

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1564-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29. 10. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.10.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/96203024**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 09. 99**
(Věstník č. 9/99)

(86) PCT číslo: **PCT/NL97/00593**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/18933**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/40
A 61 K 39/12
C 12 N 5/00

(71) Přihlášovatel:

STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG
ONDERZOEK, Wageningen, NL;

(72) Původce:

Meulenberg Johanna Jacoba Maria,
Amsterdam, NL;
Pol Johannes Maria Antonius, Lelystad, NL;
Bos-de Ruijter Judy Norma Aletta,
Almere-Buiten, NL;

(74) Zástupce:

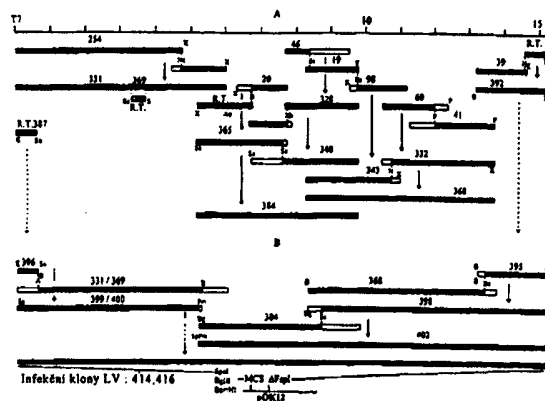
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob přípravy infekčního klonu, založeného na genomu +RNA viru, jej zahrnující rekombinantní nukleová kyselina, modifikovaný RNA virus, obsahující tuto kyselinu, a vakcína, obsahující tento modifikovaný RNA virus

(57) Anotace:

Způsob vytvoření infekčního klonu, založeného na genomu +RNA viru, který má genom alespoň okolo 15 kb. Způsob vytvoření infekčního klonu, založeného na genomu +RNA viru, kde tento způsob dále zahrnuje selekci infekčních klonů pomocí transfekce hostitelské buňky rekombinantní nukleovou kyselinou, kde hostitelská buňka je v podstatě necitlivá k infekci zmíněným virem, jakož i modifikované RNA viry a vakcíny.



Způsob přípravy infekčního klonu, založeného na genomu +RNA viru, jej zahrnující rekombinantní nukleová kyselina, modifikovaný RNA virus, obsahující tuto kyselinu, a vakcína, obsahující tento modifikovaný RNA virus. 4027

Oblast techniky

Vynález se týká oblasti RNA virů a infekčních klonů, získaných z RNA virů. Dále se týká vakcín a diagnostických testů, které se dají získat použitím a modifikací takovýchto infekčních klonů RNA virů.

Dosavadní stav techniky

Technologie rekombinantní DNA zahrnuje množství různých a velmi účinných technik molekulární biologie, jejichž předmětem je modifikování nukleových kyselin na úrovni DNA a které umožňují analyzování a modifikování genomů na molekulární úrovni. Takovéto manipulace se dají provádět zejména u virů, kvůli malé velikosti jejich genomu. Technologie rekombinantní DNA se však nedá rovnou aplikovat na neretrovirové RNA viry, protože tyto viry neprocházejí při své replikaci stadiem DNA. U takovýchto virů musí být před tím, než na jejich genom může být aplikována technologie rekombinantní DNA, za účelem vytvoření modifikovaného viru, vytvořeny infekční klony (například jako DNA kopie nebo jako in vitro transkribovaná RNA kopie nebo jako derivát jedné z těchto možností). Infekční klony mohou být získány pomocí vytvoření cDNA (zde použito v širším slova smyslu, zhrnujícím kopii DNA kopii RNA, a ne pouze užším slova smyslu, zhrnujícím DNA kopii mRNA) plné délky (genomové délky)

viru a pomocí následného zjišťování, který transkript, syntetizovaný in vivo v buňkách transfekovaných touto cDNA plné délky, je infekční. Infekční transkripty mohou být také získány pomocí in vitro transkripce in vitro ligovaných cDNA fragmentů částečné délky, které zahrnují celý virový genom. Ve všech případech nese RNA všechny modifikace, které byly zavedeny do cDNA, a může být použita pro další pasážování takto modifikovaných virů.

Infekční cDNA klony a infekční in vitro transkripty byly vytvořeny pro velké množství +RNA virů (přehled viz např. Boyer a Haenni, *Virology* 198, 415-426) s genomem do 12 kb nebo nepatrně větším. Zdá se, že velikost genomu Pestivirů je doposud největší velikostí genomu +RNA virů, ze kterého byly infekční klony připraveny (Moormann et al., *J. Vir.* 70 : 763-770).

Problémy spojené s délkou genomu nezahrnují pouze potíže se získáním a udržením dlouhých a stabilních cDNA klonů v bakterii, ale také potíže s infektivitou počátečního RNA transkriptu, jehož replikace v hostitelské buňce musí být provedena bez pomoci virových proteinů, které jsou normálně spojeny s virovou replikací. Pro dosažení úspěšné infekce musí virový transkript interagovat s virem-kódovanými proteiny, zejména s virovou replikázou, a se součástmi hostitelské buňky, jako např. translačním aparátem; struktura virového transkriptu musí tudíž napodobovat virionovou RNA co nejpřesněji. Další problémy mohou vznikat u těch +RNA virů, které se replikují pomocí subgenomových mRNA, transkribovaných z 3' strany genomu, a u těch +RNA virů, které během své replikace vytváří defektní interferující partikule, jako jsou nahé kapsidy či prázdné partikule, obsahující několik strukturních proteinů, ale pouze část genomu. Přítomnost neúplných virových RNA nebo např. matrixových či nukleokapsidových



proteinů, interagujících nebo interferujících s virovou RNA, která má být transkribována, a s RNA, která je intermediátem replikace, a narušujících jejich strukturu, zruší syntézu RNA plné délky a tedy vytvoření infekčního viru, který obsahuje RNA genomové délky.

Lelystad virus (LV), také zvaný PRRSV (porcine reproductive respiratory syndrome virus, velikost genomu 15,2 kb), patří do čeledi Arteriviridae, do které patří také EAV (equine arteritis virus, velikost genomu 12,7 kb), LDV (lactate dehydrogenase-elevating virus, velikost genomu minimálně 14,2 kb) a SHFV (simian hemorrhagic fever virus, velikost genomu přibližně 15 kb). (Meulenberg et al., 1993a; Plagemann a Moennig, 1993).

Nedávno se Mezinárodní výbor pro taxonomii virů rozhodl zařadit tuto čeleď od nového řádu Nidovirales, společně s Coronaviridae (velikost genomu 20 až 30 kb) a toroviridae (velikost genomu 26 až 28 kb). Řád Nidovirales představuje obalené RNA viry, které obsahují +RNA genom a které během své replikace syntetizují sadu subgenomových RNA od 3' konce. Subgenomové RNA koronavirů a arterivirů obsahují vedoucí sekvenci, která je odvozena od 5' konce virového genomu (Spaan et al., 1988). Subgenomové RNA torovirů postrádají vedoucí sekvence. (Snijder a Horzinek, 1993). Zatímco ORF 1a a 1b, kódující RNA dependentní RNA polymerázu, jsou exprimovány z genomové RNA, menší ORF na 3' konci genomu Nidovirales, kódující strukturní proteiny, jsou exprimovány ze subgenomových mRNA.

PRRSV (Lelystad virus) byl nejdříve izolován v 1991 Wesvoortem et al. (1991) a ukázalo se, že je příčinou nové nemoci, známé jako PRRSV (porcine reproductive respiratory syndrome virus). Hlavní příznaky této nemoci jsou problémy s dýcháním v prasat a potraty u prasnic. Ačkoliv největší rozšíření, nejdříve v USA v 1987 a v Evropě v 1991, byla

snížena, tento virus stále způsobuje ekonomické ztráty ve stádech v USA, Evropě a Asii. PRRSV roste přednostně v plicních alveolárních makrofázích (Wesvoort et al., 1991). Několik buněčných linií, jako je CL2621 a jiné buněčné linie, klonované z buněčné linie opičí ledviny MA-104 (Benfield et al., 1992; Collis et al., 1992; Kim et al., 1993), je k tomuto viru také citlivých. Některé známé PRRSV kmeny jsou známy pod přístupovými čísly CNCM I-1102, I-1140, I-1287, I-1388, ECACC V93070108 nebo ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR2429, VR 2474 a VR 2402. Genom PRRSV byl úplně nebo částečně osekvenován (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a; Murthaugh et al., 1995) a kóduje, kromě RNA dependentní RNA polymerázy (ORF 1a a 1b), šest strukturních proteinů, z nichž čtyři jsou obalové glykoproteiny, označené jako GP₂ (ORF2), GP₃ (ORF3), GP₄ (ORF4) a GP₅ (ORF5), neglykosylovaný membránový protein M (ORF6) a nukleokapsidový protein N (ORF7) (Meulenberg et al., 1995, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996). Imunologická charakterizace a nukleotidové sekvenování kmenů PRRSV z Evropy a USA odhalilo menší a antigenní rozdíly ve strukturních virových proteinech mezi kmeny PRRSV (Nelson et al., 1993; Wensvoort et al., 1992; Murtaugh et al., 1995).

Prasata mohou být infikovány PRRSV oronazální cestou. Virus je v plicích pohlcen alveolárními makrofágy a do 9 hodin je v těchto buňkách dokončena replikace PRRSV. PRRSV cestuje z plic do plicních lymfatických uzlin (do 12 hodin) a do periferních lymfatických uzlin, do kostní dřeně a sleziny (do 3 dnů). V těchto místech se pouze několik buněk barví pozitivně na virový antigen. Virus je přítomen v krvi po dobu alespoň 21 dní a často i mnohem déle. Po 7 dnech se v krvi nacházejí protilátky proti PRRSV. Společná přítomnost viru a

protilátek proti PRRSV u infikovaných prasat ukazuje, že virová infekce, ačkoliv na nízké úrovni, může přetrvávat po dlouhou dobu, navzdory přítomnosti protilátky. Během alespoň 7 týdnů je populace alveolárních buněk v plicích odlišná od normálních SPF plic.

