



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85379 (13) C2

(51) МПК (2009)

C12N 15/863

A61K 39/285 (2008.01)

A61K 39/275

C12N 5/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) РЕКОМБІНАНТНИЙ ПОКСВІРУС, ЯКИЙ МІСТИТЬ ПРИНАЙМНІ ДВА АТІ ПРОМОТОРИ КОРОВ'ЯЧОЇ ВІСПИ

1

2

(21) а200506292

(22) 12.11.2003

(24) 26.01.2009

(86) PCT/EP2003/012610, 12.11.2003

(31) PA 2002 01814

(32) 25.11.2002

(33) DK

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ЛЕЙПЕР СОНЯ, DE/DE, ХОУЛІ ПОЛ, GB/AU

(73) БАВАРІАН НОРДІК А/С

(56) WO9702355 A, 23.01.97.

WO0218585 A, 07.03.02.

HOWLEY P. M. ET AL.: "A vaccinia virus transfer vector using a GUS reporter gene inserted into the I4L locus" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 172, no. 2, 26 June 1996 (1996-06-26), pages 233-237.

HAENGGI M. ET AL.: "CONSERVED TAAAT MOTIF IN VACCINIA VIRUS LATE PROMOTERS OVERLAPPING TATA BOX AND SITE OF TRANSCRIPTION INITIATION" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 5, no. 5, 1986, pages 1071-1076.

LI Y. ET AL.: "High-level expression of Amsacta moorei entomopoxvirus spheroidin depends on sequences within the gene" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 79, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 613-622.

BOYLE D B. ET AL.: "CONSTRUCTION OF RECOMBINANT FOWLPOX VIRUSES AS VECTORS FOR POULTRY VACCINES" VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 10, no. 4, June 1998 (1998-06), pages 343-356.

(57) 1. Рекombinantний поксвірус, який містить у вірусному геномі принаймні дві експресійні касети, кожна з яких містить АТІ промотор коров'ячої віспи відповідно до SEQ ID.: No.1, його похідну або підпоследовність АТІ промотору, та кодуючу последовність, де експресія кодуючої последовності регулюється вказаним промотором, похідною або підпоследовністю і де похідна АТІ промотору коров'ячої віспи є последовністю, в якій не більше ніж 6 нуклеотидів замінено, видалено та/або вве-

дено в последовність SEQ ID.: No.1, де підпоследовність АТІ промотору має довжину принаймні 10 нуклеотидів последовності SEQ ID.: No.1 та де промотор, похідна або підпоследовність включають нуклеотиди 22-29 последовності SEQ ID.: No.1, та де промотор, похідна або підпоследовність мають біологічну активність як промотор.

2. Рекombinantний поксвірус за п.1, де промотор, похідна або підпоследовність мають біологічну активність як пізній промотор вірусу коров'ячої віспи.

3. Рекombinantний поксвірус за будь-яким з пп.1-2, де промотори, похідні або підпоследовності в рекombinantному поксвірусі є одним й тим самим.

4. Рекombinantний поксвірус за будь-яким з пп.1-3, де принаймні дві експресійні касети введені в один і той самий сайт вбудовування поксвірусного геному.

5. Рекombinantний поксвірус за будь-яким з пп.1-4, де промотор у принаймні одній з експресійних касет має последовність SEQ ID.: No.1.

6. Рекombinantний поксвірус за будь-яким з пп.1-5, де промотор у принаймні одній з експресійних касет є похідною АТІ промотору або підпоследовністю АТІ промотору або їх похідною.

7. Рекombinantний поксвірус за будь-яким з пп.1-6, де поксвірус вибрано з групи, яка складається з ортопоксвірусів та авіпоксвірусів.

8. Рекombinantний поксвірус за п.7, де ортопоксвірус є вірусом коров'ячої віспи та де авіпоксвірус вибирають з поксвірусу канарок та поксвірусу свійської птиці.

