTTCTCCAGGACGTCCTTCAAG	-	21
5'RACE-seq	GGCGGCGGCATGGTCGTTGGACGACCGG	-	22
Cap-R	CCTTCAGCATAGTCATGGCCTTCTTTGG	-	23
GFP-R	TTAAGCTCGAGATCTGAGTCCGGAC	-	24

Restriksjonssetene er understreket. Sekvensene i kursiv er en del av nsP4-sekvensen, og sekvensene indikert i bold er en del av GFP-sekvensen.

Eksempel 1: Kloning av det fullstendige SDV genom

- 5 Et helt SDV cDNA-konstrukt, pBS-VMS ble oppnådd fra cDNA-fragmenter (nummerert 1 til 3) som dekket det komplette SDV-genom, oppnådd fra den tidligere publiserte sekvens (VILLOING et al., 2000; WESTON et al., 2002, nevnt ovenfor; GENBANK aksessnummer: NC_003433.1/GI:19352423). Hvert fragment ble forsterket ved reverstranskripsjon fulgt av PCR (RT-PCR) ved bruk av den SDV-genomiske RNA som templat. RNA'et ble ekstrahert ved bruk av
- 10 det QIAamp virale RNA rensesett (Qiagen), fra de PEG-konsentrerte supernatanter sv SDV-infektete celler. Primerne (P1 til P6) som ble benyttet for reverstranskripsjonen og PCR-forsterkningen, er gitt i tabell 1.

cDNA-fragmentene som ble oppnådd, ble ligert til hverandre og satt sammen på det multiple kloningssete av pBlueScript-plasmidet ved bruk av *EcoRI*-, *SmaI*-, *XbaI*- og *NotI*-restriksjonssetene.

- 15 Det oppnådde plasmid er vist i figur 1.

Som antydnet i figur 1 ble et *Xba*I-restriksjonssete innført kunstig for å lette etterfølgende klonings-trinn. Sekvenseringen av pBS-VMS-konstruktet viste 42 variasjoner sammenliknet med den publiserte sekvens. Disse variasjoner er oppsummert i tabell II nedenfor og antydes ved bokstavene (a til x) på det pBS-VMS-konstrukt som er vist i figur 1.

- 5 Blant disse ble 8 sjansemutasjoner korrigeret som følger: forskjellige deler av SDV RNA-genomet tilsvarende de områder av cDNA-genomet som inneholdt mutasjonen ble forsterket igjen ved RT-PCR. Hvert PCR-produkt ble sekvensert og, hvis sekvensen var korrekt, skutt inn i stedet for sin homolog i pBS-VMS-konstruktet ved bruk av de egnede restriksjonsseter og standardteknologi (SAMBROOK et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. utg. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Med unntaket av *Xba*I-restriksjonssetet inneholdt det endelige pBS-VMS-konstrukt en nøyaktig cDNA-kopi av SDV RNA-genomet.
- 10

Tabell II

Posisjon (nt)			Nukleotid*		Aminosyre*	
5'UTR	2	a	T?	A		
nsP1	35	b	T?	A	L?	Q
	1123	c	G?	A	D?	N
	1519	d	G?	A	G?	R
	1531	d	C?	A	L?	I
nsP2	1958		C?	A	A?	D
	2345		G?	A	G?	E
	2477		A?	G	E?	G
	2669		T?	C	L?	P
	3728	e	G?	C	R?	P
	3934	f	CG?	GT	R?	V
	3938	f	G?	T	R?	L
	3941	f	C?	T	S?	F
nsP3	5084		C?	T	P?	L
	5095		A?	G	I?	V

Posisjon (nt)		Nukleotid*		Aminosyre*			
nsP4	6107	g	T?	C	L?	P	
	6392		T?	A	F?	Y	
	6471	h	A?	C	E?	D	
	6505	i	A?	G	K?	E	
	7467	j	A?	C	E?	D	
jun	7836		CA?	AG			
Kapsid	8337	k	T?	A	F?	I	
	8383	l	T?	A	V?	D	
	8415	m	T?	A	C?	S	
	8469	n	G?	T	G?	W	
	8482	o	A?	C	N?	T	
	8486	o	T?	-	rammeverk		
	8490	o	G?	-			
	8504	p	T?	G			
	8506	p	T?	C			
	8510	p	T?	A			
	8539	q	G?	-			
		8553-55	r	GcA?	GcC	P?	A
		8556	r	T?	A	F?	I
E2	9310	s	C?	T	T?	M	
	9937	t	T?	G	L?	W	
6K	10422	u	GCG?	AGC	A?	S	
E1	10858		A?	G	E?	G	
	11709	v	A?	G	R?	G	
	11722	w	A?	-	rammeverk		
	11739	w	T?	-			
	11751	x	G?	-			

*Den første posisjon tilsvarer den publiserte sekvens; den andre posisjon tilsvarer den cDNA sekvens som bestemmes i den foreliggende studie. De tilfeldige mutasjoner som ble korrigert er an-tydet i bold. Bokstavene (a-x) henviser til figur 1.

Eksempel 2: Konstruksjon av en genomisk RNA som tillater syntesen av de ikke-strukturelle SDV-proteiner i fiskeceller, og av en SDV-replikon som uttrykker GFP og luciferase

SDV cDNA-innskuddet ble overført fra pBS-VMS til en vektor pcDNA3 (Stratagene) mellom *EcoRI*- og *NotI*-restriksjonssetene, nedstrøms den cytomegalovirus (CMV) umiddelbare tidligere (IE)-promoter og en T7 RNA-polymerasepromoter. Det resulterende konstrukt ble kalt pSDV.

Det området av den cDNA som koder de strukturelle proteiner, ble fjernet ved digestering med *XbaI* der et stede er i skjøtområdet og det andre i det multiple kloningssete av pDNA3 nedstrøms cDNA'et. Konstruktet ble autoligert for å gi plasmidet p-nSP, vist i figur 2A).

Plasmidet p-nSP ble så linearisert med *XbaI* for, nedstrøms området som koder de ikke-strukturelle proteiner, å skyte inn en sekvens som koder GFP eller luciferase (LUC) og som foregår av enden av skjøtområdet og fulgt av den 3'-ikke-translaterte ende av SDV fusert til en poly (A)-hale. Det kunstige *XbaI*-setet av skjøtområdet ble fjernet ved interutbytting av et *SandDII/BIP1*-fragment. Lese-rammen for GFP eller den for luciferase kantes av to unike restriksjonsseter: et *EcoRV*-sete og et *BIP1*-sete. I disse sluttkonstrukter kalt p-nsp-GFP og p-nsp-LUC, separeres CMV/T7 promoterkombinasjonen fra 5'-enden av SDV-genomet ved 61 nukleotider som hører til et multippelt kloningssete av pcDNA3. Disse konstrukter er vist i figur 2B.

For å evaluere funksjonaliteten av disse konstrukter for ekspresjonen av GFP- og LUC-rapportørgener ble hver av disse benyttet for å transfektere BF-2-celler som ble inkubert ved 10 °C i kulturplatebrønner (6 x 10⁵ celler/brønn), og luciferaseaktiviteten og GFP aktiviteten ble målt daglig.

For å måle luciferaseaktiviteten ble de transfekterte celler høstet før måling, vasket med PBS og lysert med 75 µl 1 x luseringsbuffer (25 mM Tris-fosfat (pH 7,8), 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocykloheksan-N,N,N',N'-tetraeddikstre, 10 % glyserol, 1 % Triton X-100). Lysatene gjøres klare ved lavhastighetssentrifugering, og proteinene kvantiteres ved Bradfordmetoden for å normalisere prøvene.