PRRSV potřebuje k infekci prasat oronazální cestou svůj obal a normální imunitní reakce prasete tedy zahrnuje mezi jinými produkci neutralizačních protilátek, cílených proti jednomu nebo několika obalovým proteinům; takovéto protilátky mohou učinit virus neinfekčním. Je-li však již jednou virus v alveolárním makrofágu, může také produkovat nahé kapsidy, složené z RNA, enkapsidované M a/nebo N proteinem, někdy částečně obsahující nějaký z glykoproteinů. Intra- a extracelulární přítomnost těchto neúplných virových partikulí nebo (částečně) nahých kapsid může být prokázána elektronovou mikroskopií. Někdy mohou být nalezeny nahé kapsidy bez nukleové kyseliny. Nahé kapsidy jsou roznášeny po těle krevním oběhem a z krve jsou pohlcovány makrofágy ve slezině, lymfatických uzlinách a kostní dřeni. Tyto nahé ale infekční virové kapsidy nemohou být neutralizovány protilátkami, vytvořenými prasetem a tedy vysvětlují přetrvávání virové infekce v přítomnosti protilátek. Tímto způsobem rozšiřuje makrofágové potomstvo z infikovaných buněk kostní dřene virovou infekci do nových míst těla. Protože ne všechny makrofágy, pocházející z buněk kostní dřene, jsou infikovány, pouze malé množství makrofágů v periferních místech je infikováno a produkuje virus. V nepřítomnosti jiných virových proteinů mohou být pomocí např. infekce makrofágů chimerním pseudorabies-ORF7 vektorovým virem vytvářeny PRRSV kapsidy, složené pouze z ORF7 proteinů. PRV virus byl upraven tak, aby obsahoval ORF7 genetickou informaci z PRRSV. 18 hodin po infekci obsahovala cytoplazma infikovaných buněk velké

množství malých, prázdných, kulových struktur, s velikostí nukleokapsid PRRS viru.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález nyní poskytuje infekční klon, odvozený od viru s velikostí genomu, která daleko přesahuje maximální velikost genomu +RNA virů, u kterých byly doposud infekční klony získány. V příkladech provedení vynálezu je popsána příprava infekčního klonu, který je založen a odvozen od PRRSV s velikostí genomu 15,2 kb, ale takovéto klony mohou být nyní získány také pro LDV a SHFV, které také mají velikost genomu okolo 15 kb, a pro EAV, ačkoliv velikost jeho genomu je lehce menší, a pro viry s vyššími velikostmi genomu, jako např. Coronaviridae nebo Toroviridae.

Tento vynález také poskytuje způsob vytvoření infekčního klonu obejitím problémů spojených se syntézou řetězce virové RNA, které jsou spojeny s přítomností nekompletních virových RNA nebo např. matrixových nebo nukleokapsidových proteinů, interagujících nebo interferujících s virovým RNA transkriptem, který má být transkribován, a RNA, která je intermediátem replikace, a narušujících jejich strukturu, které ruší syntézu RNA řetězce plné délky a tedy vytvoření infekčního viru, který obsahuje RNA genomové délky. Tento vynález poskytuje způsob vytvoření infekčních klonů pomocí transfekce hostitelské buňky, která je v podstatě necitlivá k infekci virem divokého typu, rekombinantní nukleovou kyselinou, která je založena na genomu zmíněného viru, po níž následuje zachránění infekčního virového potomstva ze zmíněných hostitelských buněk pasážírováním nebo kultivací s buňkami, které jsou citlivé k tomuto viru. Buňky, které

v podstatě nejsou citlivé, mohou, ve srovnání s jinými buňkami, které jsou rutinně používány pro pomnožení studovaného viru, být pouze lehce citlivé nebo úplně necitlivé ke studovanému viru, ale mohou být plně citlivé k jiným virovým kmenům. Vynález poskytuje způsob vytvoření infekčních klonů pomocí transfekce hostitelských buněk, které nejsou citlivé k infekci virem divokého typu, čímž nedochází ke vzniku nahých kapsid nebo neúplných virových partikulí, obsahujících fragmenty RNA a matrixové či nuklokapsidové proteiny, které brání syntéze řetězce virové RNA. Infekční virus je zachráněn z takto transfekovaných hostitelských buněk pasážováním s hostitelskými buňkami, které jsou k tomuto viru citlivé. V příkladech provedení vynálezu je popsáno, jak je tímto způsobem získán infekční klon PRRSV, ale tento způsob se dá také aplikovat na jiné +RNA viry.

Předkládaný vynález nyní také poskytuje možnost vytvoření modifikovaného klonu další aplikací technologie rekombinantní DNA. Takovéto modifikace mohou být jednoduché nebo několikanásobné mutace, substituce, delece nebo inserce nebo jejich kombinace, kterých může být dosaženo pomocí jakékoliv v oboru známé metody technologie rekombinantní DNA. Předkládaný vynález tedy poskytuje modifikované RNA viry, které mohou být použity pro zkoumání RNA virů a pro přípravu vakcín.

Předkládaný vynález nyní také poskytuje infekční klony, například odvozené od Arteriviridae, jako je PRRSV, které mohou být použity jako jednoúčelové vakcíny proti nemoci, způsobené virem, na kterém je tento infekční klon založen. Například, infekční klon, založený na PRRSV, může být nyní použit pro studium virulenčních markerů nebo serologických markerů PRRSV. Známé serologické markery jsou například umístěny na kterémkoliv ze strukturních proteinů PRRSV,

kódovaných ORF2-7, ale mohou se také nacházet na proteinech, kódovaných ORF 1a a 1b. Virulenční markery jsou přítomny v ORF 1 a 1b, kódujících nestrukturní proteiny PRRSV, ale mohou se také nacházet na kterémkoliv z proteinů, kódovaných ORF2-7. Upravením genomu infekčního klonu s ohledem na tyto markery je možno získat PRRSV, který není nebo je mnohem méně virulentní než jeho rodičovský kmen, a/nebo který je upraven delecí nebo zavedením serologických markerů, za účelem umožnění serologické rozlišení mezi očkovanými prasaty a prasaty infikovanými virem divokého typu. Takovéto modifikace jsou například poskytnuty u infekčních klonů PRRSV, ve kterých je sekvence nukleové kyseliny, kódující ORF7 N protein, nahrazena ORF7 proteinem z ATCC VR2332 nebo LDV.

Překládaný vynález nyní také poskytuje infekční klony, například odvozené od Arteriviridae, jako např. PRRSV, které mohou být použity jako přenašecí systém nebo virová vektorová vakcína pro velkou řadu antigenů. V takovýchto klonech je inzerována heterologní sekvence nukleové kyseliny, která neodpovídá sekvenci studovaného viru. Takováto heterologní sekvence nukleové kyseliny může být například odvozena od sekvence, kódující jakýkoliv vybraný antigen. Tento antigen je protein nebo peptid, který může indukovat imunitu proti patogenu. Protože tento virus infikuje makrofágy a buňky makrofágové linie v kostní dřeni a roznáší antigen-obsahující virus skze své dceřiné buňky, tato vektorová virové vakcína infikuje ústřední buňky v imunitním systému a může prezentovat antigeny pro další zpracování. Tato vektorová virová vakcína infikuje antigen prezentující buňky, jako dendritické makrofágy nebo Kuppferovy buňky nebo jiné buňky imunitního systému a může to dělat jako (neúplně) obalená virová partikule nebo jako nahá kapsida. Protože infekce nahými kapsidami



nebo neúplnými virovými partikulami zajistí přetrvávající infekci, imunologický zesilovací efekt způsobí doživotní (kvůli průběžné stimulaci na nízké úrovni) imunitu proti patogenům, ze kterých byly antigeny vybrány. Po vložení informace pro epitopy jiných patogenních organismů nebo látek, můžeme tento virus použít jako nosič antigenu. Několik takovýchto vektorových vakcínových virů, nesoucích informaci pro cizí epitopy, může být smícháno a podáváno najednou. Toto umožní aktivní imunitu proti několika různým antigenům jednoho patogena, nebo aktivní imunitu proti několika různým patogenům.

Předkládaný vynález nyní také poskytuje infekční klony, například odvozené od Arteriviridae, jako je PRRSV, který může být použit jako dvouúčelové vakcíny. Například, infekční klon, založený na PRRSV, může být použit pro vytvoření vakcíny, která chrání proti PRRSV a proti jinému patogenu, jednoduše kombinací vývoje vektorové vakcíny s vývojem směřovaným k vývoji jednoúčelové vakcíny, směřované proti PRRSV. Konkrétní dvouúčelová vakcína, která by chránila proti nemoci dýchací soustavy u prasat, by mohla být vyvinuta inzercí antigenů, odvozených od kteréhokoliv z velké řady jiných patogenů dýchací soustavy, kteří jsou známi u prasat, do PRRS vakcíny.

Tento vynález také poskytuje vakcíny, ať už jednoúčelové, dvouúčelové nebo vektorové, které jsou bezpečné v tom smyslu, že se tyto vakcíny nemohou šířit do prostředí. Bezpečnost vakcín (nešíření se) může být zajištěna delecí informace pro ty virové proteiny, které jsou třeba pro tvorbu obalených, infekčních virů. Tento virus musí být množen v buněčné linii, která konstitutivně exprimuje tento protein. Virus, replikující se v této komplementární buněčné linii, má úplný obal a je schopen infekce makrofágu v praseti. Po jednom replikačním cyklu již potomstvo viru, kterému chybí informace pro obalový protein, není

schopno infekce jiných buněk jako obalený virus. Infekce makrofágů v těle je stále možná nahými kapsidami nebo neúplnými virovými partikulemi.