9. Рекombinantний поксвірус за п.8, де вірус коров'ячої віспи є модифікованим вірусом коров'ячої віспи штаму Анкага (MVA), зокрема MVA-BN та MVA 575, депоновані за номерами V00083008 та V00120707 відповідно в Європейській колекції культур тваринних клітин (ECACC).

10. Рекombinantний поксвірус за п.9, де щонайменше одна з експресійних касет уведена в сайт природної делеції MVA геному відносно геному вірусу коров'ячої віспи штаму Copenhagen.

(13) C2

(11) 85379

(19) UA

11. Рекombінантний поксвірус за будь-яким з пп.1-10, де щонайменше одна з експресійних касет уведена в міжгенну ділянку поксвірусного геному.
12. Рекombінантний поксвірус за будь-яким з пп.1-11, де щонайменше одна з кодуючих послідовностей кодує щонайменше один антиген, епітоп антигену та/або терапевтичну сполуку.
13. Рекombінантний поксвірус за будь-яким з пп.1-12 як вакцина або лікарський засіб.
14. Вакцина або фармацевтична композиція, яка включає рекombінантний поксвірус за будь-яким з пп.1-12.
15. Застосування рекombінантного поксвірусу за будь-яким з пп.1-13 для приготування вакцини або лікарського засобу.
16. Спосіб введення кодуючих послідовностей у клітини-мішені, який включає інфікування клітин-мішеней вірусом за будь-яким з пп.1-12, де клітина-мішень не є клітиною тварини або людини.
17. Спосіб продукування пептиду, протеїну та/або вірусу, який включає:

- a) інфікування клітини-хазяїна рекombінантним поксвірусом за будь-яким з пп.1-12,
- b) культивування інфікованої клітини-хазяїна за придатних умов, та
- c) виділення та/або збагачення пептиду та/або протеїну, та/або вірусів, що продукуються вказаною клітиною-хазяїном.
18. Застосування вірусу за будь-яким з пп.1-12, для одержання вакцини або фармацевтичної композиції для впливу, переважно індукування, імунологічної відповіді в живому тваринному організмі, включаючи людину.
19. Застосування за п.18, де вводять принаймні 10^2 TCID₅₀ (Інфекційна доза титру культури) вірусу.
20. Клітина, яка містить вірус за будь-яким з пп.1-12.
21. Спосіб продукування рекombінантного вірусу за будь-яким з пп.1-12, який включає етап введення щонайменше двох експресійних касет у геном поксвірусу.

Винахід стосується рекombінантних поксвірусів, які містять у вірусному геномі, принаймні, дві експресійні касети, кожна з яких включає АТІ промотор коров'ячої віспи або його похідне та кодуючу послідовність, де експресія кодуючої послідовності регулюється вказаним промотором або його похідним. Вірус може використовуватися як вакцина або частина фармацевтичної композиції.

Рекombінантні поксвіруси широко застосовуються для експресування чужорідних антигенів в інфікованих клітинах. Більше того, рекombінантні поксвіруси на сьогоднішній момент тестовано як багатообіцяючі вакцини для індукування імунної відповіді проти чужорідних антигенів, які експресуються з поксвірусних векторів. Найбільш популярними є з одного боку, птишині поксвіруси та, з іншого боку, віруси коров'ячої віспи. [US 5,736,368 та US 6,051,410] описують рекombінантний штам вірусу коров'ячої віспи Wyeth, який експресує антигени та протеїни ВІЛ. [US 5,747,324] описує рекombінантний штам вірусу коров'ячої віспи NYCBH, який експресує лентивірусні гени. EP 0 243 029 описує рекombінантний штам вірусу коров'ячої віспи Western Reserve, який експресує гени ретровірусу людини. Поксвірус домашньої птиці, який містить гени ВІЛ у вірусному геномі розкрито в [US 5,736,368 та US 6,051,410].

