



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84254 (13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 15/85

C12N 15/44 (2006.01)

C12N 7/04

C12N 5/10

A61K 39/145

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МІНІМАЛЬНА ПЛАЗМІДНА СИСТЕМА ДЛЯ ГЕНЕРУВАННЯ ІНФЕКЦІЙНИХ МІНУС-ЛАНЦЮГОВИХ РНК ВІРУСІВ З КЛОНОВАНОЇ ВІРУСНОЇ КДНК, КЛІТИНА-ХАЗЯЇН, ЯКА ВКЛЮЧАЄ ПЛАЗМІДНУ СИСТЕМУ, СПОСІБ ПРОДУКУВАННЯ ІНФЕКЦІЙНОГО МІНУС-ЛАНЦЮГОВОГО РНК ВІРУСУ ТА СПОСІБ ЩЕПЛЕННЯ СУБ'ЄКТА ВІД ІНФЕКЦІЇ МІНУС-ЛАНЦЮГОВОГО РНК ВІРУСУ

1

2

(21) 2002108499

(22) 27.04.2001

(24) 10.10.2008

(86) PCT/US01/13656, 27.04.2001

(31) 60/200,679

(32) 28.04.2000

(33) US

(46) 10.10.2008, Бюл.№ 19, 2008 р.

(72) ХОФФМАНН ЕРІК

(73) СТ. ДЖУД ЧІЛДРЕНЗ РЕСЕРЧ ХОСПІТАЛ

(56) HOFFMANN ERICH ET AL: "Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 81, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 2843-2847

NEUMANN GABRIELE ET AL: "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 16, 3 August 1999 (1999-08-03), pages 9345-9350.

PALESE P ET AL: "NEGATIVE-STRAND RNA VIRUSES: GENETIC ENGINEERING AND APPLICATIONS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 93, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 11350-11354.

HOFFMANN E ET AL: "Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1?" JOURNAL OF VIROLOGY. UNITED STATES JUL 2000, vol. 74, no. 14, July 2000 (2000-07), pages 6309-6315

WO A1 9103552, 21.03.1991.

US A3992522, 16.11.1976.

OFFMANN E ET AL: "'Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template." VIROLOGY. UNITED STATES 15 FEB 2000, vol. 267, no. 2, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 310-317.

(57) 1. Мінімальна плазмідна система для генерування інфекційних мінус-ланцюгових РНК вірусів з клонованої вірусної кДНК, що включає набір плазмід, де кожна плазміда включає вірусну кДНК, що відповідає вірусному геномному сегменту, інсерційованому між промотором РНК-полімерази I (pol I) і термінаторною послідовністю, які здатні спрямовувати синтез вРНК, яка у свою чергу, інсерційована між промотором РНК-полімерази II (pol II) та сигналом поліаденілювання, які здатні спрямовувати синтез мРНК, причому зазначена плазмідна система є кДНК-двонаправленою транскрипційною системою.

2. Плазмідна система за п. 1, у якій вказана термінаторна послідовність являє собою термінаторну послідовність РНК-полімерази I (pol I).

3. Плазмідна система за п. 1, у якій вказана термінаторна послідовність являє собою послідовність рибозиму.

4. Плазмідна система за будь-яким з пп. 1-3, у якій вРНК включає 3' кінець.

5. Плазмідна система за будь-яким з пп. 1-4, у якій РНК вірус являє собою ортоміксовірус.

6. Плазмідна система за п. 5, у якій ортоміксовірус являє собою вірус грипу А.

7. Плазмідна система за п. 5, у якій ортоміксовірус являє собою вірус грипу В.

8. Плазмідна система за будь-яким з пп. 5-7, у якій вірусний геномний сегмент кодує протеїн, вибраний з групи, що складається з протеїну вірусного полімеразного комплексу, М-протеїну та NS-

(13) C2

(11) 84254

(19) UA

протеїну, де вказаний вірусний геномний сегмент походить зі штаму, добре адаптованого для вирощування у клітинній культурі, або з атенуйованого штаму, або обох.

9. Плазмідна система за будь-яким з пп. 5-7, у якій вірусний геномний сегмент включає ген гемаглютиніну (HA) або нейрамінідази (NA), або обох, причому вказані гени належать до патогенного вірусу грипу.

10. Плазмідна система за п. 6, що включає плазмиду, вибрану з групи, до якої входять: плазмід, яка містить ген PB2, плазмід, яка містить ген PB1, плазмід, яка містить ген PA, плазмід, яка містить ген NA, плазмід, яка містить ген NP, плазмід, яка містить ген M, та плазмід, яка містить ген NS.

11. Клітина-хазяїн, яка включає плазмідну систему за будь-яким з пп. 1-10.

12. Спосіб продукування інфекційного мінус-ланцюгового РНК вірусу, який включає культивування клітини-хазяїна за п. 11 за умов, що дозволяють продукування вірусних протеїнів та вРНК.

13. Спосіб за п. 12, у якому РНК вірус є патогенним.

14. Спосіб за п. 12 або 13, у якому РНК вірус являє собою ортоміксовірус.

15. Спосіб за п. 14, у якому ортоміксовірус являє собою вірус грипу А.

16. Спосіб за п. 14, у якому ортоміксовірус являє собою вірус грипу В.

17. Спосіб одержання атенуйованого мінус-ланцюгового РНК вірусу, де спосіб включає:

(а) видозміну одного або декількох вірусних геномних сегментів у плазмідній системі за будь-яким з пп. 1-10, та

(б) визначення того, чи є атенуйованим мінус-ланцюговий РНК вірус, продукований плазмідною системою при введенні в придатну клітину-хазяїна.

18. Спосіб продукування інфекційного мінус-ланцюгового РНК вірусу для використання у вакцинах, де спосіб включає:

(а) культивування клітини-хазяїна, що включає плазмідну систему за будь-яким з пп. 1-10 для генерування зазначеного вірусу, та

(б) очистку зазначеного вірусу, продукowanego зазначеною клітиною-хазяїном.

19. Спосіб за п. 18, у якому РНК вірус вирощують у клітинній культурі.

20. Спосіб за п. 18, у якому РНК вірус вирощують у яйцях.

21. Спосіб за будь-яким з пп. 17-20, у якому РНК вірус являє собою ортоміксовірус.

22. Спосіб за п. 21, у якому ортоміксовірус являє собою вірус грипу А.

23. Спосіб за п. 21, у якому ортоміксовірус являє собою вірус грипу В.

24. Спосіб за будь-яким з пп. 12-23, у якому зазначена клітина-хазяїн вибрана з групи, що включає: клітину нирки собаки Madin-Darby (MDCK), клітину VERO, клітину CV1, клітину COS-1, клітину COS-7 та клітину BHK-1.

25. Спосіб за п. 24, у якому клітина-хазяїн являє собою клітину VERO.

26. Спосіб за будь-яким з пп. 12-15, 17-22 та 24-25, у якому принаймні одна плазмід з плазмідної системи включає вірусний геномний сегмент штаму грипу A/PR/8/34.

27. Спосіб за будь-яким з пп. 12-15, 17-22 та 24-25, у якому принаймні одна плазмід з плазмідної системи включає вірусний геномний сегмент штаму грипу A/Ann Arbor/6/60.

28. Спосіб за будь-яким з пп. 12-14, 16-21 та 23-25, у якому принаймні одна плазмід з плазмідної системи включає вірусний геномний сегмент штаму грипу B/Ann Arbor/1/66.

29. Спосіб щеплення суб'єкта від інфекції мінус-ланцюгового РНК вірусу, де спосіб включає введення композиції, що містить мінус-ланцюговий РНК вірус, генерований плазмідною системою за будь-яким з пп. 1-10.

30. Спосіб за п. 29, у якому зазначений мінус-ланцюговий РНК вірус являє собою вірус грипу.

Ця заявка претендує на переваги [тимчасової заявки США №60/200679, поданої 28 квітня 2000р.], яка цілком включена сюди за посиланням.

Дослідження, що привели до цього винаходу, були підтримані грантами на проведення досліджень в галузі суспільної охорони здоров'я AI95357, AI29680, AI29559 та AI29680 від Національного інституту алергії та інфекційних хвороб. Отже, уряд Сполучених Штатів має певні права на цей винахід.

Даний винахід стосується розробки системи, основаної на мінімальній плазміді, для генерування інфекційних РНК-вірусів, краще вірусів грипу, з клонованої ДНК. Зокрема, ця багатоплазмідна pol I-pol II система сприяє генеруванню як рекомбінантних, так і реасортативних вірусів. У кращих варіантах втілення винахід включає восьмиплазмідну pol I-pol II систему для генерування вірусів грипу. Він може бути також застосований при виділенні інших РНК-вірусів цілком з клонованої кДНК.

Життєвий цикл РНК-вірусів

Геноми РНК-вірусів мають різні конфігурації, включаючи мономолекулярну чи сегментовану; одноститкову з (+)- чи (-)- полярністю або двоститкову. Однак, віруси мають дві істотні спільні ознаки: (1) геномні РНК повинні ефективно копіюватись у формі, яка може бути ефективно використана для збирання частинок вірусного потомства, і (2) повинні синтезуватись мРНК, які можуть бути ефективно трансльовані у вірусні протеїни. Загалом, РНК-віруси (за винятком ретровірусів) кодують та/або несуть у собі РНК-залежну РНК-полімеразу для каталізу синтезу нової геномної РНК (для збирання у потомство) та мРНК (для трансляції у вірусні протеїни). Оскільки еукаріотні клітини-хазяї типово не містять механізмів для реплікації РНК-матриці або для трансляції поліпептидів з "мінус"-ланцюгової чи дволанцюгової РНК-матриці, віруси, що містять ці нуклеїнові кислоти у своїх геномах, повинні нести у вірусній частинці протеїн РНК-

полімерази. З цієї причини депротейнізовані молекули РНК "мінус"-ланцюгових та дволанцюгових РНК-вірусів (без асоційованої РНК-полімерази) є неінфекційними. На відміну від них, депротейнізована РНК з геному "плюс"-ланцюгового РНК-вірусу є звичайно інфекційною, тому що кодовані вірусні протеїни придатні для трансляції клітинними механізмами хазяїна.

Для передачі вірусу геномна вірусна РНК повинна бути спакована у вірусні частинки. Деякі капсиди РНК-вірусів оточені ліпідними мембранами з інфікованих клітин-хазяїв, а інші мають зовнішню оболонку з вірусного протеїну без ліпідного бішару. Незважаючи на ці розбіжності між вірусними капсидами, процеси збирання потомства вірусних частинок та взаємодії протеїн/протеїн, що відбуваються під час збирання, є подібними. Вірусні протеїни загалом класифікують на структурні та неструктурні протеїни. Загалом, неструктурні протеїни беруть участь у геномній реплікації, регулюванні транскрипції та пакуванні. Структурні протеїни загалом виконують три типи функцій, включаючи: (1) зв'язування з геномною РНК (наприклад, нуклеокапсидний протеїн вірусу грипу А), (2) утворення містків між спакованою РНК та зовнішніми протеїнами (наприклад, матричний протеїн) та (3) зв'язування із зовнішнім вірусним шаром (наприклад, поверхневі протеїни, такі як гемаглютинін). Збирання у вірусні частинки забезпечує ефективне перенесення РНК-геному з одної клітини-хазяїна до іншої в одному хазяїні чи між різними організмами-хазяями.

Вірус грипу

Вірус грипу А (Orthomyxoviridae) є РНК-вірусом з "мінус"-кодуючим ланцюгом та сегментованим геномом. Геномні РНК містять одну чи кілька відкритих рамок зчитування, до 5'- та 3'-кінців яких приєднані некодуючі послідовності [Desselberger et al., *Gene*, 1980, 8:315]. Вірусні РНК у віріонах та інфікованих клітинах асоційовані з вірусним нуклеопротеїном (NP) та полімеразними протеїнами (PB1, PB2 і PA) з утворенням рибонуклеопротеїнових (РНП) комплексів (RNP) [Hsu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84:8140]. Генетичний склад цього вірусу дозволяє йому розвиватися шляхом рекомбінації генних сегментів з різних штамів; ця рекомбінація створює нові варіанти, для яких новоінфікований організм не має анамнестичної імунної реакції. Відомо, що з 15 гемаглютининів (HA) та 9 нейрамінідаз (NA) субтипів грипу, що циркулюють у морських птахів, три - H1N1, H2N2 та H3N2 - викликали пандемії у людей [Webster et al., *Microbiol. Rev.*, 1992, 56:152]. Немає свідчень того, що свині можуть виступати в ролі проміжного хазяїна ("змішувальна посуда") для генерування нових штамів, що є патогенними для людини [Scholtissek et al., *Virology*, 1985, 147:287]. Спалах грипу А H5N1 у Гонконгу у 1997р показав, що високопатогенні віруси грипу А можуть також передаватися людям безпосередньо від птахів [Claas et al., *Lancet*, 1998, 351:472; Suarez et al., *J. Virol.*, 1998, 72:6678; Subbarao et al., *Science*, 1998, 279:393; Shortridge, *Vaccine*, 1999, 17 (Suppl. 1): S26-S29]. Потенціал вірусів грипу А до генерування нових патогенних штамів з величезної кількості циркулюючих штамів у природних басейнах

вказує на те, що для боротьби з хворобою потрібний контроль за цими вірусами та розробка удосконалених антивірусотерапій та вакцин. Швидкість виникнення нових штамів вимагає контролю та розширення можливостей сучасної технології щодо продукування достатньої кількості вакцини проти нового ідентифікованого патогенного штаму для попередження епідемії чи пандемії.

Для вірусу грипу А зворотно-генетичні системи дозволили маніпулювати вірусним геномом [Palese et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93:11354; Neumann and Kawaoka, *Adv. Virus Res.*, 1999, 53:265]. На відміну від "плюс"-ланцюгових вірусів (наприклад, поліовірусу), "мінус"-кодуючі вірусні РНК (вРНК) вірусів грипу А є неінфекційними. Лише молекули вРНК, що мають капсиди з чотирьох протеїнів вірусного полімеразного комплексу (PB1, PB2, PA, NP) здатними ініціювати цикл вірусної реплікації та транскрипції. Після проникнення рибонуклеопротеїнів (РНП) до клітинного ядра асоційовані протеїни починають транскрипцію (-)-вРНК у мРНК та "плюс"-кодуючі комплементарні РНК - (+)-кРНК. Ці кРНК служать матрицями для синтезу вРНК. Першою зворотно-генетичною системою, розробленою для вірусу грипу А, був спосіб РНК-трансфекції [Luytjes et al., *Cell*, 1989, 59:1107; Enami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87:3802]. Після транскрипції вірусоподібної вРНК РНК-полімеразою Т7 та реконституції молекул вірусного рибонуклеопротеїну (вРНК) генетично змінені сегменти РНП були введені до еукаріотичних клітин шляхом трансфекції. Інфікування вірусом-помічником грипу призвело до генерування вірусів, які містили ген, що походив з клонованої кДНК. Однак присутність вірусу-помічника в трансфекції РНК та ДНК сильно обмежує практичне значення цих способів, оскільки для видалення вірусу-помічника потрібна система суворого добору.

Розробка РНК полімераза I (pol I) - керованого синтезу молекул вРНК *in vivo* дозволила здійснювати внутрішньоклітинне продукування РНК-комплексів [Neumann and Hobom, *Virology*, 1994, 202:477]. В цій системі, вірусоподібну кДНК вставляли поміж промоторною та термінальною послідовностями pol I [Zobel et al., *Nucl. Acids Res.*, 1993, 21:3607]. На відміну від транскрипції мРНК, синтезованих РНК-полімеразою II (pol II), pol I-генеровані РНК позбавлені як 5'-кепа, так і 3'-полі(А) кінця. Функціональні вРНП молекули можуть бути генеровані шляхом інфікування вірусом-помічником або котрансфекції плазмідами експресії протеїнів, що кодують PB1, PB2, PA чи NP [Neumann and Hobom, *supra*; Flick et al., *RNA*, 1996, 2:1046; Pleschka et al., *J. Virol.*, 1996, 70:4188; Zhou et al., *Virology*, 1998, 246:83].

Недавні дослідження продемонстрували, що плазміда-керована експресія усіх восьми вРНК з промотору pol I та коекспресія протеїнів полімеразного комплексу приводить до утворення інфекційного вірусу грипу А [Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96:9345; Fodor et al., *J. Virol.*, 1999, 73:9679]. Оскільки генерування вірусу грипу А, кероване виключно плазмідами, не потребує інфікування вірусом-помічником, система добору не потрібна, тому можна маніпулювати всіма ген-

ними сегментами без технічних обмежень. В системі, розробленій [Neumann et al. (supra)], вісім кДНК вставляли між промоторною послідовністю pol I людини (407п.н.) та термінальною послідовністю миші (174п.н.). Експресією чотирьох протеїнів РНП-комплексів керував промотор цитомегаловірусу людини. Трансфекція 12 плазмід до 10^6 клітин 293Т привела до виходу вірусу більше 10^3 бляшкоутворюючих одиниць (pfu); цю ефективність можна було збільшити до 5×10^7 pfu при трансфекції 17 плазмід. [Fodor et al. (supra)] розробили систему, в якій вісім кДНК вставляли між промоторною послідовністю pol I людини (250п.н.) та геномною рибозимною послідовністю вірусу гепатиту дельта для забезпечення точного 3'-кінця вРНК. Для експресії генів полімеразного комплексу використовували плазмід, що містять головний пізній промотор аденовірусу типу 2. Після трансфекції 12 плазмід експресії до клітин Vero з 10^6 трансфікованих клітин було виділено усього лише одну чи дві інфекційні вірусні частинки.

Однак система, що не містить вірусопомічника, описана [Neumann et al. (supra)], яка включала промотори pol I та pol II з кДНК вірусу грипу на різних плазмідах, потребувала конструювання та котрансфекції щонайменше 12 плазмід для виділення вірусу і 17 плазмід для ефективного виходу вірусу. Трансфекція клітин такою великою кількістю плазмід може обмежувати використання цієї системи клітинними лініями, які мають високу ефективність трансфекції. Можливість виділення вірусу з різних типів клітин може підвищити вихід вірусу шляхом посилення реплікації вірусу грипу А в цих клітинах та розширення кола клітин, придатних для продукування вакцин [Govorkova et al., J. Virol., 1996, 70:5519].

Таким чином, у фахівців існує потреба в ефективнішому генеруванні рекомбінантних вірусів грипу. Крім того, у фахівців також існує потреба в ефективному генеруванні реасортативних вірусів для продукування вакцин у відповідь на новий ідентифікований вірусний штам. Даний винахід задовольняє ці та інші потреби фахівців шляхом створення систем, в яких синтез сегментів "мінус"-ланцюга РНК вірусного геному (вРНК) та вірусної мРНК відбувається з одної матриці, тим самим зменшуючи до мінімуму кількість плазмід, потрібних для генерування вірусу і дозволяючи проведення ефективного та передбачуваного реасортменту.

Віруси Reoviridae

Віруси сімейства Reoviridae, включаючи віруси роду Rotavirus, мають дволанцюговий сегментований РНК-геном. Ротавірус людини є найпоширенішим вірусним агентом тяжкої дитячої діареї у Сполучених Штатах, спричиняючи приблизно 50000 госпіталізацій та від 20 до 50 смертей за рік при розрахункових втратах більше 1 мільярда доларів. У країнах, що розвиваються, ротавірус за оцінками відповідає за третину всіх асоційованих з діареєю госпіталізацій і спричинює щорічно приблизно 850000 смертей.

Існує подвійна система опису серотипів ротавірусу за реакцією нейтралізації, яка викликається двома вірусними протеїнами (VP) - VP7 та VP4. Серотипи VP7 позначаються як типи G, а сероти-

пи, виділені з VP4, позначаються як типи Р. На сьогодні у людей було знайдено щонайменше 10 серотипів G та щонайменше 7 серотипів Р. Оскільки гени VP4 та VP7 сегрегують окремо, нові ротавіруси генеруються шляхом реасортменту. У Сполучених Штатах найпоширенішими є серотипи Р1-Р4 та G1-G4; інші комбінації були описані у таких країнах як Індія та Єгипет. Перша ліцензована ротавірусна вакцина людини, вакцина резус-ротавірусу, була виготовлена для продукування серотип-специфічного захисту від чотирьох звичайних серотипів G1-G4. Однак, використання цієї вакцини було заборонено внаслідок зв'язку між вакцинацією та підвищеним рівнем кишкової непрохідності у осіб, які пройшли вакцинацію. Отже, існує потреба у продукуванні ротавірусної вакцини, що представляє всі G- та Р-субтипи і не має небажаних побічних ефектів. Даний винахід пропонує вектори (краще плазмід), способи та клітинні хазяї, які можуть бути використані для генерування ротавірусів виключно з клонованої кДНК.

Було визначено тринадцять первинних генних продуктів. Щоб запобігти плутанині та сприяти порівнянню з протеїнами інших родів Reoviridae з аналогічними функціями, використовували таку номенклатуру: згідно з міграцією під час аналізу способом SDS-PAGE, починаючи з найбільшого протеїну, структурним протеїном був наданий префікс "VP", а неструктурним протеїнам - префікс "NSP", з наведенням функції кожного протеїну у дужках. Наприклад, скорочення VP1(Pol) вказує на те, що найбільший протеїн у вірусних частинках є РНК-залежною РНК полімеразою. Сім структурних протеїнів збираються у вірусні частинки, які включають три шари структури: (1) внутрішня вірусна серцевина, що містить геном dsRNA, має три асоційовані з нею протеїни, два з яких - (VP1(Pol) та VP3(Cap)) є безпосередньо асоційованими з геномом, у той час як третій (VP2(T2)) утворює оболонку серцевини, (2) середня протеїнова оболонка віріону складається з 780 молекул VP6(T13), зібраних у 260 тримерних блоків, і (3) VP4 та VP7 утворюють зовнішню оболонку. Протеїн вістря VP4 містить трипсиновий сайт розщеплення, який є важливим для розщеплення на VP5 та VP8, причому таке розщеплення підвищує ефективність. Намагалися ввести до віріонів дві форми VP7, виділені з різних внутрішньорамкових рамок зчитування - VP7(1) та VP7(2).

Набагато менше відомо про функції шести неструктурних протеїнів. Аналогічно РНК-вірусам, очікується, що неструктурні протеїни відіграють важливу роль у реплікації, транскрипції і трансляції вірусних РНК та їх упаковок. Дійсно, на основі аналізів температура-чутливих вірусів у сегменті 8, висунуто гіпотезу про те, що NSP2(ViP) безпосередньо відіграє певну роль у вірусній реплікації. Вважається, що NSP3 зв'язується з консервативними послідовностями з 3'-кінця вірусних РНК та з клітинним кеп-зв'язуючим протеїном eIF4G, тим самим здійснюючи специфічну підвищуювальну регуляцію трансляції ротавірусних мРНК, які мають 5'-кеп структури, але не мають 3'-поліА-кінців. NSP1; мабуть, є неістотним, але можливо, що він відіграє активну роль у ротавірусній реплікації в клітинній культурі. NSP4, як вважається, бере

участь у вірусному морфогенезі. Два неструктурні протеїни - NSP5 та NSP6 - кодується двома різними рамками читування із сегменту 11, але їх функція у життєвому циклі вірусу невідома.

Цикл реплікації завершується за 10-12 годин при 37°C. Сучасні дані дають змогу припустити, що віруси можуть потрапляти до клітин шляхом рецептор-медіованого ендцитозу, але може існувати альтернативний механізм проникнення до клітини. Після проникнення до клітини-хазяїна зовнішня вірусна оболонка вивільняє транскрипційно-активну частинку у двох оболонках до цитоплазми інфікованої клітини. Віріон-асоційовані ферменти продукують 5'-кеповані неполіаденільовані мРНК, які є непроцесованими транскриптами "мінус"-ланцюга кожного сегмента геному віріону. Вірусні мРНК, утворені з кожного сегмента, виконують дві функції: по-перше, вони транлюються з генеруванням вірусних протеїнів, кодованих сегментом, і по-друге, вірусні мРНК є також матрицями для реплікації геному. Збирання сегментів геному відбувається шляхом добору різних вірусних мРНК, потрібних для утворення прекорової RI. Після збирання 11 мРНК відбувається синтез "мінус"-ланцюга, який проходить у "коровій RI" та VP6(T13)-RI, які є присутніми у "віроплазмах", виявлених у цитоплазмі інфікованої клітини. Наступні стадії морфогенезу віріонів потомства є унікальними для ротавірусів і зв'язані з пупкуванням двох шарової частинки до ендоплазматичного ретикулуму в результаті процесу, у якому бере участь NSP4. Це призводить до тимчасового утворення оболонки частинки, яка втрачається під час кінцевих стадій дозрівання, на яких додається зовнішня оболонка віріону з VP4 та VP7.

Сегментований геном, геномна структура з високим ступенем впорядкованості та складний цикл реплікації є великими проблемами розробки зворотнo-генетичної системи для генерування ротавірусів. Однак даний винахід може бути використаний для простого та зручного генерування ротавірусів.

Вакцини грипу

Вакцини грипу, ліцензовані нині установами охорони здоров'я до використання у Сполучених Штатах та Європі, є інактивованими вакцинами грипу. Віруси, що представляють епідеміологічно важливі штами грипу А та грипу В, вирощують у курячих яйцях з ембріонами і вірусні частинки згодом очищають та інактивують хімічними засобами. Кожний рік Всесвітня організація охорони здоров'я обирає субтипи, вірогідність циркуляції яких є найбільшою: зараз це два штами грипу А-(H1N1) та (H3N2), і штам В.

Для продукування безпечної та ефективної вакцини важливо, щоб обрані штами вакцин були тісно споріднені зі штамами, що циркулюють, тим самим забезпечуючи здатність антитіл у вакцинованого населення нейтралізувати антигенетично подібний вірус. Однак не всі віруси, тісна спорідненість яких була встановлена, є придатними для продукування вакцини, оскільки вони погано ростуть в яйцях. Тому бажано спробувати генерувати реасортативний вірус з високими показниками росту для поєднання високого виходу вірусу лабораторного штаму (A/PR/8/34) (H1N1) з антигенни-

ми характеристиками передбачуваного патогенного штаму. На жаль, коінфікування двома вірусами грипу, що містять вісім сегментів, призводить до генерування теоретично $2^8=256$ різних вірусів потомства. Для одержання вірусу з високими показниками росту та потрібними антигенами глікопротеїну потрібний метод селекції для усунення відповідних генних сегментів з батьківського лабораторного штаму з високими показниками росту. Процедура селекції для одержання вірусу з відповідними глікопротеїнами та верифікація генної сукупності є трудомісткою задачею, що потребує багато часу. Хоч система РНП-трансфекції [Luytjes et al., Cell, 1989, 59:1107] зменшує кількість вірусів потомства, потреба у надійному способі селекції залишається актуальною.

Живі вакцини атенуйованих вірусів грипу, що вводяться інтраназально, індують місцевий, муккозальний, клітинно-медіований та гуморальний імунітет. Адаптовані холодом (са) реасортативні (CR) віруси, що містять шість внутрішніх генів живого атенуйованого грипу A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) чи B/Ann Arbor/1/66, та гемаглютинін (HA) і нейромінідазу (NA) сучасних вірусів грипу дикого типу є, мабуть, надійно атенуйованими. Ця вакцина може бути ефективною для дітей та молоді. Однак вона може бути надто атенуйованою для стимулювання ідеальної імунної відповіді у людей похилого віку, які складають найбільшу групу з 20000-40000 осіб у США, що вмирають кожного року внаслідок інфекції грипу. Хоч послідовності внутрішніх генів са-вірусів були описані, внесок кожного сегмента до атенуйованого фенотипу все ще не визначений. Ця інформація може бути одержана лише шляхом послідовного введення до вірусу специфічних визначених атенувальних мутацій. Хоч метод РНП-трансфекції дозволяє введення мутації до геному грипу, потреба у системі селекції та технічні складнощі реконституції вірусних РНП in vitro обмежують її використання для маніпуляцій з внутрішніми генами.