Tento vynález také poskytuje virové antigeny a proteiny, které mohou být sklizeny z buněčných kultur, které byly infikovány upravenými RNA viry podle tohoto vynálezu. Takovéto antigeny mohou být použity v diagnostických pokusech, jako je ELISA nebo jiné typy diagnostických pokusů, známých v oboru. Takovéto pokusy mohou být použity jako samostatné testy pro primární diagnózy nebo jako doprovodné testy, aplikované u zvířecích populací, které byly očkovány rozlišovací nebo markerovou vakcínou, založenou na modifikovaném RNA viru podle tohoto vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1. Vytvoření cDNA klonu LV genomové délky. Horní část (A) ukazuje fúzi cDNA klonů, které byly dříve sekvenovány (Meulenberg et al., 1993a) v pGEM-4Z. pABV čísla klonů a restrikční místa, která byla použita, jsou uvedena. Černé obdélníky představují ty části cDNA klonů, které jsou fúzovány dalším klonovacím kroku. Světle šedé obdélníky, označené s R. T., jsou cDNA klony, vytvořené pomocí RT-PCR a tmavě šedý obdélník představuje nový cDNA klon, vytvořený pomocí PCR. Dolní část (B) ukazuje spojení větších částí cDNA klonů pABV331/369, pABV384 a pABV368 s pABV396 klonem 5' konce, který obsahuje promotor pro T7 RNA polymerázu, a pABV395 klonem 3' konce, který obsahuje poly(A) konec, v nízkokopiovém vektoru pOK12. Restrikční místa v rámci a mimo mnohonásobného klonovacího místa pOK12 jsou uvedena. Místa pro restrikční endonukleázy jsou A, Apal; Ap, Apol; B, BamHI; Bg, BglII; Bs, BspEI; Bc, BclI; E, EcoRI;

Ec, EcoRV; H, HindIII; K, KpnI; N, NarI; Nc, NcoI; S, SacII; Sp, SpeI; Sa, SalI; Sc, ScaI; P, PstI; Pm, PmlI; X, XbaI; Xh, XhoI.

Obrázek 2. Terminální sekvence klonované LV cDNA plné délky a infekční RNA, transkribované z tohoto cDNA klonu. cDNA klony genomové délky byly linearizovány PvuI a byly transkribovány v přítomnosti syntetického analogu čepičky $m^7G(5')ppp(5')G$ T7 RNA polymerázou. Výsledná RNA by měla obsahovat jeden nukleotid (G) navíc na 5' konci a dva nukleotidy (GC) na 3' konci. Šipky u RNA odpovídají 5' a 3' koncové nukleotidy, odpovídající původní LV RNA sekvenci.

Obrázek 3. Růstové křivky LV viru divokého-typu TH, LV4.2.1 a rekombinantních virů vABV414 a vABV416 ve vepřových alveolárních makrofázích (A) a CL2621 buňkách (B). Rekombinantní viry vABV414 a vABV416, vytvořené v buňkách BHK-21 byly použity buď přímo (BHK) nebo po několikanásobné multiplikaci ve vepřových alveolárních makrofázích (PAM). TH virus byl připraven ve vepřových alveolárních makrofázích (PAM), zatímco LV4.2.1 byl připraven v buňkách CL2621 (CL). Buněčné kultury byly infikovány uvedenými viry při MOI 0,05 a sklizeny v uvedených časech. Titry virů ($TCID_{50}/ml$) byly určeny na vepřových alveolárních makrofázích nebo buňkách CL2621 konenčím ředěním.

obrázek 4. Zavedení unikátních míst PacI a SmaI do infekčního cDNA klonu LV. PacI a SmaI místa byla vytvořena pomocí PCR-řízené mutagenese, jak je popsáno v příkladech provedení vynálezu. cDNA fragmenty, obsahující PacI a SmaI, byly vloženy do pABV414, za použití unikátních HpaI a WbaI míst, která jsou uvedena. Výsledkem toho byly jednotlivě pABV437 a pABV442.

Příklady provedení vynálezu

Příprava cDNA klonů, ze kterých mohou být in vitro transkribovány infekční RNA, se stala důležitým nástrojem technik molekulární genetiky +RNA virů. Tato technologie je aplikovatelná na +RNA viry, jejichž RNA genomy mohou sloužit jako mRNA a zahajují celý infekční cyklus, po zavedení do příslušných hostitelských buněk. Pro řadu virů byly popsány infekční klony, které usnadňují studie genové exprese, replikace, funkce virových proteinů a rekombinace RNA virů (přehled viz Boyer a Haenni, 1994). Tyto klony mohou být dále využity pro přípravu nových virových vektorů a vakcín. Infekční cDNA klony pro Arteriviry doposud nebyly popsány. Popisujeme zde přípravu infekčního klonu PRRSV a jeho první využití pro vytvoření chimerních PRRVS virů.

Příklad 1

Materiály a metody

Buňky a viry

Kmen Ter Huurne PRRVS (nebo LV) (uložený v CNCM, Paříž, pod přístupovým číslem I-1102) byl izolován v roce 1991 (Wensvoort et al., 1991) a rostl v alveolárních makrofázích nebo v buňkách CL2621. V této studii byla použita pasáž 6 kmene Ter Huurne (TH), stejně jako od tohoto kmene odvozený kmen LV4.2.1, který byl sériovým pasážováním upraven pro růst na buňkách CL2621. Alveolární makrofágy byly udržovány na mediu RPMI 1640 growth medium (Flow), kdežto buňky CL2621 byly udržovány na mediu Hank's minimal essential medium (Gibco-BRL/Life technologies). Buňky BHK-21 byly udržovány na mediu Dulbecco's minimal essential medium. Pro transfekční pokusy

byly buňky BHK-21 kultivovány na mediu Glasgow minimal essential medium (GIBCO-BRL/Life Technologies Ltd), podle metody Lijeströma a Garoffa (1993).

Izolace virových RNA

Intracelulární RNA byla izolována z alveolárních makrofágů nebo buněk CL2621 24 hodin po infekci PRRSV, při několikanásobné infekci makrofágů, jak bylo popsáno dříve (Meulenberg et al., 1993a). Za účelem izolace virionové genomové RNA, byly viriony purifikovány v sacharozovém gradientu, jak jest popsáno Nieuwstadtem et al., (1996) a poté byly resuspendovány v TNE (0,01 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,1 M NaCl, 1mM EDTA). K 1 ml purifikovaných PRRSV virionů (10^8 TCID₅₀) byl přidán 1 ml pufru pro Proteinkinázu K (100 mM Tris-HCl, pH 7,2, 25 mM EDTA, 300 mM NaCl, 2% (w/v) SDS) a 0,4 mg Proteinkinázy K (Boehringer Mannheim). Tato reakční směs byla inkubována při 37 °C po dobu 30 min. RNA byla jednou extrahována směsí fenol/chloroform (1:1) a vysrážena ethanolem. RNA byla skladována v ethanolu při - 20°C. Desetina takto připravené RNA byla použita pro reakce reverzní transkripce (RT)

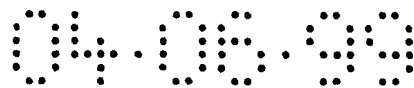
Klonování 5' a 3' konců genomu PRRSV.

5' konec virového genomu PRRSV byl klonován za použití upraveného postupu jenořetězcové ligace do jednořetězcové cDNA (SLIC; Edwards et al., 1991). Jedna desetina virionové RNA, připravené tak, jak je popsáno výše, byla použita pro RT s primerem 11U113 (5'TACAGGTGCCTGATCCAAGA 3'), který je komplementární k nukleotidům 1232 až 1251 genomu. RT byla provedena v konečném objemu 20 µl, jak bylo popsáno dříve (Meulenberg et al., 1993b).

Následně byly do RT reakce přidán 2 µl NaOH a RNA byla hydrolyzována po dobu 30 min při 37 °C. Jednořetězcová cDNA byla

purifikována za použití soupravy High pure PCR product purification kit od Boehringer Mannheim. Purifikovaná cDNA byla vysrážena ethanolem, resuspendována v TE a ligována s nástavcem ALG3 (5' CACGAATTCACCTATCGATTCTGGATCCTTA 3') Tento primer obsahuje EcoRI, ClaI a BamHI místa a jeho 3' konec je modifikován aminoblokující skupinou pro zamezení samoligaci. Jednořetězcový cDNA produkt byl ligován v roztoku se 4 pmol ALG3 v 50 mM 50 Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 10 µl/ml BSA, 25% PEG, 1,0 mM Hexamine Cobaltchloride, 40 µM ATP a 0,5 µl (10 U) T4 RNA ligázy (New England Biolabs) přes noc při pokojové teplotě. Jedna třetina ligační reakce byla použita jako templát v PCR s primery LV68 (5' AGGTCGTCGACGGGCCCCGTGATCGGGTACC 3') a ALG4 (5' GAAGGATCCAGAATCGATAG 3'), Primer LV69 je komplementární k nuklotidům 594 až 615 LV genomu, zatímco ALG4 je komplementární k nástavci ALG3. Použity byly takové podmínky PCR, jako ty popsané v Meulenberg et al. (1993b) a získaný produkt byl štěpen EcorI a Sall a klonován do pGEM-4Z. Obdobný postup byl použit pro klonování 5' konce LV genomu z intracelulární LV RNA. Pro tyto pokusy bylo použito 10 µl totální buněčné RNA, izolované z buněk CL2621, které byly infikovány LV. 5'cDNA byly sekvenovány a jeden klon, pABV387, který obsahoval prodloužení o 10 nuklotidů ve srovnání s publikovanou PRRSV sekvencí (Meulenberg et al., 1993a) byl použit pro další pokusy.

Klony 3'koncové cDNA obsahující dlouhý poly(A) konec byly vytvořeny pomocí reverzní transkripce LV RNA s primerem LV76 (5'TCTAGGATTCTAGACGATCG(T)₄₀ 3'), který obsahuje EcoRI, XbaI a PvuI místa. Reverzní transkripce byla následována PCR s primery LV 75 (5'TCTAGGAATTCTAGACGATCGT 3'), který je identický s LV76



s výjimkou poly(T) prodloužení, a 3970R (5'GGAGTGGTTAACCTCGTCAA 3'), sense primeru, který odpovídá nukleotidům 14566-14585 LV genomu a obsahuje HpaI místo. Výsledné produkty byly štěpeny HpaI a EcoRI a klonovány do pABV39, který byl štěpen stejnými enzymy (obr. I). Dva cDNA klony, obsahující poly(A) prodloužení, o 45 A (pABV382) a 109 A (pABV392), a správnou genomovou cDNA sekvenci, jak bylo zjištěno oligonukleotidovým sekvenováním, byly použity pro vytvoření klonu cDNA plné genomové délky.

Sekvenční analýza.

Oligonukleotidové sekvence byly určeny pomocí soupravy PRISMTM Ready Reaction Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit a automatického sekvenátoru od Applied Biosystems.