Для індукування ефективної імунної відповіді, бажано експресувати не лише одиничний протеїн агенту, проти якого викликається імунна відповідь. Натомість, бажано експресувати стільки різних протеїнів або епітопів вказаного агента, скільки це можливо, для отримання широкої та ефективної імунної відповіді проти вказаного агента. Отже, може бути корисним вставити декілька різних експресійних касет в той самий поксвірусний геном, якщо він призначений для використання як вектор для вакцинації. US 5,736,368 описує конструкцію рекombінантного поксвірусу, який має експресійну касету генів HIV-1 env та HIV-1 gag-pol. Для експресування протеїнів, кодованих різними експре-

сійними касетами застосовуються різні промотори, а саме, промотор D1 та промотор 40K вірусу коров'ячої віспи. Недоліком цієї стратегії є те, що дії різних промоторів не є однаковими, що призводить до різного рівня протеїнів, експресованих з різних експресійних касет.

Більш рівномірний рівень експресії може бути одержаний, коли промотори в різних експресійних касетах поксвірусного геному будуть однаковими. Хоча, недоліком цієї стратегії є ризик того, що може відбутися небажані рекombінації між гомологічними/ідентичними промоторними послідовностями. Дійсно, було показано Howley та ін. (Gene (1996) 172,233-237), що може бути створений вірус коров'ячої віспи, який містить три промотори p7.5 в різних позиціях вірусного геному; однак, відбуваються рекombінації між гомологічними промоторними послідовностями, що призводить до появи змішаних геномних популяцій рекombінантного поксвірусу. Такі змішані та невизначені геномні популяції, які відображають нестабільність вірусного геному не є прийнятними, якщо вони призначені для використання рекombінантного поксвірусу для вакцинації, зокрема для вакцинації людей.

Об'єктом даного винаходу було створення стабільних рекombінантних поксвірусів, які несуть, принаймні, дві експресійні касети, переважно для генів, які не є природними частинами вірусного геному, коли має бути можливе продукування протеїнів, кодованих вказаними, принаймні, двома різними експресійними касетами в рівних кількостях.

Це завдання було вирішено створенням рекombінантних поксвірусів, які мають у вірусному геномі, принаймні, дві експресійні касети, кожна з яких містить промотор коров'ячої віспи АТІ або його похідне та кодуючу послідовність, де експресія кодуючої послідовності регулюється вказаним промотором або його похідним.

Даним винаходом було продемонстровано, що поксвіруси, які містять дві або більше копій промо-

тору АТІ, є неочікувано стабільними; було продемонстровано, що нема виявлених рекомбінацій, що пройшли між гомологічними або ідентичними до промоторних послідовностей АТІ. Це контрастує із вірусами коров'ячої віспи, які містять у вірусному геномі два або більше промоторів р7.5.

Згідно даного винаходу, поксвірус може бути будь-яким поксвірусом, в котрому експресія генів має регулюватися промотором АТІ або його похідним. Отже, поксвірус може бути будь-яким вірусом сімейств Chordopoxvirinae та Entomopoxvirinae (див. Fields Virology 3rd edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, Chapter: 83, ISBN 0-7817-0253-4). Віруси з підсімейства Chordopoxvirinae, є зокрема переважними, якщо рекомбінантний поксвірус використовується для експресії генів у ссавцевих тварин, включаючи людей.