50 µl luciferasereagens (Promega) settes til alikvoter av de klarede lysater.

Når det gjelder GFP, blir ekspresjonen i de transfekterte celler direkte fulgt ved observasjon under et mikroskop i UV-lys.

Ekspresjonen av de ikke-strukturelle proteiner detekteres ved immunofluorescens fra dagen etter transfeksjon og fremover. På den annen side respektivt for tiden etter transfeksjon ble verken luciferaseaktivitet eller GFP-fluorescens detektert.

Resultatene er gitt i tabell III nedenfor.

Tabell III

Plasmidkonstrukt	Ekspresjon av ikke-strukturelle proteiner	GFP ekspresjon	Luciferaseekspre-sjon
p-nsp-GFP	+++	-	
p-nsp-LUC	+++		-

Disse resultater antyder at den virale RNA ble transkribert, men at ingen ekspresjon av GFP- eller luciferaserapportørgenene som ble plassert under kontrollen av den SDV 26 subgenomiske promoter, ble observert.

Dette gjør det mulig å anta at det replikative, virale kompleks ikke er funksjonelt på grunn av det faktum at 5'-enden ikke strikt er identisk med den til SDV-genomet.

Anvendelse av et ribozym som spacer:

En hammerhoderibozymsekvens (HH-sekvens) ble fusert til det første nukleotid av 5'-enden av SDV cDNA-genomet på følgende måte: et *HindIII*-fragment av p-nSP inneholdende de første to Kb av SDV cDNA ble fjernet og subklonet inn i et plasmid pUC19 for å gi konstruktet pUC-SDV *HindIII*. Et *BamHI*/*NaeI*-fragment inneholdende 5'-enden av SDV-genomet ble fjernet fra dette konstrukt og ble erstattet med et syntetisk DNA-fragment generert ved hybridisering av de to partielt komplementære oligonukleotider på 79 og 80 nukleotider omfattende sekvensen av hammerhoderibozymet fusert til 5'-enden av SDV-genomet og fylling ved bruk av T4 DNA-polymerase Klenowfragmentet. Sekvensen for disse oligonukleotider (5'RIBO og 3'RIBO) er gitt i tabell I.

Sekvensen for hammerhoderibozymet er representert i figur 3A; *BamHI*- og *NaeI*-setene og T7-promoterer er understreket. Ribozym spaltingssetet og starten for SDV-genomet er antydnet ved piler.

Etter digestering med de egnede restriksjonsenzymmer ble det syntetiske DNA-fragment innskutt i plasmidet pUC-SDV *HindIII* for å gi konstruktet pUC-HH-SDV *HindIII*. Det modifiserte *HindIII*-fragment ble gjenvunnet fra dette konstrukt og gjeninnført i plasmidet p-nSP for å gi konstruktet pHH-nSP.

Det resulterende konstrukt pHH-nSP ble så linearisert med *XbaI* og modifisert på samme måte som når det gjelder p-nSP: innføring nedstrøms området som koder de ikke-strukturelle proteiner, av en sekvens som koder GFP eller luciferase (LUC), kantet av *BspI*- og *EcoRV*-setene og foregått av enden av skjøtområdet og fulgt av den 3'-ikke-translaterte ende av SDV, fusert til en poly (A)-hale,

korreksjon av det kunstige *XbaI*-sete. Sluttkonstruktene kalles pHH-nsP-GFP og pHH-nsP-LUC. Trinnene for å oppnå disse konstrukter er gitt i figur 3B.

Funksjonaliteten for disse konstrukter ble evakuert på samme måte som for konstruktene p-nsP-GFP og p-nsP-LUC.

5 Resultatene er vist i figur 4.

En signifikant luciferaseaktivitet detekteres fra og med 2 dager etter infeksjon og øker opp til 9 dager etter transfeksjon (figur 4A). GFP-ekspresjon vises 4 dager etter transfeksjon og er optimal, som for luciferase, etter 9 dager (figur 4B).

10 Disse resultater antyder at SDV-replikasekomplekset (nsP1, nsP2, nsP3 og nsP4) som uttrykkes fra pHH-nsP-LUC- eller -GFP-vektorene, er biologisk aktive og er i stand til replikering og transkribering av en subgenomisk RNA inneholdende rapportørgenene. Disse data viser også at spaltingen av 5'-enden av SDV-genomet effektivt ble gjennomført av hammerhoderibozymet.

Eksempel 3: Konstruksjon av en infeksjøs, rekombinant cDNA av SDV

En infeksjøs SDV cDNA-klon ble konstruert på følgende måte:

15 Området som koder de strukturelle proteiner av SDV, ble innskutt mellom *BlnI*- og *EcoRV*-setene av pHH-nsP-LUC som erstatning for sekvensen som koder luciferase, for å gi konstruktet pHH-SDV.

20 Dette konstrukt ble også modifisert ved innskyting av en T7-terminator (T7t): pHH-SDV-vektoren ble linearisert ved digestering med *NotI*-restriksjonsenzymet og stumpendet ligert med et *BlnI/NheI*-fragment av vektoren pET-14b (Novagen) inneholdende en T7-terminator (før ligering ble endene av de to fragmenter fylt ved bruk av T4 DNA polymerase Klenowfragmentet). Det resulterende konstrukt kalles pHH-SDV-T7t. Trinnene for å oppnå dette konstrukt er vist skjematisk i figur 5.

25 Dette konstrukt ble benyttet for å transfektere BF-2-celler som var smittet med den rekombinante vaksinevirus vTF7-3 som uttrykker T7 RNA-polymerasen (FUERST et al., 1986, nevnt ovenfor). BF-2-celler (rundt $1,2 \times 10^6$ celler/brønn) dyrkes i 12-brønners plater og smittes med vTF7-3 (infeksjonsmultiplisitet = 5). Etter 1 times adsorpsjon ved 37 °C vaskes cellene to ganger og transfekteres med 1,6 µg pSDV ved bruk av Lipofectamine 2000-reagensen i henhold til produsentens instruksjoner (Invitrogen). Cellene inkuberes i 7 timer ved 37 °C og vaskes med MEM-medium før overføring til 10 °C og inkuberes ved denne temperatur i 7 eller 10 dager. I visse forsøk gjennomføres 30 transfeksjoner i henhold til den samme protokoll, men uten forutgående infeksjon av cellene med vTF7-3.

7 dager og 10 dager etter transfeksjon fikseres cellene med en alkohol:acetone 1:1-blanding ved 20 °C i 15 minutter og inkuberes med et assortiment av monoklonale antistoffer rettet mot strukturelle

eller ikke-strukturelle proteiner av SDV idet antistoffene fortynnes til 1:1 000 i PBS-Tween. Etter inkubering i 45 minutter ved omgivelsestemperatur vaskes cellene og inkuberes med et anti-museimmunoglobulinantistoff (Biosys, Frankrike). Etter vasking undersøkes cellene med et mikroskop under UV-lys.

5 Parallelt blir supernatantene gjenvunnet, gjort klare ved sentrifugering ved 10000 x g i en mikrosentrifuge og benyttet for å smitte friske BF-2 celler, dyrket ved 10 °C som et monosjikt i 24-brønners plater. Cellene som smittes på denne måte, analyseres ved immunofluorescens som beskrevet ovenfor.

10 Resultatene som observeres 7 dager etter transfeksjon er vist i figur 6A: noen små loki opptrer; disse er større 10 dager etter infeksjon, noe som muligens reflekterer en celle-mot-celle-infeksjon ved rekombinant SDV.