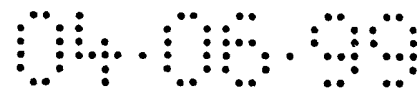
Příprava klonů PRRSV cDNA plné genomové délky.

cDNA klony, vytvořené před určením nukleotidové sekvence genomu LV (Meulenberg et al., 1993a) byly ligovány spolu ve vhodných restrikčních místech, jak jest ukázáno na obrázku 1. Plazmid pABV254 byl vytvořen z pABV klonů 25, 11, 12 a 100 a byl použit v předešlé studii (den Boon et al., 1996). Standardní klonovací techniky byly provedeny podle Sambrook et al., (1989). Výsledkem byly tři vysokokopiové plazmidy pGEM-4Z, obsahující překrývající se cDNA sekvence LV. Plazmidy pABV331 a pABV369 obsahují nukleotidy 5 až 6015 z LV genomu. V pozici 3462 byl nalezen nukleotidový rozdíl v poměru 1 : 1 v sadě 6 nezávislých cDNA klonů, které byly sekvenovány v tomto úseku. Tento nukleotidový rozdíl měl za následek aminokyselinovou substituci v pozici 1084 v ORF1A (Leu místo Pro). Protože jsme nemohly předpovědět vliv této aminokyseliny na

infektivitu, naklonovali jsme také Leu kódující fragment do pABV331 výměnou v místech EcoRV (nukleotid 3403) a SacII (nukleotid 3605), výsledkem čehož byl pABV369. Plazmid pABV384 obsahuje nuklotidy 5168 až 9825 LV genomu. Protože ještě neexistoval vhodný cDNA klon, který by měl překryv s plazmidy pABV20 a pABV5 a který by mohl být fúzován s cDNA sekvencemi pABV331 a pABV369, byly vytvořeny dva cDNA fragmenty pomocí RT-PCR. V jednom PCR byl použit

	sense	primer	LV59
(5'	TCGGAATCTAGATCTCACGTGGTGCAGCTGCTG		3')

odpovídající nukleotidům 5169-5186, a antisense primer 61U303 (5'CATCAACACCTGTGCAGACC 3'), komplementární k nukleotidům 6078 až 6097. V druhém PCR byl použit sense primer 61U526R (5' TTCCTTCTCTGGCGCATGAT 3'), odpovídající nukletidům 5936-5955, a LV60 (5' GTACTGGTACCGGATCCGTGAGGATGTTGC 3'), komplementární k nukleotidům 6727 až 6745. Tyto dva PCR fragmenty spolu byly ligovány do pABV20, za použití místa XbaI, které bylo v LV59, a vnitřního místa ApoI (nukleotidy 6006) a místa BamHI na nukleotidu 6740, které bylo také v primeru LV60. Nový cDNA fragment byl úplně osekvenován a neobsahoval žádné mutace, které by měly za následek aminokyselinové rozdíly s publikovanou sekvencí (Meulenberg et al., 1993a). Plazmid pABV368 obsahuje nukleotidy 8274 až 13720 PRSV genomu. Protože další ligace cDNA fragmentů do pGEM-4Z měla za následek nestabilní klony, byly inzerty pABV331/369, pABV384 a pABV 368 ligovány s 5' a 3' koncovými cDNA fragmenty do pOK12 (Viera a Messing, 1991). Má se za to, že plazmidový vektor pOK12 je vhodnější pro klonování větších cizorodých cDNA sekvencí, protože má nižší kopiové číslo než pGEM-4Z. Kmen *Escherichia coli* DH5a byl transformován těmito plazmidy,



byl kultivován při 32 °C v přítomnosti 15 µg/ml kanamycinu, za účelem udržení co nejnižšího kopiového čísla. Nejprve byly vyštěpeny cDNA fragmenty pABV382 ((A)₄₅) a pABV392 ((A)₁₀₉) pomocí stěpení EcoRI a modifikace tohoto místa Klenowovým fragmentem (Pharmacia) pro zatupení, následované stěpením BamHI. Tyto fragmenty byly klonovány do pOK12, který byl štěpen BamHI a FspI, kde toto druhé místo bylo také zatupeno. Výsledkem byly pABV394 a pABV395. Tímto způsobem byl odstraněn T7 RNA polymerázový promotor, přítomný na pOK12. Poté byly s 3' cDNA klony ligovány cDNA fragmenty pABV368 a pABV384, za použití místa BclI (nukleotid 13394), místa ScaI (nukleotid 8657) a míst BamHI a BglII, v koncové nebo vektorové sekvenci. Výsledkem tohoto byly plazmidy pABV401 a pABV 402 (obr. 1).

5' cDNA klon, obsahující T7 RNA polymerázový promotor, přímo fúzovaný s 5' koncem LV genomu, byl amplifikován pomocí PCR z pABV387 s primery LV83 (5' GAATTCAGTTAATACGACTCACTATAGATGATGTGTAGGGTATTCC 3') a LV69. LV83 je ve směru 5' k 3' složen z míst EcoRI a SpeI a sekvence T7 RNA polymerázového promotoru, jednoho G pro iniciaci transkripce a nukleotidů 1 až 19 z LV genomu. Tento PCR fragment byl klonován do EcoRI a Sall míst pOK12, výsledkem čehož byl pABV396. Správná sekvence pABV396 byla stanovena pomocí oligonukleotidového sekvenování. Následně byly vyštěpeny fragmenty LV cDNA z pABV331 a pABV369 pomocí ApaI a BamHI a byly ligovány do pABV396, který byl štěpen ApaI a BamHI. Nakonec byly výsledné 5'cDNA fragmenty klonovány do pABV401 a pABV402, za použití SpeI místa upstream od T7 RNA polymerázového promotoru a jedinečného PmlI místa v pozici 5168 virového genomu. Tímto

způsobem byly získány klony cDNA plné délky, odpovídající virům, podobajícím se rodičovskému kmenu, a chimerním virům, obsahujícím cizí otevřené čtecí rámce.

Příklad 2

Příprava mutantních virů, obsahujících PacI a /nebo SwaI místa.

Pro zavedení jedinečného PacI místa do klonu cDNA genomové délky, přímo downstream od genu ORF7, byly nukleotidy T a A v pozicích 14987 a 14988 oba zaměněny za A pomocí PCR, za použití sense primeru

LV108

(5'GGAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAAAACCAGAG CC 3') společně s primerem

LV12

(5'CCATTCACCTGACTGTTTAATTAACCTTGCACCCTGA 3') a sense primerem (5'TCAGGGTGCAAGTTAATTAAACAGTCAGGTGAATGG 3') s LV75. Obdobně bylo vytvořeno jedinečné SwaI místo záměnou G v pozici 14980 za T a T v pozici 14985 za A pomocí PCR s primery LV108 a LV110 (5' CCTGACTGTCAATTTAAATTGCACCCTGAC 3') a primery LV109 (5' GTCAGGGTGCAATTTAAATTGACAGTCAGG 3') a LV111. PCR fragmenty byly ligovány do pABV395 za použití míst PacI a SwaI a ohraničujících míst HpaI a XbaI, což mělo za výsledek pABV427 respektive pABV426. Tento fragment byl poté vložen do pABV414, za použití stejných unikátních míst HpaI a XbaI, výsledkem čehož byly pABV437 respektive pABV442 (viz obr. 4). Za účelem detekce markerové mutace ve viru, získaném z transkriptu pABV437 a pABV422, byla ze supernatantu infikovaných vepřových alveolárních makrofágů izolována RNA. Tato RNA byla použita pro RT-PCR, za účelem amplifikace fragmentu délky přibližně 0,8 kb (zahrnujícího nukleotidy 14576-polyA různé velikosti), s primery LV76, LV75 a

30U70R. Přítomnost genetického markeru byla detekována štěpením těchto PCR fragmentů enzymy *PacI* nebo *SwaI*.

Příklad 3

In vitro transkripce a transfekce RNA

Plazmidy pABV414, pABV416, obsahující genomovou LV cDNA plné délky, byly linearizovány v místě *PvuI*, které je umístěno přímo downstream od poly(A) konce. Plazmid pABV296, což je ORF4 v Semliki Forest virus (SFV) expresním vektoru pSFV1 (Meulenberg et al., 1997) byl linearizován pomocí *SpeI* a posloužil jako kontrola pro in vitro transkripční a transfekční pokusy. Tyto linearizované plazmidy byly precipitovány ethanolem a 1,5 μ g těchto plazmidů bylo použito pro in vitro transkripci T7 RNA polymerázou (plazmidy pABV414 a pABV416) nebo Sp6 RNA polymerázou (pABV296), podle metod, popsaných pro SFV Liljetromem a Garoffem (1991 a 1993). In vitro transkribovaná RNA byla precipitována isopropanolem, promyta 70% ethanolem a uložena při -20 °C až do použití. BHK-21 buňky byly zaočkovány na misky M6 (přibližně 10^6 buněk/misku) a byly transfekovány 2,5 μ l RNA za použití 10 μ l lipofektinu, jak jest popsáno Liljetromem a Garoffem (1993). Alternativně, byla RNA zavedena do BHK21 buněk elektroporací. V tomto případě bylo přibližně 10^7 BHK-21 buněk transfekováno 10 μ g in vitro transkribované RNA nebo 10 μ g intracelulární LV RNA, za použití elektroporačních podmínek popsaných Liljetromem a Garoffem (16). Medium bylo sklizeno 24 hodin po transfekci a bylo přeneseno k buňkám CL2621, za účelem zachránění infekčních virů. Transfekované a infikované buňky byly testovány na expresi LV-specifických proteinů pomocí IPMA (immuno peroxidase monolayer assay), v podstatě tak, jak jest popsáno ve

Wensvoort et al., (1986). V IPMA byly pro barvení použity monoklonální protilátky (MAb) 122,13, 122,59, 122,9 a 122,17, směřované proti proteinům GP₃, GP₄, M a N (van Nieuwstadt et al., 1996).

Výsledky

Rekonstrukce 5' terminální sekvence genomové RNA LV.