Зокрема переважними родами, що належать до сімейства Chordopoxvirinae є Orthopoxviruses, Parapoxviruses, Avipoxviruses, Capripoxviruses, Leporipoxviruses та Suipoxviruses. Найбільш переважними є Orthopoxviruses та Avipoxviruses. Прикладами авіпоксвірусів є поксвіруси канарок та домашньої птиці. Прикладом Orthopoxvirus є вірус коров'ячої віспи. Штам вірусу коров'ячої віспи який може бути використаний згідно даного винаходу може бути штамом вірусу коров'ячої віспи, таких штамів як Copenhagen, Temple of Heaven, Wyeth, Western Reserve, Elstree, NYCBH та таке інше. Зокрема, переважним є модифікований вірус коров'ячої віспи Ankara (MVA). MVA був одержаний 516 послідовними пасажами на фібробластах курячих ембріонів штаму вірусу коров'ячої віспи Ankara (CVA) (для огляду дивись Mayr, A., et al. Infection 3,6-14 [1975]). Як наслідок цих довготривалих пасажів одержаний вірус MVA втратив близько 31 тис. Основ (kb) своєї геномної послідовності, і як наслідок, був описаний як дуже обмежений у відношенні клітин-хазяїв до пташиних клітин (Meyer, H. et al., J. Gen. Virol. 72,1031-1038 [1991]). Було показано, на різноманітних тваринних моделях, що одержаний MVA був досить вірулентним (Mayr, A. & Danner, K. [1978] Dev. Biol. Stand. 41: 225-34). Також, цей штам MVA пройшов тестування в клінічних випробуваннях як вакцина для імунізації людей проти захворювання на віспу (Mayr et al., Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B 167,375-390 [1987], Stickl et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 [1974]).

Згідно даного винаходу може використовуватися будь-який штам MVA. Прикладами штамів вірусу MVA, використовуваних згідно даного винаходу й депонованих у відповідності до вимог Будапештської Угоди є штам MVA 572 та MVA 575 депоновані в Європейській колекції тваринних клітинних культур (European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Salisbury (UK)) із депозитними номерами ECACC V94012707 та ECACC V00120707, відповідно, та MVA-BN із депозитним номером ECACC V00083008.

Найбільш переважним штамом MVA є MVA-BN або його похідні. Характерні ознаки MVA-BN, опис біологічних тестів, які дозволяють визначити чи є штам MVA є штамом MVA-BN або його похідним

та способи, які дозволяють одержувати MVA-BN або його похідні розкрито в [WO 02/42480]. Зміст цієї заявки включено в дану заявку через посилання на неї.

Взагалі, бажано використовувати віруси, які не є шкідливими для тварин, включаючи людей, якщо вірус використовується для вакцинації тварин, включаючи людей. Для людей, зокрема, безпечними вірусами є різні штами вірусу коров'ячої віспи, такі як MVA та пташині поксвіруси, такі як поксвірус домашньої птиці та канарковий поксвірус.

Для вирощування поксвірусів, еукаріотичні клітини інфікують поксвірусом. Еукаріотичні клітини є клітинами, які можуть бути інфіковані відповідним поксвірусом та дозволять реплікацію та вироблення інфікуючого вірусу. Такі клітини для кожного вірусу є відомими особам досвідченим в цій галузі. Для MVA прикладом цього типу клітин є фібробласти курячого ембріону (CEF) та клітини BHK (Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V. and Slitter G., J. Gen. Virol. (1998), 79, 347-352). Клітини CEF можуть культивуватися за умов, відомих особам досвідченим в цій галузі. Переважно, клітини культивуються в безсироватковому середовищі в закріплених колбах або ролерних флаконах. Інкубування зазвичай займає від 48 до 96 годин при 37°C±2°C. Для інфікування MVA, переважно беруть в МОІ від 0,05 до 1 TCID₅₀ й інкубування зазвичай займає від 48 до 72 годин при 37°C±2°C.

Промоторна послідовність гену інклюзивного протеїну типу А вірусу коров'ячої віспи (промотор АТІ) є відомою особі, обізнаній в даній галузі. В цьому контексті робиться посилання на вхідний номер D00319 в Genbank. Переважною послідовністю промотору АТІ є послідовність, відома як SEQ ID.: No.1 яка являє собою наступне:

5' GTTTT GAATA AAATT TTTT ATAAT AAAT 3'