Таким чином, у фахівців існує потреба у розробці рекомбінантних вакцин грипу, які дозволяють уникнути використання вірусу-помічника, добре ростуть у культурі (яйцях чи клітинній культурі), дозволяють надійно розробляти реасортативні віруси, що можуть бути розмножені для розробки нової вакцини і забезпечують систематичну мутацію для розробки живих атенуйованих вірусних штамів для інтраназальної вакцинації. Даний винахід спрямований на задоволення цих та інших потреб рівня техніки.

У даному винаході переважно запропоновано плазмиду експресії, що включає промоторну та термінальну послідовності РНК полімерази I (pol I), які вставлені між промотором РНК полімерази II (pol II) та сигналом поліаденілювання. Плазмід експресії названа тут системою pol I-pol II, системою подвійного промотора експресії чи плазмідом подвійного промотора експресії. Така плазмід оптимально містить сегмент вірусного гена РНК-вірусу, вставлений між промотором pol I та сигналом термінації. Краще, якщо РНК-вірус є вірусом грипу (наприклад, вірусом грипу А чи грипу В).

Винахід включає дві системи на основі плазмід для генерування інфекційних РНК-вірусів з клоно-

ваних генів чи кДНК. В одній системі (двонаправлена система) ген чи кДНК розташований між верхнім промотором pol II та нижнім промотором pol I. Транскрипція гена чи кДНК з промотора pol II продукує кеповану "плюс"-кодуючу вірусну мРНК, а транскрипція з промотора pol I продукує "мінус"-кодуючу некеповану вРНК. В інших системах (односпрямованих системах) ген чи кДНК розташований нижче промотора pol I та pol II. Промотор pol II продукує кеповану "плюс"-кодуючу вірусну мРНК, а промотор pol I продукує некеповану "плюс"-кодуючу вірусну кРНК.

Мінімальна система на основі плазмиди за винаходом дозволяє генерувати інфекційні РНК-віруси з клонованої вірусної кДНК. Така система включає набір плазмід, у якому кожна плазміда включає один автономний вірусний геномний сегмент РНК-вірусу. В кожній плазміді вірусна кДНК, що відповідає автономному вірусному геномному сегменту, вставлена між промоторною та термінальною послідовностями РНК полімерази I (pol I), тим самим приводячи до експресії вРНК, яка у свою чергу вставляється між промотором РНК полімерази II (pol II) та сигналом поліаденілювання, тим самим призводячи до експресії вірусної мРНК. Отже, ця система використовує технологію двонаправленої плазмиди і дозволяє здійснювати ефективний реасортмент з метою одержання РНК-вірусів, що відповідають сучасним патогенним штамам, які циркулюють, наприклад, для генів грипу NA та HA у фоновому штамі, добре адаптованому для вирощування у клітинній культурі чи з атенуйованого штаму, або обом. Краще, якщо вірус є вірусом грипу А чи вірусом грипу В.

Винахід пропонує клітини-хазяї, що включають систему на основі плазмиди для генерування інфекційних віріонів та способи продукування віріони РНК-вірусу, що включають культивування клітини-хазяїна за умов, які дозволяють продукування вірусних протеїнів та вРНК.

Система на основі плазмиди, клітини-хазяї та спосіб продукування віріонів є особливо придатними для виготовлення вакцини, специфічної до РНК-вірусу. Такі способи включають очищення віріонів. Очищені віріони можуть бути інактивовані або атенуйовані. Вакцини за винаходом можуть бути використані для вакцинації проти РНК-вірусної інфекції. Наприклад, захисна доза вакцини, що включає інактивовані віріони, може бути введена шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. За іншим варіантом, захисна доза вакцини, що включає атенуйовані віріони, може бути введена особі інтраназально.

Винахід далі пропонує віріони реасортативно-го вірусу та композиції вакцин, що містять такі віріони, включаючи інактивовані та атенуйовані віріони.

За іншим кращим варіантом втілення, винахід пропонує спосіб генерування атенуйованого РНК-вірусу. Цей спосіб включає проведення мутації одного чи кількох вірусних генів у системі на основі плазмиди, з подальшим визначенням того, чи атенуйовані інфекційні РНК-віруси, продуковані системою. Такі атенуйовані віруси можуть бути використані для розробки інтраназальних вакцин, включаючи інтраназальні вакцини з підвищеною

здатністю викликати захисний імунітет у популяціях осіб похилого віку та інших, що несприйнятливі до сучасних атенуйованих вакцин.

Фігура 1. Схематичне зображення системи транскрипції pol I-pol II для синтезу вРНК та мРНК. кДНК кожного з восьми сегментів вірусу грипу вставляють між промотором pol I (p_{in}) та термінатором pol I (t_i). Ця одиниця транскрипції pol I граничить з боків з промотором pol II (P_{ICMV}) цитомегаловірусу людини та сигналом поліаденілювання (a_{HBG}) гена, що кодує бичачий гормон росту. Після трансфекції восьми плазмід експресії синтезують два типи молекул. З промотора pol I людини клітинна pol I синтезує "мінус"-кодуючу вРНК. Синтезована вРНК містить некодуючу ділянку (NCR) з 5'-та 3'-кінців. Транскрипція за допомогою pol II дає мРНК з 5'-кеп-структурами та 3'-поліА-кінцем; ці мРНК транслюються у вірусні протеїни. АТГ вірусної кДНК є першим АТГ нижче сайту початку транскрипції pol II.

Фігура 2. Система восьми плазмід pol I-pol II для генерування вірусу грипу А. Вісім плазмід експресії, що містять вісім вірусних кДНК, вставлених між промотором pol I людини та промотором pol II (див. Фігуру 1), трансфікують до еукаріотних клітин. Оскільки кожна плазміда містить два різних промотора, клітинні pol I та pol II обидві будуть транскрибувати плазмідну матрицю, гадано у різних ядерних компартментах, що приводить до синтезу вірусних мРНК та вРНК. Після синтезу протеїнів вірусного полімеразного комплексу (PB1, PB2, PA, NP) ініціюється цикл вірусної реплікації. Зрештою, збирання усіх вірусних молекул безпосередньо (pol II-транскрипція) чи опосередковано (pol I-транскрипція та вірусна реплікація), що утворюються за механізмами клітинної транскрипції та трансляції, приводить до взаємодії усіх синтезованих молекул (вРНК та структурні протеїни NA, NA, M1, M2, NS2/NEP) з генеруванням інфекційного вірусу грипу А.

Фігури 3А та 3Б. Схематичне зображення способу, розробленого для конструювання та трансфекції восьми плазмід експресії з метою виділення A/Teal/HK/W312/97 (H6N1). А. Вірусну РНК екстрагували з вірусних частинок. Проводили полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскриптазою (RT-PCR) з використанням праймерів, що містять сегмент-специфічні нуклеотиди та послідовності для ендонуклеаз рестрикції BsmBI чи BsaI типу IIs. Вісім вірусних фрагментів PCR гідролізують BsmBI чи BsaI та вставляють до pHW2000 (лінеаризованого за допомогою BsmBI). Ця інсерція приводить до одержання восьми експресійних конструктів, у яких вірусні кДНК точно злиті з промотором та термінатором pol I (для сегмента PB2 у чорних прямокутниках показані вірусні термінальні послідовності AGC...ACT). В. Вісім плазмід експресії з промотором pol I та промотором pol II містять по одній копії кожного з восьми сегментів вірусних кДНК. Відкриті рамки зчитування для 10 вірусних протеїнів граничать з боків із сегмент-специфічними некодуючими ділянками (сірі прямокутники). Оскільки використаний промотор pol I людини виявляє високу активність у клітинних лініях, що походять від людини чи споріднених видів, клітини 293T людини культивували спільно зі

стандартною клітинною лінією, що використовується для грипу А (MDCK-клітини). Тоді віруси, продуковані у клітинах 293Т після трансфекції можуть інфікувати MDCK-клітини та реплікувати.

Фігури 4А та 4Б. Характеризація виділених вірусів методом RT-PCR.

А. Екстрагували РНК з вірусних частинок після двох пасажів надосадової рідини трансфікованих клітин (див. Таблиці 1 та 2) на MDCK-клітинах. Проводили RT-PCR з використанням праймерів, специфічних щодо генного сегмента NS та вРНК, екстрагованої з віріонів. Використані NS-праймери не були штам-специфічними і, таким чином, дозволяли ампліфікацію будь-якого NS-сегмента грипу А. Продукти реакції піддавали електрофорезу на 2% агарозному гелі. Для того, щоб впевнитися у тому, що ампліфіковані фрагменти ДНК походили з вРНК, а не з плазмідної ДНК, перенесеної з трансфікованих клітин, одну реакцію проводили без додання зворотної транскриптази (-). Смути 1 та 2, рекомбінантні A/Teal/HK/W/312/97 (Таблиця 1); смуги 3 та 4, М-реасортмент (Таблиця 2); смуги 5 та 6, NS-реасортмент (Таблиця 2); смуги 7 та 8, рекомбінантний вірус A/WSN/33 (Таблиця 1); смуги 9 та 10, квадрупольний реасортмент (Таблиця 2). В. Гідроліз за допомогою NcoI фрагментів, показаних на А. Ідентичність фрагментів NS була також верифікована секвенуванням ампліфікованого продукту (не показано).

Фігура 5. Односпрямована система транскрипції РНК pol I-pol II. В односпрямованій системі транскрипції pol I-pol II вірусну кДНК вставляють у "плюс"-кодуючий орієнтації між промотором pol I людини (p_{IH}) та термінальною послідовністю (t_t). Ця одиниця транскрипції pol I у цілому граничить з боків з промотором pol II (p_{HCMV} : безпосередній ранній промотор цитомегаловірусу людини) та сайтом поліаденілювання гена, що кодує бичачий гормон росту (a_{HBGH}). Після трансфекції очікується синтез двох типів транскриптів РНК. "Плюс"-смысловая кРНК з трифосфатною групою з її 5'-кінця, синтезована pol I, та "плюс"-смысловая мРНК, синтезована pol II, з 5'-кеп-структурою та полі(А)-термінальною ділянкою з її 3'-кінця. Обидва елементи мРНК є потрібними для ефективної трансляції.

Фігура 6. Клонуючий вектор рНВ11 з pol I та pol II промоторами, розташованими тандемом. Плазміда містить 225п.н. промотор pol I РНК людини (p_{IH}) та 33п.н. мишачий термінатор (t_t). Послідовності промотора pol I та термінатора граничать з боків з промотором РНК полімерази II (p_{HCMV}) цитомегаловірусу людини та сигналом поліаденілювання (a_{HBGH}) гена, що кодує бичачий гормон росту. Для вставлення вірусної кДНК між промотором pol I та термінатором були введені два сайти рестрикції BsmBI (позначені підкреслюванням). Гідроліз вектора за допомогою BsmBI створив фрагмент вектора з липкими, але некомплементарними виступаючими кінцями. Конструкція цього вектора дозволяє здійснити точне злиття вірусної кДНК у "плюс"-смысловій орієнтації стосовно послідовностей промотору pol I та термінатора. Для розмноження у *E.coli* плазміда має сайт початку реплікації (ori), а для селекції в ампіцилінмісному

середовищі плазміда містить ген бета-лактамази (bla)

Фігури 7А та 7Б. Система подвійного промотора для генерування інфекційних РНК-вірусів. Оскільки РНК-віруси функціонують як клітинні паразити, вони повинні оптимізувати стратегію використання клітин-хазяїв для експресії своєї генетичної інформації. Всі РНК-віруси повинні синтезувати мРНК, придатні до трансляції у протеїни. Загалом, синтезовані протеїни потрібні для реплікації, транскрипції та продукування нових вірусних частинок потомства. Для ефективної реплікації геномних РНК треба виготовити РНК-транскрипти з точними 5'- та 3'-кінцями.

Дана система включає зовнішню та внутрішню одиниці транскрипції. Внутрішня одиниця транскрипції включає промотор ($p(+РНК)$ чи $p(-РНК)$), краще, промотор pol I. кДНК РНК-вірусів складається з однієї чи кількох відкритих рамок читання (ORF), які граничать з некодуючими ділянками (NCR). Краще, якщо між вірусною кДНК та промотором не розташовано ніяких послідовностей. Відсутність проміжних послідовностей є суттєвою, тому що 5'- та 3'-кінці геномної вРНК звичайно містять послідовності, що розпізнаються вірусними протеїнами, потрібними для транскрипції та реплікації; додаткові невірусні послідовності типово заважають ефективному розпізнаванню та реплікації вРНК вірусними протеїнами. Відсутність проміжних послідовностей дозволяє ефективне використання транскрибованих (-)-ланцюга РНК (А) чи (+)-ланцюга РНК (В) протеїнами вірусної полімерази. Зовнішня одиниця транскрипції має промотор ($p(мРНК)$), краще, промотор pol II, який керує транскрипцією мРНК з кДНК; мРНК включає 5'-послідовності (наприклад, метил-Г-кепи) та 3'-послідовності (наприклад, полі-А термінальні ділянки), потрібні для ініціації трансляції та продукування вірусних протеїнів. Оскільки процес трансляції є толерантним до додаткових послідовностей між промотором, зовнішньою одиницею транскрипції та вірусною кДНК, то присутність проміжних послідовностей з внутрішньої одиниці транскрипції суттєво не заважає трансляції мРНК.

Ця система може бути модифікована та удосконалена для РНК-вірусів, що відрізняються від вірусу грипу, шляхом використання різних промоторів у внутрішній одиниці трансляції (наприклад, pol II, pol III, T3, SP6, T7 чи будь-який інший промотор для ДНК-залежної РНК-полімерази) і термінальних елементів чи рибозимів для внутрішньоклітинного синтезу вірусної РНК з точними 5'- та 3'-кінцями (обговорюється далі). Для генерування вірусної РНК з точними кінцями можуть бути використані молоткоподібні (Hammerhead) рибозими чи рибозим вірусу гепатиту дельта (HDV) [Schnell et al., EMBO J., 1994, 13:4195; Pleschka et al., J. Virol., 1996, 70:4188; Herald, J. et al., J. Virol., 2000, 74(14): 6394-400].

Зовнішня одиниця трансляції може включати промотор pol I чи III, промотор T7 РНК-полімерази, промотор T3 РНК-полімерази, промотор SP6 РНК-полімерази або будь-який інший промотор для ДНК-залежної РНК-полімерази. Якщо промотор у внутрішній одиниці трансляції керує синтезом транскрипту, у якому відсутній метил-Г-кеп, то

внутрішній сайт входження рибосом (Internal Ribosome Entry Site, IRES) може бути розташований з 5'-кінця кодуєчої послідовності кДНК для сприяння ініціації трансляції (обговорюється далі).

Слід відзначити, що вектор рНВ2000 має промотор Т7 між CMV-промотором та сайтом термінації. Транскрипти пол II синтезуються у ядрі, тоді як транскрипти Т7 синтезуються у цитоплазмі клітин, що експресують РНК-полімеразу Т7. Отже, транскрипти, що походять від кількох різних промоторів у зовнішній одиниці транскрипції, можуть бути продуковані з утворенням різних мРНК. Таким чином, плазмиди експресії, одержані з рНВ2000, дозволяють здійснювати швидку оцінку оптимальності використання промоторів пол II чи Т7 або їх комбінації для синтезу РНК вірусів з "плюс"-ланцюгом, що мають внутрішній сайт входження рибосом (IRES).

Фігура 8. Система подвійного промотора для генерування (+)-ланцюгових РНК-вірусів. Даний винахід може бути також адаптований для продукування вірусів, що включають "плюс"-ланцюговий одномолекулярний геном, таких як вірус гепатиту С. За цим варіантом втілення, кДНК, що включає геном вірусу гепатиту С (приблизно 9500 нуклеотидів) вставляють у конструкт, що дозволяє ефективну внутрішньоклітинну транскрипцію кДНК у мРНК та непроцесовану "мінус"-РНК (двоспрямований підхід) чи мРНК та непроцесовану "плюс"-РНК (односпрямований підхід). кДНК складається з однієї відкритої рамки зчитування (ORF), яка граничить з боїв з некодуєчими ділянками (NCR). На фігурі показана плазмідна експресія, що містить двоспрямовану систему. Непроцесовану кДНК вставляють між промоторною пол I (p_I) та термінальною послідовностями (t_i), що приводить до синтезу після трансфекції непроцесованої (-)-ланцюгової РНК.

Внутрішня одиниця транскрипції граничить з боїв із зовнішньою одиницею транскрипції, що має промотор (p(мРНК)) для проведення синтезу мРНК. Краще, цей промотор є промотором пол II. Однак, якщо синтезована РНК має внутрішній сайт входження рибосом (IRES), то промотор пол II може бути замінений на промотори пол I, пол III, SP6, Т7 чи Т3 (використання промоторів Т3 чи Т7 потребує експресії протеїнів Т3- чи Т7-полімерази шляхом котрансфекції плазмиди, що кодує полімерази, або використання стабільної клітинної лінії, що експресує полімерази). На 3'-кінці зовнішньої одиниці транскрипції використовують полі А-сигнал або вставлену полі А послідовність для забезпечення поліА-термінальної ділянки у синтезованій мРНК.

Одержана мРНК трансклюється у великий поліпротеїновий прекурсор, який розщеплюється ко- та післятрансляційно з утворенням індивідуальних структурних та неструктурних вірусних протеїнів.

Неструктурні протеїни NS5a та NS5b, які є протеїнами РНК-залежної РНК-полімерази, використовують (-)-РНК, синтезовану внутрішньою одиницею транскрипції як матрицю для ініціації циклу вірусної реплікації/транскрипції. Таким чином, продукується (+)-РНК/мРНК, яка використовується для трансляції у протеїн. Зрештою, гене-

руються інфекційні віруси, що містять (+)-РНК разом з вірусними структурними протеїнами.

Фігура 9. Система пол I-пол II для генерування вірусу парагрипу людини III. Даний винахід може бути використаний для продукування вірусу парагрипу III, який включає "мінус"-ланцюговий одномолекулярний РНК-геном. Вірусна кДНК може бути вставлена до системи пол I-пол II у смисловій чи антисмисловій орієнтації. На Фігурі представлена односпрямована система. Промотор пол I керує синтезом кРНК, а промотор пол II керує синтезом мРНК. За цим варіантом втілення, промотор пол II продукує поліцистронну мРНК, з якої перша відкрита рамка зчитування ефективно трансклюється у нуклеокапсидний протеїн (NP). Цей протеїн є потрібним для реплікації. Готують плазмиди, що кодуєть L- та Р-протеїн, що також є суттєвими для реплікації та транскрипції (але не трансклюється ефективно з поліцистронної мРНК), які котрансфкують на окремих плазмідах експресії. У порівнянні із зворотно-генетичною системою, розробленою [Durbin, A.P. et al., Virology, 1997, 235(2):323-332], система пол I-пол II має кілька переваг. Завдяки експресії NP з тієї самої кДНК, ця мінімальна плазмідна система потребує конструювання та трансфекції лише трьох плазмід замість чотирьох для генерування вірусу парагрипу III цілком з клонованої кДНК. На відміну від зворотно-генетичних систем, основаних на транскрипції *in vivo* з Т7-промотора, система пол I-пол II повністю керується еукаріотними ДНК-залежними РНК-полімеразами, які присутні у кожній клітині. Крім того, інфікування вірусом коров'ячої віспи, який керує експресією Т7 РНК-полімерази, потребує використання клітин, що є пермісивними для вірусу коров'ячої віспи (клітини HeLa чи їх похідні, такі як клітини Нер-2), але не оптимальні для росту вірусу парагрипу людини, тим самим обмежуючи корисність цього підходу для генерування інфекційного вірусу. Тяжкі цитопатичні ефекти вірусу коров'ячої віспи та вимоги безпеки, потрібні при використанні інфекційних агентів, є небажаними ознаками цієї системи. Використання системи пол I-пол II усуває потребу у інфікуванні вірусом та дозволяє використовувати клітини LLC-MK2 для трансфекції та вирощування вірусу парагрипу III людини, тим самим створюючи технологію генерування атеноування вірусів у більш простий та безпечний спосіб.

Фігура 10. Система на основі плазмиди для генерування ротавірусу з клонованої сДНК. Ця система може бути використана для генерування вірусів з сегментованими дволанцюговими РНК-геномами (наприклад, ротавірус). Вона може бути застосована, наприклад, до вірусів, що є членами сімейства Reoviridae (10,11,12 сегментів dsРНК) чи Birnaviridae (2 сегменти dsРНК). Досі для вірусів сімейства Reoviridae не існувало зворотно-генетичних систем. Ця Фігура ілюструє, як з використанням даного винаходу можуть бути генеровані ротавіруси, що мають 11 сегментів dsРНК, але аналогічні системи можуть бути використані для членів родів Orbivirus (10 сегментів dsРНК) чи Orthoreoviruses (12 сегментів dsРНК).

Наведений далі опис ілюструє генерування ротавірусу A/SA11 цілком з клонованої кДНК. Були визначені усі 11 сегментів дволанцюгового РНК-

геному ротавірусу мавп. dsРНК у геномі мають довжину від 3302п.н. до 663п.н., а розмір повного геному становить 18550п.н. Сегменти геному пронумеровані 1-11 у порядку підвищення рухомості, визначеної шляхом аналізу за методом PAGE (електрофорез на поліакриламідному гелі). Сегменти мають повністю спаровані основи, і "плюс"-смысловий ланцюг містить структуру 5'-термінального кепу (m7GpppGmGPy), але не має сигналу поліаденілювання поблизу його 3'-кінця. Всі геномні сегменти мають короткі консервативні 5'- та 3'-термінальні послідовності з 10-нуклеотидною консенсусною послідовністю на 5'-кінці та 8-нуклеотидною консенсусною послідовністю на 3'-кінці. З внутрішнього боку ці термінальні ділянки в кожному гені безпосередньо граничать з другою консервативною ділянкою розміром щонайменше 30-40 нуклеотидів, які є сегмент-специфічними. 5'-нетрансльовані ділянки (NTRs) змінюються за довжиною, але всі є меншими за 50 нуклеотидів і в усіх сегментах після NTRs за першим AUG йде щонайменше одна довга відкрита рамка зчитування. Сегменти 9 та 11 кодуєть два протеїни. 3'-NTRs відрізняються за довжиною в інтервалі від 17 nts (сегмент 1) до 182 nts (сегмент 10).

Ротавірусна кДНК клонується в систему з подвійним промотором, краще, систему pol I-pol II. Після трансфекції одержаних плазмід до придатних клітин-хазяїнів продукуються вірусні РНК та протеїни, які приводять до утворення інфекційного ротавірусу. Краще, для продукування ротавірусу використовується односпрямована система транскрипції. Використання цього підходу приводить до внутрішньоклітинного синтезу 11 (+)-РНК молекул ротавірусного геному, які мають трифосфати на своїх 5'-кінцях. Експресія вірусоподібної мРНК приводить до експресії вірусних протеїнів. Вірусний протеїн VP3(кеп), який виявляє гуанілілтрансферазну та метилтрансферазну активність, каталізує приєднання 5'-кеп-структур до усіх 11 ротавірусних (+)-РНК [Chen D., et al., *Virology*, 1999, 265:120-130]. Дійсно, раніше було показано, що очищений VP4(кеп), що є аналогом ротавірусного VP3(кеп) вірусу катаральної лихоманки овець (BTV), може приєднувати кеп-структури до вірусоподібної (+)-РНК in vitro [Ramadevi N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(23): 13537-42]. Очікується, що транскрипція in vivo кДНК та внутрішньоклітинна експресія протеїну VP3(Kep) приводить до генерування кепованих РНК для всіх 11 ротавірусних геномних сегментів. Ці мРНК трансклюються у вірусні протеїни або спакуюються у передкор-RI. Після формування частинок VP6(T13)-RI "плюс"-смыслова мРНК використовується як матриця для синтезу (-)-РНК. Зрештою, приєднання VP4 та VP7 в ході морфогенезу приводить до утворення інфекційних віріонів потомства.

Оскільки ефективно ініціювання реплікації та морфогенез можуть бути залежними від оптимальної концентрації кожного з вірусних протеїнів, може бути бажаним генерувати окремі плазмиди для синтезу РНК та експресії протеїнів. Однак, оскільки рівень експресії протеїнів може бути оптимізований шляхом змін у кількості плазмід у клі-

тині-хазяїні або шляхом використання різних промоторів для синтезу мРНК, використання двох плазмід для одного сегмента навряд чи буде необхідним для більшості генів. Оскільки (+)-РНК синтезується з (-)-РНК, внутрішньоклітинна експресія (-)-РНК та протеїну може привести до генерування компетентних одиниць реплікації, які продукують вірусну мРНК. Таким чином, система подвійного промотора дозволяє створити мінімальну плазмідну систему, яка включає значно меншу кількість плазмід порівняно з 22, що були б необхідними, якби плазмиди для експресії РНК та протеїну знаходились на окремих плаزمідах. Генерування ротавірусу може бути здійснене у спосіб, аналогічний до того, що використовується для продукування вірусу грипу А.

Фігури 11А-Г. Реплікація та синтез мРНК геномів РНК-вірусу.

(А) Здійснюють синтез мРНК протеїнами вірусної полімерази шляхом інфікування (-)-ланцюговими вірусами: одна чи дві мРНК для сегментованих РНК-вірусів або численні мРНК для вірусів з мономолекулярними геномами. Механізми антiterмінації приводять до синтезу непроцесованих (+)-ланцюгів, які можуть бути скопійовані у (-)-геномну РНК.

(Б) Сегментовані геноми амбісмыслових РНК-вірусів копіюються з утворенням однієї мРНК; друга РНК синтезується з комплементу.

(В) У клітинах, інфікованих дволанцюговими РНК-вірусами, мРНК, що синтезовані першими, можуть бути трансльовані у протеїн або використовуватись як матриці для синтезу (-)-ланцюгів, з утворенням дволанцюгової геномної РНК.

(Г) Для (+)-ланцюгових вірусів геномна РНК є також мРНК і копіюється у (-)-ланцюгову РНК, що може бути скопійована у (+)-геномну РНК. мРНК деяких (+)-РНК вірусів не містять поліА термінальної ділянки. У деяких сімействах продукуються одна чи кілька субгеномних РНК.

Життєвий цикл усіх РНК-вірусів включає синтез РНК та збирання вірусних частинок після синтезу протеїну; ці функції утворюють концептуальну основу зворотно-генетичних систем за даним винаходом, які можуть бути використані для продукування РНК-вірусів з клонованої кДНК. Даний винахід спрощує та удосконалює існуючі на даний час зворотно-генетичні системи шляхом створення системи подвійного промотору для продукування "мінус"-ланцюгових сегментованих вірусів (наприклад, грипу А, грипу В, Bunyaviridae), несегментованих "мінус"-ланцюгових РНК-вірусів (наприклад, Paramyxoviridae, Mononegavirales), дволанцюгових РНК-вірусів (наприклад, Reoviridae, Bimaviridae) та "плюс"-ланцюгових РНК-вірусів (наприклад, Flaviviridae, Picomaviridae, Coronaviridae, Togaviridae). Оскільки система за даним винаходом використовує єдину вірусну кДНК для синтезу як протеїну, так і геномної РНК, ця система зменшує кількість плазмід, потрібних для продукування вірусу, і дозволяє швидко та дешево розробляти вакцини.