Ačkoliv byla již popsána infektivita in vitro transkribovaných RNA se zkrácenými 5' konci (Davis et al., 1989, Klump et al., 1990), má se obecně ze to, že pro získání infekčních klonů je zapotřebí celá virová sekvence, včetně nejzažších 5'a 3' konců. Pro klonování 5' konce LV genomu byla použita upravená metoda jednořetězcové ligace do jednořetězcové cDNA (SLIC, Edwards et al., 1991). RNA, izolovaná z buněk CL2621 infikovaných LV, a LV RNA z purifikovaných virionů byla reverzně transkribována za použití primeru LV69, který byl komplementární s 5'koncem ORF1A. První řetězec cDNA byl ligován s nástavcem ALG3, jehož 3' konec byl blokován proti samoligaci. Tyto ligované produkty byly amplifikovány pomocí PCR a klonovány. Dvanáct klonů, odvozených od LV intracelulární RNA, které byly výsledkem dvou nezávislých PCR, a čtrnáct klonů, odvozených od virionové RNA, které byly výsledkem dvou nezávislých PCR, bylo sekvenováno. Z těchto 26 cDNA klonů obsahovalo 22 klonů prodloužení o 10 nukleotidů (5' ATGATGTGTA 3'), ve srovnání s cDNA sekvencí, která byla dříve publikována (Meulenberg et al., 1993a), zatímco 4 klony postrádaly 1 až 3 nukleotidy na 5'konci této přídatné sekvence (tabulka 1). Toto nás vedlo k závěru, že těchto 10 nukleotidů představuje nejzažší 5' konec LV genomu, a byly tudíž zahrnuty do cDNA klonu plné délky.

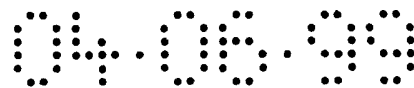
Příprava klonů cDNA plné genomové délky LV.

Za účelem vytvoření klonů cDNA plné genomové délky LV, byly cDNA, které byly dříve izolovány a osekvenovány (Meulenberg et al., 1993a), spolu spojeny ve sdílených restrikčních místech, podle strategie, která je zobrazena na obrázku 1. Dále byly vytvořeny nové cDNA fragmenty pro sestavení klonu cDNA plné délky. Jeden cDNA fragment, obsahující nukleotidy 5168 až 6740 byl vytvořen pomocí RT-PCR, za účelem umožnění ligace cDNA sekvencí z klonů pABV5 a pABV20. T7 RNA polymerázový promotor pro in vitro transkripci byl přímo spojen s 5'koncem genomu LV pomocí PCR a tento nový cDNA fragment, klonovaný v pABV396, byl inzerován od klonu cDNA plné genomové délky. Přeseqvenování nukleotidů 3420 až 3725 v šesti nových a nezávislých cDNA klonech ukázalo, že v aminokyselinové pozici 1084 v ORF1a jsou přítomny Leu a Pro v poměru 1 : 1. Protože jsme nemohly předpovědět vliv této aminokyseliny na infektivitu RNA transkribované z konečného klonu cDNA genomové délky, použily jsme pro vytvoření tohoto klonu obě. Na 3' konci byly použity dva různé cDNA klony. Již dříve jsme izolovaly 3'koncové cDNA klony, obsahující poly(A) konce maximálně 20 A (Meulenberg et al., 1993a). Avšak vzhledem ke studiím, týkajícím se délky poly(A) konce příbuzných virů jako LDV (Chen et al., 1994), jsme očekávaly, že je úplný poly(A) konec mnohem delší. Proto byly vytvořeny nové 3' koncové cDNA klony, za použití primeru LV76, který obsahuje prodloužení o 40 T zbytků. Tyto cDNA klony byly sekvenovány a obsahovaly prodloužení 40 až 109 A zbytků. cDNA klon, obsahující nejdelší poly(A) konec (109 A; pABV392), byl použit pro klon cDNA genomové délky. Protože dlouhé homo-polymerní úseky mohou bránit replikaci plazmidů v *E. coli*. (Deng a Wu, 1981), vyselektovali jsme

také druhý klon pABV382, obsahující 45 A zbytků, pro použití v následných klonovacích krocích. Dříve bylo pozorováno, že zachování klonu cDNA genomové délky ve vysokokopiových plazmidech vede k akumulaci mutací nebo delecí, které mají za následek ztrátu infekivity transkriptů, syntetizovaných z těchto klonů (Lai et al., 1991; Rice et al., 1987; Sumiyoshi et al., 1992). Pozorovaly jsme také nestabilitu plazmidů, když jsme se pokusily ligovat větší cDNA fragmenty pABV klonů 331/369, 384 a 368 s 5' a 3' konci do pGEM-4Z a proto jsme nakonec spojily tyto klony spolu v nízkokopiovém vektoru pOK12 (Viera a Messing, 1991). Výsledkem tohoto byly klony cDNA genomové délky pABV 414/415 a 416, které mohly být stabilně množeny v *E. coli*, za použitých kultivačních podmínek. Nebyly pozorovány žádné rozdíly ve stabilitě klonů cDNA genomové délky, které obsahovaly 45 nebo 109 A zbytků.

Infektivita LV RNA.

LV roste přednostně ve vepřových alveolárních makrofázích. Ukázalo se, že se LV množí v buněčných liniích CLS2621 nebo jiných klonech odvozených od buněčné linie MA104 opičí ledviny (Befield et al., 1992; Collins et al., 1992; Kim et al., 1993). Buňky CL2621 byly tudíž použity pro určení optimálních podmínek pro transfekci LV RNA RNA izolovaná z CL2621 buněk, které byly infikované LV, byla transfekována do CL2621 buněk v různých dávkách, za použití různých metod, jako je metoda využívající lipofektin, lipofektamin, DEAE-dextran a elektroporace. Buňky byly testovány na cytopatický účinek a plaky 7 dní po transfekci, ale tyto signály virové infekce nebyly detekovatelné. Navíc, v IPMA nebyly za použití LV-specifických MAb detekovatelné žádné LV-specifické antigeny. RNA, transkribovaná in vitro z pABV269, byla v těchto pokusech použita jako kontrola.



Plazmid pABV296 sestává z ORF4 genu, který kóduje GP₄, inzerovaného v expresním vektoru pSFV1 (Meulenberg et al., 1997). Transfekční úspěšnost RNA z pABV296 byla testována barvením transfekovaných buněk v IPMA pomocí GP₄ specifických MAb. Nejvyšší transfekční úspěšnosti, jejímž výsledkem bylo 0,01 % pozitivních CLS261 buněk, bylo dosaženo elektroporací, zatímco za podobných podmínek u BHK-21 buněk bylo získáno 80-90 % pozitivních buněk. Tyto výsledky naznačily, že CLS2621 buňky nejsou vhodné pro transfekční pokusy, zatímco BHK-21 buňky (necitlivé k infekci virem divokého typu) se překvapivě ukázaly jako velmi vhodné. Pro testování infekitivity LV RNA byly tudíž použity buňky BHK-21. Přibližně 10⁶ BHK-21 bylo pomocí lipofektinu transfekováno 2 µg RNA, izolované z buněk CL2621 infikovaných LV, za podmínek popsaných pro SFV (Liljetröm a Garoff, 1993). Dvacet čtyři hodin po transfekci, byly buňky barveny LV-specifickou MAb 122,17, která je směřována proti proteinu N z LV. Přibližně 3-10 individuálních buněk bylo barveno pozitivně, ale pozorována nebyla žádná infekční centra ani plaky, které by naznačovaly šíření z buňky na buňku. Výsledkem transfekce kontrolní RNA, transkribované z pABV296, bylo 60-70 % pozitivních BHK-21 buněk, za použití stejných podmínek. Supernatant z BHK-21 buněk, transfekovaných intracelulární LV RNA a RNA z pABV296 byl přenesen na CL2621 buňky. Po 3 až 4 dnech byly na buňkách, které byly inkubovány se supernatantem z BHK-21 buněk, transfekovaných intracelulární LV RNA, pozorovány plaky. Ty nebyly pozorovány u buněk, které byly inkubovány se supernatantem, transfekovaných RNA z pABV296. Tyto plaky byly v IMPA pozitivně barveny LV-specifickými MAb. Podobné výsledky byly získány, když byla použita RNA izolovaná z virionů LV. Počet pozitivně barvených

buněk se navíc zvýšil 2 až 4 krát, když byly transfekovány elektroporací. Tyto údaje naznačují, že LV není schopen infikovat buňky BHK-21, protože nejpravděpodobněji postrádají receptor pro LV. Když je však již jednou genomová RNA do BHK-21 buněk vpravena, jsou produkovány nové infekční virové partikule a ty jsou sekretovány do media. Reinfekce již transfekovaných BHK-21 buněk těmito partikulemi, což jsou buď nahé kapsidy nebo úplně či částečně obalené partikule, také není možná.

In vitro syntéza infekční RNA

Protože -- k PRRSV divokého typu v podstatě necitlivé -- BHK-21 buňky byly vhodné pro záchranu viru z intracelulární LV RNA a citlivé buňky CL2621 vhodné nebyly, byly pro testování, zda je RNA, transkribovaná z klonu cDNA genomové délky, infekční, použity BHK-21 buňky. Plazmidy pABV414/416 byly linearizovány PvuI a transkribovány in vitro za použití T7 RNA polymerázy. PvuI místo je umístěno downstream od poly(A) tak, že transkribovaná RNA obsahuje 2 nevirové nukleotidy na 3'konci (obr. 2). Transkripty by navíc měly obsahovat nevirový G na 5' konci, který je počátečním místem transkripce T7 RNA polymerázy. Přibližně 2,5 µg in vitro transkribované RNA bylo transfekováno do BHK-21 buněk, společně s 2 µg intracelulární LV RNA, sloužícími jako pozitivní kontrola pro následnou záchranu viru v CL2621 buňkách, a s RNA z pABV296, sloužící jako pozitivní kontrola pro RNA transfekci do BHK-21 buněk a negativní kontrola pro následnou záchranu viru v CL2621 buňkách. 24 hodin po transfekci byl supernatant z buněk sklizen a buňky byly fixovány a barveny v IPMA N-specifickou MAb 122,17. Zatímco na miskách s BHK-21 buňkami, které byly transfekovány intracelulární LV RNA, bylo pozorováno pouze několik pozitivních buněk, na miskách s