15 Den rekombinante SDV har et *BlnI*-restriksjonssete som er fraværende fra villtypeviruset. For å verifisere at viruset som fremstilles av de smittede celler virkelig er den rekombinante SDV, blir RNA'et ekstrahert fra cellene som er smittet med den rekombinante SDV etter den første passasje, og benyttet som et templat for å gjennomføre en RT-PCR ved bruk av primerne NsP4-F og CapR som kanter *BlnI*-setet. Posisjonen for disse primere er antydnet i figur 6C. Det gjennomføres også en RT-PCR med de samme primere ved bruk av RNA som er ekstrahert fra celler som er smittet med villtypeviruset.

20 Forsterkningsproduktene digesteres med *BlnI*, og deres restriksjonsprofiler sammenliknes. Resultatene er vist i figur 6B. I fravær av *BlnI* (-*BlnI*) observeres et fragment på 1326 nukleotider med den rekombinante SDV som med villtypeviruset. Etter digestering med *BlnI* (+*BlnI*) forblir dette fragment intakt når det gjelder villtypeviruset og gir et fragment på 990 nukleotider og et fragment på 336 nukleotider når det gjelder den rekombinante SDV.

Eksempel 4: In vivo infeksjon med den rekombinante SDV

25 For å verifisere den infeksjøsese evne hos den rekombinante SDV, ble 50 friske unge regnbueørreter (*Oncorhynchus mykiss*) smittet ved nedsenking i 2 timer i et akvarium fylt med vann ved 10 °C og inneholdende 5×10^4 PFU/ml villtype SDV eller rekombinant SDV, oppnådd fra smittede BF-2-celler. Akvariet fylles så til 30 liter med friskt vann. Fisk som benyttes som kontroll behandles under de samme betingelser med kulturmedium i stedet for den virale suspensjon.

30 3 uker etter infeksjon ble noen fisker avlivet, og homogenater av organer av hver fisk ble benyttet for å smitte BF-2-celler. Analyse av disse celler ved immunofluorescens som beskrevet i eksempel 3 ovenfor, viser nærværet av virus i cellene smittet med organhomogenatene fra fisk som var smittet med villtype SDV eller med rekombinant SDV (resultater er ikke vist).

All den avlivede fisk var positiv på SDV, og den virale titer var rundt 10^7 PFU/ml for villtype SDV som for den rekombinante SDV.

Eksempel 5: Konstruksjon av en infeksjøs rekombinant SDV som uttrykker et heterologt gen

5 For å produsere et infeksjøs, rekombinant virus som uttrykker GFP, blir den infeksjøse cDNA pHH-SDV-T7t modifisert på to forskjellige måter for å skyte inn en ytterligere ekspresjonskassetten som uttrykker GFP.

1) Konstruksjon av den infeksjøse cDNA pHH-SDV-GFPfirst

pHH-nsP-GFP konstruktet benyttes som templat for å generere to separate PCR forsterkningsprodukter: "GFP PCR"-produktet oppnådd ved å anvende 5'-GFP- og 3'-GFP-primere (tabell 1); den 10 "subgenomiske SDV PCR" oppnås ved bruk av 5'nsP4(77-6-7750)- og 3'Jun-primere (tabell 1). Fordi den eksakte lokasjon og den minimale størrelse for den SDV-subgenomiske promoter ennå ikke er bestemt, ble det benyttet et fragment på rundt 100 nukleotider inneholdende enden av sekvensen av nsP4 og skjøtområdet. Den SDV-subgenomiske promoter blir så ligert ved PCR i en posisjon 3' for sekvensen som koder GFP ved blanding av de to produkter som stammer fra den 15 første forsterkning og bruk av 5'GFP- og 3'Jun-primere.

Det resulterende forsterkningsprodukt (GFP-SDVPro) digesteres med BlnI og settes inn i pHH-SDV-T7t-konstruktet, digestert på forhånd med *BlnI* for å oppnå den infeksjøse cDNA pHH-SDV-GFPfirst.

2) Konstruksjon av den infeksjøse cDNA pHH-SDV-GFPsecond

20 I dette konstrukt er GFP ekspresjonskassetten innskutt nedstrøms de strukturelle gener.

To PCR forsterkningsprodukter genereres:

- den SDV subgenomiske promoter fusert til GFP (produkt PCR1) ved bruk av 5'ProGFP og 3'ProGFP (tabell 1) som primere og pHH-nsP-GFP-konstruktet som matriks;
- det 3'ikke-translaterte området av SDV fusert til en poly(A)-hale og til T7-promoter (produkt PCR2), ved bruk av 3'UTR og T7t (tabell 1) som primere og pHHSDV-T7t-konstruktet 25 som templat.

PCR1- og PCR2-produktene settes sammen ved PCR ved bruk av 5'ProGFP- og T7t-primere. PCR-forsterkningsproduktet digesteres med *EcoRV* og *NotI* og skytes inn i pHH-SDV-konstruktet som digesteres med de samme enzymer for derved å oppnå den infeksjøse cDNA pHH-SDV- 30 GFPsecond.

Disse to konstrukter er vist skjematisk i figur 7A.

Disse konstrukter benyttes for å transfektere BF-2-celler som er smittet med vTF7, og GFP-ekspresjonen følges daglig. Resultatene er vist i figur 7B.

GFP-ekspresjonen er detekterbar fra og med 7 dager etter transfeksjon for de to pHH-SDV-GFP-konstrukter. Imidlertid observeres en mer intens ekspresjon av GFP når GFP-genet er lokalisert nedstrøms de strukturelle proteingener i genomet.

5 Under kloningen av GFP-genet i pSDV for å oppnå pHH-SDV-GFP_{first}-konstruktet, ble et plasmid (pHH-SDV-GFP₃) som var antatt å inneholde 3 GFP-kassetter, valgt.

Dette plasmid er vist skjematisk i figur 8A.

En RT-PCR ved bruk av nsP4-F- og GFP-R-primere (tabell 1) gjorde det mulig å bekrefte at effektivt 3 GFP-kassetter var til stede i pHHSDV-GFP₃-plasmidet.

10 Resultatene av denne RT-PCR er vist i figur 8B. Sammen representerer disse tre GFP-kassetter et DNA-fragment på 2,7 kb.

Dette konstrukt ble transfektert inn i BF-2-celler som var smittet med vTF7-3, og opptreden av loki av smittede celler etter 9 dager bekreftet funksjonaliteten for dette konstrukt.

Disse resultater viser at SDV kan inneholde en heterolog nukleinsyre som er mer enn 20 % lenger enn villtypevirusgenomet.

Sekvenslister

[0096]

5 <110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE LEBERRE, Monique
MORIETTE, Coralie BREMONT, Michel

<120> cDNA-konstrukt av salmonidae a-virus

<130> MJP/mad-F539/127-WO

10 <150> FR 05 06275
<151> 2005-06-21

<160>24

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211 > 42
20 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Amorce PCR

25 <400> 1
ccgaattcgt taaatccaaa agcatacata tatcaatgat gc 42

<210> 2
30 <211 > 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
35 <223> Amorce PCR

<400> 2
cccggggcgg cccaaggtc gagaactgag ttg 33

40 <210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

45 <220>
<223> Amorce PCR

<400> 3
50 cccggggagg agtgaccgac tactgcgtga agaag 35

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

55 <220>
<223> Amorce PCR

	<400> 4 ggctagagt atgatgcaga aaatattaag g	31
5	<210> 5 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Amorce PCR	
	<400> 5 cctctagacc aaccatgttt cccatgcaat tcacc	35
15	<210> 6 <211>42 <212> DNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Amorce PCR	
25	<400> 6 ccgcggccgc attgaaaatt ttaaaaacca atagatgact ca	42
30	<210>7 <211>79 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> Amorce PCR	
35	<400> 7 ggatcctgga ttatcctga tgagtcctg aggacgaaac tataggaaag gaattcctat	60
	agtcgataaa tccaaaagc	79
40	<210>8 <211>80 <212> DNA <213> Artificial	
45	<220> <223> Amorce PCR	
	<400> 8 gccggcggaa gggtagctg tgagatttg catcattgat atatgtatgc tttggattt	60
50	atcgactata ggaattcctt	80
55	<210>9 <211>25 <212> DNA <213> Artificial	