Якщо вірус, що має сегментований РНК-геном, має бути продукований з використанням даного винаходу, то вірусна кДНК, що відповідає кожному гену у цільовому геномі, вставляється до плазмиди

експресії за винаходом. Винахід включає систему експресії, основу на двоспрямованій плазміді, та систему експресії на основі односпрямованої плазміді, у яких кДНК вставлена між послідовностями промотора РНК-полімерази I (pol I) та термінатора (внутрішня одиниця транскрипції). Ця одиниця транскрипції pol I у цілому граничить з промотором РНК-полімерази II (pol II) та сайтом поліаденілювання (зовнішня одиниця транскрипції). У односпрямованій системі, промотори pol I та pol II розташовані вище кДНК і продукують "плюс"-смыслову некеповану кРНК (починаючи з промотора pol I) та "плюс"-смыслову кеповану мРНК (починаючи з промотора pol II). Промотор pol I₁ термінальна послідовність pol I, промотор pol II та сигнал поліаденілювання в односпрямованій системі можуть бути названі такими, що мають "орієнтацію зверху вниз". У двоспрямованій системі, промотори pol I та pol II знаходяться з протилежних боків кДНК, причому верхній промотор pol II продукує "плюс"-смыслову кеповану мРНК, а нижній промотор pol I "мінус"-смыслову некеповану вірусну РНК (вРНК). Ці системи pol I-pol II починають з ініціювання транскрипції двох клітинних ферментів РНК-полімерази зі своїх власних промоторів, гадаю, у різних компартментах ядра. Послідовності промотора pol I та термінатора pol I у двоспрямованій системі можуть бути позначені як такі, що мають "орієнтацію знизу уверх", тоді як промотор pol II та сигнал поліаденілювання у двоспрямованій системі можуть бути названі такими, що мають "орієнтацію зверху вниз".

Якщо цільовий вірус включає "плюс"-ланцюговий сегментований РНК-геном, то промотор pol I краще розташований вище кДНК у внутрішній одиниці транскрипції (односпрямована система). За цим варіантом втілення, генерується "плюс"-ланцюгова РНК для прямого включення до нових вірусів. Однак, до обсягу винаходу входять варіанти втілення, у яких цільові віруси, що включають "мінус"-ланцюгові сегментовані РНК-геноми, продукуються з використанням односпрямованої системи.

Якщо цільовий вірус включає "мінус"-ланцюговий сегментований РНК-геном, то промотор pol I краще розташований нижче кДНК у внутрішній одиниці транскрипції (двоспрямована система). За цим варіантом втілення, генерується "мінус"-ланцюгова РНК для прямого включення до нових вірусів. До обсягу даного винаходу входять варіанти втілення, у яких цільові віруси включають "плюс"-ланцюгові сегментовані РНК-геноми, що продукуються за допомогою двоспрямованої системи.

Даний винахід може бути також використаний для продукування вірусів, які включають інфекційний чи неінфекційний несементований РНК-геном (одноланцюгові чи дволанцюгові). Загалом, просте введення інфекційної вірусної геномної РНК до клітини-хазяїна є достатнім для того, щоб спричинити ініціювання життєвого циклу вірусу усередині клітини з подальшим продукуванням цілих вірусів. Наприклад, просте введення пікорнавірусної геномної ДНК до клітини-хазяїна є достатнім для того, щоб спричинити генерування повних пікорнавірусів. Ініціювання життєвого циклу вірусу, що вклю-

чає неінфекційну геномну РНК, типово потребує додаткового введення інших вірусних протеїнів, які звичайно переносяться у вірусній частинці разом з геномом. Наприклад, вірус парагрипу III несе РНК-залежну РНК-полімеразу, присутність якої є необхідною у новоінфікованій клітині для ініціювання реплікації вірусної геномної РНК та транскрипції вірусних мРНК; у відсутності полімерази геномна РНК парагрипу III є неінфекційною. За варіантами втілення даного винаходу, у яких генеруються віруси, що включають інфекційні несементовані геномні РНК, просте введення плазміді подвійної експресії за винаходом, яка несе нуклеїнові кислоти, що включають вірусний геном, до придатної клітини-хазяїна є достатнім для спричинення генерування повних вірусів. За варіантами втілення, у яких генеруються віруси, що включають неінфекційну несементовану геномну РНК, може знадобитися також введення до клітини-хазяїна додаткових плазмід експресії поряд з плазмідною подвійної експресії, що несе вірусний геном. Додаткова плазмід має експресувати протеїн(и), потрібний для ініціювання життєвого циклу вірусу, який звичайно потрапляє до клітини-хазяїна при інфікуванні (наприклад, РНК-залежні РНК-полімерази).

За варіантами втілення, у яких продукується пікорнавірус, що включає інфекційний несементований РНК-геном, кДНК, що включає повний вірусний геном, вставляється до плазміді з подвійним промотором експресії за винаходом. Верхній промотор у зовнішній одиниці транскрипції, краще, промотор pol II, керує продукуванням "плюс"-ланцюгової мРНК, що включає повний вірусний геном -поліпротеїн транслюється з мРНК і окремі протеїни відщеплюються вивільняються з поліпротеїну (наприклад, за допомогою протеази у поліпротеїні). Оскільки вірусний геном включає "плюс"-ланцюгову РНК, другий верхній промотор у внутрішній одиниці транскрипції (односпрямована система), краще, pol I, керує продукуванням "плюс"-ланцюгової копії геному. Якщо вірусний геном включає "мінус"-ланцюгову РНК, то другий нижній промотор у внутрішній одиниці транскрипції (двоспрямована система), краще, pol I, буде керувати продукуванням мінус"-ланцюгової копії геному. До обсягу винаходу входять варіанти втілення, у яких продукуються "мінус"-ланцюгові несементовані РНК-віруси з використанням односпрямованої системи. Аналогічно, до обсягу винаходу входять варіанти втілення, у яких "плюс"-ланцюгові несементовані РНК-віруси продукуються з використанням двоспрямованої системи.

Віруси, що включають неінфекційні несементовані РНК-геноми, у яких поліпротеїн не продукується, також можуть бути генеровані за даним винаходом. Наприклад, система за даним винаходом може бути використана для продукування вірусів *rhadinoviridae* чи вірусів *paramyxoviridae*, краще, вірусу парагрипу III, життєвий цикл якого звичайно включає продукування численних моноцистронних мРНК з геномної "мінус"ланцюгової РНК за допомогою створеної вірусом РНК-залежної РНК-полімерази; окремі протеїни експресуються з моноцистронних мРНК. В цих варіантах втілення, зовнішня одиниця транскрипції, що включає про-

мотор, краще, промотор pol II, керує продукуванням "плюс"-ланцюгової поліцистронної копії вірусного геному, з якої, загалом, трансклюється лише перший ген (NP). Додатково, внутрішня одиниця трансляції, що включає промотор, краще, промотор pol I, керує експресією копії РНК геному для включення до нових вірусів. Оскільки вірусний ген парогрипу III включає "мінус"-ланцюгову РНК, промотор внутрішньої одиниці трансляції краще розташований нижче кДНК (двоспрямована система). Якщо вірусний геном включає "плюс"-ланцюгову РНК, промотор внутрішньої одиниці транскрипції краще розташований вище кДНК (односпрямована система). До обсягу винаходу входять варіанти втілення, у яких віруси, що включають "плюс"-ланцюговий РНК-ген, продукуються з використанням двоспрямованої системи, та варіанти втілення, у яких віруси, що включають "мінус"-ланцюговий РНК-ген, продукуються з використанням односпрямованої системи. Для вірусної транскрипції та реплікації потрібні додаткові вірусні протеїни (що відрізняються від протеїнів, експресованих з поліцистронної мРНК) (L та P), і ці протеїни вводяться окремо на окремих плазмідах експресії.

Винахід може також включати варіанти втілення, у яких генеруються віруси, що включають дво-ланцюгові сегментовані РНК-гені. В цих варіантах втілення, плазмід, що включає кожний ген з цільового вірусного геному, вставляється до плазмід експресії з подвійним промотором за винаходом. Плазмід може бути односпрямованою плазмідною або двоспрямованою плазмідною. Промотор у зовнішній одиниці транскрипції, краще, промотор pol II, керує експресією мРНК-транскрипта кожного гена, що трансклюється у кодований протеїн. Промотор у внутрішній одиниці трансляції, краще, промотор pol I, керує транскрипцією "плюс"-ланцюга (односпрямована система) або "мінус"-ланцюга (двоспрямована система). Згодом, перший продукований ланцюг може виступати в ролі матриці для продукування комплементарного ланцюга за допомогою вірусної РНК-полімерази. Дво-ланцюговий РНК-продукт, що утворюється, включається до нових вірусів.

Виділення двох вірусів грипу А з мінімальної системи на основі плазмід - A/WSN/33 (H1N1) та A/Teal/HK/W312/97 (H6N1) - підтвердило користність цієї системи. Виділення фенотипово невідомого штаму A/PR/8/34 (H1N1), який є стандартом для продукування інактивованої вакцини грипу А, підтвердило користність цієї системи для розробки вакцин. Через сімдесят дві години після трансфекції восьми плазмід експресії до співкультивованих клітин 293Т та MDCK вихід вірусу у надосадовій рідині трансфікованих клітин складав від 2×10^5 до 2×10^7 інфекційних вірусів на мл. Ця восьмиплазмідна система була також використана для генерування одинично та квадрупольно-реасортативних вірусів з A/Teal/HK/W312/97 (H6N1) та A/WSN/33 (H1N1), а також для генерування вірусів A/WSN/33 з тандемно-орієнтованої системи (яка продукує кРНК та мРНК).

Оскільки система pol I-pol II сприяє конструюванню та одержанню як рекомбінантних, так і реасортативних вірусів грипу А, вона є також застосовною для одержання інших РНК-вірусів цілком з клонованої кДНК. Хоч у даному винаході краще використовується кДНК, може бути використаний будь-який інший тип нуклеїнових кислот, що кодує вірусний ген, який має бути експресований, при збереженні суттєвих елементів винаходу. Наприклад, можуть бути використані PCR-ампліфіковані продукти чи рестрикційні фрагменти, що включають вірусні гени. Крім того, гени, що експресуються у системі на основі плазмід за винаходом, можуть бути злиті з чи помічені іншими генами, такими як мітки для очищення/детектування (наприклад, глутатіон-S-трансфераза, полігістидин, зелений флуоресцентний протеїн, мітки тус та мітки FLAG). Даний винахід також передбачає варіанти втілення, в яких у плазмідах за даним винаходом використовуються часткові генні послідовності.

Наведена далі таблиця містить необмежувальний перелік "мінус"-ланцюгових РНК-вірусів, які можуть бути продуковані з використанням даного винаходу:

Порядок	Сімейство	Підсімейство	Рід	Типовий вид
Mononegavirales	Bornaviridae		Bornavirus	Вірус хвороби Борна
Mononegavirales	Filoviridae		Ебола-подібний вірус	Вірус Ебола
Mononegavirales	Filoviridae		Марбург-подібний вірус	Вірус Марбург
Mononegavirales	Paramyxoviridae	Paramyxovirinae	Respirovirus	Вірус парогрипу людини I
Mononegavirales	Paramyxoviridae	Paramyxovirinae	Morbillivirus	Вірус кору
Mononegavirales	Paramyxoviridae	Paramyxovirinae	Rubulavirus	Вірус свинки
Mononegavirales	Paramyxoviridae	Pneumovirinae	Pneumovirus	Респіраторно-синцитіальний вірус людини
Mononegavirales	Paramyxoviridae	Pneumovirinae	Metapneumo-virus	Вірус ринотрахеїту індички
Mononegavirales	Rhabdoviridae		Vesiculovirus	Вірус везикулярного стоматиту Індіана
Mononegavirales	Rhabdoviridae		Lyssavirus	Вірус сказу
Mononegavirales	Rhabdoviridae		Ephemerovirus	Вірус бичачої ефемерної лихоманки
Mononegavirales	Rhabdoviridae		Novirhabdovirus	Вірус інфекційного некрозу кровотворної тканини

Mononegavirales	Rhabdoviridae		Cytorhabdovirus	Вірус некротичної жовтяниці салату
Mononegavirales	Rhabdoviridae		Nucleorhabdo-virus	Вірус жовтої карликовості картоплі
Mononegavirales	Ortnomyxoviridae		Influenzavirus A	Вірус грипу А
Mononegavirales	Ortnomyxoviridae		Influenzavirus B	Вірус грипу В
Mononegavirales	Ortnomyxoviridae		Influenzavirus C	Вірус грипу С
Mononegavirales	Orthomyxoviridae		Thogotovirus	Вірус Thogoto
Mononegavirales	Bunyaviridae		Bunyavirus	Вірус Bunyamwera
Mononegavirales	Bunyaviridae		Hantavirus	Вірус Hantaan
Mononegavirales	Bunyaviridae		Nairovirus	Вірус хвороби Найробі овець
Mononegavirales	Bunyaviridae		Phlebovirus	Вірус сицилійської флехоманки
Mononegavirales	Bunyaviridae		Tospovirus	Вірус плямистого в'янення томату
Mononegavirales	Bunyaviridae		Tenuivirus	Вірус смугастості рису
Mononegavirales	Bunyaviridae		Opiliavirus	Вірус псорозису цитрусових
Mononegavirales	Arenaviridae		Arenavirus	Вірус лімфоцитарного хореіомеїнігіту
Mononegavirales	Arenaviridae		Deltavirus	Вірус гепатиту дельта

Даний винахід далі частково оснований на створенні двоспрямованого транскрипційного конструкту, який містить вірусну кДНК, що кодує PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, М чи NS, які граничають з боків з промотором РНК-полімерази I (pol I) для синтезу вРНК та промотором РНК-полімерази II (pol II) для синтезу вірусної мРНК. Придатність цього підходу підтверджена генерування вірусу після трансфекції конструкту pol I/pol II-промотор-PB1 разом з вРНК- та протеїн-експресивними конструктами для решти семи сегментів. Оскільки цей підхід зменшує кількість плазмід, потрібних для генерування вірусу, він також зменшує обсяг робіт, потрібних для клонування, підвищує ефективність генерування вірусу і поширює використання зворотно-генетичних систем на клітинні системи, для яких неможливо здійснити ефективну котрансфекцію 17 плазмід. Сюди входить також односпрямований транскрипційний конструкт, який включає промотори pol I та pol II, розташовані вище кодуєчої послідовності вірусної кДНК. Обидва промотори знаходяться у звичайній орієнтації зверху вниз по відношенню до гена. Хоч двоспрямована система продукує вищий титр вірусу грипу А, односпрямована система є придатною для інших видів застосування (наприклад, продукування інших "мінус"-ланцюгових вірусних штамів).

Промотор, термінатор чи сигнал поліаденілювання розташований "вище" гена, якщо він знаходиться у проксимальному положенні до початку гена (наприклад, першого кодону) і дистальному - до кінця гена (наприклад, термінального кодону). Промотор, термінатор чи сигнал поліаденілювання розташований "ниже" гена, якщо він знаходиться у проксимальному положенні до кінця гена і дистальному - до початку гена. Промотори у плазмідах за винаходом, що є функціонально асоційованими з геном, орієнтовані у такий спосіб, щоб промотувати транскрипцію смислового чи анти-смислового ланцюга гена.

У тому значенні, що використовується у даному винаході, "плазміда експресії" є ДНК-вектором,

що включає "внутрішню одиницю транскрипції" та "зовнішню одиницю транскрипції". Як обговорювалося вище, плазміди експресії можуть бути використані для генерування будь-якого типу РНК-вірусу, краще, "плюс"- чи "мінус"-ланцюгових РНК-вірусів, РНК-вірусів з сегментованим чи несегментованим геном або дволанцюгових РНК-вірусів. Зовнішня одиниця транскрипції включає промотор, краще промотор pol II, який керує транскрипцією, з вірусної кДНК, мРНК, що придатна для трансляції. Зовнішня одиниця транскрипції може включати промотор T7 РНК-полімерази, промотор T3 РНК-полімерази, промотор SP6 РНК-полімерази або будь-який промотор чи комбінацію генетичних елементів, здатних керувати експресією придатного до трансляції РНК-продукту. Наприклад, зовнішня одиниця трансляції може включати промотор pol I чи pol II, якщо вірусна кДНК, що має бути експресована з плазміди, є зміненою методами генної інженерії так, щоб вона включала сигнал поліаденілювання на 3'-кінці транскрибованої РНК. Це може бути здійснене шляхом вставки нитки з А нуклеотидів на 3'-кінці кодуєчої послідовності кДНК безпосередньо перед стоп-кодоном. Крім того, вірусна кДНК може бути змінена методами генної інженерії так, щоб вона включала внутрішній сайт входження рибосом (Internal Ribosomal Entry Site, IRES) на 5'-кінці кДНК для сприяння ініціації трансляції з транскрибованої РНК. "Внутрішня одиниця транскрипції" у плазмідах експресії за винаходом розташована усередині зовнішньої одиниці транскрипції і включає промотор, краще, промотор pol I, який може керувати транскрипцією вірусної кДНК, яка може бути реплікована вірусними механізмами та включена до нових вірусів. Краще, промотор у внутрішній одиниці транскрипції транскрибує РНК, яка не має надлишкових невірусних чужорідних послідовностей на 5'- та 3'-кінцях, краще, шляхом точного злиття вірусної кДНК з послідовностями промотора pol I та термінатора. Однак, винахід включає варіанти втілення, у яких внутрішня одиниця транскрипції включає

промотор, який здійснює продукування РНК-транскриптів, що включають 5'- та 3'-додаткові невірусні послідовності (наприклад, промотори pol II, промотори pol III, промотор T7 РНК-полімерази, промотори T3 РНК-полімерази або промотори SP6 РНК-полімерази). В цих варіантах втілення, додаткові послідовності можуть бути включені до плазмиди експресії, яка забезпечує, щоб РНК, продукована з внутрішньої одиниці транскрипції, не включала надлишкових невірусних послідовностей. Наприклад, плазміда експресії може бути змінена) методами генної інженерії так, щоб вона включала рибозимні послідовності на кінцях транскриптів, продукованих внутрішньою одиницею транскрипції, причому рибозимні ділянки транскрибованої РНК розщеплюють транскрипт у такий спосіб, щоб утворювалися 5'- та 3'-термінальні послідовності РНК, аналогічні до тих, що існують у вірусній РНК. Крім того, плазміди експресії можуть бути змінені методами генної інженерії так, щоб вони включали термінальні послідовності, які спричиняють термінацію транскрипції на кінці кодуєчої послідовності вірусної кДНК, тим самим запобігаючи включенню надлишкових нетрансльованих послідовностей до 3'-кінця транскрибованої РНК. Краще, "плазміда експресії" є ДНК-вектором, який використовує систему pol I-pol II. Отже, така плазміда включає послідовності промотора РНК-полімерази I (pol I) та термінатора pol I, вставлені між промотором РНК-полімерази II (pol II) та сигналом поліаденілювання. У двоспрямованій системі, промотор РНК-полімерази I керує експресією геномної "мінус"-смісловою некепованою РНК (далі позначена "вРНК") кДНК, яка вставляється у "антисмісловій" орієнтації між промотором та термінатором. Промотор РНК-полімерази II керує експресією матричної РНК; сегмент кДНК вірусного гена, вставлений у "смісловій" орієнтації між промотором pol II та сигналом поліаденілювання, приводить до експресії "плюс"-сміслової некепованої вірусної мРНК. В односпрямованій системі, вірусна кДНК вставлена нижче промоторів pol I та pol II у смісловій орієнтації. Промотор pol II керує експресією "плюс"-сміслової некепованої вірусної мРНК, а промотор pol I керує експресією "плюс"-сміслової некепованої вірусної кРНК.

Плазміда може включати "по суті цілком" іншу основну плазмиду, якщо присутні всі гени та функціональні некодуєчі ділянки основної плазмиди. Наприклад, плазміда, сконструйована шляхом простого видалення ділянки полілінкера та інсерції чужорідного гена, включає по суті цілком основну плазмиду.

"Мінус"-ланцюговий РНК-вірус" є вірусом, у якому вірусний геном включає "мінус"-ланцюгову РНК. "Мінус"-ланцюгова РНК є комплементарною до мРНК і, загалом, для трансляції протеїнів має бути скопійована у комплементарну "плюс"-ланцюгову мРНК. Типово, ці віруси спакуюють РНК-залежну РНК-полімеразу для продукування мРНК після інфікування клітини-хазяїна. Сімейства "мінус"-ланцюгових РНК-вірусів включають, без обмеження, *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* та *Bunyaviridae*. Краще, якщо вірусний геном походить з вірусу, який є членом вірусного сімейства

Orthomyxoviridae, і оптимально, має сегментований геном. Члени вірусного сімейства *Orthomyxoviridae* включають, без обмеження, віруси грипу А, грипу В, грипу С, тогатовірус (*Thogotovirus*), віруси кору та свинки (*Paramyxovirus*) або вірус сказу (*Rhabdovirus*).

"Плюс"-ланцюговий РНК-вірус" є вірусом, який включає "плюс"-ланцюговий РНК-геном. Приклади "плюс"-ланцюгових РНК-вірусів включають поліовірус (*Picornavirus*), тогавіруси та флавівіруси. Геномна РНК цих вірусів має таку саме смислову орієнтацію, як мРНК і може функціонувати як мРНК. Ці віруси можуть включати сегментований чи несегментований геном.

"Дволанцюгові РНК-віруси" включають дволанцюговий РНК-геном. Дволанцюговими РНК-вірусами є реовіруси.

Вірусний геном може бути також сегментованим чи несегментованим (мономолекулярним). Сегментований геном включає дві чи більше нуклеїнових кислот, кожна з яких кодує один чи кілька вірусних генів. Краще, якщо сегментований геном включає окрему нуклеїнову кислоту для кожного вірусного гена. Ортоміксовіруси (віруси грипу А, В чи С), буніавіруси та аренавіруси включають сегментовані РНК-геноми. Несегментований геном включає єдину нуклеїнову кислоту, яка містить кожен вірусний ген. Віруси *Mononegavirales*, рабдовіруси, віруси *Flaviviridae*, віруси *Picornaviridae*, віруси *Togaviridae* та праміксовіруси включають несегментований РНК-геном.

Дволанцюгові РНК можуть бути скорочено позначені як "dsРНК". Одноланцюгові РНК можуть бути скорочено позначені як "ssРНК". "Мінус"-одноланцюгові РНК можуть бути скорочено позначені як "-ssРНК". "Плюс"-одноланцюгові РНК можуть бути скорочено позначені як "+ssРНК".

"Сегмент вірусного гена" є, краще, клонованою кДНК, що відповідає молекулі геномної РНК з геному РНК-вірусу. Цей термін може також включати будь-який ген чи сегмент гена (наприклад, продукт PCR чи рестрикційний фрагмент), що включає ген, який походить з РНК-вірусу.

"Мінімальна система на основі плазмід" є системою, що містить плазмиду експресії, яку було визначено вище, що включає кожний автономний вірусний геномний сегмент РНК-вірусу. Таким чином, загальна кількість плазмід, що містять вірусні геномні послідовності, не перевищуватиме загальної кількості генних сегментів РНК-вірусу, що використовується як джерело. Винахід включає варіанти втілення, у яких інші плазми, що не містять вірусних послідовностей, можуть бути котрансфектовані до клітин-хазяїнів. Це забезпечує значні переваги завдяки обмеженню загальної кількості плазмід, потрібної для встановлення системи у клітині-хазяїні, усуненню потреби у вірусі-помічнику, усуненню необхідності процесу селекції та створенню можливості ефективного генерування реасортативних вірусів.

Деякі вірусні гени у мінімальній системі на основі плазмід за винаходом можуть походити з вірусного штаму, добре адаптованого для вирощування у клітинній культурі, такого як штами PR/8/34 (H1N1) чи WSN/33 (H1N1), або з атенуйованого вірусу, такого як A/Ann Arbor/6/60 (H2N2)

чи, для грипу В/Ann Axbor/1/66. Краще, якщо атенуований штам також є добре адаптованим для вирощування у клітинній культурі. Зокрема, для грипу А, кращі сегменти вірусного гена у системі на основі плазмід кодують вірусні протеїни полімеразного комплексу, М-протеїни та/або NS-протеїни зі штаму, добре адаптованого для вирощування у клітинній культурі, або з атенуованого штаму, чи з обох. Ці протеїни у цьому документі називаються "вірусними внутрішніми протеїнами" або вірусними "не-глікопротеїнами".

Геном вірусу грипу А типово кодує 10 різних протеїнів: PB2, який вважається транскриптазою, PB1, який вважається транскриптазою, PA, який вважається транскриптазою, HA, який вважається гемаглютиніном, NP, який вважається РНК-зв'язуючим нуклеопротеїном, NA, який вважається нейрамінідазою, M1/M2, які вважаються матричним протеїном та інтегральним мембранним протеїном, відповідно, та NS1/NS2, які вважаються неструктурними протеїнами, що можуть впливати на РНК-процесинг та транспорт. Вважається, що PB1, PB2, NP та PA є частиною транскрипційного полімеразного комплексу вірусу грипу.

Термін "клітинна культура", що використовується в даному описі, краще стосується комерційно прийнятного способу розмноження вірусу для продукування вакцини, наприклад, курячі яйця з ембріонами, а також клітинної культури *in vitro* у клітині-хазяїні [див. Furminger, У книзі: Nicholson, Webster and May (eds.), Textbook of Influenza, Chapter 24, pp.324-332, особливо, pp.328-329].

Аналогічно, система на основі плазмід включає генні сегменти антигенів, потрібних для продукування захисної імунної реакції. "Захисна імунна реакція" включає гуморальний (антитіла) чи клітинний компоненти, чи обидва, що ефективно знищують віруси та інфіковані клітини у імунізованій (вакцинованій) особи. Таким чином, захисна імунна реакція може запобігти чи усунути інфекцію РНК-вірусу, наприклад, вірусу грипу. Краще, антигени є "поверхневими антигенами", тобто, експресуються на поверхні віріону або поверхні інфікованих клітин. Ще краще, поверхневі антигени є глікопротеїнами. Для грипу, первинними глікопротеїновими антигенами є гемаглютинін (HA чи H) та нейрамінідаза (NA чи N).

У тому значенні, що використовується тут, термін "імуногенний" значить, що поліпептид є здатним викликати гуморальну чи клітинну імунну реакцію, краще, обидві. Імуногенний продукт є також антигенним. Імуногенна композиція є композицією, яка викликає гуморальну чи клітинну імунну реакцію або обидві разом при введенні тварині. Молекула є антигенною, якщо вона здатна специфічно взаємодіяти з антиген-розпізнавальною молекулою імунної системи, такою як імуноглобулін (антитіло) або рецептор антигену Т-клітини. Антигенний поліпептид містить епітоп, що складається щонайменше з приблизно п'яти, краще, щонайменше з приблизно 10 амінокислот. Антигенна ділянка поліпептиду, яка тут також називається епітопом, може бути такою ділянкою, що є імунодомінантною для розпізнавання антитілом чи рецептором Т-клітини, або вона може бути ділянкою, що використовується для генерування анти-

тіла до молекули шляхом кон'югації антигенної ділянки з поліпептидом-носієм для імунізації. Молекула, яка є антигенною, не повинна бути сама по собі імуногенною, тобто, здатною викликати імунну реакцію без носія.

Термін "патогенний вірусний штам" використовується тут для посилення на будь-який вірусний штам, здатний спричинювати хворобу; краще, вірус внесений у поточний перелік ймовірно циркулюючих вірусів Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO), Центрів з боротьби та профілактики хвороб (CDC) або іншої державної установи охорони здоров'я. Такі віруси можуть включати членів сімейства вірусу гепатиту, сімейства реовірусів, сімейства ортоміксовірусів, сімейства параміксовірусів, сімейства *filoviridae*, сімейства *bornaviridae*, сімейства *bunyaviridae*, сімейства *arenaviridae*, сімейства *coronaviridae*, сімейства поліовірусів чи сімейства рабдовірусів. Винахід краще передбачає для вставлення у систему на основі плазмід гени первинних антигенів з таких штамів, у яких решта вірусних генів мають бажані характеристики культивування та/або атенуації, тим самим забезпечуючи продукування значної кількості вірусу з належними антигенними характеристиками для продукування вакцини. Наприклад, гени параміксовірусу, вірусу парогрипу людини 3 (нуклеокапсидний ген, ген фосфопротеїну, матричний ген, ген злиття, ген протеїну гемаглютиніну-нейрамінідази та великий ген) можуть бути зручно поміщені у плазмід за винаходом для продукування віріонів вірусу парогрипу 3.