BHK-21 buňkami, které byly transfekovány RNA transkribovanou z pABV414/416, bylo pozorováno 800 až 2700 pozitivních buněk. Za účelem kontroly, zda byl z buněk uvolněn infekční virus, byly supernatanty použity k infekci CL2621 buněk. Plaky byly vytvořeny v CL2621 kulturách, které byly infikovány supernatantem z BHK-21 buněk, které byly transfekovány LV RNA a transkripty pABV414/416. Plaky byly obarveny pozitivně v IPMA MAb proti proteinům N, M, GP₄ a GP₃, což naznačuje, že všechny tyto proteiny byly správně exprimovány. Žádné plaky ani barvení v IPMA nebylo pozorováno v CL2621 kulturách, které byly inkubovány se supernatantem z BHK-21 buněk, které byly transfekovány RNA transkribovanou z pABV296. Tyto výsledky tudíž jasně ukazují, že transfekce BHK-21 buněk RNA, transkribovanou z cDNA klonů genomové délky pABV 414 a pABV 416, má za následek produkci a uvolňování infekčního LV. Navíc, když byly BHK-21 buňky transfekovány transkripty pABV414 a pABV416 pomocí elektroporace místo lipofektinu, bylo dosaženo 2 až 4 násobného zvýšení pozitivního barvení buněk LV-specifickými protilátkami. Titr rekombinantních virů v supernatantech těchto elektroporovaných BHK-21 buněk byl přibližně 10^5 TCID₅₀/ml. Růstové křivky infekční kopie viru ve srovnání s Ter Huurne a LV4.2.1:

Růstové charakteristiky zachráněného viru

Počáteční transfekční a infekční pokusy naznačily, že zachráněné rekombinantní viry, označené jako vABV414 a vABV416, infikují a rostou stejně dobře ve vepřových alveolárních makrofázích, ale rostou pomaleji v CL2621 buňkách než virus, zachráněný z BHK-21, které byly transfekovny intracelulární LV RNA. Tato intracelulární LV RNA byla izolována z CL2621 buněk, které byly infikovány LV4.2.1, který byl přizpůsoben růstu na CL2621. Pro důkladnější studium růstových

vlastností vABV414 a vABV416 byly stanoveny růstové křivky v CL2621 a vepřových alveolárních makrofázích a byly srovnány s růstovými křivkami LV divokého typu, který byl pouze pasážován s vepřovými alveolárními makrofágy (TH), a s růstovými křivkami LV4.2.1, který rostl na buňkách CLS2621. Růstové rychlosti těchto dvou rekombinantních virů se nelišily a rostly stejně dobře bez ohledu na to, zda byly odvozeny přímo od BHK-21 nebo byly dále pasážovány na vepřových alveolárních makrofázích (obr. 3). Titry (7,1-7,9 TCID₅₀/ml) ve vepřových alveolárních makrofázích měli maximum asi 32 hodin po infekci, zatímco titry v CL2621 byly nižší a neměly maximum ani 96 po infekci. TH měl podobné charakteristiky jako tyto rekombinanti. Naopak, na CL2621 adaptovaný viru LV4.2.1 rostl rychleji na CL2621 než viry vABV414, vABV416 a TH (obr. 3). V souhrnu tyto výsledky dokazují, že růstové vlastnosti rekombinantních virů jsou podobné růstovým vlastnostem TH viru. Toto bylo očekáváno, protože cDNA sekvence, použitá pro tvorbu infekčních klonů byla odvozena od „neadaptovaného“ TH viru.

Zavedení genetického markeru do infekčního klonu LV

Jako důkaz toho, že klon cDNA genomové délky může být použit pro tvorbu mutantních LV virů, bylo pomocí PCR-řízené mutagenese přímo downstream od ORF7 genu zavedeno PacI a SmaI místo (obr. 4). Když byla RNA, transkribovaná z klonu cDNA plné délky pABV374, obsahujícího PacI místo, a pABV442, obsahujícího SmaI místo, transfekována do BHK-21 buněk a supernatant byl přenesen na vepřové alveolární makrofágy, byl produkován infekční virus. Zachráněné viry vABV437 a vABV442 měly podobné růstové vlastnosti ve vepřových alveolárních makrofázích a CL2621 buňkách jako rodičovský virus vABV414 (údaje nejsou ukázány). Reverzní transkripcí a PCR virové

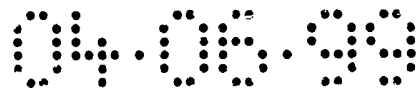
RNA, izolované ze supernatantu vepřových alveolárních makrofágů, které byly infikovány vABV414 a vABV416, byl amplifikován specifický úsek, přibližně 0,6 kb (nukleotidy 14576-poly(A)). Štěpení v místě *PacI* ukázalo, že toto restriční místo bylo skutečně přítomno na fragmentu, který byl odvozen vABV437, ale chybělo na fragmentu, který byl odvozen vABV414. Obdobně byla prokázána přítomnost *SwaI* ve vABV442 (údaje nejsou ukázány). Byly jsme tedy schopni vyloučit možnost kontaminace virem divokého typu a tudíž potvrdit identitu vABV437 a vABV442.

Diskuse

Moderní technologie rekombinantní DNA nám umožňuje analyzovat a modifikovat genomy na molekulární úrovni a tedy hlouběji proniknout do jejich organizace a exprese. V případě RNA virů je třeba vytvořit klony cDNA genomové délky, ze kterých mohou být syntetizovány infekční transkripty. Ve většině případů je pro přípravu infekčních klonů napřed nutné zjištění sekvence na koncích dotyčného virového genomu, které jsou pravděpodobně pro replikaci virové RNA rozhodující. V dřívější studii bylo zjištěno, že LV obsahuje na 3' konci poly(A) (Meulenberg et al., 1993a). V této práci byl určen přesný 5' konec LV genomu. Bylo popsáno několik metod určení 5' konce virových genomových RNA nebo mRNA, ale většina z nich má významná omezení. Pro flaviviry a pestiviry bylo použita metoda, která je založena na cirkularizaci genomové RNA. Tato metoda však vyžaduje doprovodné analýzy pro definování hranice mezi 5' a 3' koncem genomu. 5' rychlá amplifikace cDNA konců (5' RACE) je metoda, založená na přidělení homopolymerního konce terminální deoxyrinukleotid transferázou (TdT) k prvnímu řetězci cDNA. Tato

prodlužovací reakce je však dost neúčinná a tato metoda také vyžaduje doprovodné analýzy, protože není možno rozhodnout, zda první nukleotid konce představuje virovou sekvenci nebo zda je to již část enzymaticky připojeného konce. V této studii jsme určily nejzažší konec virového genomu pomocí ligace oligonukleotidu specifické sekvence s prvním řetězcem cDNA a PCR amplifikace. V několika nezávislých kloních bylo nalezeno prodloužení o 10 nukleotidů (ATGATGTGTA) vzhledem k publikované sekvenci. Předpokládáme tudíž, že představuje nejzažší 5' konec virového genomu. Dohromady je zde tvořena vedoucí sekvence z 221 nukleotidů, která je délkou podobná vedoucí sekvenci EAV (207 nukleotidů; den Boon et al., 1991), SHFV (208 nukleotidů; Zeng et al., 1995), ale delší než vedoucí sekvence LDV (155 nukleotidů; Chen et al., 1994). Mezi vedoucími sekvencemi arterivirů však neexistuje žádná významná homologie.

Nejzažší 5' konec byl zahrnut do cDNA genomové délky, za účelem vytvoření infekčního klonu. Největší problémy při přípravě infekčních klonů jsou spojeny se stabilitou virové sekvence, když je klonována v bakterii, stejně jako s vytvořením správných 5' a 3' konců. Ačkoliv původní pokusy o vytvoření klonu cDNA genomové délky v pGEM-4Z ztroskotaly, 15 207 nukleotidů dlouhá genomová cDNA zůstala stabilní v nízkokopiovém plazmidu pOK12 a je nyní nejdelším, doposud připraveným infekčním klonem +RNA viru. Transkripty těchto klonů cDNA genomové délky obsahovaly 5' čepičku a nevirový G navíc na 5' konci a nevirové CG na 3' konci, ale tato prodloužení nezrušila jejich infektivitu. Několikrát již byla popsána snížená původní infekčnost RNA, transkribované z klonů cDNA genomové délky, kvůli cizím, nepůvodním sekvencím na 5' či 3' konci, nebo neúplné čepičce. Transkripty cDNA plné délky LV postrádající čepičkovou strukturu



nebyly infekční. Zatímco infektivita transkriptů infekčních cDNA klonů byla vždy testována na buněčných liniích, které jsou citlivé k danému viru, my jsme nebyli schopni prokázat infektivitu transkriptů klonů cDNA genomové délky nebo LV RNA, izolované z CL2621 buněk, transfekcí těchto RNA do CL2621 buněk. Toto bylo způsobeno malou transfekční úspěšností u CL2621 buněk, způsobenou pravděpodobně zastavením syntézy RNA řetězce interakcemi s nekompletními RNA fragmenty nebo kapsidovými proteiny, které pochází z reinfekce CL2621 buněk defektními interferujícími partikulami, jako jsou nahé kapsidy, obsahující pouze části virového genomu. Výsledkem transfekce transkriptů klonů cDNA plné délky a intracelulární LV RNA do BHK-21 byla produkce a uvolňování infekčního viru, který mohl být zachráněn v CL2621 buňkách. K reinfekci BHK-21 buněk nahými kapsidami zde nedochází a není tedy bráněno syntéze virové RNA plné délky. Konkrétní infektivita byla zhruba 400-1500 pozitivních buněk na μg in vitro transkribované RNA, zatímco u intracelulární LV RNA bylo získáno pouze 2 až 5 pozitivních buněk na 1 μg . Tyto konkrétní infekivity však nemohou být srovnávány, protože genomová LV RNA představuje pouze velmi malou část intracelulární RNA, izolované z CL2621 buněk, které byly infikovány LV. Množství genomové RNA izolované z virionů, které bylo použito pro transfekci bylo navíc příliš malé pro přesnou kvantifikaci.

U BHK-21 buněk byla navíc sledována produkce antigenu v IMPA pomocí LV-specifických MAb, která nutně nemusí mít vztah s produkcí infekčního viru. Toto bylo zřejmé z faktu, že supernatant z BHK-21 buněk, které byly transfekovány 2 μg intracelulární LV RNA, testovaný na CL2621 buňkách, obsahoval vyšší titr složek tvořících plaky než supernatant z BHK-21 buněk, které byly transfekovány 2,5 μg



transkriptu z klonů cDNA plné délky. Ačkoliv již dříve bylo u řady virů ukázáno, že délka poly(A) konce ovlivňuje infektivitu virových transkriptů (Holy a Abouhaidar, 1993; Sarow, 1899), nepozorovali jsme žádné rozdíly v infektivitě mezi transkripty z klonů genomové cDNA, které obsahovaly konec 45 či 109 zbytků. Je možné, že konec tvořený 45 A zbytky je nad prahem délky, pod kterou je stabilita odpovídajících transkriptů měněna. Nalezli jsme rozdíl mezi klony v aminokyselině 1084 v ORF1a; PRO a LEU v poměru 1 : 1. Tato aminokyselina neměla vliv na infektivitu, protože transkripty klonů cDNA plné délky, obsahující LEU nebo PRO kodon, nevykazovaly žádné rozdíly v infektivitě BHK-21 buněk.