Згідно даного винаходу можна використати промотор АТІ як зазначено в SEQ ID.: No.1 або використовувати похідний промотору АТІ, який може бути підпослідовністю послідовності SEQ ID.: No.1. Термін "підпослідовність послідовності згідно із SEQ ID.: No.1" стосується більш коротшого фрагменту послідовності SEQ ID.: No.1, який все ще залишається активним як промотор, зокрема пізній промотор вірусу коров'ячої віспи. Типовий фрагмент послідовності SEQ ID.: No.1 має довжину принаймні 10 нуклеотидів, більш переважно 15 нуклеотидів, ще більш переважно 20 нуклеотидів, найбільш переважно 25 нуклеотидів послідовності SEQ ID.: No.1. Підпослідовність переважно може мати нуклеотиди з 25 по 29 послідовності SEQ ID.: No.1, тобто послідовність 5'-TAAAT-3' розташована в 3' кінці послідовності SEQ ID.: No.1. Підпослідовність переважно може мати нуклеотиди з 22 по 29 послідовності SEQ ID.: No.1, тобто послідовність 5'-TAAAT-3' розташована в 3' кінці послідовності SEQ ID.: No.1.

Промотор може бути вставлений раніше кодуючої послідовності, таким чином, що нуклеотиди з 28 по 29 послідовності SEQ ID.: No.1 (підкреслені в наведеній послідовності) є частиною стартового кодону трансляції 5' ATG 3'. Або, промотор може бути відділений декількома нуклеотидами від стартового кодону трансляції. Спейсер між 3'-

кінцем промотору, згідно до SEQ ID.: No.1 та A в стартовому кодоні 5'ATG 3', переважно, менший за 100 нуклеотидів, більш переважно, менший за 50 нуклеотидів та ще більш бажано, менший за 25 нуклеотидів. Однак, спейсер може бути значно довшим за довжину промотора, залишаючись здатним спрямовувати експресію кодуючої послідовності, розташованої пізніше (нижче) промотору.

Похідний промотору АТІ також може бути послідовністю, яка має одну або більше нуклеотидних заміни, делецій та/або вставок відповідно до послідовності SEQ ID.: No.1 або її підпослідовностей, де вказані похідні є все ще активними як промотори, зокрема, як пізній промотор вірусу коров'ячої віспи. Послідовність, яка має одну або більше нуклеотидних заміни є послідовністю, у якій один або більше нуклеотидів послідовності згідно з SEQ ID.: No.1 замінені різними нуклеотидами. Послідовність, яка має одну або більше нуклеотидних вставок є послідовністю, у якій один або більше нуклеотидів введені в один або більше локусів послідовності згідно з SEQ ID.: No.1. Послідовність, яка має одну або більше нуклеотидних делецій є послідовністю, у якій один або більше нуклеотидів послідовності згідно з SEQ ID.: No.1 видалено в одному або більше локусів. У похідних SEQ ID.: No.1 делеції, заміни та вставки можуть бути поєднані у доній послідовності. Переважно похідне має гомологію принаймні 40%, більш бажано принаймні 60%, навіть більш бажано принаймні 80%, найбільш бажано принаймні 90% якщо порівнювати з послідовністю SEQ ID.: No.1. Згідно з найбільш бажаним втіленням не більше ніж 6 нуклеотидів, навіть більш бажано не більше ніж 3 нуклеотиди замінують, видаляють та/або вводять у послідовність SEQ ID.: No.1.

Зокрема, може бути бажаним залишити нуклеотиди з 25 по 29 послідовності SEQ ID.: No.1, тобто, послідовність 5'-TAAAT-3' в промоторі для досягнення промоторної активності. Також може бути переважним залишити нуклеотиди з 22 по 29 послідовності SEQ ID.: No.1, тобто, послідовність 5'-ТААТАААТ-3 в промоторі.

Вище згадані пояснення щодо розташування промотору АТІ або його підпослідовності також застосовні до вище визначених послідовностей, які мають одну або більше нуклеотидних заміни, делецій та/або вставок відповідно до послідовності згідно із SEQ ID.: No.1 або відповідно до її послідовностей.