Таким чином, кращий "реасортативний" вірус за винаходом є вірусом, у якому генні сегменти, що кодують антигенні протеїни з патогенного штаму вірусу, поєднані з генними сегментами, що кодують вірусний полімеразний комплекс чи інші аналогічні гени (наприклад, неглікопротеїнові гени, включаючи М-гени та NS-гени) з вірусів адаптованих для вирощування у культурі (або атенуованих вірусів). Таким чином, реасортативний вірус несе бажані антигенні характеристики у фенотипі, що дозволяє ефективно продукування у клітині-хазяїні, як описано вище. Такий реасортативний вірус є бажаним "вірусним насінням" для продукування віріонів для виготовлення вакцини [див. Funninger, *supra*].

Термін "клітина-хазяїн" позначає будь-яку клітину будь-якого організму, яку відбирають, модифікують, трансформують, вирощують чи використовують або обробляють у будь-який спосіб для продукування клітиною рекомбінантних РНК-віріонів, краще, "мінус"чпанцюгових сегментованих РНК-віріонів. Приклади клітин-хазяїнів включають, без обмеження, клітини Медін-Дербі собачої нирки (MDCK), клітини VERO, клітини CV1, клітини COS-1 та COS-7 і клітини BHK-1, які наведено як необмежувальні приклади. В конкретному варіанті втілення кращим для продукування віріонів є транзиторне співкультивування. Співкультивування дозволяє ефективно здійснити трансфекцію рецептивної клітини, такої як клітина 293T, з наступним інфікуванням пермісивної клітини для вирощування вірусів, такої як клітина MDCK.

Термін "віріони РНК-вірусу" стосується вірусних частинок, які одразу ж після продукування є

повністю інфекційними, з клітин-хазяїнів, трансфікованих чи котрансфікованих системою на основі плазмід за винаходом. Така система продукує вРНК та вірусні протеїни (шляхом трансляції вірусної мРНК), приводячи до збирання інфекційних вірусних частинок (віріонів).

У тому значенні, що використовується тут, "РНК-вірусоспецифічна вакцина" позначає композицію, яка може викликати захисний імунітет до РНК-вірусу при введенні суб'єкту. Термін "вакцина" стосується композиції, що містить вірус, інактивованій вірус, атенуйований вірус, розщеплений вірус або вірусний протеїн, наприклад, поверхневий антиген, який може бути використаний для викликання захисного імунітету у реципієнта [див. Furminger, supra]. Слід відзначити, що для того, щоб бути ефективною, вакцина за винаходом може викликати імунітет у частини населення, оскільки деякі особи можуть виявитися нездатними виробити стійку чи захисну імунну реакцію або, у деяких випадках, жодної імунної реакції. Ця нездатність може бути спричинена генетичними особливостями особи або станом імунodefіциту (набутого чи вродженого) чи імунопригнічення (наприклад, лікування імунодепресивними лікарськими засобами для запобігання відторгнення органу чи для пригнічення аутоімунного стану) Ефективність може бути визначена на тваринних моделях.

"Захисна доза" вакцини позначає її кількість, самої чи у поєднанні з ад'ювантом, яка ефективно викликає захисну імунну реакцію у особи-реципієнта. Захист може також залежати від шляху введення, наприклад, внутрішньом'язового (який є кращим для інактивованої вакцини) чи інтраназального (який є кращим для атенуйованої вакцини).

Термін "суб'єкт" використовується тут для посилення на тварину, яка підтримує РНК-вірусну інфекцію, включаючи, без обмеження, водоплавну птицю, курей, свиней та людей. Зокрема, термін стосується людини.

"Ад'ювант" позначає молекулу чи композицію, яка потенціює імунну реакцію на імуноген. Ад'ювант є "прийнятним для використання людиною", якщо він є фармацевтично прийнятним, як визначено нижче. Приклади ад'ювантів наведені нижче.

У тому значенні, що використовується тут, термін "ізолюваний" означає, що матеріал, про який йде мова, є видаленим з його нативного середовища, наприклад, клітини. Таким чином, ізолюваний біологічний матеріал може бути звільнений від деяких чи усіх клітинних компонентів, тобто, компонентів клітин, у яких нативний матеріал знаходиться у природних умовах (наприклад, цитоплазматичний чи мембранний компонент). Матеріал вважається ізолюваним, якщо він знаходиться у формі клітинного екстракту чи надосадової рідини. У випадку молекул нуклеїнової кислоти, ізолювана нуклеїнова кислота включає продукт PCR, ізолювану мРНК, кДНК або рестрикційний фрагмент. За іншим варіантом втілення, ізолювана нуклеїнова кислота є краще вирізаною з хромосоми, у якій вона може знаходитися, і ще краще, більше не з'єднана чи не знаходиться у проксимальному положенні до некодуючих ділянок (але може бути з'єднана зі своїми нативними регуляторними діля-

нками чи їх частинами) або до інших генів, розташованих вище чи нижче від гена, що міститься у ізолюваній молекулі нуклеїнової кислоти, коли вона знаходиться у хромосомі. За ще іншим варіантом втілення, у ізолюваній нуклеїновій кислоті відсутній один чи кілька інтронів. Ізолювані молекули нуклеїнової кислоти включають послідовності, які вставляють до плазмід, космід, штучних хромосом і т.п., наприклад, коли вони утворюють частину химерного конструкту рекомбінантної нуклеїнової кислоти. Так, у конкретному варіанті втілення, рекомбінантна нуклеїнова кислота є ізолюваною нуклеїновою кислотою. Ізолюваний протеїн може бути асоційований з іншими протеїнами чи нуклеїновими кислотами чи з обома зразу, з якими він асоціює у клітині, або з клітинними мембранами, якщо він є мембранно-асоційованим протеїном. Ізолювана органела, клітина чи тканина видаляється з анатомічного положення, у якому вона знаходиться в організмі. Ізолюваний матеріал може бути очищений, але це необов'язково.

Термін "очищений" у тому значенні, що використовується тут, стосується матеріалу, який був ізолюваний за умов, що зменшують чи усувають присутність неспоріднених матеріалів, наприклад, домішок, включаючи нативні матеріали, з яких був одержаний даний матеріал. Наприклад, краще, щоб очищений віріон по суті не містив клітин-хазяїв чи компонентів культури, включаючи тканинну культуру чи протеїни яйця, неспецифічні патогени тощо. У тому значенні, що використовується тут, термін "по суті чистий" використовується функціонально, у контексті аналітичних випробувань матеріалу. Краще, якщо очищений матеріал, що по суті не містить забруднень, є чистим щонайменше на 50%; ще краще, чистим щонайменше на 90%, і найкраще, чистим щонайменше на 99%. Ступінь чистоти можна оцінити за допомогою хроматографії, гель-електрофорезу, імуноаналізу, аналізу складу, біологічного аналізу та інших способів, відомих фахівцям.

Способи очищення добре відомі фахівцям. Вірусні частинки можуть бути очищені шляхом ультрафільтрації чи ультрацентрифугування, краще безперервним центрифугуванням [див. Furminger, supra]. Можливе використання інших способів очищення, що передбачені цим документом. Очищений матеріал може містити менш ніж приблизно 50%, краще менш ніж приблизно 75%, найкраще, менш ніж приблизно 90% клітинних компонентів, середовища, протеїнів чи інших небажаних компонентів чи домішок (в залежності від контексту), з якими він був спочатку асоційований. Термін "по суті чистий" вказує на найвищий ступінь чистоти, що може бути досягнутий з використанням звичайних методик очищення, відомих фахівцям.

В конкретному варіанті втілення терміни "близько" чи "приблизно" означають відхилення значення в межах 20%, краще в межах 10%, і найкраще в межах 5% від вказаної величини чи інтервалу. За іншим варіантом, при використанні у біології логарифмічних показників, термін "близько" може означати відхилення в межах порядку величини від вказаного значення, краще, в межах половини порядку величини значення.

Генетична інженерія систем на основі плазмід

Згідно з даним винаходом можуть бути використані звичайні методики молекулярної біології, мікробіології та рекомбінантної ДНК, доступні фахівцям. Такі методики повністю описані у літературі. [Див., наприклад, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (тут та надалі "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds., (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds., (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.X. Freshney ed., (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994)].

Ці звичайні методики стосуються приготування систем *pol I-pol II* плазмід, ізоляції клонів кДНК сегментів вірусного гена, інсерції таких ДНК у плазмиди ат трансфекції клітин плазмідною чи системою на основі плазмід за винаходом. Зокрема, звичайні методики сайт-спрямованого мутагенезу чи генної модифікації дозволяють модифікацію РНК-вірусних, краще "мінус"-ланцюгових сегментованих РНК-вірусних генів для одержання атенуйованого вірусу, як описано нижче; або вірусних протеїнів, що включають нові епітопи, наприклад, у нейрамінідазний стеблінці; або для створення дефектних вірусів.

"Ампліфікація" ДНК в тому значенні, що використовується тут, позначає використання полімеразної ланцюгової реакції (PCR) для збільшення кількості окремої ДНК-послідовності у суміші ДНК-послідовностей. [Опис PCR див. у Saiki et al., *Science*, 1988,239:487].

"Молекула нуклеїнової кислоти" стосується фосфоефірної полімерної форми рибонуклеозидів (аденозину, гуанозину, уридину чи цитидину, "РНК-молекули") або дезоксирибонуклеозидів (дезоксиденозину, дезоксигуанозину, дезокситимідину чи дезоксицитидину; "ДНК-молекули") або будь-яких їх фосфоефірних аналогів, таких як фосфоротіоати та тіоефіри, чи у одноланцюговій формі, чи у вигляді дволанцюгової спіралі. "Молекула рекомбінантної ДНК" є молекулою ДНК, яку було піддано молекулярно-біологічним маніпуляціям.

"Полінуклеотид" чи "нуклеотидна послідовність" є рядом нуклеотидних основ (які також називаються "нуклеотидами") у ДНК та РНК, і позначає будь-який ланцюг з двох чи більше нуклеотидів. Нуклеотидна послідовність типово несе генетичну інформацію, включаючи інформацію, що використовується клітинними механізмами для виробництва протеїнів.

Полінуклеотиди тут можуть граничити з боків з гетерологічними послідовностями, включаючи промотори, внутрішні сайти входження рибосом [IRES; Ghattas, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 11:5848-5859, 1991] та інші послідовності рибосома-зв'язуючих сайтів, енхансери, елементи відповіді, супресори, сигнальні послідовності, послідовності поліаденілювання, інтрони, 5'- та 3'-некодуєчі ділянки і т.п. Нуклеїнові кислоти можуть бути також модифіко-

вані багатьма способами, відомими фахівцям. Необмежувальні приклади таких модифікацій включають метилювання, "кепи", такі як 5'-7-метил-С(5')ppp(5')N-кепи, заміщення одного чи кількох з природних нуклеотидів на аналоги та інтернуклеотидні модифікації. Полінуклеотиди можуть містити один чи кілька додаткових ковалентно-зв'язаних фрагментів, таких як, наприклад, протеїни (наприклад, нуклеази, токсини, антитіла, сигнальні пептиди, полі-L-лізин і т.д.), інтеркалятори (наприклад, акридин, псорален і т.д.), комплекси (наприклад, метали, радіоактивні метали, ферум, окисні метали тощо) та алкілатори. Полінуклеотиди можуть бути дериватизовані шляхом утворення метил- чи етилфосфотрифірного або алкілфосфорамідатного зв'язку. Крім того, полінуклеотиди тут можуть бути також модифіковані за допомогою мітки, здатної забезпечувати вимірюваний сигнал, безпосередньо чи опосередковано. Приклади міток включають радіоізотопи, флуоресцентні молекули, біотин і т.п.

"Кодуюча послідовність" чи послідовність, що "кодує" продукт експресії, така як поліпептид, є нуклеотидною послідовністю, що в результаті експресії приводить до продукування цього поліпептиду, тобто нуклеотидна послідовність кодує амінокислотну послідовність цього поліпептиду. Кодуюча послідовність протеїну може включати стартовий кодон (звичайно ATG) та стоп-кодон.

Термін "ген", який також називається "структурним геном", позначає ДНК-послідовність, яка кодує чи відповідає певній послідовності амінокислот, яка включає цілком чи частково один чи кілька поліпептидів, і може включати чи не включати регуляторні ДНК-послідовності, такі як промоторні послідовності, що визначають, наприклад, умови, за якими відбувається експресія гена.

Крім того, даний винахід дозволяє використання різних мутантів, послідовність-консервативних варіантів та функціонально консервативних варіантів сегментів РНК вірусного гена, краще, "мінус"-ланцюгових сегментів РНК вірусного гена, за умови, що всі такі варіанти зберігають потрібну імунізаційну дію. Дійсно, винахід зручно дозволяє використовувати мутагенез для розробки атенуйованих вірусних штамів у систематичний спосіб.

Термін "мутант" та "мутація" позначають будь-які виявлювані зміни у генетичному матеріалі, наприклад, ДНК, або будь-який процес, механізм чи результат такої зміни. Це включає генні мутації, у яких змінюється структура (наприклад, ДНК-послідовність) гена, будь-який ген чи ДНК, що утворюються в результаті будь-якого процесу мутації, та будь-який продукт експресії (наприклад, протеїн), що експресується модифікованим геном чи ДНК-послідовністю. Термін "варіант" також може бути використаний для позначення модифікованого чи зміненого гена, ДНК-послідовності, ферменту, клітини, тобто, будь-якого виду мутантів. Мутації можуть бути здійснені за методом випадкового мутагенезу або сайт-спрямованим мутагенезом, включаючи модифікацію послідовності на основі методу PCR. Як було вказано вище і як обговорюється детально далі, мутагенез одного чи кількох індивідуальних генних сегментів РНК-

вірусу (наприклад, "мінус"-ланцюгового сегментованого РНК-вірусу) дозволяє здійснювати розробку атенуєваних вірусів, а також визначати механізм атенуації. Крім того, система на основі плазмід за винаходом долає недоліки попередніх спроб розробки атенуєваних вірусів шляхом мутагенезу, такі як обмеження системи ефективною селекції [див. Bilsel and Kawaoka, У книзі: Nicholson, Webster and May (eds.), *Textbook of Influenza*, Chapter 32, pp.422-434, особливо, pp.423-425].

"Послідовність-консервативними варіантами" полінуклеотидної послідовності є такі, у яких зміна одного чи кількох нуклеотидів у визначеній позиції кодону не спричинює альтерації амінокислоти, що кодується у цій позиції. Апельні варіанти можуть бути послідовність-консервативними варіантами.

"Функція-консервативними варіантами" є такі, у яких певний амінокислотний залишок у протеїні чи ферменті був заміщений і без зміни загальної конформації та функції поліпептиду, включаючи, без обмеження, заміщення амінокислоти на таку, що має аналогічні властивості (такі як, наприклад, полярність, потенціал водневих зв'язків, кислотність, основність, гідрофобність, ароматичність і т.п.). Деякі апельні варіації приводять до одержання функціонально-консервативних варіантів, так що заміщення амінокислоти не має різкого впливу на функцію протеїну. Аналогічно, гомологічні протеїни можуть бути функціонально-консервативними варіантами. Амінокислоти з аналогічними властивостями добре відомі фахівцям. Наприклад, аргінін, гістидин та лізин є гідрофільно-основними амінокислотами і можуть бути взаємозамінними. Аналогічно, ізолейцин, що є гідрофобною амінокислотою, може бути заміщений на лейцин, метіонін чи валін. Очікується, що такі зміни не будуть впливати чи матимуть незначний вплив на уявну молекулярну вагу чи ізоелектричну точку протеїну чи поліпептиду. Амінокислоти, крім тих, що вказані як консервативні, можуть відрізнятися у протеїні чи ферменті, так що процент подібності протеїну чи амінокислотної послідовності між будь-якими двома протеїнами з аналогічною функцією може змінюватись і становити, наприклад, від 70% до 99% при визначенні за методикою суміщення, такою як кластерний метод (Cluster Method), у якій подібність визначається на основі алгоритму MEGALIGN. "Функція-консервативний варіант" також включає поліпептид чи фермент, який має амінокислотну ідентичність щонайменше 60% при визначенні за алгоритмами BLAST чи FASTA, у яких параметри обираються таким чином, щоб одержати найбільший збіг досліджуваних послідовностей по всій довжині еталонної послідовності, краще щонайменше 75%, ще краще щонайменше 85%, і найкраще щонайменше 90%, і який має такі самі або по суті аналогічні властивості чи функції, як і нативний чи батьківський протеїн чи фермент, з яким він порівнюється.

В тому значенні, що використовується тут, термін "гомологічний" в усіх його граматичних формах та варіантах написання стосується співвідношення між протеїнами, що мають "спільне еволюційне походження", включаючи протеїни з суперсімейств (наприклад, суперсімейство імуноглобулінів) та гомологічні протеїни від різних видів

(наприклад, легкий ланцюг міозину і т.д.) [Reeck, et al., *Cell*, 50:667, 1987]. Такі протеїни (та гени, що їх кодують) мають гомологію послідовностей, яка визначається через подібність їх послідовностей, чи у формі показників процентної подібності, чи у присутності специфічних залишків чи мотивів.

Відповідно, термін "подібність послідовностей" в усіх його граматичних формах стосується ступеня ідентичності чи відповідності між послідовностями нуклеїнових кислот чи амінокислот протеїнів, які можуть мати чи не мати спільне еволюційне походження [див. Reeck, et al., *supra*]. Однак, у загальному користуванні та в даній заявці термін "гомологічний", якщо він модифікований прислівником, таким як "високо", може стосуватися подібності послідовностей і може бути зв'язаним чи не зв'язаним із спільним еволюційним походженням.

В конкретному варіанті втілення, дві ДНК-послідовності є "по суті гомологічними" чи "по суті подібними", якщо на протязі визначеної довжини ДНК-послідовності збігається достатня кількість нуклеотидів для того, щоб відрізнити ці послідовності від інших, при визначенні за допомогою алгоритмів порівняння послідовностей, таких як BLAST, FASTA, DNA Strider та інших, у яких параметри обираються таким чином, щоб одержати найбільший збіг між досліджуваними послідовностями по всій довжині еталонної послідовності. Послідовності, які є по суті гомологічними, можуть бути ідентифіковані шляхом порівняння послідовностей з використанням стандартного програмного забезпечення, що використовується в банках даних послідовностей, або шляхом проведення експерименту методом Саузерн-гібридизації, наприклад, за суворих умов, визначених для цієї конкретної системи. Такі суворі умови є відомими для фахівців в цій області і можуть бути знайдені у [книзі *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]. Необмежувальним прикладом суворих умов гібридизації є гібридизація у 6х хлориді натрію/цитраті натрію (SSC) при приблизно 45°C з подальшим одним чи кількома промиваннями у 0,2хSSC, 0,1% ДСН при 50°C, краще при 55°C, і ще краще при 60°C або 65°C.

Аналогічно, в конкретному варіанті втілення, дві амінокислотні послідовності є "по суті гомологічними" чи "по суті подібними", якщо на протязі певної довжини достатня кількість амінокислот є ідентичною чи подібною (функціонально ідентичною) для того, щоб диференціювати ці послідовності від інших послідовностей. Краще, якщо подібні чи гомологічні послідовності ідентифікують шляхом порівняльного аналізу первинної структури з використанням, наприклад, програми накладання GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) або будь-якої іншої з описаних вище програм (BLAST, FASTA і т.д.). Наведені далі посилання, що стосуються алгоритму BLAST, включені сюди за посиланням: [АЛГОРИТМИ BLAST: Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990; Gish, W. & States, D.J., *Nature Genet.*, 3:266-272, 1993; Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J., *Meth Enzymol.*, 266:131-141, 1996; Altschul, S.F.,

Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997; Zhang, J. & Madden, T.L., *Genome Res.*, 7:649-656, 1997; Wootton, J.C. & Federhen, S., *Comput. Chem.*, 17:149-163, 1993; Hancock, J.M. & Armstrong, J.S., *Comput. Appl. Biosci.*, 10:67-70, 1994; СИСТЕМИ КІЛЬКІСНИХ ПОКАЗНИКІВ ПОРІВНЯННЯ ПЕРВИННОЇ СТРУКТУРИ: Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. & Orcutt, B.C. (1978) "A model of evolutionary change in proteins." In "Atlas of Protein Sequence and Structure", vol.5, suppl.3., M.O.Dayhoff (ed.), pp.345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M. & Dayhoff, M.O. (1978) "Matrices for detecting distant relationships." In "Atlas of Protein Sequence and Structure", vol.5, suppl.3., M.O.Dayhoff (ed.), pp.353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., J. Mol. Biol., 219:555-565, 1991; States, D.J., Gish, W., Altschul, S.F., *Methods*, 3:66-70, 1991; Henikoff, S. & Henikoff, J.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919, 1992; Altschul, S.F., J. Mol. Evol., 36:290-300, 1993; СТАТИСТИКА АНАЛІТИЧНОГО ПОРІВНЯННЯ ПЕРВИННОЇ СТРУКТУРИ: Karlin, S. & Altschul, S.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2264-2268, 1990; Karlin, S. & Altschul, S.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5877, 1993; Dembo, A., Karlin, S. & Zeitouni, O., *Ann. Prob.*, 22:2022-2039, 1994 та Altschul, S.F. (1997) "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." In "Theoretical and Computational Methods in Genome Research" (S. Suhai, ed.), pp.1-14, Plenum, New York].

"Промоторна послідовність" є регуляторною ділянкою ДНК, здатною зв'язувати РНК-полімеразу у клітини та ініціювати транскрипцію послідовності. В цілях визначення за даним винаходом, промоторна послідовність, що розташована вище кДНК, зв'язана з її 3'-кінця із сайтом ініціації транскрипції і простягнута уверх (в напрямку до 5'-кінця), включаючи мінімальну кількість основ чи елементів, потрібну для ініціації транскрипції на рівні, визначуваному вище фонового. Промоторна послідовність, що розташована нижче кДНК (для експресування (-)-РНК) є зв'язаною з її 5'-кінця із сайтом ініціації транскрипції і простягнута униз (в напрямку до 3'-кінця), включаючи мінімальну кількість основ чи елементів, потрібну для ініціації транскрипції на рівні, визначуваному вище фонового. Двоспрямована система за винаходом включає як верхні, так і нижні промотори, односпрямована система включає лише верхні промотори. У межах промоторної послідовності знаходиться сайт ініціації транскрипції (який зручно визначити шляхом картування за допомогою нуклеази S1), а також протеїн-зв'язуючі домени (консенсусні послідовності), що відповідають за зв'язування РНК-полімерази.

В даному винаході може бути використаний будь-який відомий промотор за умови збереження істотних елементів винаходу. Наприклад, промотори pol II, що можуть бути використані для керування експресією гена, включають, без обмеження, промотор цитомегаловірусу (CMV) [патенти США №№ 5385839 та 5168062], ділянку раннього промотора SV40 [Benoist and Chambon, *Nature*, 290:304-310, 1981]; промотор, що знаходиться в 3'-

довгому термінальному повторі вірусу саркоми Раяса [Yamamoto, et al., *Cell*, 22:787-797, 1980]; промотор тимідинкінази герпесу [Wagner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:1441-1445, 1981]; регуляторні послідовності гена металотіонеїну [Brinster, et al., *Nature*, 296:39-42, 1982]; промотори T7 РНК-полімерази; промотори T3 РНК-полімерази; промотори SP6 РНК-полімерази та інші промотори, що будуть ефективними в потрібній клітині-хазяїні. Промотори pol I для експресії некепованої РНК є поширеними в усіх еукаріотах і включають РНК полімеразу I людини [див. *Molecular Cell Biology*, Darnell et al. 1986, pp.311, 365-6]. В даному винаході можуть бути також використані промотори РНК полімерази III.

Кодуюча послідовність знаходиться "під керуванням", "функціонально асоційована з" або "оперативно асоційована з" транскрипційними та трансляційними контрольними послідовностями (наприклад, промотором pol I чи pol II) у клітині, якщо РНК-полімераза транскрибує кодуючу послідовність у РНК, наприклад, мРНК чи вРНК.

Термін "експресувати" та "експресія" позначають створення можливості для чи спричинення виявлення інформації у гені чи ДНК-послідовності, наприклад, продукування РНК (включаючи кРНК, вРНК та вірусну мРНК) або протеїну шляхом активації клітинних функцій, потрібних для транскрипції та трансляції відповідного гена чи ДНК-послідовності. ДНК-послідовність експресується у клітині чи клітиною з утворенням "продукту експресії", такого як протеїн. Можна сказати також, що власне продукт експресії, наприклад, утворюваний протеїн, "експресується" клітиною.

Термін "трансфекція" означає введення чужорідної нуклеїнової кислоти до клітини таким чином, щоб клітина-хазяїн експресувала введений ген чи послідовність для продукування бажаного поліпептиду, закодованого введеним геном чи послідовністю. Введений ген чи послідовність можуть бути також названі "клонуваним" чи "чужорідним" геном чи послідовністю, можуть включати регуляторні чи контрольні послідовності, такі як стартові, столові, промоторні, сигнальні, секретуючі чи інші послідовності, що використовуються генними механізмами клітини. Ген чи послідовність можуть включати нефункціональні послідовності чи послідовності з невідомими функціями. Клітина-хазяїн, яка одержала і експресує введену ДНК чи РНК, була "трансфікована" і є "трансформантом" чи "клоном". ДНК чи РНК, введені до клітини-хазяїна, можуть походити з будь-якого джерела, включаючи клітини від такого саме роду чи виду як клітина-хазяїн або клітини від інших родів чи видів.

Терміни "вектор", "клонуючий вектор" та "експресійний вектор" позначають носій, за допомогою якого ДНК чи РНК-послідовність (наприклад, чужорідний ген) може бути введена до клітини-хазяїна з метою трансформування хазяїна та промотування експресії (наприклад, транскрипції та трансляції) введеної послідовності. Кращими векторами за винаходом є плазміди.

Вектори типово включають ДНК агента, що переноситься, до якого вставлена чужорідна ДНК. Звичайний шлях вставлення одного сегмента ДНК до іншого сегмента ДНК включає використання

ферментів, що називаються рестрикційними ферментами, які розщеплюють ДНК у специфічних сайтах (специфічні групи нуклеотидів), що називаються рестрикційними сайтами. "Касета" стосується кодувальної послідовності ДНК чи сегмента ДНК, що кодує продукт експресії, який може бути вставлений до вектора у визначених рестрикційних сайтах. Рестрикційні сайти касети сконструйовані у такий спосіб, щоб забезпечити вставку касети до належної рамки зчитування. Загалом, чужорідна ДНК вставляється до одного чи кількох рестрикційних сайтів векторної ДНК, а потім переноситься вектором до клітини-хазяїна разом з векторною ДНК. Сегмент чи послідовність ДНК, який має вставлену чи додану ДНК, таку як експресійний вектор, може також називатися "ДНК-конструктом". Звичайним типом вектора є "плазміда", яка загалом є самостійною молекулою дволанцюгової ДНК, звичайно бактеріального походження, що може легко приймати додаткову (чужорідну) ДНК і може бути легко введена до придатної клітини-хазяїна. Плазмідний вектор часто містить кодувочу ДНК та промоторну ДНК і має один чи кілька рестрикційних сайтів, придатних для вставлення чужорідної ДНК. Кодуюча ДНК є ДНК-послідовністю, що кодує певну амінокислотну послідовність для певного протеїну чи ферменту. Промоторна ДНК є ДНК-послідовністю, яка ініціює, регулює чи іншим способом медіює чи контролює експресію кодувальної ДНК. Промоторна ДНК та кодувоча ДНК можуть походити з одного гена чи з різних генів і можуть бути з одного чи з різних організмів. Рекombінантні клонуючі вектори часто включають одну чи кілька систем реплікації для клонування чи експресії, один чи кілька маркерів для селекції у хазяїні, наприклад, стійкості до антибіотика, та одну чи кілька експресійних касет.