Infekční klon genomové délky byl použit pro vytvoření chimerního viru, který exprimuje nukleokapsidový protein PRPSV kmene ATCC VR2332. Infekční klon genomové délky byl dále použit pro vytvoření chimerního viru, který exprimuje nukleokapsidový protein myšího viru LDV. Chimerní viry mohou být rozeznány od rodičovských virů pomocí MAb, specifických pro daný kmen. Nejsou barveny monoklonálními protilátkami, specifickými pro N (ORF7) protein Ter Huurne kmene PRRSV. Chimerní virus, ve kterém je PRPSV N protein nahrazen LDV N proteinem, navíc nereaguje s vepřovými protilátkami, reaktivními s PRPSV N proteinem. Protože všechny PRRSV-infikovaná prasata vytváří protilátky, cílené proti PRRSV N proteinu, budou tyto chimerní viry použity v budoucích projektech, které využívají nové živé vakcíny proti PRRSV a které využívají tento virus jako vektorový systém, který je specificky cílen na své hostitelské buňky, plicní alveolární makrofágy. Zde by mělo být zmíněno, že počáteční pokusy o poskytnutí ochrany mrtvými buňkami nebo rekombinatními podjednotkami byly neúspěšné. Doposud jediná dostupná účinná



vakcína proti PRRSV je modifikovaná živá vakcína, založená na americkém kmeni (Gorcyca et al., 1995). Prasata, očkováná tímto modifikovaným živým produktem, však nemohou být rozlišena od prasat, která byla infikována divokým virem. Tento infekční klon PRRSV tedy poskytuje takzvanou markerovou vakcínu, pomocí místně cílené mutageneze genomu, takže očkováná prasata mohou být rozlišena od, která byla infikována divokým virem, na základě rozdílu antibiotik v séru.

Infekční klon LV, zde popsáný, je nejdelším dosud vytvořeným infekčním klonem +RNA viru a prvním z čeledi Arteriviridae. Vytvoření tohoto infekčního klonu PRRSV otevírá nové možnosti pro studie, zaměřené na patogenezí, hostitelský tropismus a replikaci a transkripci tohoto viru. Arteriviry a koronaviry sdílejí specifický mechanismus transkripce, také označovaný jako „leader primed transcription“, který zahrnuje vytvoření sady subgenomových RNA, obsahujících běžné 5' vedoucí sekvence (Spaan et al., 1988; Plagemann a Moenning, 1991). Tento druh transkripce je komplexní proces, který ještě nebyl plně pochopen. Studie virologů, studujících koronaviry, snažící se objasnit základní mechanismus této transkripce, jsou omezeny na analýzy a místně cílenou mutagenezi cDNA z neúplných interferujících RNA, protože velikost genomu (28 až 30 kb) bránila vytvoření infekčního klonu. Infekční klon PRRSV je užitečným modelovým systémem pro studium splitého mechanismu transkripce a replikace arterivirů a koronavirů.

Infekční klony, odvozené od PRRSV, mohou být také použity jako přenašečí systém nebo virová vektorová vakcína pro cizí antigeny, inzerované v genomu PRRSV, protože tento virus infikuje makrofágy a buňky makrofágové linie v kostní dřeni a jiné buňky imunitního systému

a roznáší antigen-obsahující virus skze své dceřiné buňky. V konkrétním případě antigeny-obsahujících fragmentů ORF7 a proteinu N z Arterioviru nebo PRRSV, budou tyto antigeny (nad)exprimovány na vnější stranu buněčné membrány infikované buňky, čímž dojde k dalšímu zesílení imunitní odpovědi. Takovéto imunologické zesilovací efekty způsobují doživotní (kvůli průběžné stimulaci na nízké úrovni) imunitu proti patogenům. Po vložení informace pro epitopy jiných patogenních organismů nebo látek, můžeme tento virus použít jako nosič antigenu. Několik modifikovaných PRRS virů, nesoucích informaci pro cizí epitopy, může být smícháno a podáváno najednou. Toto umožní aktivní imunitu proti několika různým antigenům jednoho patogena, nebo aktivní imunitu proti několika různým patogenům.

Bezpečnost vakcín z modifikovaného PRRSV (jako nešíření se) může být zajištěna delecí informace pro ty virové proteiny, které jsou třeba pro tvorbu obalených, infekčních virů. Tento virus musí být množen v buněčné linii, která konstitutivně exprimuje tento protein. Virus, replikující se v této komplemetární buněčné linii, má plný obal a je schopen infekce makrofágu v praseti. Po jednom replikačním cyklu již potomstvo viru, kterému chybí informace pro obalový protein, není schopno infekce jiných buněk jako obalený virus. Infekce makrofágů v těle je stále možná nahými kapsidami. Takto bude vakcína obsažena ve zvířeti, které bylo očkováno, a nebude se šířit na jiná zvířata.

Tabulka 1. Nukleotidová sekvence 5'koncových cDNA klonů LV.

Sekvence 1)	Počet klonů
ATGATGTGTAGGG.....	22
TGATGTGTAGGG.....	1
GATGTGTAGGG.....	2
ATGTGTAGGG.....	1

1) Uvedené nukleotidy představují sekvence navíc, které nebyly nalezeny v klonech cDNA, izolovaných a sekvenovaných dříve (Meulenberg et al., 1993a).

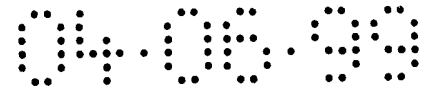
Literatura

Benfield D. A., Nelson E., Collins, J. E., Harris L., Goyal S. M., Robinson D., Christianson W. T., Morrison R. B., Gorcyca D. E. a Chladek D. W. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrom virus (Isolate ATCC-VR3332) J. Vet. Diagn. Invest. 4, 127-133.

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

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

Collins J. E., Benfield D. A., Christianson W. T., Harris L., Hennings J. C., Shaw D. P., Goyal S. M., McCullough S., Morrison R. B., Joo H. S., Gorcyca D. E., Chladek D. W. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrom virus (Isolate ATCC-VR3332) in North



America and experimental reproduction of disease in gnotobiotic pigs. J. of Vet. Diagn. Invest. 4, 117-126.

Conzelmann K. K., Visser N., van Woensel P. a Thiel H. J. (1993). Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrom virus, a member of the Arterivirus group. Virology 193, 329-339.

den Boon J. A., Faaberg K. S., Meulenberg J. J. M., Wassenaar A. L. M., Plagemann P. G. W., Gorbalenya A. E. a Snijder E. J. (1995) Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein : identification of two papainlike cysteine protease. J. Virol. 69 : 4500-4505.

Davis N. L., Willis L. V., Smith J. F. a Johnston R. E. (1989). In vitro synthesis of infection Venezuelan equine encephalitis virus RNA of an insect virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 63-66.

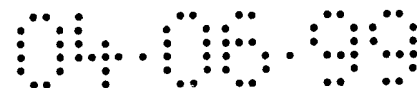
Dneg R. a Wu R. (1981). An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. Nucleic Acids Res. 9, 4173-4188.

Edwards J. B. D. M., Delort J. a Mallet J. (1991) Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs; A tool for cloning 5'ends of mRNAs and for constructing cDNA libraires by in vitro amplification. Nucleic Acids Res. 19, 5227-5232.

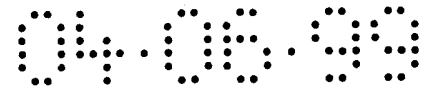
Gorcyca D., Schlesinger K., Chladek D., et al., (1995) Proc Am. Assoc. of Swine Pract., Omaha, NE, 1-22.

Holy S. a AAbouhaidar M. G. (1993). Production of infectious in vitro transcripts from a full-length clover yellow mosaic virus cDNA clone. J. Gen. Virol., 74, 781-784.

Kim H. S., Kwang J. a Yoon I. Y. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a homogenous



- subpopulation of MA-104 cell line. Arch. Virol. 133, 477-483.
- Klump W. M., Bergmann I., Muller B. C., Ameis D. a Kandolf R. (1990) Complete nucleotide sequence of infectious coxsackie-virus B3 cDNA : Two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. J Virol. 64, 1573-1583.
- Lai C. J., Zhao B., hori H. a Bray M. (1991) Infectious RNA transcribed from stably cloned full.length cDNA of dengue type 4 virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5139-5143.
- Liljeström P. a Garoff H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. Biotechnol. 9, 1356-1361.
- Liljeström P. a Garoff H. (1993). Expression of proteins using Semliki Forest virus vector, str. 16. xx. 1-16.xx.00 V: Current protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman a K. Struhl (Ed.) Greene Publishing associates and Wiley interscience, New York.
- Meulenberg J. J. M., Hulst M. M., de Meijer E. J., Moonen P. L. J. M., den Besten A., de Kluyver E. P, Wensvoort G. a Moormann R. J. M. (1993a). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) is related to LDV and EAV. Virology 192, 62-74.
- Meulenberg J. J. M., de Meijer E. J. a Moormann R. J. M. (1993b). Subgenomic RNAs of Lelystad virus, contain a conserved junction sequence. J. of Gen. Virol. 74, 1697-1701.
- Meulenberg J. J. M., Petersen-den Besten A., de Kluyver E. P, Moormann R. J. M., Wensvoort G (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. Virology 206, 155-163.
- Meulenberg J. J. M. a Petersen-den Besten (1996) Identification and



characterization of sixth structural protein of Lelystad virus : The glycoprotein GP₂ encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. Virology, v tisku.

Meulenberg et al., 1997

Murtaugh M. P., Elam M. R. a Kakach (1995) Comparison of structural protein coding sequence of the VR-2332 and Lelystad virus strains of PRRS virus. Arch. Virol., 140, 1451-1460.

Nelson E. A., Christopher-Hennings J., Drew T., Wensvoort G., Collins a Benfield D. A. (1993). Differentiation of United states and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J of Clin. Microbiol. 31, 3184-3189.