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 9
 5 cctcgtcagc gggaccata atgcc 25

<210>10
 <211>30
 <212> DNA
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 10
 15 ccgctgagcg gttggtgag agtatgatgc 30

<210> 11
 <211> 32
 20 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 11
 25 ccaaccgctg agcatggtga gcaagggcga gg 32

<210> 12
 <211> 47
 30 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 12
 35 gtggctaacg gcaggtgatt cacgcttaag ctcgagatct gagtccg 47

<210> 13
 <211 > 45
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 13
 45 gcgtgaatca cctgccgta gccacaatgg cgatggccac gctcg 45

<210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Amorce PCR

	<400> 14	
	ccatgctgag cggttggtg agagtatgat gc	32
5	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> Amorce PCR	
	<400> 15	
	ggcggcttc tgttactoga cacgg	25'
15	<210> 16	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Amorce PCR	
	<400> 16	
	atcgatgaac gatatcggcc gccgctacac gctatggcg	39
25	<210> 17	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Amorce PCR	
	<400> 17	
	ccggaatgct agcttaagct cgagatctga gtccg	35
35	<210> 18	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Amorce PCR	
	<400> 18	
	cgagcttaag ctagcattcc ggtatacaaa tcgc	34
45	<210> 19	
	<211>38	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Amorce PCR	
	<400> 19	
	ggctaggtcg gcggccgcaa aaaaccctc aagaccg	38
55		

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Amorçe PCR
 <400> 20
 10 ccgccgagtc gctccagttg gcg 23
 <210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Amorçe PCR
 20 <400> 21
 cgggttctcc aggacgtctc tcaag 25
 <210>22
 <211>28
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Amorçe PCR
 30 <400> 22
 ggcggcggca tggtcgttg acgaccgg 28
 <210> 23
 35 <211>28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Amorçe PCR
 <400> 23
 ccttcagcat agtcatggcc ttcttgg 28
 45 <210>24
 <211>25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Amorçe PCR
 <400> 24
 ttaagctcga gatctgagtc cggac 25

P a t e n t k r a v

1. Rekombinant DNA avledet fra genomet av et Salmonidae α -virus og omfattende:
- en transkripsjonspromoter; og
 - nedstrøms promoteren og under transkripsjonell kontroll av denne;
 - 5 - en spacersekvens på minst 5 nukleotider;
 - cDNA'et av det genomiske RNA av et Salmonidae α -virus, k a r a k t e r i - s e r t v e d at spacersekvensen er definert ved den generelle formel (I) nedenfor:



10 der

A, T, G og C har deres vanlige betydning;

H betyr C, T eller A;

Y betyr A eller G;

R betyr C eller T;

15 N betyr A, T, G eller C;

X_1 betyr et oligonukleotid på minst 3 nukleotider, fortrinnsvis fra 6 til 10 nukleotider, med sekvens komplementær til den til 5'-enden av genomet av nevnte α -virus;

X_2 betyr et oligonukleotid på minst 3 nukleotider og fortrinnsvis fra 3 til 5 nukleotider, med en hvilken som helst sekvens;

20 B_2 betyr et oligonukleotid på 4 eller 5 nukleotider med en hvilken som helst sekvens;

X'_2 betyr et oligonukleotid som er komplementær til X_2 ;

X_3 betyr et oligonukleotid på minst 2 nukleotider, fortrinnsvis 6 til 10 nukleotider, med en hvilken som helst sekvens;

25 B_3 betyr et oligonukleotid på 4 til 5 nukleotider med en hvilken som helst sekvens; og

X'_3 betyr et oligonukleotid som er komplementært til X_3 .

2. Rekombinant DNA ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at Salmonidae α -virus cDNA-innskuddet inneholder en eller flere ekspresjonskassetter der hver av
- 30 hvilke inneholder: en kopi av nevnte subgenomiske promoter og nedstrøms den subgenomiske promoter og under transkripsjonell kontroll av denne en heterolog sekvens som det er ønskelig å uttrykke, eller et kloningssete for innføringen av denne sekvens.

3. Fremgangsmåte for fremstilling av et Salmonidae α -virus RNA-replikon, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter *in vitro*-innføring i en vertscelle av et rekombinant DNA ifølge krav 1, og dyrkningen av vertscellen.
- 35

4. Svekket Salmonidae α -virus RNA-replikon, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er oppnådd ved hjelp av en metode ifølge krav 3.

5. Fremgangsmåte for fremstilling av et rekombinant Salmonidae α -virus, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter *in vitro*-innføringen av et rekombinant DNA ifølge et hvilket som helst av kravene 1 og 2, eller en RNA-replikon ifølge krav 4, i en vertscelle hvori alle de strukturelle proteiner for nevnte α -virus som kreves for dens innkapsling, uttrykkes, og dyrkingen av vertscellen.
5
6. Fremgangsmåte ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at all genetisk informasjon for ekspresjonen av de strukturelle proteiner bæres av nevnte rekombinante DNA eller nevnte RNA-replikon.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at all eller en del av den genetiske informasjon for ekspresjonen av nevnte strukturelle proteiner er tilveiebrakt i *trans* av vertscellen.
10
8. Svekket rekombinant Salmonidae α -virus, k a r a k t e r i s e r t v e d at det kan oppnås ved hjelp av en metode ifølge et hvilket som helst av kravene 5 til 7.
9. Anvendelsen av et rekombinant DNA ifølge et hvilket som helst av kravene 1 og 2, av et svekket Salmonidae α -virus RNA-replikon ifølge krav 4 eller av et svekket rekombinant Salmonidae α -virus ifølge krav 8, for fremstilling av en vaksine.
15
10. Vaksine, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et svekket rekombinant Salmonidae α -virus ifølge krav 8.