Термін "система експресії" позначає клітину-хазяїна та сумісну за певних умов, наприклад, для експресії протеїну, кодовану чужорідну ДНК, яка переноситься вектором і введена до клітини-хазяїна.

Термін "гетерологічний" стосується комбінації елементів, яка не зустрічається у природі. Наприклад, гетерологічна ДНК стосується ДНК, яка за звичайних умов відсутня у клітині або в хромосомальному сайті клітини. Краще, якщо гетерологічна ДНК включає ген, який є чужорідним для клітини. Гетерологічний елемент регулювання експресії є таким елементом, який оперативно асоційований з іншим геном, відмінним від того, з яким він є оперативно асоційованим за природних умов. В контексті даного винаходу ген, який кодує поліпептид, що включає послідовність з бібліотеки послідовностей, є гетерологічним до векторної ДНК, у яку він вставлений для клонування чи експресії, і гетерологічним до клітини-хазяїна, що містить такий вектор, у який він експресується.

Як було відзначено вище, винахід дозволяє генерувати реасортативні віруси з використанням гетерологічних вірусних генів. Крім введення генів вірусних антигенів до генетичного матеріалу вірусного штаму, адаптованого для доброго вирощування у культурі, винахід дозволяє здійснювати міжвидовий реасортмент, наприклад, антиген грипу В у матеріалі грипу А.

Вакцини

Як було відзначено вище, даний винахід пропонує ефективну та економічну стратегію продукування вакцин для лікування чи профілактики РНК-вірусних інфекцій, краще "мінус"-ланцюгових РНК-вірусних інфекцій. Мінімальна система на основі плазмід за винаходом усуває необхідність селекції і забезпечує щільний контроль реасортментних вірусів. Для продукування інактивованої вакцини грипу шість плазмід, що містять неглікопротеїнові сегменти (наприклад, PB1, PB2, PA, NP, M та NS) зі штаму, який дає високий вихід (наприклад, PR/8/34 (H1N1)) можуть бути котрансфектовані з двома експресійними плазмідами, що містять HA та NA кДНК рекомендованого субтипу вакцини. Оскільки вірус-помічник є непотрібним, вірус, що генерується, є вірусом грипу з бажаним сузір'ям генів. Аналогічний підхід може бути використаний для продукування будь-якого різновиду інактивованого реасортативного РНК-вірусу для використання у вакцині. Експресійні плазміди, що містять сегменти вірусного гена для цільового вірусу (наприклад, неглікопротеїнові сегменти) можуть бути котрансфектовані з іншими експресійними плазмідами, які кодувають протеїни, що відповідають визначеному інфекційному вірусному субтипу (наприклад, вірусному субтипу, який зараз циркулює у популяції). Вірус, продукований у відповідності з винаходом, може бути використаний у традиційному чи новому підході до вакцинації [див. Bilsel and Kawakita, У книзі: Nicholson, Webster and May (eds.); Textbook of Influenza, Chapter 32, pp.422-434], особливо, для розробки живих атенуованих вакцин (обговорюється детальніше нижче). Зокрема, даний винахід долає недоліки сучасної технології стосовно розробки реасортативних вірусів з обмеженим спектром хазяїнів чи непередбачуваною атенуацією (id.).

Багато зусиль було вкладено у розробку вакцин грипу [див. Wood and Williams, In: Nicholson, Webster and May (eds.), Textbook of Influenza, Chapter 23, pp.317-323]. Хоч значна частина цього розділу стосується вакцин грипу, даний винахід охоплює всі РНК-вірусні вакцини, краще, "мінус"-ланцюгові сегментовані РНК-вірусні вакцини, особливо, вакцини *Orthomyxoviridae*.

Зараз доступні три типи інактивованих вакцин грипу: вакцини цільного вірусу, продукту розщеплення і поверхневих антигенів [див. Wood, In: Nicholson, Webster and May (eds.), Textbook of Influenza, Chapter 25, pp.333-345]. Оскільки даний винахід дозволяє здійснити швидку розробку бажаного реасортативного вірусу з прийнятними характеристиками росту у культурі, він зручно створює для виробника вакцини можливість генерувати достатню кількість вакцини для задоволення потреб суспільної охорони здоров'я та забезпечити стандартизацію, що є важливою вимогою, яку зараз часто послаблюють внаслідок необхідності продукування клінічних кількостей вакцин, звичайно потягом періоду 8-9 місяців [Wood, supra, p.333].

Безпечність вакцини також має велике значення [див. Wikelka, In: Nicholson, Webster and May (eds.), Textbook of Influenza, Chapter 26, pp.346-357]. Оскільки вакцини за винаходом дозволяють

здійснювати продукування у визначених системах клітинних культур, вони не містять неспецифічних патогенів, бактерій та алергічних протеїнів, що можуть бути присутніми у комерційних вакцинах, які виготовляються у яйцях із зародками.

З вакцинами (наприклад, вакцинами грипу) можуть бути використані ад'юванти [Wood and Williams, *supra*]. Термін "ад'ювант" стосується сполуки чи суміші, що посилює імунну відповідь на антиген. Ад'ювант може виступати в ролі тканинного депо, яке повільно вивільняє антиген, а також як активатор лімфоїдної системи, який неспецифічно підсилює імунну відповідь [Hood, et al., *Immunology*, Second Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p.384]. Часто первинне провокаційне зараження самим лише антигеном, без ад'юванта, не викликає гуморальної чи клітинної імунної реакції. Ад'юванти включають, без обмеження, повний ад'ювант Фрейнда, неповний ад'ювант Фрейнда, сапонін, мінеральні гелі, такі як гідроксид алюмінію, поверхнево-активні речовини, такі як лізолецитин, багатоатомні спирти Pluronic, поліаніони, пептиди, масляні чи вуглеводневі емульсії і потенційно корисні ад'юванти людини, такі як BCG (*bacille Calmette-Guerin*) та *Coiynebacterium parvum*. Прикладом кращого синтетичного ад'юванта є QS-21. За іншим варіантом, або додатково до нього, як ад'юванти для підвищення імунної відповіді на вакцину можуть бути використані імуностимулювальні протеїни, як описано далі. Краще, якщо ад'ювант є фармацевтично прийнятним.

Термін "фармацевтично прийнятний" стосується молекулярних фрагментів та композицій, які є фізіологічно стерпними і типово не продукують алергічних чи аналогічних небажаних реакцій, таких як шлункові розлади, запаморочення тощо при введенні людині. Краще, якщо в тому значенні, що використовується тут, термін "фармацевтично прийнятний" позначає дозволений регулятивним органом федерального уряду чи уряду штату, або вказаний у Фармакопеї США чи іншій загальновищезначній фармакопеї для використання для тварин, зокрема, людей. Термін "носії" стосується розріджувача, ад'юванта, ексципієнта чи розчинника, з яким сполука вводиться. Як носії, зокрема, для розчинів для ін'єкцій, краще використовуються стерильна вода чи водний розчин, сольові розчини та водні розчини декстрози і гліцерину. Придатні фармацевтичні носії описані у книзі "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin].

Ефективність вакцинації може бути підвищена шляхом супутного введення з вакциною, особливо з векторною вакциною, імуностимулювальної молекули [Salgaller and Lodge, *J. Surg. Oncol.*, 1998, 68:122], такої як імуностимулювальний, імунопотенціювальний чи прозапальний цитокін, лімфокін або хемокін. Наприклад, можуть бути використані цитокіни чи цитокінові гени, такі як інтерлейкін IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13, гранулоцит-макрофаг (ОМ)-колонієстимулюючий фактор (CSF) та інші колонієстимулюючі фактори, запальний фактор макрофагів, ліганд Flt3 [Lyman, *Surg. Opin. Hematol.*, 5:192, 1998], а також деякі ключові ко-стимулюючі молекули чи їхні гени (наприклад, B7.1, B7.2). Доставка цих імуностимулюючих молекул може здійснюватись системно чи місцево у

виділі протейнів або шляхом експресії вектором, що кодує експресію цієї молекули.

Використання дендроподібних клітин як мішеней. Вакцинація може бути здійснена шляхом використання дендритних клітин як мішеней [Steinman, *J. Lab. Clin. Med.*, 128:531, 1996; Steinman, *Exp. Hematol.*, 24:859, 1996; Taite et al., *Leukemia*, 13:653, 1999; Avigan, *Blood Rev.*, 13:51, 1999; DiNicola et al., *Cytokines Cell Mol. Ther.*, 4:265, 1998]. Дендроподібні клітини відіграють ключову роль в активації Т-клітин-залежного імунітету. Проліферуючі дендроподібні клітини можуть бути використані для захоплення протейнів антигенів в імуногенній формі *in situ* для подальшої презентації цих антигенів у формі, що може розпізнаватися та стимулювати Т-клітини [див., наприклад, Steinman, *Exper. Hematol.*, 24:859-862, 1996; Inaba, et al., *J. Exp. Med.*, 188:2163-73, 1998 та патент США №5851756]. Для стимулювання *ex vivo* дендроподібні клітини поміщають до чашок для культивування і експонують (в імпульсному режимі) віріонами в достатній кількості та протягом достатнього періоду часу для того, щоб вірусні антигени зв'язалися із дендроподібними клітинами. Клітини, що пройшли імпульсну обробку, можуть бути потім знову трансплантовані особі, що проходить курс лікування, наприклад, шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Краще, якщо використовують аутологічні дендроподібні клітини, тобто дендроподібні клітини, одержані від особи, що проходить курс лікування, хоч може існувати можливість використання ГКС-клас II-сумісних дендроподібних клітин, які можуть бути одержані від сумісного за типом донора чи шляхом генної інженерії дендроподібних клітин, для експресії бажаних ГКС-молекул (і, краще, пригнічення експресії небажаних ГКС-молекул).

Краще, якщо дендроподібні клітини специфічно мітять *in vivo* для поглинання вірусів чи вірусних субодиниць. Для мічення дендроподібних клітин *in vivo* існують різні стратегії шляхом використання рецепторів, які медіують презентацію антигенів, таких як DEC-205 [Swiggard et al., *Cell. Immunol.*, 165:302-11, 1995; Steinman, *Exp. Hematol.*, 24:859, 1996] та Fc-рецептори.

Інактивовані вакцини

Інактивовані вірусні вакцини набули широкого визнання у вакцинації проти РНК-вірусної інфекції (наприклад, грипу) [див. Nichol, In: Nicholson, Webster and May (eds.), *Textbook of Influenza*, Chapter 27, pp.358-372]. Для приготування інактивованого вірусу, трансфікований вірус вирощують у клітинній культурі чи в яйцях із зародком. Вірус може бути інактивований обробкою формальдегідом, бета-пропіолактоном, ефіром, ефіром з поверхнево-активною речовиною (такою як Твін-80), цетилтриметиламоній бромідом (ЦТАБ) та Тритон N101, дезоксихолатом натрію та три(н-бутил)фосфатом [Furminger, *supra*; Wood and Williams, *supra*]. Інактивація може відбутися після чи до просвітління алантоїсної рідини (з вірусів, продукованих у яйцях); віріони виділяють та очищують центрифугуванням [Furminger, *supra*, див. стор.326]. Для оцінки дієвості вакцини може бути проведено тестування способом простої радіальної імунодифузії (SRD) [Schild et al., *Bull. World*

Health Organ., 1975, 52:43-50 та 223-31; Mostow et al., J. Clin. Microbiol., 1975, 2:531]. Доза, потрібна для викликання задовільної імунної відповіді, була стандартизована і становить 15мкг HA/штам/дозу. Інактивована вакцина може бути введена внутрішньо-язово шляхом ін'єкції.

Живі атенуйовані вакцини грипу

Були розроблені атенуйовані адаптовані холером живі РНК-вірусні вакцини (вакцини грипу) [див. Keitel and Piedra, In: Nicholson, Webster and May (eds.), Textbook of Influenza, Chapter 28, pp.373-390; Ghendon, In: Nicholson, Webster and May (eds.), Textbook of Influenza, Chapter 29, pp.391-399]. Здатність генерувати вірус грипу цілком з восьми плазмід дозволяє регулювати атенуацію вакцинного штаму і здійснювати розробку вакцинного штаму, оптимально пристосованого до будь-якої цільової популяції [див. Bilsel and Kawasaka, supra]. Оскільки штами грипу A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) або грипу B/Ann Arbor/1/66 використовуються зараз для виготовлення живих атенуйованих вакцин, то можна вставити кожну з шести кДНК внутрішніх генів (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) грипу у плазмиду, таку як pHW2000. Дві плаزمиди, що містять глікопротеїни HA та NA відповідного штаму грипу, будуть сконструйовані та трансфектовані з шістьма базовими плазмідами, що кодують неглікозилізовані протеїни грипу.

Очікується, що генетична модифікація кодуєчої чи некодуєчої ділянки внутрішніх генів підвищує безпечність, інфекційність, імуногенність та захисну ефективність вакцини, а також дозволяє розробку атенуйованого вірусу.

Маніпулювання геном HA також може підвищити безпечність штаму вакцини. Наприклад, видалення основних амінокислот, що знаходяться у зв'язуючому пептиді H5 чи H7 глікопротеїнів вископатогенних вірусів грипу А птиць може підвищити безпечність вакцини.

Мукозальна вакцинація. Стратегії мукозальної вакцинації є особливо ефективними для багатьох патогенних вірусів, оскільки інфікування часто відбувається крізь слизову оболонку. Вона містить дендритоподібні клітини, які є важливими мішенями для EBNA-1 вакцин та імунотерапії. Таким чином, передбачаються стратегії мукозальної вакцинації для інактивованих та атенуйованих вірусних вакцин. Хоч доставка до слизової оболонки може бути здійснена місцевим застосуванням вакцини, для доставки імуногенних протеїнів до неї використовувалися різні стратегії.

В конкретному варіанті втілення вакцина може бути введена у суміші з/або у вигляді кон'югата чи химерного злитого протеїну з холерним токсином, таким як холерний токсин В чи химера холерного токсину А/В [Hajishengallis, J. Immunol., 154:4322-32, 1995; Jobling and Holmes, Infect. Immun., 60:4915-24, 1992]. Були описані мукозальні вакцини, основані на використанні субодиниці холерного токсину В [Lebens and Holmgren, Dev. Biol. Stand., 82:215-27, 1994]. В іншому варіанті втілення для мукозальної вакцинації може бути приготовлена суміш з термолабільним ентеротоксином (LT).

Інші стратегії мукозальної імунізації включають інкапсулювання вірусу у мікрокапсулах [патенти США №5075109, №5820883 та №5853763] та ви-

користання імунопотенціювального мембранного носія [WO 98/0558]. Імуногенність імуногенів, що вводяться орально, може бути посилена шляхом використання червоних кров'яних клітин (rbc) чи "тіней" rbc [патент США №5643577], або шляхом використання антигену катаральної лихоманки овець [патент США №5690938].

Приклади

Даний винахід буде зрозумілішим при посиленні на наступні приклади, що ілюструють винахід, не обмежуючи його.

Приклад 1: "Амбісисловий" підхід до генерування вірусу грипу А: синтез вРНК та мРНК з однієї матриці

Як перша стадія у зменшенні кількості плазмід, цей Приклад описує конструювання та трансфекцію плазмід, що містять в одній плазміді промотори як pol I, так і pol II, і є свідченням того, що ця система дозволяє експресію вРНК та протеїну з однієї матриці. Цей Приклад був опублікований [Hoffmann et al., Virology, 2000, 267:310].

Матеріали та методи

Клонування плазмід. Все клонування та PCR-реакції здійснювали у відповідності до стандартних протоколів. Стисло кажучи, експресійні плазмиди для генів полімеразного комплексу A/WSN/33 були виготовлені з pcDNA3 (Invitrogen), що містить безпосередній ранній промотор цитомегаловірусу людини (CMV) та полі(A) сайт гена, що кодує бічний гормон росту (BGH). Вірусні кДНК були виготовлені з плазмід pWNP143, pWSNPA3, pWSNPB2-14, pGW-PB1 з одержанням експресійних конструктів pHW25-NP, pHW23-PA, pHW21-PB2, pHW22-PB1. pHW12 було одержано шляхом вставлення послідовностей промотора pol I та термінатора людини між промотором pol II та поліА-сайтом. Плазмиду pHW52 було одержано з pHW12 спочатку шляхом вставлення олігонуклеотидів, що містять некодуєчу ділянку PB1 з приєднаннями сайтами HindIII and XhoI, а потім вставлення до цих сайтів PB1-кодуєчої ділянки з pHW22-PB1. Плазмиду pHW82-PB1 було одержано з pHW52-PB1 шляхом делеції послідовностей промотора CMV. Кодуюча ділянка посиленого зеленого флуоресцентного протеїну (EGFP) у репортерному конструкті pHW72-EGFP була одержана після PCR-ампліфікації з використанням рEGFP-N1 (Clontech) як матриці та вставлення кДНК після SacII/XhoI-гідролізу до плазмиди pHW72, що містить промотор pol I людини та мишачий термінатор і некодуєчу ділянку М-сегмента, відокремлену сайтами SacII/XhoI. pHW127-M та pHW128-NS були сконструйовані шляхом RT-PCR ампліфікації вірусної РНК з праймерами, що містять сегмент-специфічні послідовності та сайти BsmBI для вставлення до гідролізованого BsmBI вектора pHH21 [E. Hoffmann, Ph.D. Thesis 1997, Justus Liebig University, Giessen, Germany; Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96:9345]. Конструювання плазмід pPoll-WSN-PB1; pPoll-WSN-PB2, pPoll-WSN-PA, pPoll-WSN-NP, pPoll-WSN-HA, pPoll-WSN-NA, pEWSN-HA та pCAGGS-WNA15 було описано в інших джерелах [Neumann et al., supra].

Клітинна культура та трансфекція. Клітини Медін-Дербі собачої нирки (MDCK) утримували в

модифікованому середовищі Ігла (MEM), яке містить 10% сироватки плоду корови (FBS), клітини 293Т нирки ембріону людини культивували у середовищі Ігла, модифікованому за Дюльбекко (DMEM), яке містить 10% FBS TransIT LT-1 (Panvera, Madison, Wisconsin) використовували згідно з інструкціями виробника для трансфекції 1×10^6 клітин 293Т. Різну кількість плазмід (Таблиця 1) змішували з TransIT LT-1 (2мкг TransIT LT-1 на 1мкг ДНК), інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хвилин і додавали до клітин. Через шість годин ДНК-трансфекційну суміш заміщали на Opti-MEM (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland), що містить 0,3% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) та 0,01% FBS. Через сорок вісім годин після трансфекції надосадову рідину, що містить вірус, титрували у клітинах MDCK.

Виділення РНК та RT-PCR. Вірусну РНК виділяли з вірусних частинок за допомогою RNeasy-Kit (Qiagen, Valencia, California) згідно з інструкціями виробника. Для характеристики рекомбінантних вірусів грипу використовували набір Access RT-PCR (Promega, Madison, Wisconsin) згідно з протоколом, що надається. В експериментах RT-PCR використовували такі праймери: Seq-PB1#1: 5'-AGG ATG GGA TTC CTC AAG G-3' (SEQ ID NO:1); Seq-PB1#2: 5'-GCT ATG GTT TCC AGA GCC CG-3' (SEQ ID NO:2); Bm-PB1-1: 5'-TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC A-3' (SEQ ID NO:3); Bm-PB1-2341R: 5'-ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT-3' (SEQ ID NO:4). Експерименти RT-PCR здійснювали з використанням пристрою PTC-200 DNA (MJ Research, Watertown, Massachusetts). Програма ампліфікації починалася з одного циклу при 48°C протягом 45хв. (синтез першого ланцюга кДНК) та одного циклу при 94°C протягом 2хв. (інактивація AMV-зворотної транскриптази та денатурація кДНК). За цими циклами йшли 40 циклів при 94°C протягом 20с, 52°C протягом 30 с та 72°C протягом 3с (PCR ампліфікація); програма закінчувалася одним циклом при 72°C протягом 5хв. Продукти PCR аналізували методом електрофорезу на агарозному гелі та секвенували з праймером Seq-PB1#1 чи Seq-PB1#2.

Потокова цитометрія Через сорок вісім годин після трансфекції клітини 293Т промивали фізіологічним розчином з фосфатним буфером (PBS), центрифугували та ресуспендували у PBS плюс 5% FBS. Аналіз методом потокової цитометрії проводили з використанням потокового цитометра FACS Calibur (Becton Dickinson), і дані аналізували з використанням пакета прикладних програм CellQuest. Для аналізу експресії EGFP використовували довжину хвилі емісії 530нм (FL10 для досягнення більшої чутливості детектування EGFP-медійованої флуоресценції).

Результати та обговорення

Конструювання та характеристики клонуючого вектора рНВ12, який містить два еукаріотичні промотори. Віруси грипу А є сегментованими вірусами, що містять молекули РНК з "мінус"-смыслову полярністю. Під час циклу реплікації розпізнавання 5'- та 3'-структур восьми сегментів РНК протеїнами рибонуклеопротеїнового комплексу (PB2, PB1, PA, NP) приводить до реплікації та

транскрипції генів вірусу грипу. Той факт, що елементи термінальних послідовностей є високо консервативними, вказує на те, що транскрибовані штучні РНК повинні мати послідовності, які не відрізняються від тих, що знаходяться на 5'-та 3'-кінцях [Luo et al., J. Virol., 1991, 65:2861; Flick et al., RNA, 1996, 2:1046]. Був сконструйований клонуючий вектор рНВ12, який дозволяє вставлення потрібних послідовностей між промотором pol I та термінатором за допомогою ендонуклеази рестрикції BsmBI. Одиниця транскрипції pol I границь з промотором pol II цитомегаловірусу (CMV) сигналом поліаденілювання з гена, що кодує бичачий гормон росту. CMV-промотор, полі(А)-сайт та остов плазмід узяті з клонуючого вектора рсDNA3.

Експресія протешу PB1 у pol I/pol II двоспрямованій системі транскрипції. Для випробування одноплазмідної pol I/pol II системи транскрипції, кДНК гена PB1 вірусу A/WSN/33 вставляли до клонуючого вектора рНВ12, одержуючи плазмиду рНВ52-PB1. Сайти рестрикції HindIII та XhoI були вставлені до 5'- та 3'-некодуючих ділянок цього гена. Ці генетичні мітки були включені для того, щоб забезпечити розпізнавання генерованого рекомбінантного вірусу методом RT-PCR. Очікувалося, що клітини людини, трансфіковані цією плазмидою, вироблятимуть два типи РНК: PB1-вРНК, синтезовану клітинним pol I, та мРНК з 5'-кеп структурою, синтезовану pol II. Трансляція мРНК повинна приводити до синтезу PB1-протеїну.

Для того, щоб визначити, чи продукується протеїн PB1 цим конструктором, автор дослідив реплікацію та транскрипцію штучної вРНК шляхом конструювання експресійних плазмід рНВ21-PB2, рНВ23-PA та рНВ25-NP, які містять кДНК, що кодує протеїни PB2, PA та NP A/WSN/33 під контролем CMV-промотора. Для *in vivo* синтезу штучної вРНК було сконструйовано репортерну плазмиду рНВ72-EGFP, що містить кДНК EGFP, яка границь з некодуючою ділянкою М-сегмента та промотором pol I людини і мишачою термінальною послідовністю. П'ять плазмід (2мкг рНВ21-PB2, 2мкг рНВ52-PB1 (конструкт з pol I/pol II промоторами), 2мкг рНВ23-PA, 2мкг рНВ25-NP та 1мкг рНВ72-EGFP) були трансфіковані до клітин 293Т. Через 24 та 48 годин після трансфекції клітини аналізували методом флуоресцентної мікроскопії. Після 24 годин спостерігалися флуоресцентні клітини. Цей результат показує, що протягом 24 годин синтезуються протеїни полімерази у концентрації, достатній для того, щоб дозволити розпізнавання вірусу грипу-специфічних кінців EGFP-вРНК. Ці протеїни синтезують мРНК, яка транслюється у EGFP.

Для оцінки ефективності цієї системи проведено потоковий цитометричний аналіз для підрахунку кількості флуоресцентних клітин. Через сорок вісім годин після трансфекції п'яти плазмід 18,72% клітинної популяції виявляли флуоресценцію. Якщо не додавали плазмиду рНВ52-PB1, то спостерігався лише фоновий рівень флуоресцентних клітин (0,06%); цей результат узгоджується з даними попередніх досліджень, які показують, що всі чотири РНП-комплексні протеїни є необхідними для ампліфікації вРНК [Huang et al., J. Virol., 1990,

64:5669]. Ці результати вказують на те, що PB1-кДНК транскрипція та кінцева концентрація PB1 протеїну разом з іншими РНП-комплексними протеїнами є достатньою для ініціації процесу вірусної транскрипції/реплікації.

Генерування рекомбінантного вірусу грипу А. Для генерування інфекційного вірусу грипу А необхідно, щоб плазмід рНW52-PB1 забезпечувала одержання не лише PB1 мРНК та протеїну, але також достатню кількість PB1-вРНК, яка може бути спаксована у вірусне потомство. Для решти сім'ї вРНК використовували плазмід, які містять кДНК непроцесованих РНК вірусу A/WSN/33, що граничає з промотором pol I людини та мишачим термінатором. Трансфекція цих плазмід повинна приводити до синтезу усіх восьми вірусних РНК, які реплікуються та транскрибуються полімеразними протеїнами з утворенням нових вРНК. Після синтезу структурних протеїнів ці РНП будуть спаксовані у нові вірусні частинки.

Клітини 293T трансфікували різною кількістю плазмід рНW52-PB1 (0, 2, 4мкг) разом з плазмідами рPolI-WSN-PB2, рPolI-WSN-PA, рPolI-WSN-NA, рPolI-WSN-NP, рPolI-WSN-NA, рНW127-M, рНW128-NS (по 1мкг кожної). Плазмід експресії протеїну рНW21-PB2 (1мкг), рНW23-PA (0,1мкг), рНW25-NP (1мкг), рEWSN-NA (1мкг), and рCAGGS-WNA15 (1мкг) були котрансфіковані. Плазмід експресії гемаглютиніну (HA) та нейрамінідази (NA) були включені для підвищення виходу вірусу, що трансфікується.

Через сорок вісім годин після трансфекції надосадову рідину первинних трансфікованих клітин 293T переносили до клітин MDCK. В усіх експериментах з трансфекції, у яких додавали плазмід рНW52-PB1, через 24 години спостерігали вірус-індукований цитопатичний ефект. Цитопатичний ефект не спостерігався, якщо до реакції трансфекції не було включено PB1-експресуючої плазмід. Титр вірусу визначали шляхом титрування надосадової рідини з трансфікованих клітин на клітинах MDCK; було знайдено, що надосадова рідина містить 2×10^4 - 2×10^5 pfu/мл. Цей результат показує, що після трансфікування PB1-pol I/pol II-промоторної плазмід (разом з експресійними плазмідами) PB1 вРНК та PB1 протеїни синтезуються у клітинній лінії 293T людини у рівнях, достатніх для генерування інфекційних вірусів грипу А. В експериментах з котрансфекції з використанням плазмід, що містить PB1-кДНК, розділену на дві плазмід (рНW82-PB1 та рНW22-PB1), було одержане значення титру вірусу 2×10^4 pfu/мл; аналогічний експеримент з використанням плазмід з послідовностями PB1 дикого типу (рPol I-WSN-PB1 та рНW22-PB1) дали титр вірусу 3×10^6 pfu/мл.