Велика кількість документів рівня техніки дозволяє особі, обізнаній в даній галузі передбачити які похідні SEQ ID.: No.1 залишать біологічну активність в сенсі дії як поксвірусного вірусного промотору, зокрема як пізнього вірусного промотору коров'ячої віспи. В цьому контексті посилання робиться на Chakrabarti et al., *Biotechniques* (1997) 23,1094-1097 та Davison and Moss, *J. Mol. Biol.* (1989) 210,771-784. Більше того, спеціаліст, обізнаний у даній галузі може легко перевірити чи фрагмент зберігає активність, як поксвірусний промотор, зокрема, пізній вірусний промотор коров'ячої віспи. Зокрема, похідне послідовності можна клонувати вище репортерного гену в плазмідному конструкті. Вказаний конструкт може бути трансфе-

ковано в еукаріотичну клітину або клітинну лінію, таку як клітини CEF або ВНК, які були інфіковані поксвірусом. Поксвірус використовуваний для трансфекції, переважно є поксвірусом з того ж роду, та ще більш переважно тим самим поксвірусом, в геном якого має бути вставлений поксвірус. Експресія репортерного гену потім визначається й порівнюється із експресією репортерного гену, контрольованого промотором, згідно із послідовністю SEQ ID.: No.1. Похідний згідно даного винаходу, переважно є похідним, який має промоторну активність у вказаній тест системі, принаймні 10%, бажано 30%, більш бажано 50%, ще більш бажано 70%, найбільш бажано 90%, порівняно із активністю промоторної послідовності SEQ ID.: No.1. Також ці похідні послідовності SEQ ID.: No.1 в розумінні даного винаходу можуть бути такими, що мають вищу промоторну активність ніж SEQ ID.: No.1.

Згідно даного винаходу рекомбінантний поксвірус містить, принаймні дві експресійні касети, кожна з яких містить промотор АТІ або його похідне. Іншими словами, геном рекомбінантного поксвірусу може містити два або більше промоторів АТІ або його похідних. Промотори АТІ у вірусному геномі можуть бути однаковими або різними. Таким чином, може бути, що всі промотори АТІ будуть мати послідовність згідно з SEQ ID.: No.1. Також може бути, що всі промотори АТІ є одним похідним послідовності згідно з SEQ ID.: No.1. Також, один або більше промоторів АТІ можуть мати послідовність згідно з SEQ ID.: No.1 та один або більше промоторів АТІ в тому ж поксвірусному геномі можуть бути похідними послідовності згідно з SEQ ID.: No.1. Якщо такий поксвірусний геном містить два або більше похідних промотору АТІ, ці похідні можуть бути однаковими або різними. Згідно наступної альтернативи всі промотори АТІ в поксвірусному геномі можуть бути різними похідними послідовності згідно до SEQ ID.: No.1.

В загальних рисах винахід відноситься до рекомбінантних поксвірусів, які мають принаймні, два промотори АТІ або їхні похідні в поксвірусному геномі. Таким чином, вірусний геном може містити, наприклад, два, три, чотири, п'ять, шість або більше промоторів АТІ або їхніх похідних у вірусному геномі.

Промотори АТІ або їхні похідні є зазвичай частиною експресійних касет, кожна з яких містить промотор коров'ячої віспи АТІ або його похідне та кодуєчу послідовність, експресія котрої регулюється вказаними промоторами. Кодуючі послідовності можуть бути будь-якими послідовностями, експресія котрих має контролюватися промотором АТІ або його похідним.

Згідно іншої можливості, принаймні один з промоторів АТІ в поксвірусному геномі може бути використаний для експресування гену, який вже є частиною поксвірусного геному. Такий ген може бути геном, який є природною частиною вірусного геному або чужорідним геном який вже вбудовано в поксвірусний геном. В цих випадках промотор АТІ є вставленим вище гену в поксвірусному геномі, експресія котрого має бути контролюванню промотором АТІ.