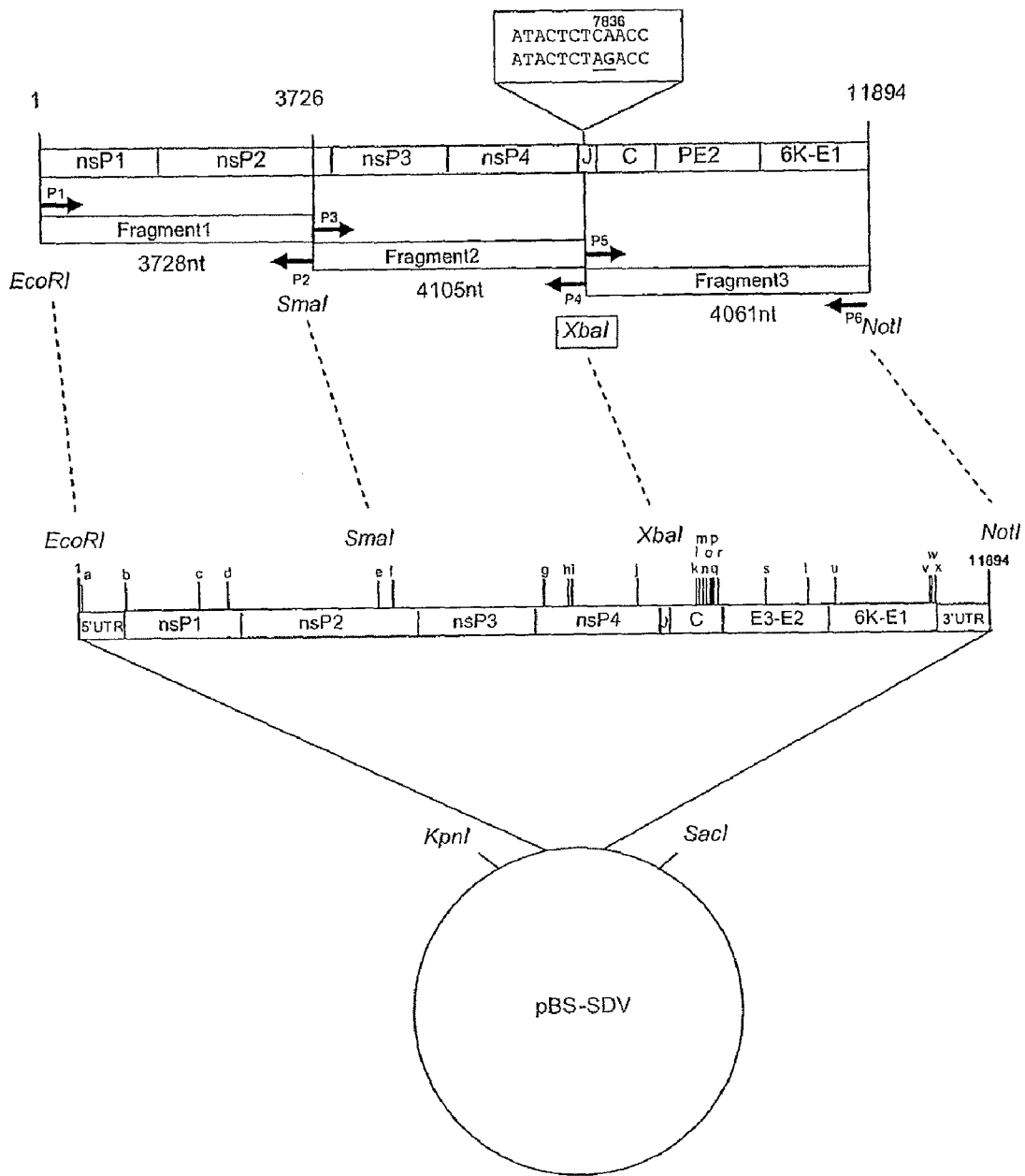


Fig. 1

2/10

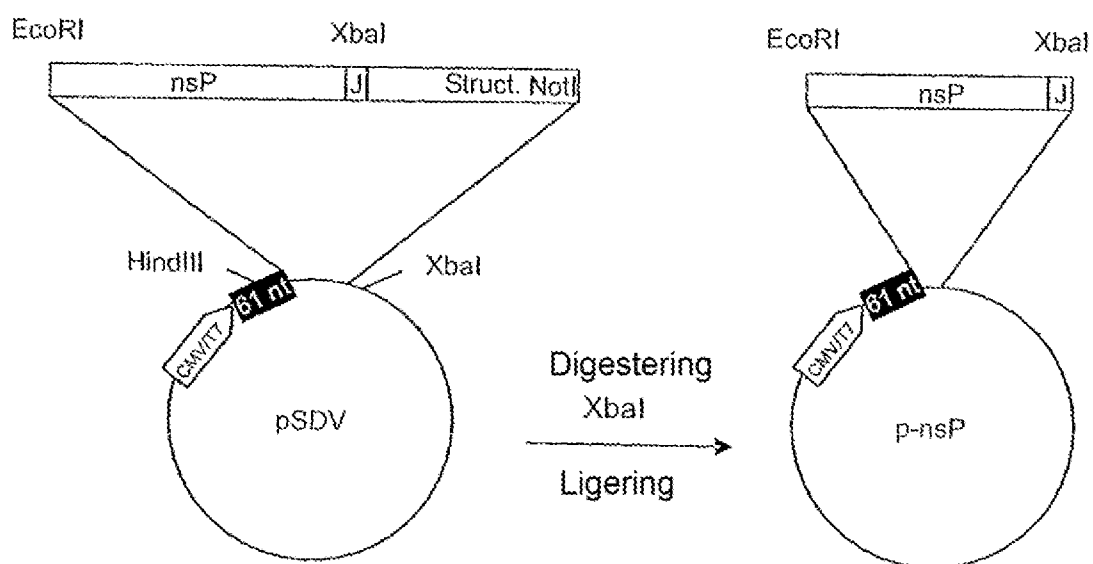


Fig. 2A

3/10