На відміну від конструкту експресії з промотором pol II, що використовувався у попередніх дослідженнях [Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96:9345], автор використовує плазмід рНW52-PB1, що містить послідовності, виділені з одиниці транскрипції pol I, які вставлені між CMV-промотором та сайтом поліаденілювання. Експресія репортерного гена EGFP демонструє, що загальна експресія PB1-протеїну в цій системі є достатньою для утворення комплексів EGFP-RNP. Хоч ділянка промотор pol I/термінатор містить послідо-

вності розпізнавання pol I-специфічних факторів транскрипції та термінації [Beckmann et al., Science, 1995, 270:1506; Bell et al., Science, 1988, 241:1192; Kuhn et al., EMBO J., 1994, 13:416], ці ДНК-зв'язуючі протеїни, мабуть, не інгібують pol II-медійовану транскрипцію. Ці результати узгоджуються з даними про те, що pol I-специфічні ДНК-зв'язуючі протеїни є більш поширеними в ядрі, яке є компартментом, де відбувається клітинна рДНК-транскрипція [Evers et al., EMBO J., 1995, 14:1248]. Ці результати вказують на те, що після трансфекції до клітини pol I/pol II-промоторного конструкта деякі плазмід доставляються до ядра, де відбувається pol I-медійована транскрипція, а деякі затримуються у ядрі, де вони транскрибуються РНК полімеразою II.

Оскільки репортерний конструкт рНW52-PB1 містив додаткові послідовності, які не належать вірусу грипу (сайти рестрикції), у некодуючій ділянці перед стартовим кодоном та після стоп-кодону, нам було цікаво, чи будуть ці послідовності стабільно підтримуватись у вірусному PB1 РНК-сегменті. Тому ми виділили вРНК після другого переміщення трансфікованого вірусу на клітинах MDCK та здійснили аналіз методом PCR із зворотною транскриптазою. Ампліфікація вРНК PB1-специфічними праймерами привела до генерування кДНК-фрагментів очікуваного розміру. При використанні тих самих вірусної РНК та праймерів, але без додавання зворотної транскриптази ніякого продукту ампліфікації одержано не було, що вказує на те, що кДНК походить від вірусної РНК, а не від плазмідної ДНК, перенесеної з надосадовою рідиною трансфікованих клітин.

Секвенування продуктів PCR виявило, що молекула РНК містить обидві послідовності сайтів рестрикції. Результати показують, що система транскрипції pol I/pol II дозволяє одержувати інфекційний рекомбінантний вірус і що вірус з чужорідними послідовностями у некодуючій ділянці гена PB1 є життєздатним. Цей модифікований сегмент PB1, як і раніше, реплікується, транскрибується та спаксовується у вірусні частинки. Раніше, була змінена некодуюча ділянка сегментів вірусу грипу А за допомогою РНП-трансфекційної системи. Шляхом заміни некодуючої ділянки гена NA на відповідну послідовність NS-сегмента грипу В були одержані трансфектантні віруси грипу [Muster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88:5177; Bergmann and Muster, J. Gen. Virol., 1995, 76:3211]. Цей тип вірусу з химерним сегментом NA виявив атенуований фенотип у мишей і захищав мишей, інюльованих нелетальною дозою, від інфікування вірусною інфекцією грипу дикого типу. Ці результати показують, що генетичні зміни некодуючої ділянки сегмента РНК можуть змінити біологічні властивості трансфікованого вірусу. В цій роботі уперше повідомляється про те, що до некодуючої ділянки сегмента PB1 можуть бути вставлені послідовності не тільки вірусу грипу.

За допомогою системи транскрипції pol I/pol II тепер можливо систематично модифікувати ці елементи послідовності у некодуючій ділянці сегмента PB1 та оцінювати, чи приведуть ці генетичні маніпуляції до змін у біологічних властивостях рекомбінантних вірусів. Дійсно, нижчий вихід віру-

сів змутованим сегментом PB1 у порівнянні з вірусом дикого типу вказує на те, що вставлені послідовності негативно впливають на ріст вірусу.

Хоч розроблена нещодавно система на основі плазмід [Neumann et al., supra] є високоефективною за показником генерування вірусу грипу, вона потребує клонування 14-17 плазмід. В цих дослідженнях зменшено кількість плазмід до 13, потрібних для ефективного виділення вірусу грипу штаму A/WSN/33. Зменшення кількості плазмід, яке досягається за цим підходом, обіцяє підвищити ефективність трансфекції для інших клітинних ліній, крім клітин 293T, тим самим дозволяючи здійснювати доставку генів у клітинних лініях, у яких важко досягти ефективної доставки 14 плазмід. [Fodor et al. (J. Virol., 1999, 73:9679)] змогли виділити вірус грипу після трансфікування 12 плазмід, але вихід вірусу в цих дослідженнях становив лише 1-2 інфекційні вірусні частинки на 10^6 трансфікованих клітин Vero.

Приклад 2: Конструювання рекомбінантних вірусів грипу А з мінімальної системи на основі плазмід

Цей приклад описує використання системи трансфекції на основі плазмід для виділення вірусу грипу А цілком з клонованої кДНК. На відміну від відомих систем на основі плазмід, ця система генерування вірусу грипу А використовує конструювання та трансфекцію лише восьми експресійних плазмід, кожна з яких містить одну копію окремої вірусної кДНК, що відповідає сегменту вірусного гена. Ця зворотно-генетична система зменшує кількість плазмід, потрібних для виділення вірусів грипу А і дозволяє передбачувати та ефективно генерувати реасортативні віруси.

Матеріали та методи

Клонування плазмід. Плазмиду pHW2000 (Фігура 3А) виготовляли з pHW12 (Приклад 1). Клонуючий вектор pHW2000 містить послідовності 225п.н. промотора pol I людини та 33п.н. мишачого термінатора, розділені двома сайтами BsmBI. Елементи промотора pol I та термінатора граничать з усиченим безпосереднім раннім промотором цитомегаловірусу людини (починаючи приблизно на 350 п.н. вище сайту початку транскрипції, як це зроблено у pcDNA3, Invitrogen, Carlsband, California) та з сигналом поліаденілювання гена, що кодує бичачий гормон росту. Вісім плазмід, які містять кДНК вірусу A/WSN/33 (H1N1) (pHW181-PB2, pHW182-PB1, pHW183-PA, pHW184-HA, pHW185-NP, pHW186-NA, pHW187-M та pHW188-NS) були сконструйовані шляхом вставлення фрагментів ApaI-Sall (з віруною кДНК та послідовностями промотора pol I та термінатора) плазмід pPoll-WSN-PB2, pPoll-WSN-PB1, pPoll-WSN-PA, pPoll-WSN-NP, pPoll-WSN-HA, pPoU-WSN-NA [Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96:9345], pHW127-M та pHW128-NS (Приклад 1) до ApaI-Sall векторного фрагмента pHW2000. Вісім плазмід, що містять кДНК A/Teal/HK/W312/97 (H6N1) (pHW241-PB2, pHW242-PB1, pHW243-PA, pHW244-HA, pHW245-NP, pHW246-NA, pHW247-M та pHW248-NS) були сконструйовані шляхом ампліфікації вірусної РНК способом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскриптазою (RT-PCR). Праймери, використані в реакції PCR, містять сег-

мент-специфічні послідовності на 3'-кінці та послідовності рестрикційних сайтів SsmBI чи BsaI на 5'-кінці. Після гідролізу продуктів PCR за допомогою BsmBI чи BsaI, фрагменти були клоновані до вектора pHW2000 (Фігура 3А). Послідовності праймерів, використаних для ампліфікації геному A/teal/HK/W312/97 (H6N1), наведені далі. Праймери наведені зліва направо, що відповідає 5'- та 3'-кінцям. Грип А-специфічні нуклеотиди підкреслені.

NS:

Bm-NS#1:

TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG (SEQ ID NO:5)

Bm-NS#2:

ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAC AAGGGTGTTT (SEQ ID NO:6)

M:

Bm-M#1:

TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG (SEQ ID NO:7)

Bm-M#2:

ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAC AAGGTAGTTTTT (SEQ ID NO:8)

NA:

Bm-NAI-1:

TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGTTTAAAC ATG (SEQ ID NO:9)

Bm-NA-1413R:

ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAC AAGGAGTTTTT (SEQ ID NO:10)

HA:

Bt-H6-1:

TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGGAAAATG (SEQ ID NO:11)

Bm-NS#2:

ATATCGTGTCTGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTT (SEQ ID NO:12)

(примітка: HA та NS-сегмент мають ідентичну послідовність в цій частині некодуючої ділянки)

NP:

Ba-NP-1:

TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGTA (SEQ ID NO:13)

Ba-NP1565R:

ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATT (SEQ ID NO:14)

PA:

Bm-PA1-1:

TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTA CTGATC C (SEQ ID NO:15)

Bm-PA1-2231R:

ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAC AAGGTACTTTT T (SEQ ID NO:16)

PB1:

Bm-PB1a-1:

TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA AACC (SEQ ID NO:17)

Bm-PB1-2341R:

ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAC AAGGCATTT (SEQ ID NO:18)

PB2:

Ba-PB2-1:

TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTCAATTAT ATTC (SEQ ID NO:19)

Ba-PB2-2341R:
ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTTT
T (SEQ ID NO:20)

RT-реакцію проводили з праймером 5'-AGCAAAAGCaGG-3' (SEQ ID NO:21). Для того, щоб впевнитися, що вірусні кДНК, одержані ампліфікацією методом RT-PCR, не містять небажаних мутацій в експресійних плазмідах, вставлені кДНК секвенували.

Віруси та клітинна культура. Віруси грипу A/WSN/33 (H1N1) та A/Teal/HK/W312/97 (H6N1) розмножували в яйцях у віці 10 днів. Клітини Медін-Дербі собачої нирки (MDCK) утримували в модифікованому середовищі Ігла (MEM), яке містить 10% FBS. Клітини нирки ембріону людини 293T культивували у Opti-MEM I (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland), що містить 5% FBS. Для експериментів з трансфекції були використані шестилункові планшети з культурами тканин. За день до трансфекції клітини 293T та MDCK на стадії суцільного росту у колбі на 75см² триптизували і 10% кожної клітиної лінії розмішували у 18мл OptiMEM I; 3мл цієї клітинної суспензії висівали в одну лунку шестилункового планшета. Спільні культури клітин MDCK та 293T 0,2-1×10⁶ клітин на лунку кожної використовували для експериментів з трансфекції. Для трансфікування клітин використовували TransIT LT-1 (Panvera, Madison, Wisconsin) згідно з інструкціями виробника. Стисло кажучи, 2мкл TransIT LT-1 на 1мкг ДНК перемішували, інкубували при кімнатній температурі протягом 45хв. і додавали до клітин. Через шість годин ДНК-трансфекційний суміш заміщали на Opti-MEM I. Через тридцять годин після трансфекції до клітин додавали 1мл Opti-MEM I, що містить TPCK-трипсин; це додавання призводило до кінцевої концентрації TPCK-трипсину 0,5мкг/мл у надосадовій рідині клітин. Вірусний титр надосадової рідини клітин визначали шляхом титрування надосадової рідини на клітинах MDCK.

Виділення РНК та RT-PCR. Вірусну РНК виділяли з вірусних частинок за допомогою RNeasy-Kit (Qiagen, Valencia, California), який використовували згідно з інструкцією виробника. Для характеристики рекомбінантних вірусів грипу використовували набір Access RT-PCR kit (Promega, Madison, Wisconsin) згідно з наданим протоколом. В експериментах RT-PCR використовували такі праймери: Bm-NS#1 (5'-TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TG-3; SEQ ID NO:5) та Bm-NS#2 (5'-ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT-3; SEQ ID NO:12). Експерименти RT-PCR здійснювали з використанням приладу PTC-200 DNA (MJ Research, Watertown, Massachusetts). Програма ампліфікації починалася з 1 циклу при 48°C протягом 45хв. та 1 циклу при 94°C протягом 2хв. За цими циклами йшли 40 циклів при 94°C протягом 20с, 52°C протягом 3с та 72°C протягом 40с; програма закінчувалася одним циклом при 72°C протягом 5хв. Продукти PCR аналізували методом електрофорезу на агарозному гелі і секвенували за допомогою праймера

Bm-NS#1. Послідовність матричної ДНК визначалася у Центрі біотехнологій Дитячої дослідницької лікарні св.Іуди (Center for Biotechnology, St.Jude Children's Research Hospital) з використанням готового до використання набору реактивів для циклічного секвенування методом барвник-термінатор dRhodamine з ДНК-полімеразою FS AmpliTaq® (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, inc. [PE/ABI], Foster City, CA) і синтетичними олігонуклеотидами. Зразки піддавали електрофорезу, детектуванню та аналізу на секвенаторах PE/ABI моделі 373, моделі 373 Stretch чи моделі 377 DNA.

Результати

Створення системи pol I-pol II для генерування A/WSN/33 (H1N1). Оскільки геном вірусу грипу А містить вісім сегментів, було зроблене припущення, що вставлення всіх восьми кДНК грипу А між промотором pol I та промотором pol II має привести до транскрипції восьми вРНК, усі з вірусними РНК, та синтезу всіх 10 вірусних протеїнів (Фігура 1). Тоді після збирання всіх вірусних рибонуклеопротеїнів зі структурними протеїнами буде утворюватись інфекційний вірус грипу А (Фігура 2).

Для того, щоб перевірити, чи може бути одержаний інфекційний вірус грипу А з використанням цієї системи двоспрямованої транскрипції кДНК, були сконструйовані вісім експресійних плазмід (pHW181-PB2, pHW182-PB1, pHW183-PA, pHW184-NA, pHW185-NP, pHW186-NA, pHW187-M та pHW188-NS), які містять вісім кДНК A/WSN/33 (H1N1). Вісім плазмід (1мкг кожної плазмід) (Таблиця 1) були котрансфіковані до тимчасово співкультивованих клітин 293T-MDCK. Обидві клітинні лінії співкультивували в одній лунці клітинної культури за день до трансфекції для забезпечення умов для високої ефективності ДНК-трансфекції (клітини 293T) та для ефективної реплікації (клітини MDCK) вірусів грипу А. Через 48 та 72 години клітини MDCK виявляли вірус-індукований цитопатичний ефект, але після трансфекції семи плазмід без PB1-експресійного конструкта ніякого цитопатичного ефекта не спостерігалось (Таблиця 1). Вірусний титр надосадової рідини визначали для різних моментів часу після трансфекції шляхом титрування на клітинах MDCK. Через двадцять чотири години після трансфекції надосадова рідина з клітин містила 1×10³ вірусів на мл; через 72 години після трансфекції було генеровано 2×10⁷ інфекційних вірусів на мл (Таблиця 1). Виділені віруси пасирували два рази на клітинах MDCK. Для того, щоб впевнитись у тому, що генерований вірус є потрібним A/WSN-вірусом, продукували методом RT-PCR кДНК гена NS (Фігура 4А, смужка 8). Генерування двох фрагментів після гідролізу ендонуклеазою рестрикції NcoI (Фігура 4Б, смужка 8) та секвенування ампліфікованого фрагмента підтвердили, що одержаний вірус дійсно був бажаним вірусом A/WSN. Ці результати показують, що синтез вРНК та мРНК з восьми матриць під керуванням pol I та pol II приводить до генерування інфекційного вірусу грипу А.

Таблиця 1

Набори плазмід, використані для одержання вірусів A/WSN/33 (H1N1) та A/Teal/HK/W312/97 (H6N1)

Сегмент	A/WSN/33(H1N1)		A/Teal/HK7W312/97 (H6N1)	
1	pHW181-PB2	PHW181-PB2	PHW241-PB2	pHW241-PB2
2	-	PHW182-PB1	-	pHW242-PB1
3	pHW183-PA	PHW183-PA	pHW243-PA	pHW243-PA
4	PHW184-HA	PHW184-HA	pHW244-HA	pHW244-HA
5	pHW185-NP	PHW185-NP	pHW245-NP	pHW245-NP
6	pHW186-NA	PHW186-NA	pHW246-NA	pHW246-NA
7	pHW187-M	pHW187-M	pHW247-M	pHW247-M
8	pHW188-NS	PHW188-NS	pHW248-NS	pHW248-NS
Вірусний титр [§]				
t=24год.	0	1×10^3	0	0
t=48год.	0	$2 \times 10^{6*}$	0	2×10^3
t=72год.	0	$2 \times 10^{6*}$	0	$2 \times 10^{6*}$

§ Числа показують кількість інфекційних вірусних частинок на мл надосадової рідини трансфікованих клітин, визначену через 24 год., 48 год. та 72 год. після трансфекції

* У співкультивованих клітин MDCK спостерігався і цитопатичний ефект.

Одержання A/Teal/HK/IV312/97 (H6N1) шляхом котрансфікування восьми плазмід. Вірус грипу A/WSN/33 (H1N1), який походить від штаму пандемії грипу людини 1918р. xGoto and Kawaoka, Proc. Acad. Sci. USA, 1998, 95:10224; Reid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96:16511, був пасирований у мишачому мозку і добре адаптований для вирощування у клітинній культурі. Для оцінки ефективності системи з восьми плазмід для генерування вірусу з клонованої кДНК, яка не була попередньо адаптована для вирощування у клітинній культурі, зробили спробу генерування вірусу A/Teal/HK/W312/97 (H6N1) з самої лише клонованої кДНК. Цей вірус H6N1 був ізолюований з мертвого чирка під час спалаху H5N1 у Гонконзі в 1997р. Генетичний аналіз цього вірусу показав, що він має сім сегментів при нуклеотидній гомології з патогенними штамами вірусу H5N1 більш ніж 97%. З інфікованої алантоїсної рідини була екстрагована РНК, і ампліфіковані способом RT-PCR кДНК були вставлені до pHW2000; ця вставка привела до одержання восьми експресійних плазмід (Фігура 3). Через сімдесят дві години після трансфекції pHW241-PB2, pHW242-PB1, pHW243-PA, pHW244-HA, pHW245-NP, pHW246-NA, pHW247-M та pHW248-NS (1мкг кожної) до співкультивованих клітин 293T-MDCK у клітин MDCK спостерігався вірус-індукований цитопатичний ефект (Таблиця 1). Вихід вірусу становив 2×10^5 інфекційних вірусів на мл надосадової рідини трансфікованих клітин. Як показано на Фігурі 4 (А та В, смужка 2), ідентичність одержаного вірусу була підтверджена шляхом характеристики сегмента NS. Ці результати показують, що ця плазмідна система потребує клонування лише восьми кДНК до одного плазмідного вектора, і що трансфекція восьми експресійних плазмід дозволяє одержати вірус грипу А1

який має антигенність вірусу, що не був адаптований до вирощування у клітинах ссавців.

Одержання реасортативних вірусів грипу А. Було перевірено придатність восьмиплазмідної системи для генерування реасортативних вірусів. Оскільки ця система трансфекції ДНК не потребує ніякої системи селекції, виділення реасортативних вірусів має забезпечуватись відповідною комбінацією експресійних плазмід у реакціях трансфекції. Сім експресійних плазмід, що містять кДНК A/Teal/HK/W312/97 (H6N1) були котрансфіковані з однією експресійною плазмідною, що містила кДНК A/WSN/33 (H1N1) (Таблиця 2). Був одержаний високий вихід реасортативних вірусів, які містили сім сегментів вірусу чирка та М-сегмент чи NS-сегмент вірусу WSN. Нижчі виходи вірусу були одержані для NA- та HA-реасортативних вірусів (Таблиця 2). Оскільки при використанні восьмиплазмідної системи одержували певні реасортативні віруси, наступним кроком було визначення того, чи може бути одержаний вірус при використанні численних сегментів, одержаних від одного вірусу. Для цього, чотири експресійні плазмиди, що містили кДНК генів РНП-комплексу вірусу H6N1 (pHW241-PB2, pHW242-PB1, pHW243-PA та pHW245-NP) були трансфіковані разом з плазмідами pHW184-HA, pHW186-NA, pHW187-M та pHW188-NS, що містили кДНК вірусу WSN (Таблиця 2). Було одержано 4×10^6 вірусів на мл клітиної надосадової рідини. Як показано на Фігурі 4 (смужка 10), ампліфікований NS-сегмент квадрупольного реасортативного вірусу розщеплювався за допомогою Л/col; таким чином, сегмент NS походить з вірусу WSN. Ці результати показують, що восьмиплазмідна система трансфекції дозволяє одержувати синглетні та квадрупольні реасортативні віруси.

Таблиця 2

Генерування реасортативних вірусів грипу А з A/Teal/HK/W312 (H6N1) та A/WSN/33 (H1N1) шляхом котрансфікування восьми плазмід

сегмент*	HA	NA	M	NS	HA-NA-M-NS
1	PHW241-PB2	pHW241-PB2	pHW241-PB2	pHW241-PB2	pHW241-PB2
2	PHW242-PB1	pHW242-PB1	pHW242-PB1	pHW242-PB1	pHW242-PB1
3	PHW243-PA	pHW243-PA	pHW243-PA	pHW243-PA	pHW243-PA
4	PHW245-NP	pHW245-NP	pHW245-NP	pHW245-NP	pHW245-NP
5	PHW184-HA	pHW244-HA	pHW244-HA	pHW244-HA	pHW184-HA
6	PHW246-NA	pHW186-NA	pHW246-NA	pHW246-NA	pHW186-NA
7	PHW247-M	pHW247-M	pHW187-M	pHW247-M	pHW187-M
8	PHW248-NS	pHW248-NS	pHW248-NS	pHW188-NS	pHW188-NS
вірусний титр [§]	2×10 ²	2×10 ³	2×10 ⁵	2×10 ⁷	4×10 ⁶
* плазміни, що містять кДНК A/WSN/33 (H1N1), виділені жирним шрифтом					
[§] Числа показують кількість інфекційних вірусних частинок на мл надосадової рідин трансфікованих клітин, визначену через 72 год. після трансфекції					

Обговорення

Можливість одержання вірусу грипу А після трансфікування восьми експресійних плазмід, що містять кДНК A/Teal/HK/W312/97 (H6N1) або A/WSN/33 (H1N1) підтверджує, що система транскрипції pol I-pol II створює достатню кількість вРНК та вірусних протеїнів для утворення інфекційного вірусу грипу А. Синтезовані два типи мРНК, що відрізняються своїми некодуючими ділянками (Фігура 1). Тип мРНК, який кодує всі вірусні протеїни, транскрибується безпосередньо pol II. Крім послідовностей вірусу грипу, ці мРНК у некодуючих ділянках (NCR) містять послідовності з ділянок промотора pol I та мишачого термінатора. Важливо, що розроблена система експресії pol I-pol II містить лише 33п.н. мишачих термінальних послідовностей. Попередні дослідження з використанням репортерних генів хлорамфеніколацетилтрансферази (CAT) та зеленого флуоресцентного протеїну (GFP) показали, що послідовності у 174п.н.-термінальній ділянці знижували pol II-медіовану експресію протеїну [Hoffmann, E., Ph.D. Thesis 1997, Justus Liebig University, Giessen, Germany]. Другий тип мРНК генерується після ініціації процесу вірусної реплікації та транскрипції (Фігура 2). Ця мРНК синтезується протеїнами вірусної полімерази і містить 5-кеп структуру, яка утворюється з клітинних РНК шляхом захоплення кепи, що передують некодуючим послідовностям вірусу грипу. Структурні протеїни, трансльовані з обох мРНК, асоціюють з РНП-комплексами з утворенням нових вірусних частинок. Після пупкування трансфікованих вірусів, генеровані вірусні частинки можуть згодом реплікуватись у клітинах 293Т та у співкультурованих клітинах MDCK.

На відміну від підходів, описаних вище у розділі "Відомий рівень техніки", спосіб за даним винаходом використовує вісім кДНК у восьми плазмідах, які містять 225п.н. промоторні послідовності pol I та 33п.н. термінальних послідовностей. У системі pol I-pol II усі 10 вірусних протеїнів експресуються з усиченого безпосередньо раннього промотора цитомегаловірусу людини. Той факт, що експресія усіх структурних протеїнів з використан-

ням 17-плазмідної системи [Neumann et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1999, 96:9345] та 8-плазмідної системи (ці дослідження) давала більшу ефективність виходу вірусу, ніж котрансфікування плазмід, що експресують протеїни РНП-комплексу [Neumann et al., supra; Fodor et al., J. Virol., 1999, 73:9679] підтверджує думку про те, що генерування інфекційного вірусу грипу А посилюється за рахунок надання протеїнів HA, NA, M1, M2 та NS2 одразу ж після трансфекції.

Цикл вірусної реплікації включає комплексну взаємодію вірусних протеїнів один з одним та з клітинними факторами [Ludwig et al., Virol. Immunol., 1999, 12:175]. Так, для генерування інфекційного вірусу керований плазмідом синтез вірусних молекул повинен забезпечувати оптимальні концентрації вірусних протеїнів для ініціації циклу реплікації та утворення вірусоподібних частинок. Хоч восьмиплазмідна система виявилася ефективною, може існувати можливість додаткового збільшення продуктування вірусу. Було показано, що частка трансфікованих плазмід, що експресують протеїни РНП-комплексу, та експресія протеїну M1 впливають на транскрипційну активність [Pleschka et al., J. Virol., 1996, 70:4188; Perez and Donis, Virology, 1998, 249:52]. Ефективність утворення вірусоподібних частинок залежить також від концентрації структурних вірусних протеїнів [Mena et al., J. Virol., 1996, 70:5016; Gomez-Puertas et al., J. Gen. Virol., 1999, 80:1635; Neumann et al., J. Virol., 2000, 74:547]. Ефективність генерування інфекційного вірусу з використанням системи pol I-pol II може бути тому додатково підвищена шляхом варіювання концентрації плазмід, що використовуються у реакції трансфекції, або шляхом використання експресійних плазмід з різними промоторами pol II. Оскільки ефективність розщиплення, медіованого клітинними факторами, впливає на здатність вірусу грипу А до реплікації [Lau and Scholtissek, Virology, 1995, 212:225], використання інших клітинних ліній, ніж 293Т, може підвищити вихід вірусу для деяких штамів грипу А. Високий вихід вірусу при квадруальному реасортменті (Таблиця 2) узгоджується

з результатами, за якими швидка реплікація A/WSN/33 (H1N1) у культурі клітин медіюється сегментами HA, NA та M [Goto and Kawaoka, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95:10224; Schulman and Palese, J. Virol., 1977, 24:170; Yesuda et al., J. Virol., 1994, 68:8141].

Генерування життєздатних реасортантів (Таблиця 2) з вірусу H6N1 птахів та вірусу H1N1 людини вказує на те, що вірус H6N1 може включати генні сегменти з віддалено спорідненого вірусу. Генетичний аналіз дає змогу припустити, що патогенні віруси H5N1 були генеровані шляхом реасортменту [Xu et al., Virology, 1999, 261:15]. Сегменти H5M1-подібного гена були знайдені у субтипах H6N1 та H9N2 [Guan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96:9363], що вказує на те, що ці віруси можуть бути прекурсорами патогенних вірусів H5N1. Випадки реасортменту, що можуть створити нові патогенні віруси грипу ймовірно будуть відбуватися у майбутньому. Однак здатність генерувати та маніпулювати цими вірусами з використанням спрощеного методу, розробленого у цих дослідженнях, допоможе дослідникам краще зрозуміти біологічні властивості цих нових вірусів та розробити ефективні вакцини для захисту населення від них. Тривалість періоду часу між появою нового патогенного штаму та виготовленням вакцини є критичною змінною ефективності програми вакцинації. Можливість генерувати віруси шляхом клонування усього лише восьми зменшує час, потрібний для генерування потенційних вакцин-кандидатів та поліпшує існуючі зворотньо-генетичні системи за рахунок спрощення створення вірусу та зниження загальної вартості продукування вакцини.