Plagemann P. G. W. a Moenning V. (1991). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA virus. Adv. in Virus Res. 41, 99-192.

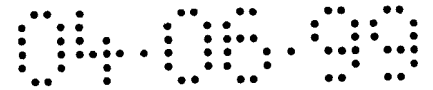
Rice C. M., Levis R., Strauss J. H. a Huang H. V. (1987). Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones : mapping of lethal mutations, rescue of a temperature-sensitive marker, and in vitro mutagenesis to generate defined mutants. J. Virol., 61, 3809-3819.

Sambrook J., Fritsch E. F. a Maniatis T. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor NY.

Sarnow P. (1989) Role of 3' end sequence in infectivity of polio-virus transcripts made in vitro. J. Virol., 63, 467-470.

Snijder E. J. a Horzinek M. C. (1993). Toroviruses : replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. J. Gen. Virol., 74, 2305-2316.

Spaan W. J. M., Cavanagh D. a Horzinek M. C. (1988) Coronaviruses : Structure and genome expression. J. Gen. Virol. 69, 2939-2952.



Sumiyoshi H., Hoke C. H. a Trent D. W. (1992). Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro ligated cDNA templates. *J. Virol.*, 66, 5425-5431.

van Nieuwstadt A. P., Meulenberg J. J. M., van Essen-Zandbergen A., Petersen-den Besten A., Bende R. J., Moormann R. J. M., Wensvoort G (1996). Proteins encoded by ORFs 3 and 4 of genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J. Virol.*, 70, 4767-4772.

Viera J. a Messing J. (1991) New pUC-derived cloning c;vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene*, 100, 189-194.

Wensvoort G., de Kluyer E. P., Luijtz E. A., den Besten A., Harris L., Collins J. E., Christianson W. T. a Chladek D. (1992) Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory (SIRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 134-138.

Wensvoort G., Terpstra C., Boonstra J., Bloemraad M. a Van Zaane (1986) Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* 12, 101-108.

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

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

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob vytvoření infekčního klonu, založeného na genomu +RNA viru, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje přípravu rekombinantní nukleové kyseliny, která zahrnuje alespoň jednu DNA kopii plné délky nebo in-vitro transkribovanou RNA kopii nebo derivát jedné z těchto možností, kde tento RNA virus má genom alespoň okolo 15 kb.

2. Způsob vytvoření infekčního klonu, založeného na genomu +RNA viru, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje přípravu rekombinantní nukleové kyseliny, která zahrnuje alespoň jednu DNA kopii plné délky nebo in-vitro transkribovanou RNA kopii nebo derivát jedné z těchto možností, a který dále zahrnuje selekci infekčních klonů pomocí transfekce hostitelské buňky zmíněnou rekombinantní nukleovou kyselinou, kde zmíněná hostitelská buňka je v podstatě necitlivá k infekci zmíněným virem.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněný virus je +RNA virus s genomem alespoň okolo 15 kb.

4. Způsob podle nároků 2 a 3, vyznačující se tím, že zmíněná hostitelská buňka je BHK-21 buňka.

5. Rekombinantní nukleová kyselina, zahrnující infekční klon, který se dá získat způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4.

6. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 5, zahrnující infekční klon, založený na genomu viru, který je vybrán z řádu Nidovirales.

7. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 6, zahrnující infekční klon, založený na genomu viru, který je vybrán z čeledi Arteriviridae.

8. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 7, kde zmíněný virus je PRRSV.

9. Rekombinantní nukleová kyselina podle kteréhokoliv z nároků 5 až 8, kde byla modifikována sekvence nukleové kyseliny, kódující marker virulence a/nebo serologický marker.

10. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 9, kde je sekvence nukleové kyseliny, kódující zmíněný marker, umístěna v rámci kteréhokoliv z otevřených čtecích rámců, kódujících strukturní virové proteiny.

11. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 10, kde jedním otevřeným čtecím rámcem je ORF7 kteréhokoliv viru z čeledi Arteriviridae.

12. Rekombinantní nukleová kyselina podle kteréhokoliv z nároků 5 až 8, kde je jeden otevřený čtecí rámec substituován ORF7 kteréhokoliv viru z čeledi Arteriviridae.

13. Rekombinantní nukleová kyselina podle kteréhokoliv z nároků 5 až

12, kde je inzerována alespoň jedna heterologní sekvence nukleové kyseliny navíc.

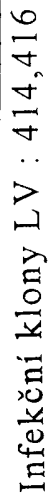
14. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 13, kde zmíněná heterologní sekvence nukleové kyseliny kóduje nějaký antigen.

15. Rekombinantní nukleová kyselina podle kteréhokoliv z nároků 5 až 14, kde byl modifikován jeden otevřený čtecí rámec.

16. Modifikovaný RNA virus, obsahující rekombinantní nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 5 až 15.

17. Vakcína, obsahující modifikovaný RNA virus podle nároku 16.

18. Buňka, infikovaná modifikovaným RNA virem podle nároku 16.



Obt. I

cDNA

Počátek T7 transkripce

5' TAATACGACTCACTATAG ATGATGTGTAGGGTATTCC AAA(109) CGATCGTCTAGAEcoRI/ΔFspI -3'

PvuI

3' - GCTAGC - 5'

T7 transkripce

RNA

5'-Cap-G AUGAUGUGUAGGGUAUUCU AAA(109) CG - 3'

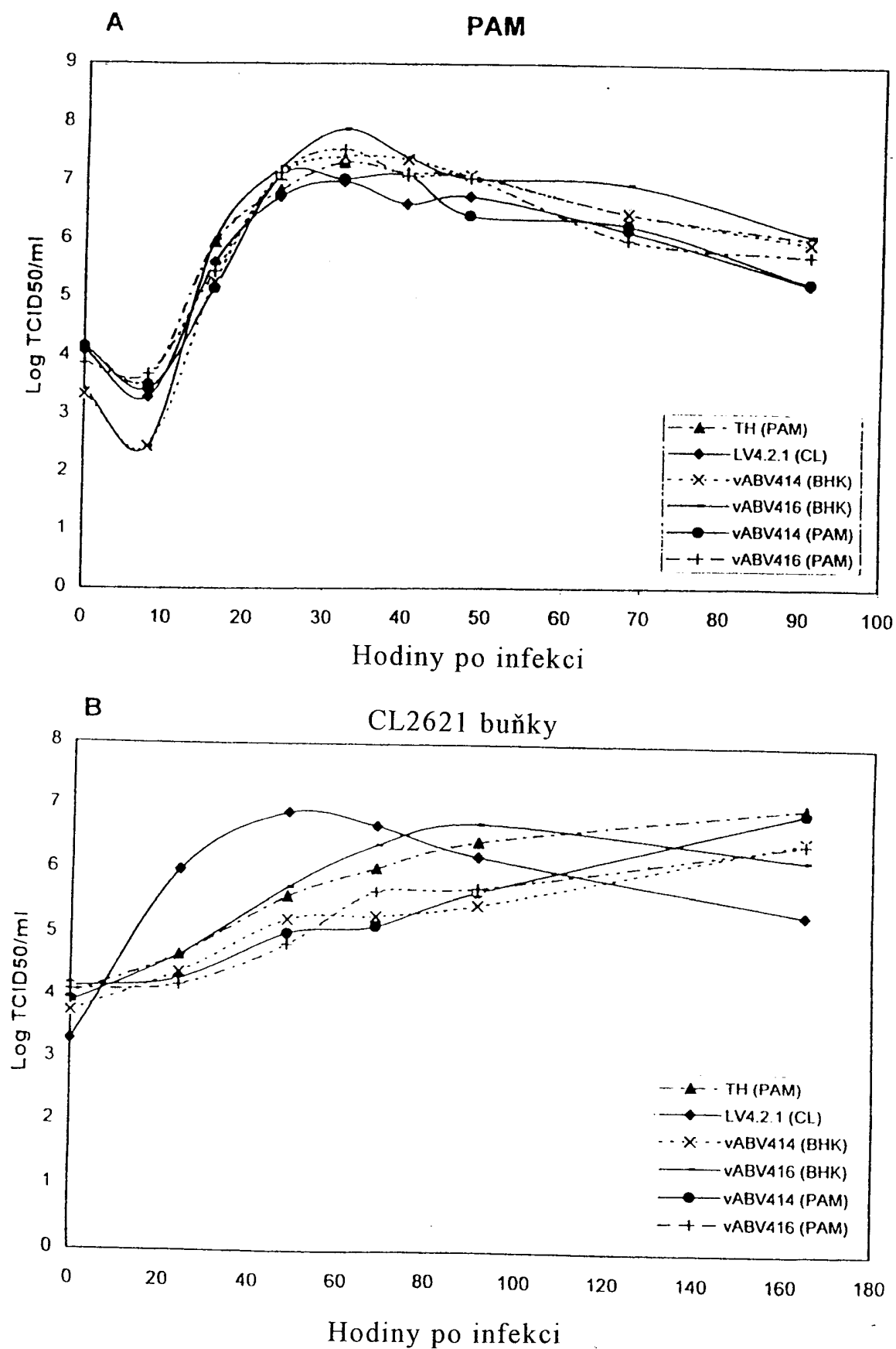
15207

Infekční klony Lelystad viru

414 PRO, 109 A's

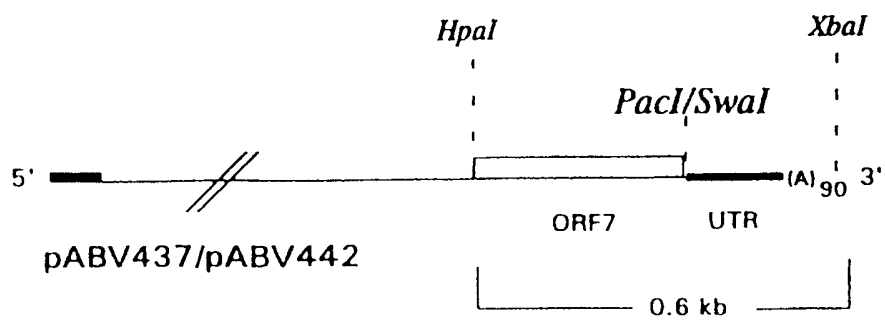
416 LEU, 109 A's

Obr. 2



04.06.99

4/4



Obr. 4