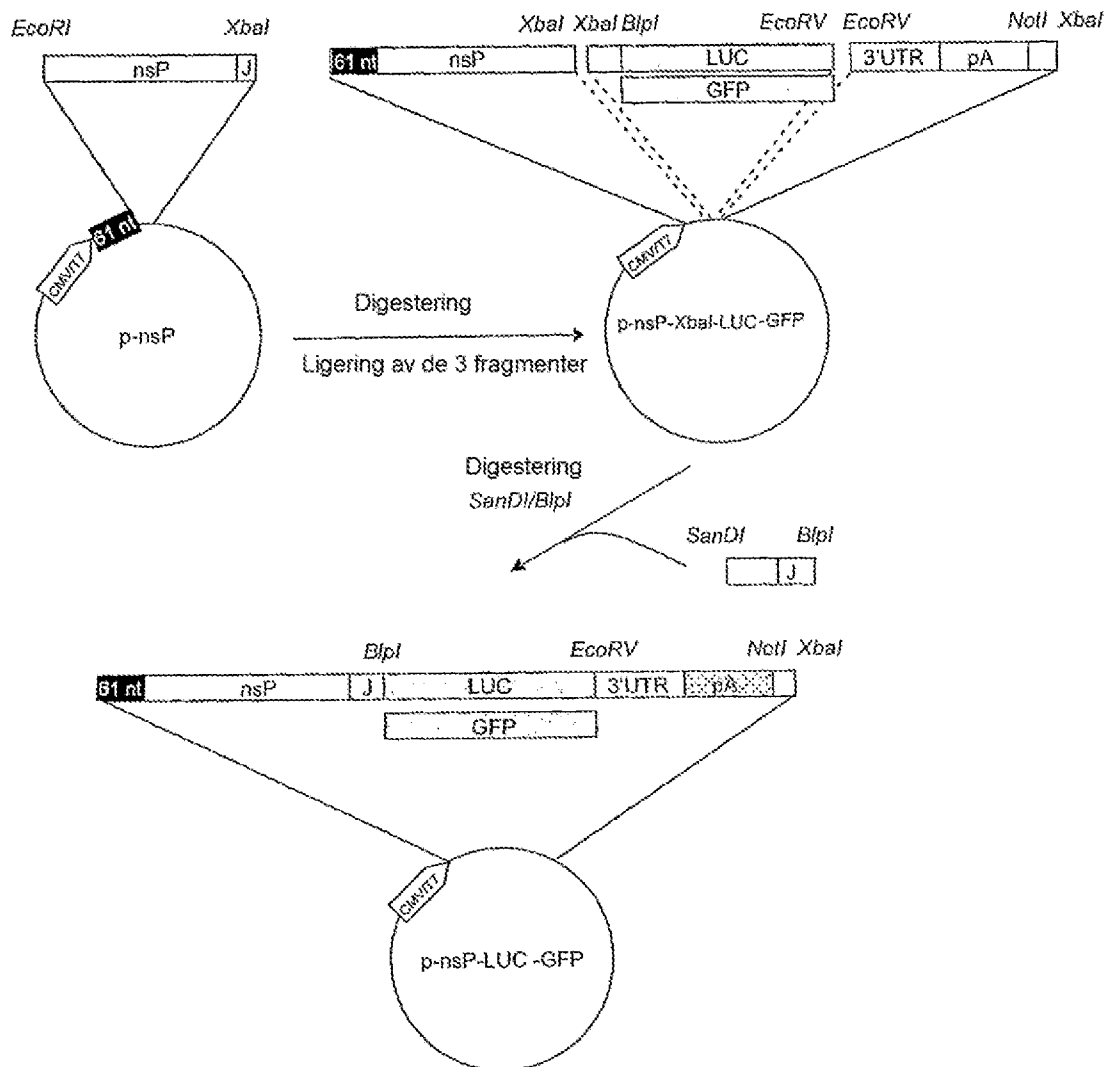


Fig. 2B

4/10

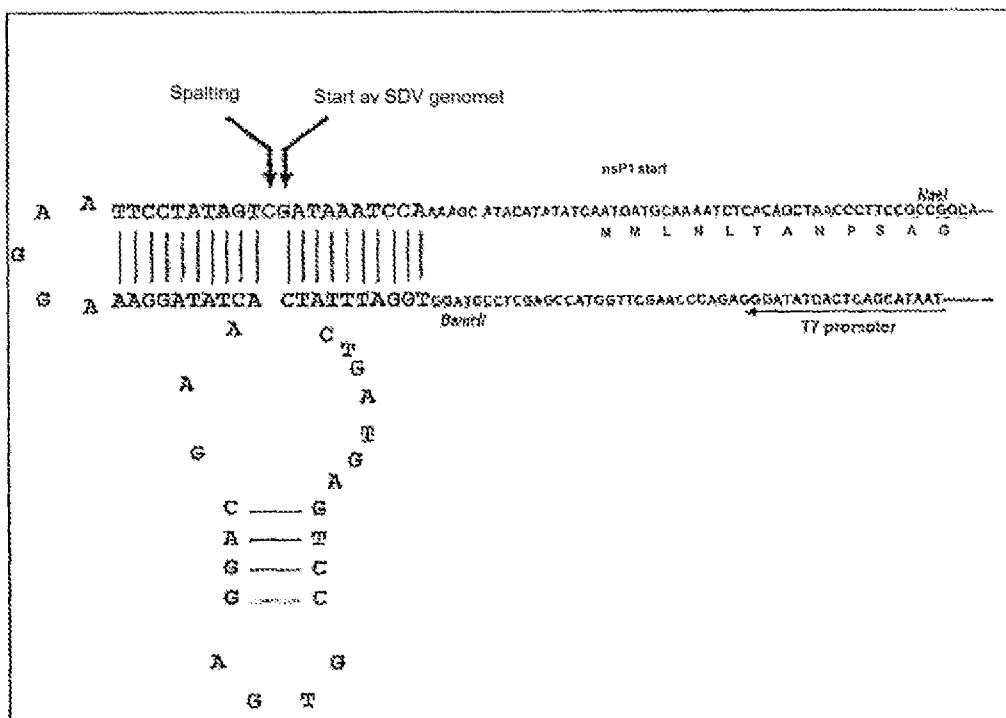


Fig. 3A

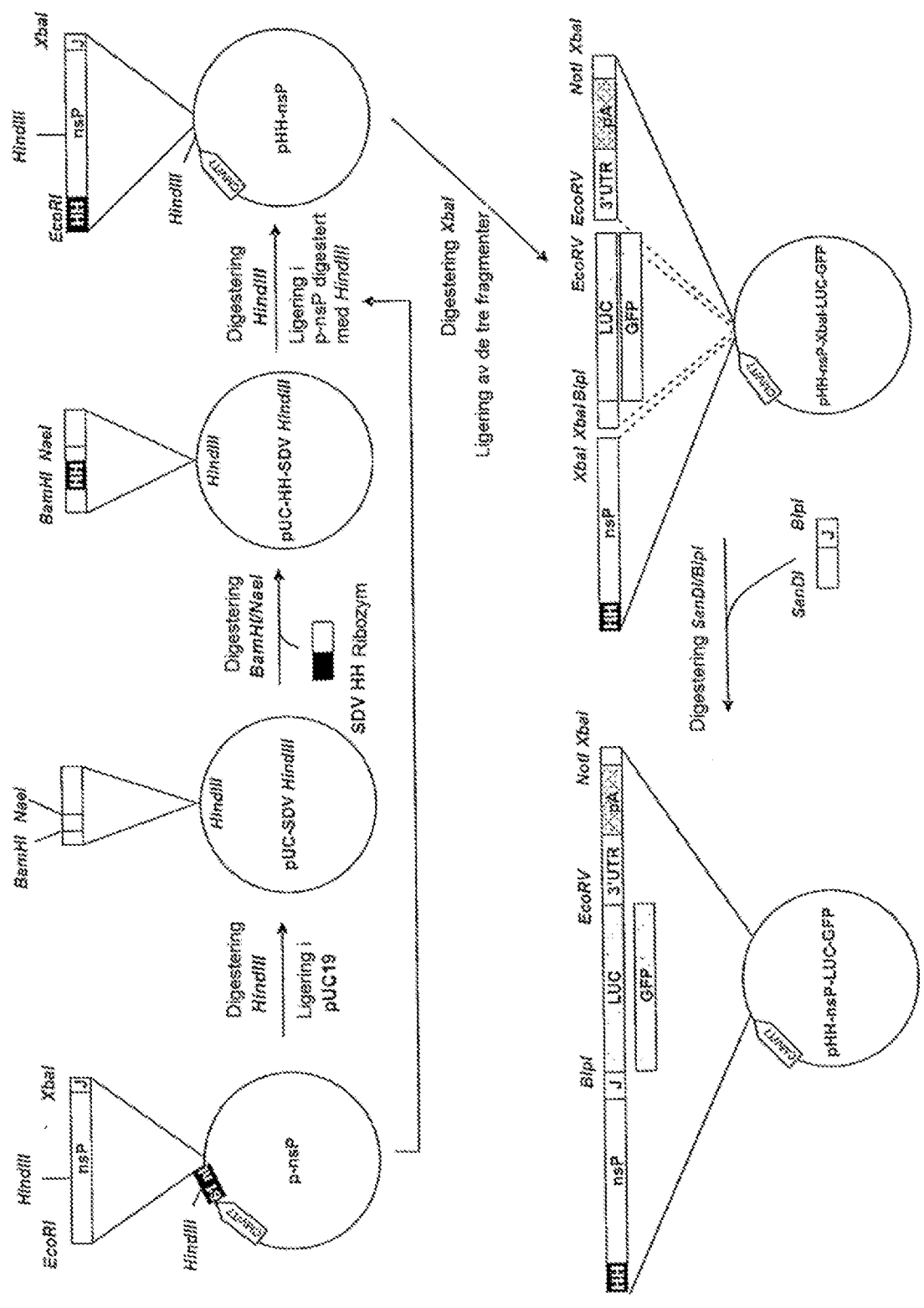