Крім того або додатково принаймні один з промоторів АТІ або його похідних можуть бути частиною експресійної касети, котру вбудовано в поксвірусний геном. Експресійні касети, що містять промотор АТІ або його похідні та кодуєчі послідовності можуть бути вставлені в будь-яке придатне місце у вірусному геномі. Не обмежуючись до наступних прикладів, придатні сайти вставки можуть бути вибрані з поміж: (i) другорядних генів, таких як ген ТК, (ii) генів, необхідних для реплікації вірусу, якщо ця функція доповнюється клітиною, яка використовується для розмноження вірусу; (iii) міжгенних регіонів поксвірусного геному, де значення "міжгенний регіон" стосується, переважно, тих частин вірусного геному, які розташовано між двома суміжними генами, які не включають кодуєчі послідовності; (iv) сайтів поксвірусного геному, де природно зустрічаються делеції. Прикладом вірусного геному, який має делеції, що природно зустрічаються є геном MVA, в котрому певні регіони, як наприклад, в геномі вірусу коров'ячої віспи штаму Copenhagen.

Як зазначено вище, сайти вставки не є обмеженими до цих переважних сайтів вставки, оскільки в розумінні даного винаходу є те, що експресійна касета може бути вставлена будь-де у вірусному геномі, де це можливо для одержання рекомбінантів, які можуть бути ампліфіковані або розмножені в, принаймні, одній клітинній системі, такий як фібробласти курячого ембріону (клітини CEF) у випадку MVA та інших поксвірусів, таких як віруси коров'ячої віспи взагалі та пташині поксвіруси.

Різні експресійні касети/АТІ промотори або їхні похідні можуть бути вставлені в різні сайти вставки в поксвірусному геномі.

З різних причин, може бути бажаним вставка двох або більше експресійних касет в той самий сайт вставки поксвірусного геному. Однак, в такому випадку має бути виключено те, що гомологічна рекомбінація відбувається між двома різними експресійними касетами. Гомологічна рекомбінація може призводити до рекомбінантних вірусів, в яких частина експресійних касет є видаленими. Оскільки не видалено значних частин поксвірусного векторного геному, одержаний рекомбінант є життєздатним. Отже, відсутня селекція для вірусів, які мають дві або більше експресійних касет в тому ж сайті вставки. Для уникнення таких небажаних рекомбінаційних подій вже стало рівнем техніки використання двох різних промоторів, якщо дві або більше експресійних касет вводяться в той самий сайт вставки. Згідно даного винаходу, тепер можливо вбудовувати дві або більше експресійних касет, кожна з яких включає промотор АТІ або його похідне в той самий сайт вставки, оскільки не відбуваються гомологічні рекомбінації між промоторами в експресійних касетах.

Таким чином, згідно переважної реалізації, принаймні дві, якщо не всі з експресійних касет вставлені в той самий сайт вставки в поксвірусному геномі. В цьому випадку різні експресійні касети є безпосередньо суміжні без поксвірусних послідовностей між різними експресійними касетами або, принаймні, із більш короткими поксвірусними

послідовностями між різними експресійними касетами.

Методи, необхідні для конструювання рекомбінантного поксвірусу є відомими особі обізнаній в даній галузі. За для прикладу, експресійну касету та/або промотор АТІ або його похідне може бути вбудовано в поксвірусний геном шляхом гомологічної рекомбінації. Для цього нуклеїнову кислоту трансфікують у придатну клітинну лінію, де нуклеїнова кислота включає експресійну касету та/або промотор АТІ або його похідне фланковані нуклеотидними ланками, які гомологічні до регіону поксвірусного геному в котрому вставлена експресійна касета та/або промотор АТІ або його похідне. Для MVA придатними клітинами є клітини CEF та ВНК. Клітини інфіковані поксвірусом та в інфікованих клітинах гомологічна рекомбінація відбувається між нуклеїновою кислотою та вірусним геномом. Крім того, також можливо спочатку інфікувати клітини поксвірусом і потім трансфікувати нуклеїнову кислоту в інфіковані клітини. Повторна рекомбінація відбувається в клітинах. Рекомбінантний поксвірус потім селектується способом відомим з рівня техніки. Конструювання рекомбінантних поксвірусів не обмежується цим окремим способом. Наприклад, будь-який придатний спосіб відомий особі, обізнаній в даній галузі, може бути використаний для цього.