Концепція вставлення вірусної кДНК між промотором pol I та промотором pol II до еукаріотичних клітин для одержання вірусу є також застосовною до генерування інших членів сімейства Orthomyxoviridae. Для вірусу грипу В ця стратегія вимагатиме конструювання та котрансфекції восьми плазмід, для грипу С - семи, а для тоготовірусу (Thogotovirus) - шести. Транскрипція in vivo 5'-кепованих мРНК, а також вРНК з однієї кДНК-матриці може також спростити системи на основі плазмід для інших РНК-вірусів, або навіть сприяти створенню систем pol I-pol II для вірусів з інших сімейств (наприклад, Arenaviridae, Bunyaviridae).

Приклад 3: Система РНК pol I/pol II для генерування вірусу грипу В цілком з клонованої кДНК

Віруси грипу А та В містять кожний по вісім сегментів одноланцюгової РНК з негативною поляриністю [див. огляд Lamb and Krug, "Orthomyxoviridae: The viruses and their replication"; in Fields (Ed.), Virology, p.1353-1395]. На відміну від грипу А, вісім сегментів грипу В кодують 11 протеїнів. Три найбільші гени кодують компоненти РНК-полімерази PB1, PB2 та PA; сегмент 4 кодує гемаглютинін. Сегмент 5 кодує нуклеопротеїн, який є основним структурним компонентом, асоційованим з вірусною РНК, сегмент 6 кодує нейрамінідазу (NA) та протеїн NB. Обидва протеїни - NB та NA - транслюються з перекривних рамок зчитування біцистронної мРНК Сегмент 7 грипу В також кодує два протеїни: BM1 та BM2 Найменший сегмент

кодує два продукти: NS1 транслюється з повної РНК, а NS2 транслюється з розщепленої мРНК.

Для конструювання експресійних плазмід, що містять кДНК грипу В, використовується та сама стратегія, що була описана для генерування вірусу грипу А A/teal/HK/W312/97 (H6N1). Спочатку ізолюють РНК з вірусних частинок, одержаних з інфікованої алантоїсної рідини, наприклад, B/Lee/40. На основі консервативних послідовностей некодируючого регіону були виготовлені праймери для RT-PCR, які використовувались для синтезу кДНК. На 5'-кінці ці праймери містять послідовності для ендонуклеаз рестрикції BsmBI чи BsaI. Гідроліз продуктів PCR за допомогою BsmBI чи BsaI дозволяє здійснювати вставлення до клонуючого вектора pHW2000 (або pHW11), лінеаризованого за допомогою BsmBI. Щоб впевнитися у тому, що кДНК у плазмідах не мають небажаних мутацій внаслідок помилок, зроблених полімеразою в процесі PCR, конструкти треба секвенувати.

Котрансфікування співкультивованих клітин 293T-MDCK (або клітин COS-1-MDCK) та додання трипсину приводить до генерування інфекційного вірусу грипу В. Надосадові рідини трансфікованих клітин потім пасерують на нові клітини MDCK. Одержаний вірусний титр може бути визначений стандартними способами, наприклад, методами аналізу HA та аналізу бляшкоутворення. Проведення RT-PCR із специфічними праймерами до кожного генного сегмента дозволяє здійснювати ампліфікацію РНК з рекомбінантного вірусу грипу В. Секвенування продуктів підтверджує, що генерований вірус є дійсно потрібним вірусом грипу В.

Приклад 4: Восьмиплазмідна система виготовлення еталонного штаму вірусу грипу А

Для визначення комерційної придатності цієї системи на основі плазмід для продукування вакцин, ми генерували еталонний штам A/PR/8/34 (H1N1), який зараз використовується для продукування інактивованої вакцини, цілком з клонованих кДНК, як описано у Прикладі 2. Вихід вірусу, визначений методом HA-аналізу після пасивування рекомбінованого вірусу у яйцях, був таким саме високим, як і вихід батьківського вірусу дикого типу. Ці результати підтверджують, що генерований рекомбінантний вірус має таку саме здатність до росту, як і батьківський вірус, вирощений на яйцях, і вказують на те, що восьмиплазмідний спосіб трансфікування має потенціал до удосконалення методів, які зараз використовуються для продукування вірусів для вакцин.

Матеріали та методи

Віруси та трансфекція. Вірус грипу A/PR/8/34 (H1N1) був одержаний з репозитарію Дитячої дослідної лікарні св.Іуди (St. Jude Children's Research Hospital) і розмножувався у курячих яйцях із зародками у віці 10 днів. Клітини Медін-Дербі собачої нирки (MDCK) утримували у MEM, що містить 10% FBS. Клітини нирки людини 293T та клітини Vero культивували у Opti-MEM I (Life Technologies, Gaithersburg, MD), що містить 5% сироватки плоду корови (FBS). Для експериментів з трансфекції використовували шестилункові чашки для тканинних культур. Для експериментів з трансфекції використовували сілкультивовані клітини MDCK та 293T ($0,21 \times 10^6$ кожної з клітин на

лунку). Для трансфікування клітин використовували TransIT LT-1 (Panvera, Madison, WI) згідно з інструкціями виробника. Стисло, змішували 2мкл TransIT LT-1 з 1мг ДНК, інкубували при кімнатній температурі протягом 45хв. і додавали до клітин. Через шість годин ДНК-трансфекційну суміш заміщали на Opti-MEM I. Через двадцять чотири години після трансфекції до клітин додавали 1мл Opti-MEM I, що містить ТРСК-трипсин; це додавання приводило до кінцевої концентрації ТРСК-трипсину 0,5мкг/мл у надосадовій рідині клітин. Вірусний титр визначали шляхом пасивування надосадової рідини клітин на клітинах MDCK методом аналізу бляшкоутворення.

RT-PCR та конструювання плазмід. Екстрагували вірусну РНК з 200мкл вірус-вмісної алантоїсної рідини яйця із зародком за допомогою набору Qiagen RNeasy Kit. Використовували двостадійну RT-PCR для ампліфікації кожного з сегментів вірусного гена. Стисло, РНК транскрибували у кДНК за допомогою AMV зворотної транскриптази (Roche Diagnostics, Germany) у відповідності до наданого протоколу, і потім кДНК ампліфікували за допомогою системи Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics, Germany). Програма ампліфікації починалася з 1 циклу при 94°C протягом 2хв., за яким йшли 3 циклів при 94°C протягом 20с, 54°C протягом 30с, 72°C протягом 2хв.; програма закінчувалася одним циклом при 72°C протягом 5хв. Використані праймери містили послідовності для BsaI чи SmaI для того, щоб забезпечити точне вставлення гідролізованих PCR-фрагментів до клонуючого вектора рНW2000 (див. Приклад 2).

Для клонування генів HA, NP, NA, M, NS PCR-фрагменти були гідролізовані за допомогою BsmBI чи BsaI та лігovanі в один клонуючий вектор рНW2000. Для клонування Р-генів два (PB2, PA) чи три (PB1) фрагменти ізолювали, гідролізували та лігували у рНW2000-BsmBI. Щоб впевнитись в тому, що гени не містять небажаних мутацій, одержані в результаті PCR фрагменти секвенували. Вісім плазмід, що містили непроцесовану кДНК A/PR/8/34 (H1N1), були позначені як рНW191-PB2, рНW192-PB1, рНW193-PA, рНW194-HA, рНW195-NP, рНW196-NA, рНW 197-M та рНW198-NS. Визначення послідовності матричної ДНК проводив Центр біотехнологій Дитячої дослідної лікарні св.Іуди з використанням родаміну чи готових до застосування наборів реагентів dRhodamine для циклічного секвенування методом барвник-термінатор з ДНК-полімеразою AmpliTaq® DNA polymerase FS (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Inc. [PE/ABI], Foster City, CA) та синтетичними олігонуклеотидами. Зразки піддавали електрофорезу, детектуванню та аналізу на секвенаторах PE/ABI модель 373, модель 373 Stretch чи модель model 377 DNA.

Результати

Для забезпечення можливості внутрішньоклітинного синтезу вірусоподібних vРНК та mРНК ми створили систему експресії pol I-pol II (див. Приклад 2). В цій системі вірусну кДНК вставляли між послідовностями промотору РНК-полімерази I людини (pol I) та термінатора. Ця одиниця транскрипції pol I у цілому граничить з промотором РНК-полімерази II (pol II) та полі(А)-сайтом. Орієнтація

двох транскрипційних одиниць дозволяє синтез "мінус"-смыслові вірусної РНК та "плюс"-смыслові mРНК з однієї вірусної матриці кДНК. Ця система pol I-pol II починає з ініціювання транскрипції двох клітинних ферментів РНК-полімераз з їх власних промоторів, гадано, в різних компартментах ядра (див. Фігуру 1). Трансфекція восьми плазмід до клітин 293Т приводить до взаємодії всіх молекул, утворених механізмами клітинної та вірусної транскрипції та трансляції, і зрештою, до генерування інфекційного вірусу грипу А. Ця система виявилася дуже ефективною для утворення вірусів грипу A/WSN/33 (H1N1) та A/Cal/NC/312/97 (H6N1) (Приклад 2).

Оскільки поточним еталонним штамом для продукування інактивованої вірусної вакцини є A/PR/8/34 (H1N1), ми спробували генерувати цей вірус цілком з клонованої кДНК. кДНК, які представляють вісім РНК-сегментів, були клоновані до вектора рНW2000. Плазмиди, що утворилися (рНW191-PB2, рНW192-PB1, рНW193-PA, рНW194-HA, рНW195-NP, рНW196-NA, рНW197-M та рНW198-NS) були трансфіковані до співкультивованих клітин 293Т-MDCK чи Vero-MDCK. Через сімдесят дві години після трансфікування визначали вірусний титр шляхом титрування на клітинах MDCK. Надосадова рідина співкультивованих клітин Vero-MDCK містив 1×10^4 pfu, а надосадова рідина співкультивованих клітин 293Т-MDCK містив 2×10^6 pfu на мл. Вищий вихід у клітинах 293Т-MDCK, найвірогідніше, спричинений вищою ефективністю трансфекції клітин 293Т у порівнянні з клітинами Vero. Ці результати показують, що восьмиплазмідна система дозволяє генерування A/PR/8/34 (H1N1) з клонованої кДНК.

Для порівняння показників росту вірусу дикого типу та генерованого рекомбінантного вірусу інокулювали курячі яйця з ембріонами вірусом дикого типу чи рекомбінантним вірусом. Алантоїсну рідину збирали через 48 годин після інфікування. Вихід вірусу визначали методом аналізу на HA. Хоч значення HA-титру для окремих яєць відрізнялися, ми знайшли, що обидва віруси мали HA-титр від 5120 до 10240 гемаглютинуючих одиниць, що свідчить про те, що обидва віруси є ізолятами з високим виходом. Таким чином, рекомбінантний вірус, генерований шляхом ДНК-трансфекції, мав такий саме фенотип здорової культури, як і батьківський ізолят.

Обговорення

Восьмиплазмідна система за винаходом унікає використання окремих плазмід для експресії протеїну (див. розділ Відомий рівень техніки), тим самим спрощуючи спосіб генерування вірусу грипу А цілком з клонованої кДНК. Продукування вакцин включає генерування вірусу, який використовується як вірусне насіння для продукування вірусної вакцини в яйцях або в клітинній культурі. Ефективність програми вакцинації залежить від вибору субтипу, який тісно співпадає з циркулюючими патогенними штамми для стимулювання високого титру специфічних антитіл у вакцинованій популяції, забезпечуючи ефективний захист. Шість основних плазмід A/PR/8/34 (рНW191-PB2, рНW192-PB1, рНW193-PA, рНW195-NP, рНW197-M та рНW198-NS), які кодуєть внутрішні гени грипу А,

можуть бути тепер використані для котрансфекції з плазмідами, що кодують глікопротеїни HA та NA поточного циркулюючого штаму. Можливість маніпулювання кожним генним сегментом дозволяє нам також визначити, який генний сегмент (сегменти) є важливим для одержання високого виходу при вирощуванні реасортативних вірусів у яйцях, а також у клітинній культурі.

Той факт, що вдалося генерувати два лабораторні штами вірусу грипу (AWSN/33 (H1N1) та A/PR/8/34 (H1N1)) і один польовий ізолят (A/Teal/HK/W312/97 (H6N1)) шляхом котрансфекції лише восьми плазмід дає змогу припустити, що ця система є застосовною для розробки живих атенуйованих вакцин грипу. Живі вакцини атенуйованого вірусу грипу, введені інтраназально, індукують місцевий, мукозальний, клітинно-медіований та гуморальний імунітет. Адаптовані холодом (ca) реасортативні (CR) віруси, що містять шість внутрішніх генів живого атенуйованого грипу A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) і гемаглютинін (HA) та нейрамінідазу (NA) сучасних вірусів грипу дико-го типу є, по-видимому, надійно атенуйованими. Було показано, що ця вакцина є ефективною для дітей та дорослої молоді [Keitel & Piedra, In: Textbook of Influenza, Nicholson et al., eds. 1998, 373-390]. Однак, вона може бути занадто атенуйована для того, щоб стимулювати ідеальну імунну відповідь у людей похилого віку, які складають велику групу з 20000-40000 осіб, що вмирають у США кожного року в результаті інфекції грипу. Внесок кожного сегменту до атенуйованого фенотипу досі не дуже добре визначений [Keitel & Piedra, supra]. Ця інформація може бути одержана лише шляхом поступового введення до вірусу специфічних визначених атенуюючих мутацій. Оскільки детальний аналіз потребує проведення випробувань великої кількості використовуваних вірусів, конструювання та трансфекція лише восьми плазмід спрощує цю задачу і зменшує час та витрати, потрібні для досягнення цієї мети.

Приклад 5: Односпрямована транскрипційна система на основі РНК-полімерази I-полімерази II для генерування вірусу А з восьми плазмід

Наведені вище приклади описують систему для генерування вірусу шляхом котрансфекції лише восьми плазмід, з яких експресуються "мінус"-смыслові вРНК та "плюс"-смыслові мРНК [ця робота була згодом опублікована; див Hoffmann et al., 2000, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 97, 6108-6113]. Цей Приклад описує створення іншої транскрипційної системи для експресії вірусоподібних РНК, яка забезпечує внутрішньоклітинний синтез некепованої "плюс"-смыслові кРНК та 5'-кепованої мРНК з однієї матриці. Котрансфекція восьми плазмід з тандемом промоторів РНК pol I-pol II, що містять кДНК A/WSN/33 (H1N1), привело до генерування інфекційного вірусу грипу А, хоч і з меншим виходом вірусу, ніж у двоспрямованій системі. Наш підхід до продукування вРНК та мРНК або кРНК та мРНК внутрішньоклітинно з мінімального набору плазмід є корисним для створення чи оптимізації зворотного генетичних систем інших РНК-вірусів.

Результаті, що наводяться в цьому Прикладі, були опубліковані [див. Hoffmann and Webster, J. Gen. Virol., 2000, 81:2843].

Для генерування "мінус"-смысового РНК-вірусу як матрицю можна використовувати "мінус"-смысову вРНК або "плюс"-смысову кРНК. Для зменшення кількості плазмід, необхідних для одержання вірусу, припустили, що може існувати можливість синтезу клітинними РНК pol I та pol II кРНК та мРНК з однієї матриці. Тому ми спробували розробити односпрямовану pol I-pol II транскрипційну систему (Фігура 5). Вірусну кДНК вставляють у "плюс"-смысовій орієнтації між послідовностями промотора РНК pol I та термінатора. Вся ця pol I транскрипційна одиниця вставляється у "плюс"-смысовій орієнтації між промотором РНК pol II та сайтом поліаденілювання (Фігура 5). На відміну від "мінус"-смысової вРНК та "плюс"-смысової мРНК, які генерувалися в нашій двоспрямованій транскрипційній системі (Фігура 1), очікувалося, що будуть синтезуватися два типи "плюс"-смысових РНК. В нуклеоплазмі з промотора pol II повинна транскрибуватися мРНК з 5'-кепованою структурою. Цей транскрипт повинен транслюватися у протеїн. У ядерці очікується синтез клітинним pol I некепованої "плюс"-смысової кРНК вірусу грипу з трифосфатною групою на 5'-кінці (Фіг.5). Був сконструйований клону-ючий вектор рНВ11, який може бути використаний для вставлення довільних фрагментів кДНК (Фігура 6). Ця плазмід містить промотор pol II (безпосередній ранній промотор цитомегаловірусу людини) та промотор pol I людини, які знаходяться вище термінальної послідовності pol I та полі(А)-сайта.

Для того, щоб перевірити, чи може кеп інфекційного вірусу грипу А бути генерований шляхом синтезу кРНК та мРНК з однієї матриці, ми сконструювали вісім плазмід. Плазміді рНВ171-PB2, рНВ172-PB1, рНВ173-PA, рНВ174-HA, рНВ175-NP, рНВ176-NA, рНВ177-M та рНВ178-NS містять кДНК, що представляють вісім генних сегментів штаму A/WSN/33 (H1N1) грипу А. Всі ці кДНК мають "плюс"-смысову орієнтацію по відношенню до промоторів pol I та pol II. Вісім плазмід (1 мкг кожної плазмід) були трансфіковані до клітин 293Т чи COS-1, які культивували спільно з клітинами MDCK чи без них, як описано у Прикладі 2.

Вихід вірусу у надосадовій рідині трансфікованих клітин в різний час визначався методом аналізу бляшкоутворення після пасивування на клітинах MDCK. Через сорок вісім годин після трансфекції було продуковано 2.5×10^3 інфекційних віріонів (Таблиця 3). Через сімдесят дві години після трансфекції надосадова рідина містила 4×10^4 pfu/мл при трансфікуванні 293Т або 2×10^4 pfu/мл при трансфікуванні клітин COS-1. Вихід вірусу через 72 год. може бути підвищений шляхом співкультивування клітин 293Т чи клітин COS-1 з клітинами MDCK (Таблиця 3).

Генерування вірусу доказує, що після трансфікування восьми плазмід РНК pol I синтезує вісім некепованих "плюс"-смысових кРНК. Чотири вірусні полімеразні протеїни, транслювані з транскриптів, синтезованих клітинною РНК pol II, зв'язуються з голими вірусоподібними кРНК з утворенням

кРНК. Полімеразна субодиниця PB1 є важливою для розпізнавання термінальної структури та зв'язування вірусоподібних кРНК [Gonzalez & Ortin, EMBO J., 1999, 18:3767; Gonzalez & Ortin, J. Virol., 1999, 73:631; та 1999b; Li et al., EMBO J., 1998, 17:5844]. Взаємодія з іншими полімеразними протеїнами розпочинає цикл реплікації-транскрипції, який приводить до синтезу вРНК та вірусних мРНК [Toyoda et al., J. Gen. Virol., 1996, 77:2149; Gonzalez et al., Nucl. Acids Res., 1996, 29:4456]. У транскрипційній системі pol I-pol II синтезуються два різні типи мРНК. Один транскрибується безпосередньо з плазмідної ДНК за допомогою РНК pol II і містить 225п.н. промоторну послідовність pol I

на 5'-кінці та pol I термінальну послідовність на 3'-кінці. Інша мРНК синтезується протеїнами вірусного полімеразного комплексу, які використовують вРНК як матрицю. 5'-кеп структура цієї мРНК захоплюється механізмом кеп-захоплення, за яким полімеразна субодиниця PB2 забирає кеп з клітинних РНК [Umanen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 21:3607]. Хоч обидва типи мРНК розрізняються у своїх 5'- та 3'-некодуючих ділянках, вони містять одні й ті самі відкриті рамки зчитування для всіх вірусних протеїнів. Трансльовані структурні протеїни разом з вРНК збираються з утворенням інфекційного вірусу грипу А.

Таблиця 3

Набори плазмід, використані для продукування А/WSN/33 (H1N1)

Сегмент вірусного гена	Плазмиди*							
	односпрямована система				двоспрямована система			
1	PHW171-PB2	pHW171-PB2	pHW171-PB3	pHW171-PB2	pHW181-PB2	pHW181-PB2	pHW181-PB2	pHW181-PB2
2	PHW172-PB1	pHW172-PB1	pHW172-PB1	pHW172-PB1	pHW182-PB1	pHW182-PB1	pHW182-PB1	pHW182-PB1
3	pHW173-PA	pHW173-PA	pHW173-PA	pHW173-PA	pHW183-PA	pHW183-PA	pHW183-PA	pHW183-PA
4	PHW174-HA	pHW174-HA	pHW174-HA	pHW174-HA	pHW184-HA	pHW184-HA	pHW184-HA	pHW184-HA
5	pHW175-NP	pHW175-NP	pHW175-NP	pHW175-NP	pHW185-NP	pHW185-NP	pHW185-NP	pHW185-NP
6	pHW176-NA	pHW176-NA	pHW176-NA	pHW176-NA	pHW186-NA	pHW186-NA	pHW186-NA	pHW186-NA
7	pHW177-M	pHW177-M	pHW177-M	pHW177-M	pHW187-M	pHW187-M	pHW187-M	pHW187-M
8	pHW178-NS	pHW178-NS	pHW178-NS	pHW178-NS	pHW188-NS	pHW188-NS	pHW188-NS	pHW188-NS
Трансфековані клітини [#]	293T	293T+MDCK	COS-1	COS-1+MDCK	293T	293T+MDCK	COS-1	COS-1+MDCK
Транскрипти [†]	кРНК та мРНК				вРНК та мРНК			
Вірусний титр (pfu/мл) [§]								
24год.	0	0	0	0	5×10 ²	4×10 ²	1×10 ³	1×10 ³
48год.	4×10 ³	5×10 ³	2×10 ³	5×10 ³	8×10 ⁶	1×10 ⁷	6×10 ⁶	1×10 ⁷
72год.	4×10 ⁴	2×10 ⁵	2×10 ⁴	4×10 ⁵	1×10 ⁷	2×10 ⁸	1×10 ⁷	3×10 ⁸

* Плазмиди з односпрямованими одиницями транскрипції та плазмиди з двоспрямованими одиницями транскрипції (Фіг. 1) містять кДНК, що представляють вісім генних сегментів А/WSN/33 (H1N1).

[‡] Клітини 293T чи COS-1 трансфектували зі співкультивованими клітинами MDCK чи без них.

[†] РНК-транскрипти, синтезовані pol I чи pol II.

[§] Вірусний титр надосадові рідини визначали через вказаний час (24год., 48год., 7 год.) після трансфекції методом аналізу бляшкоутворення на клітинах MDCK.

Хоч генерування WSN-вірусу з клітин, трансфектованих вісьмома плазмидами з тандемом промоторів виявилось дуже надійним, вихід вірусу при цьому кРНК-мРНК підході був нижчим, ніж у двоспрямованій системі, що продукує транскрипти вРНК та мРНК (Таблиця 3). Через сімдесят дві години після того, як клітини 293T чи COS-1 були трансфектовані вісьмома плазмидами, що містять двоспрямовану транскрипційну систему pol I-pol II [Фігура 1; Приклад 2; див. Hoffmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:6108; pHW181-PB2, pHW182-PB1, pHW183-PA, pHW184-HA, pHW185-NP, pHW186-NA, pHW187-M та pHW188-NS], вірусний титр становив 1×10⁷pfu/мл (Таблиця 3). Через двадцять чотири години після трансфектування клітин COS-1 чи 293T у надосадовій рідині було виявлено 0,4-1×10³pfu/мл. Ці дані показують, що восьмиплазмідна двоспрямована система має однаково ефективність генерування вірусу з аналогічною кінетикою, як і більш складна та трудомістка багатоплазмідна система, що потребує кот-

рансфектування 12 чи 17 плазмід [Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96:9345].

Через 24год. після трансфектування вісьмома плазмидами з тандемом промоторів інфекційних вірусів знайдено не було (Таблиця 3). Ці результати дають змогу припустити, що різниця у виході вірусів між вРНК-мРНК та кРНК-мРНК підходами спричинена різною полярністю первинних транскриптів pol I. Двоспрямована система починає з внутрішньоклітинного синтезу вРНК, що нагадує ситуацію з інфікуванням природним грипом А, у якій вРНК транспортуються до ядра і вРНК спочатку служать матрицями для синтезу мРНК та кРНК. В односпрямованій системі кРНК є першими реплікація-компетентними одиницями, що продукуються. Для продукування мРНК, кРНК мають бути репліковані у вРНК, а вРНК зрештою спокуються у вірусні частинки потомства [Hsu et al., J. Gen. Virol., 1987, 77:2575]. Оскільки для генерування вРНК з кРНК потрібні додаткові реакції, утворення вірусу в односпрямованій системі від-

бувається пізніше, ніж утворення вірусу в двосп-рямованій системі.

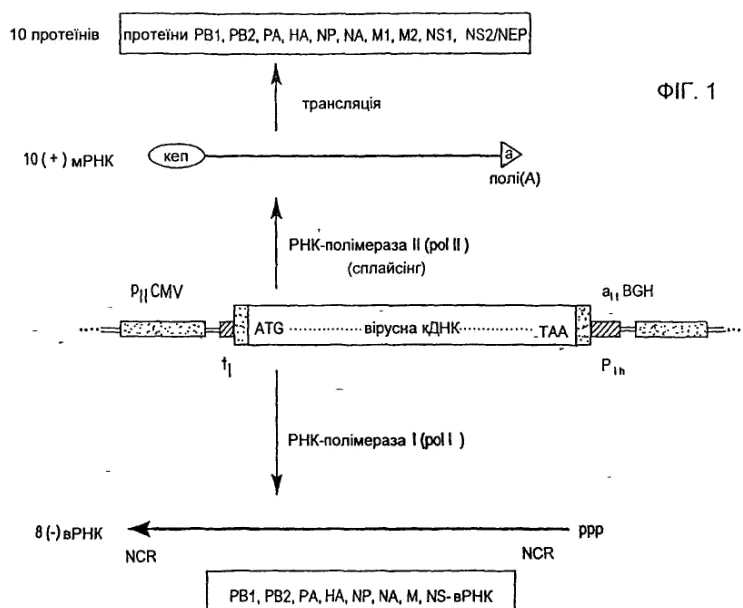
Іншими можливими причинами різниці у виході вірусів для двох систем є те, що елементи послі-довності у кДНК знижують ефективність транскрипції шляхом термінації транскрипції, або послідовності у РНК-транскриптах знижують рівень pol I чи pol II транскриптів у стабільному стані. Знижена концентрація усього лише однієї з восьми вірусоподібних кРНК чи мРНК знижує загальну ефективність цієї системи, оскільки всі вРНП та структурні протеїни повинні бути синтезовані в концентраціях, що є оптимальними для вірусної реплікації та збирання вірусу.