Fig. 3B

6/10

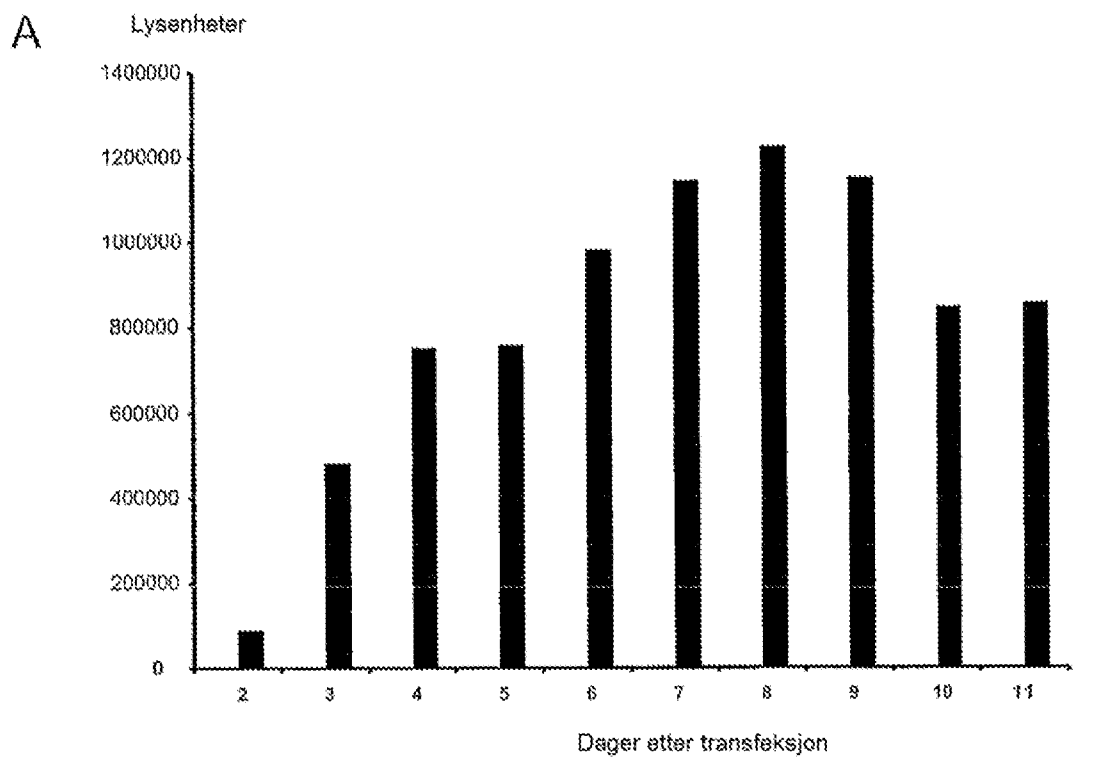
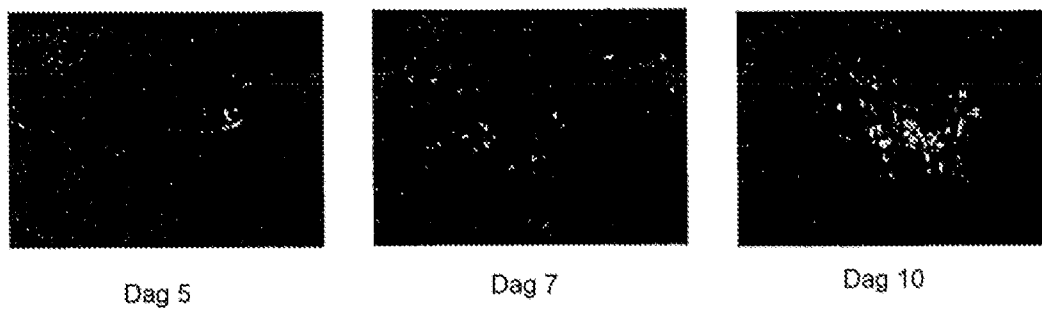
**B**

Fig. 4

7/10

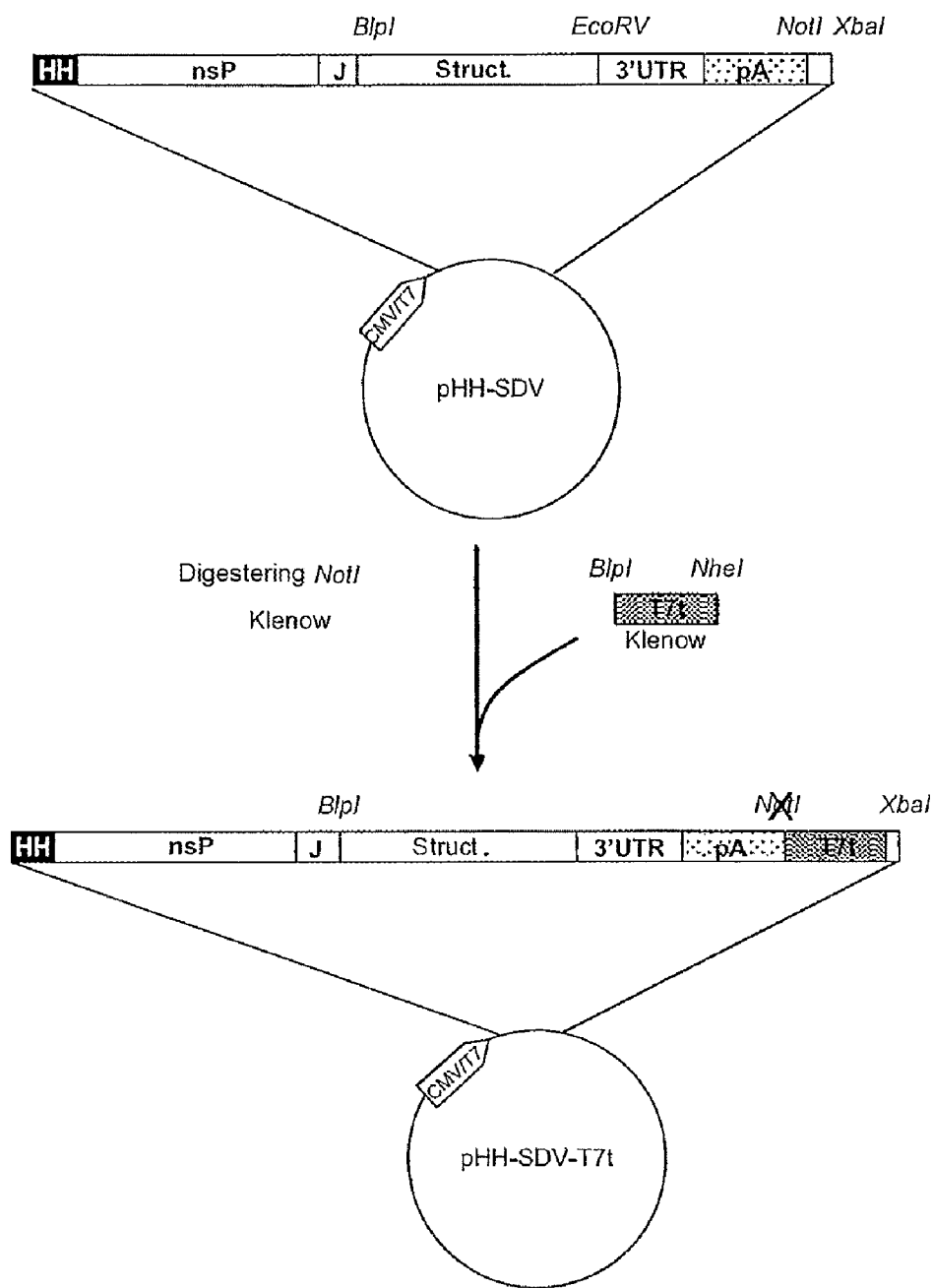


Fig. 5

9/10

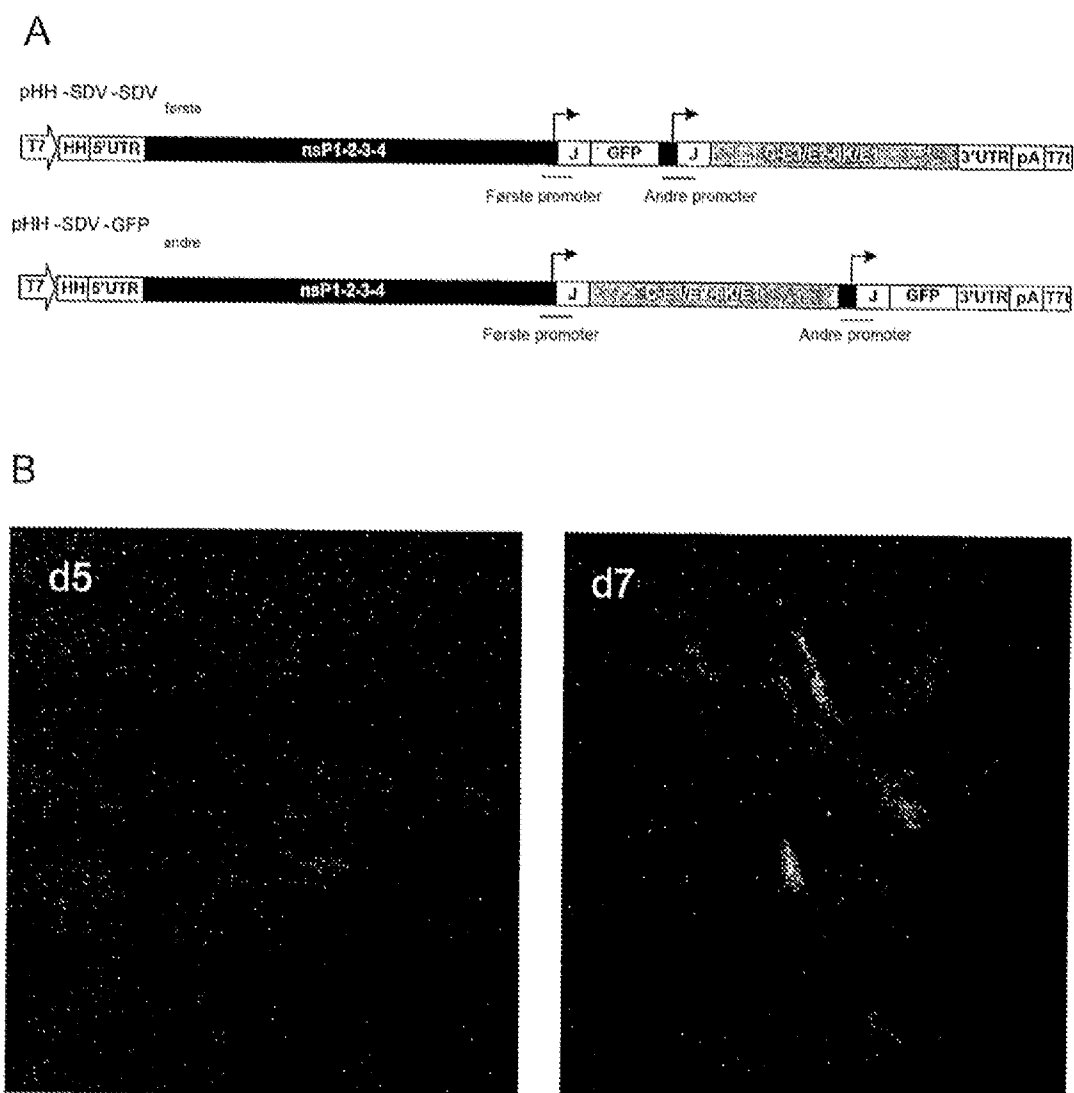


Fig. 7

10/10

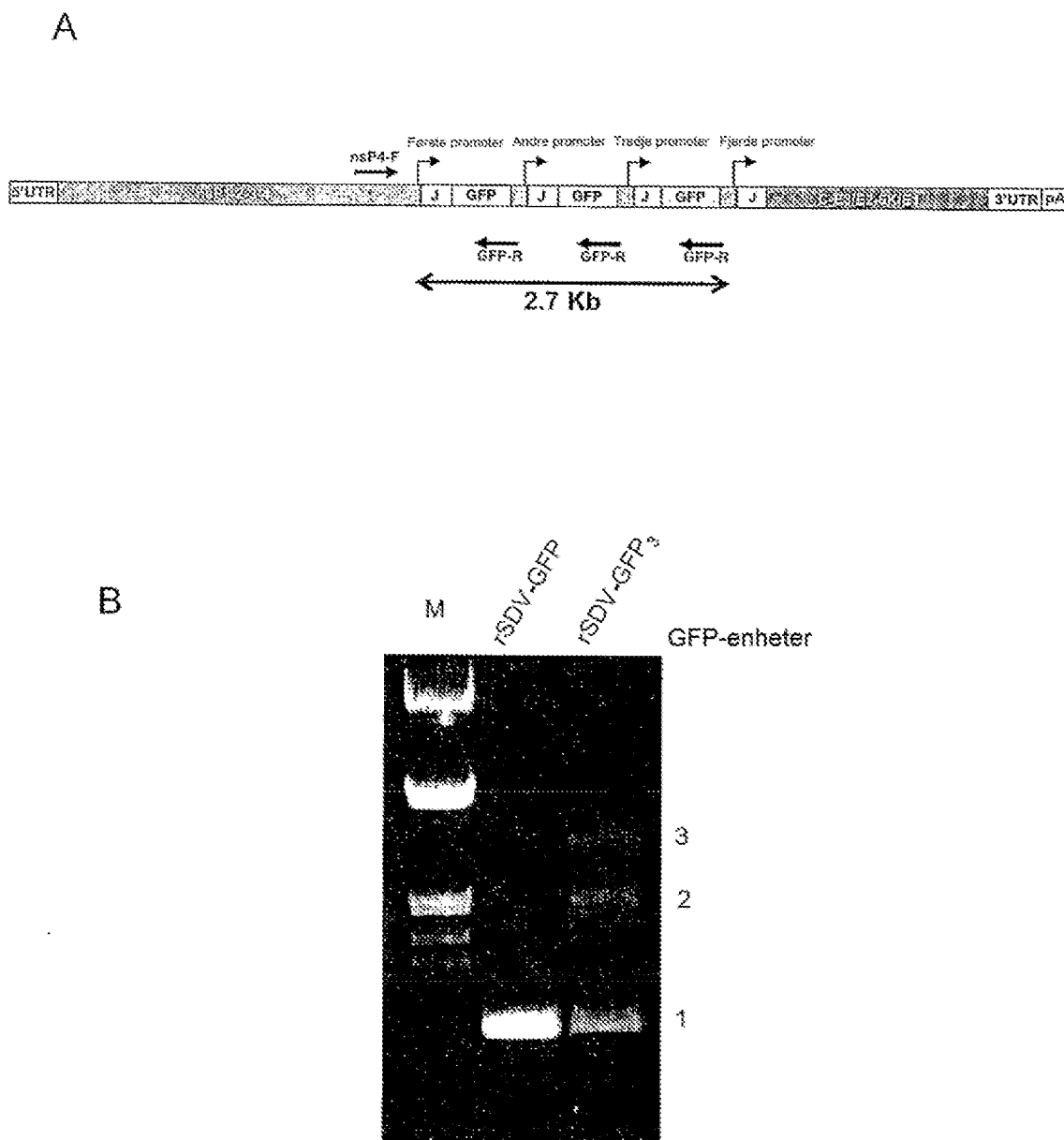


Fig. 8