Висока ефективність восьмиплазмідної системи для генерування вірусу грипу А свідчить, що ця система є застосовною для інших ортоміксовірусів, наприклад, вірусу грипу В, вірусу грипу С та тогтовірусу. Результати цих досліджень дають змогу припустити, що система вРНК-мРНК буде найефективнішим способом генерування цих вірусів цілком з плазмід. Даний винахід дозволяє створювати системи на основі pol I для генерування інших РНК-вірусів крім членів сімейства Orthomyxoviridae, наприклад, членів Paramyxoviridae, Arenaviridae чи Bunyaviridae [Roberts, A. & Rose, J.K., Virology, 1998, 247:1-6; Bridgen & Elliot, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93:15400; Lee et al., J. Virol., 2000, 74:3470]. На відміну від ортоміксовірусів, більшість РНК-вірусів реплікується у цитоплазмі інфікованих клітин. В процесі своєї еволюції РНК цих вірусів не зазнавав селекційного тиску, що існує у ядрі, наприклад, сплайсингу. Загалом, зворотногогенетичні системи для несеgmentованих "мінус"-ланцюгових РНК-вірусів ґрунтуються на внутрішньоклітинній транскрипції з промотора Т7, як це було спочатку запропоновано Conzelmann з колегами для одержання вірусу сказу [Schnell et al., EMBO J., 1994, 13:4195]. Експресія вірусоподібних РНК відбувається під керуванням Т7 РНК-полімерази, яка надається шляхом інфікування рекомбінантним вірусом коров'ячої віспи або шляхом використання клітинних

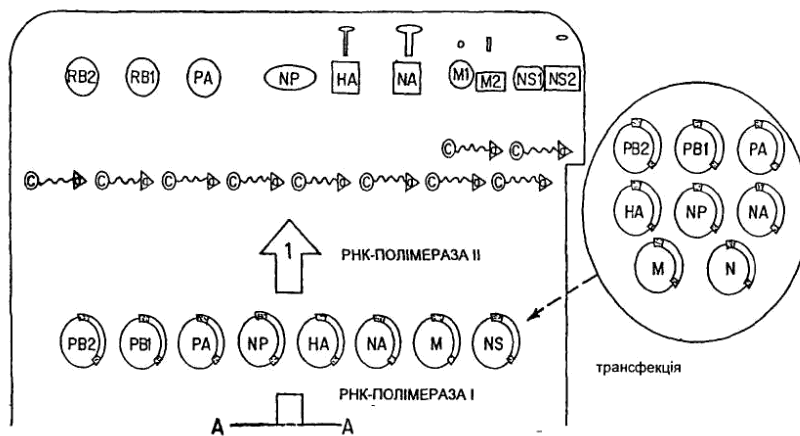
ліній, що конститутивно експресують Т7 РНК-полімеразу. На відміну від pol I транскрипції, яка відбувається у ядрі, транскрипція Т7 РНК-полімеразою відбувається у цитоплазмі. Використання pol I транскрипційної системи для цитоплазматичних РНК-вірусів потребуватиме транспортування РНК-транскриптів з ядра. Те, що транскрипти pol I дійсно транспортуються з ядра, підтверджується детектуванням продуктування протеїну у клітинах, що містять pol I-транскрипти, які мають внутрішній сайт проникнення до рибосом, вставлений до 5'-некодуючої ділянки [Palmer et al., Nucl. Acids Res., 1993, 21:3451]. Внаслідок обмеженості інформації про послідовності, які є ключовими для експорту чи утримання pol I-транскриптів, синтез "мінус"-смыслових чи "плюс"-смыслових РНК може привести до різної ефективності ядерного експорту. Крім того, експорт великого pol II-генерованого коронавірусподібного транскрипту (що має більше 30000 нуклеотидів) з ядра [Almazan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:5516] вказує на те, що критичною для експорту може бути наявність специфічних РНК-послідовностей, а не довжина транскрипту. Розроблені нами клонуєчі вектори pol I-pol II та ефективний спосіб клонування на основі використання ендонуклеаз рестрикції типу Hs дозволяють здійснювати у ядрі синтез "плюс"- та "мінус"-смыслових РНК для генерування цитоплазматичних РНК-вірусів з помірними витратами та протягом помірного періоду часу.

Даний винахід не повинен обмежуватись в обсязі описаними тут конкретними варіантами втілення. Дійсно, різні модифікації винаходу крім тих, що описані тут, будуть зрозумілі фахівцям в цій області з наведеного вище опису та фігур, що додаються. Передбачається, що такі модифікації входять до обсягу пунктів формули, що додається. Крім того, слід розуміти, що всі значення є приблизними і надані для опису.

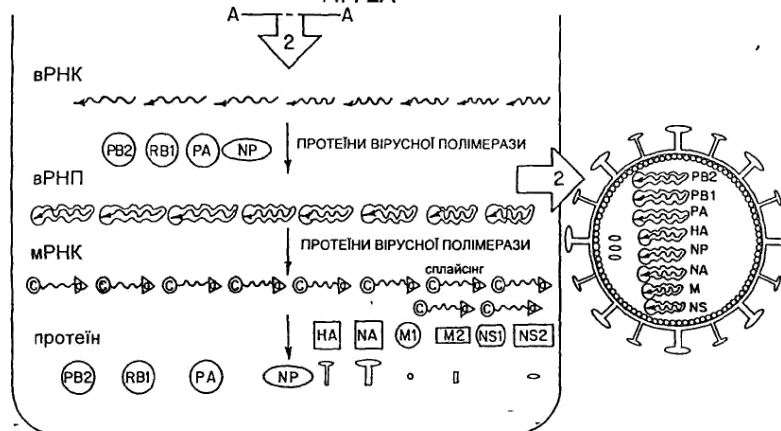
Всі патенти, патентні заявки, публікації та інші матеріали цим включені цілком до цього опису за посиланням.



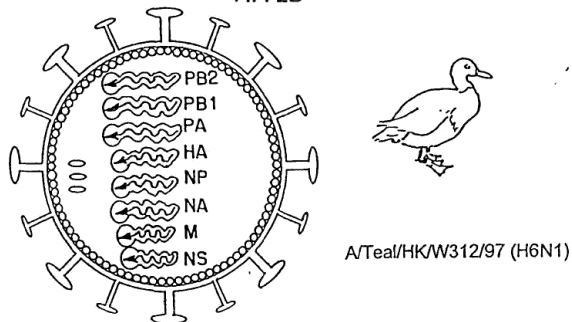
ФІГ. 1



ФІГ. 2А

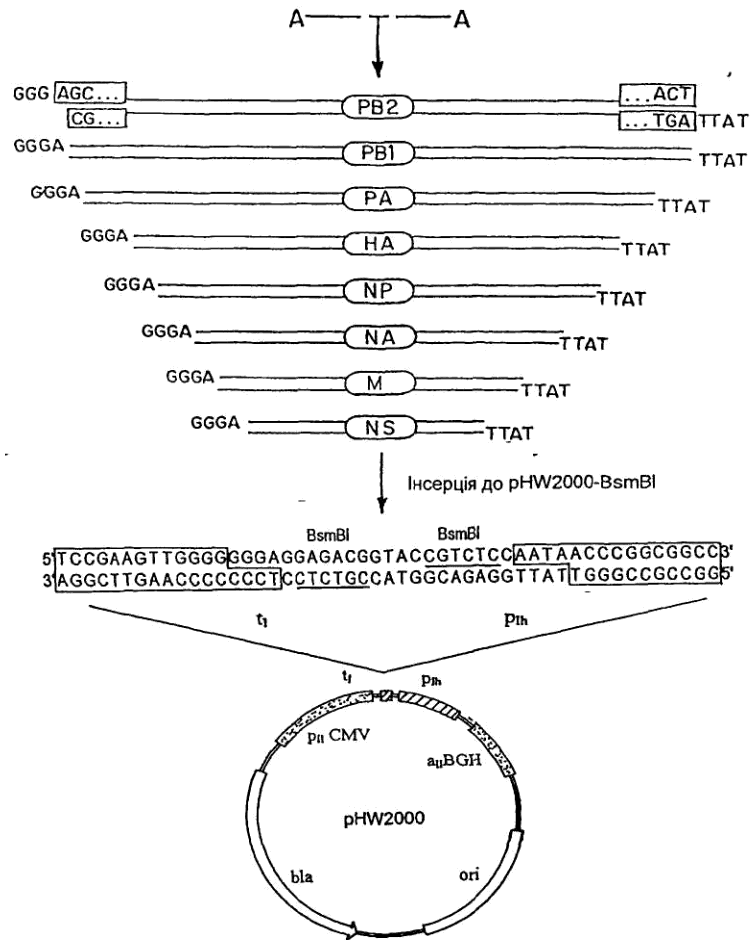


ФІГ. 2Б

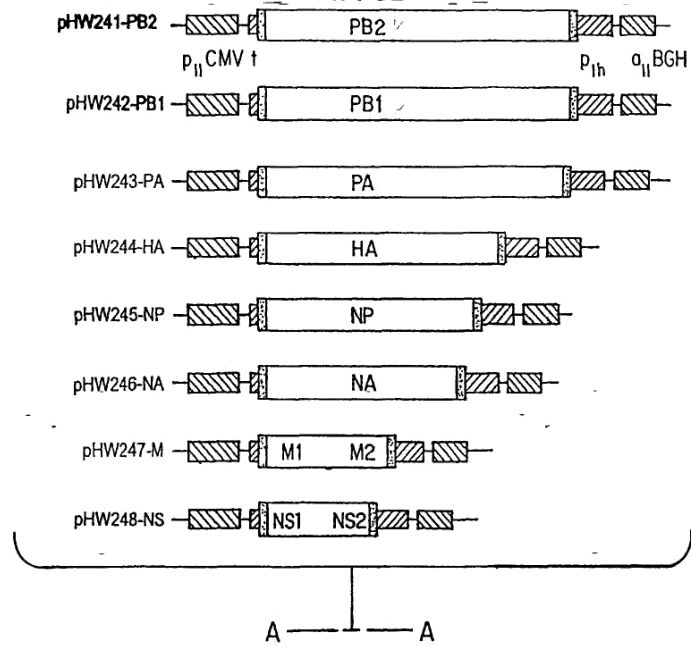


Екстрагування РНК
8 PCR із зворотною транскриптазою
Гідроліз PCR-фрагментів за
допомогою BsmBI чи BsaI

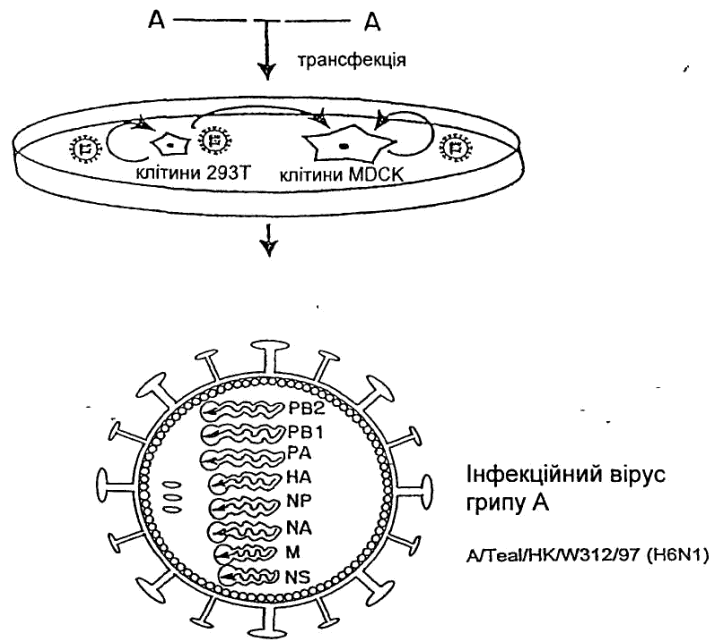
ФІГ. 3А



ФІГ. 3Б

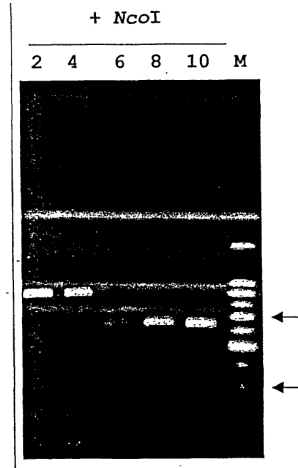


ФІГ. 3Б



ФІГ. 3Г



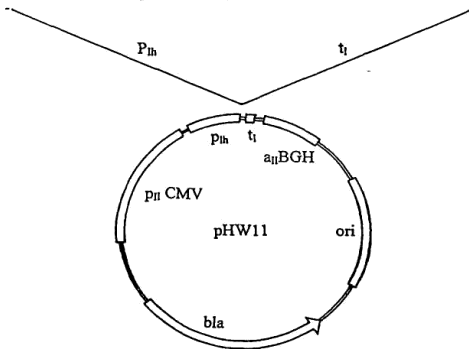


ФІГ. 4Б

BsmBI KpmI BsmBI

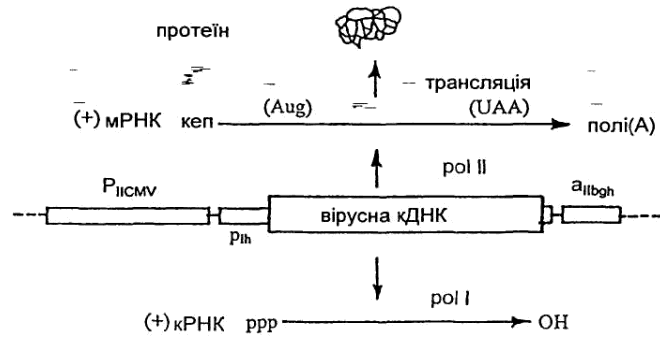
5'CGGGTTATTGGAGACGGTACCGTCTCCTCCCCCCC3'

3'GCCCCAATAACCTCTGCCATGGCAGAGGAGGGGGGG5'

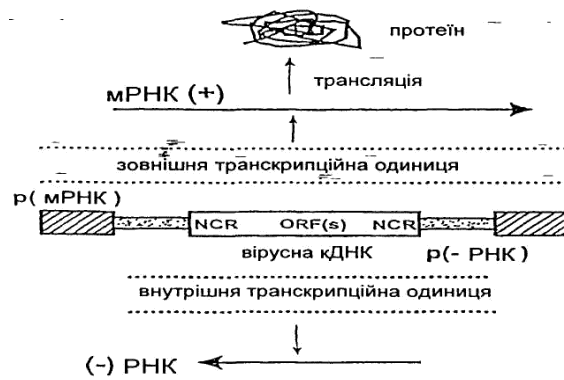


ФІГ. 6

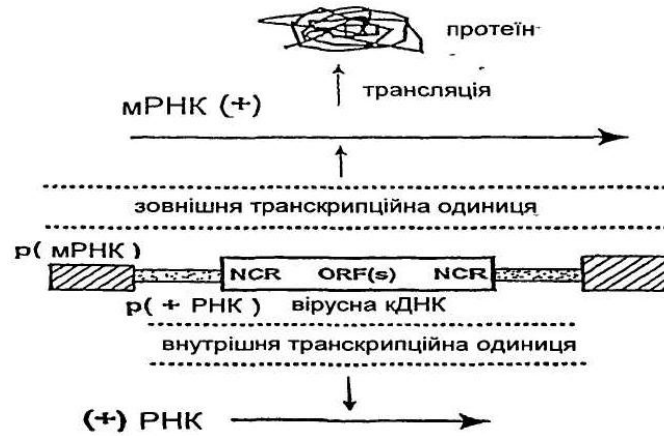
односпрямована pol I-pol II транскрипційна система:



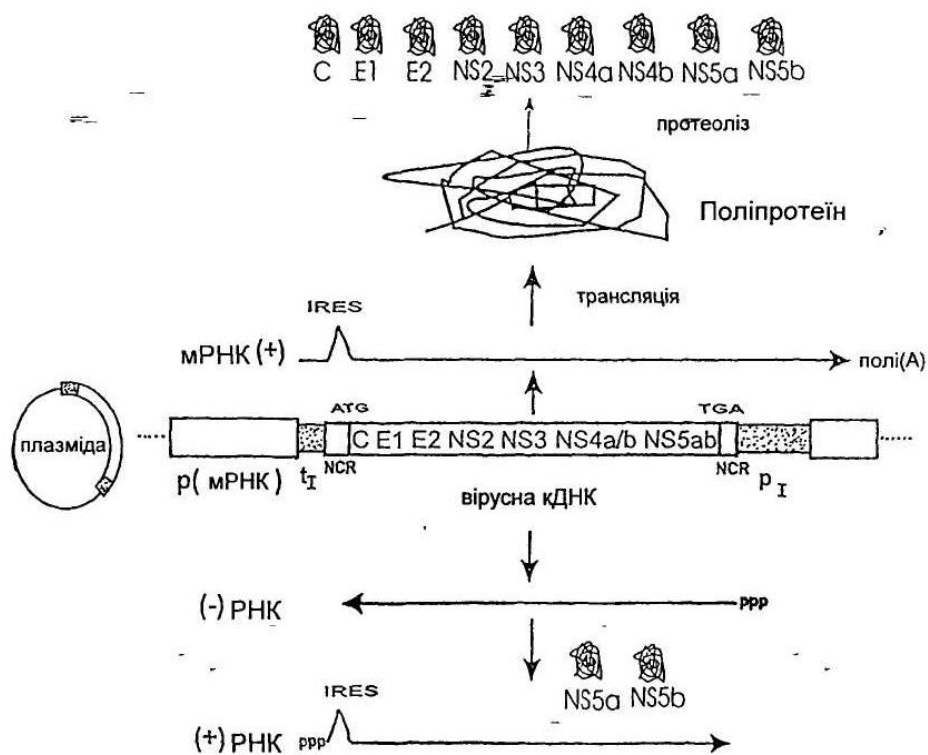
ФІГ. 5



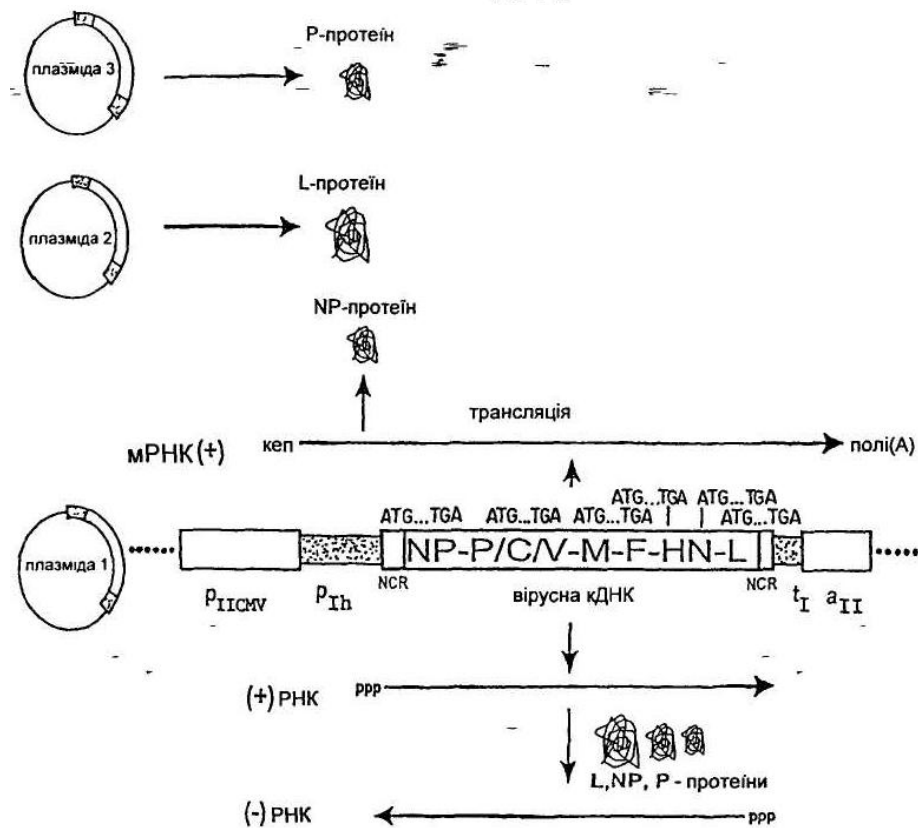
ФІГ. 7А



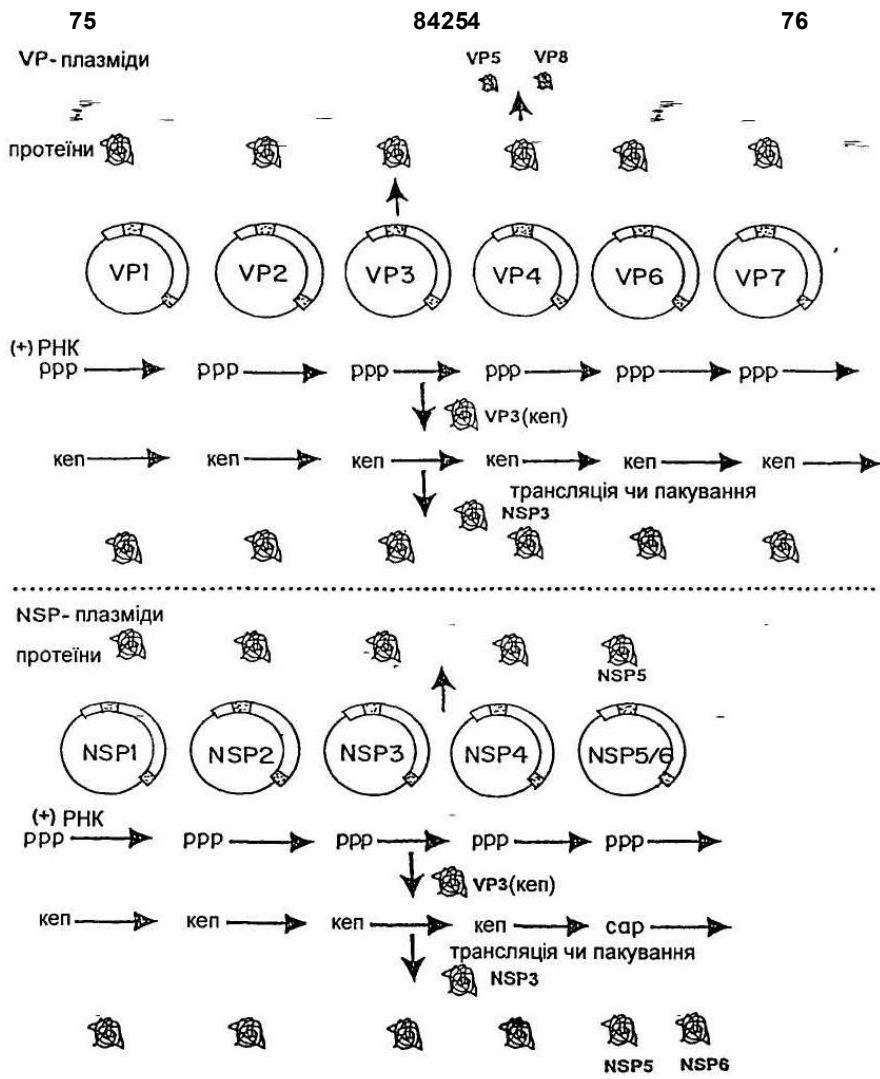
ФІГ. 7Б



ФІГ. 8



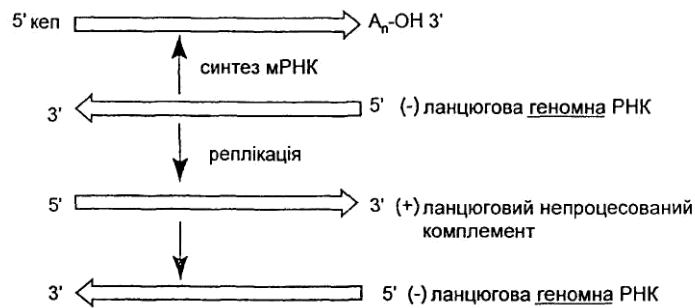
ФІГ. 9



ФІГ. 10

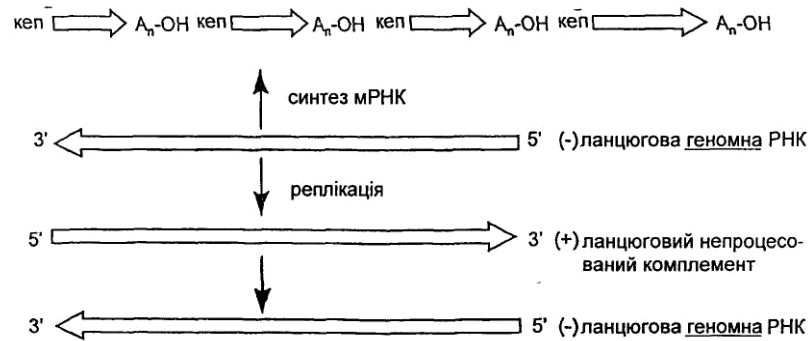
Сегментовані:

Orthomyxoviridae: Грип А, грип В, грип С,
вірус Тогото, вірус Дорі



Мономолекулярні:

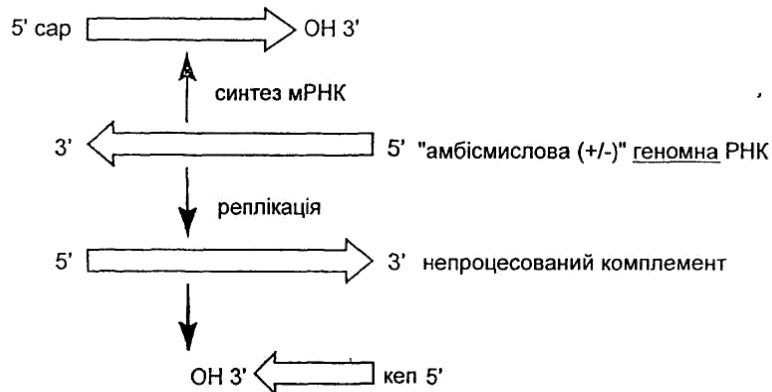
Mononegavirales: Bornaviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae



ФІГ. 11А

Амбісислові РНК-віруси

Arenaviridae, Bunyaviridae



ФІГ. 11Б

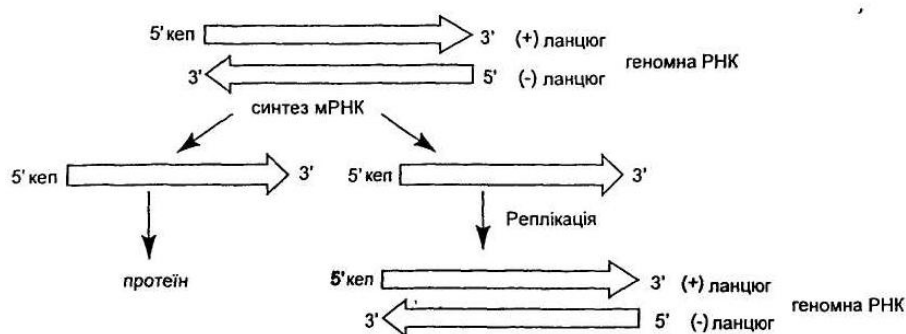
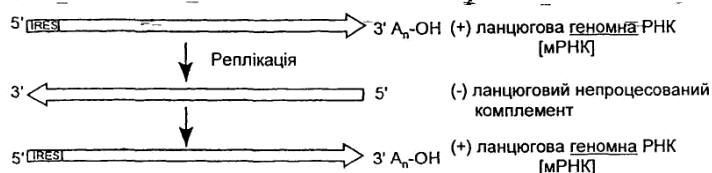


FIG. 118

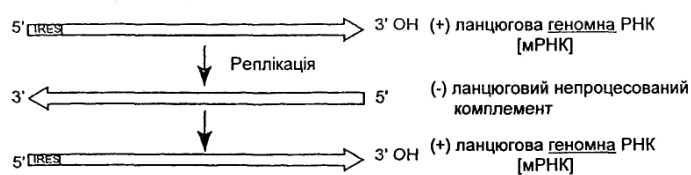
(+) ланцюгові РНК-віруси

Picornaviridae:

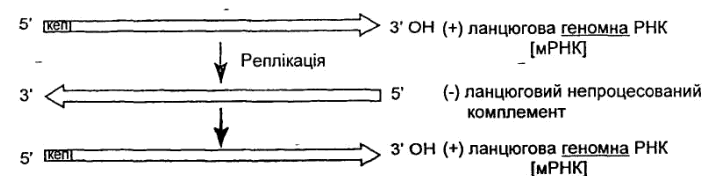
~~Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus, Aphtovirus, Hepatovirus, Parechovirus~~



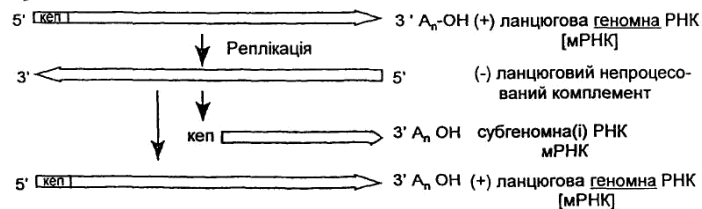
Flaviviridae: Hepacivirus, Pestivirus



Flaviviridae: Flavivirus



Togaviridae and Coronaviridae



ΦΙΓ. 11,Γ