Промотор АТІ в рекомбінантному поксвірусі може бути використаний для керування експресією будь-якої кодуєчої послідовності(ей). Кодуюча послідовність може, переважно, кодувати, принаймні, один антигенний епітоп або антиген. У цьому випадку рекомбінантний поксвірус може бути використано для експресії вказаного антигену після інфікування клітин в організмі, наприклад, ссавця включаючи людину. Презентація вказаного антиген/антитіло може викликати імунну відповідь в організмі, що може привести до вакцинації організму проти агента, з якого було одержано антиген/епітоп. Більш конкретно, епітоп/антиген може бути частиною більшої амінокислотної послідовності, такої, як поліепітоп, пептид або протеїн. Прикладами таких поліепітопів, пептидів або протеїнів можуть бути поліепітопи, пептиди або протеїни одержані з (i) вірусів, таких, як ВІЛ, HTLV (вірус Т-клітинного лейкозу людини), вірус герпесу, вірус тропічної лихоманки, вірус поліомієліту, вірус кору, вірус свинки, вірус краснухи, віруси гепатиту та інші, (ii) бактерій, (iii) грибків.

Протеїни, пептиди або епітопи, експресовані з різних експресійних касет, можуть бути одержані з одного і того ж збудника, такого, як вірус, бактерія або грибок. За для прикладу, всі продукти, експресовані з експресійних касет, можуть бути протеїнами ВІЛ. Якщо всі продукти одержані від одного агента, то є можливим індукувати дуже широку імунну відповідь проти вказаного агента. Крім того, також можливо, що протеїни, пептиди або епітопи, експресовані з різних експресійних касет, походять від одного агента. За для прикладу, продукти, одержані з експресійних касет в одному поксвірусному геномі, походять від різних вірусів, таких як віруси свинки, кіру та краснухи. Згідно цієї реалізації, є можливим використовувати один рекомбінан-

тний вірус для індуквання імунної відповіді проти декількох агентів.

Крім того, принаймні, одна з кодуєчи послідовностей може кодувати терапевтичну речовину, таку як інтерлейкіни, інтерферони, рибозими, ензими і таке інше.

Рекомбінантний поксвірус, згідно даного винаходу, може вводиться в тіло тварини або людини згідно знань особи обізнаної в даній галузі. Отже, рекомбінантний поксвірус, згідно даного винаходу, може використовуватись як медикамент (наприклад, фармацевтична композиція) або вакцина.

Фармацевтична композиція або вакцина в загальному випадку може включати один або більше фармацевтично придатний та/або дозволений носії, домішки, антибіотики, консерванти, адюванти, дилуенти та/або стабілізатори додатково до рекомбінантного вірусу. Так додатковою речовиною може бути вода, сольовий розчин, гліцерин, етанол, змочуючі або емульгуючі речовини, рН буферні речовини або подібні. Прийнятними носіями є типово великі, молекули, які повільно метаболізують, такі, як протеїни, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, амінокислотні кополімери, ліпідні агрегати або подібні.

Для виготовлення фармацевтичних композицій або вакцин рекомбінантний поксвірус перетворюють в фізіологічно прийнятну форму. Це можна здійснити на основі досвіду у виготовленні поксвірусних вакцин, які використовуються для вакцинації проти віспи (як це описано Stickl, H. et al. [1974] Dtsch. med. Wschr. 99,2386-2392). Наприклад, якщо поксвірус є MVA, очищений вірус може зберігатися при -80°C із титром 5×10^8 TCID₅₀/ml в приблизно 10mM Tris, 140mM NaCl pH 7.4. Для виготовлення вакцинних ін'єкцій, наприклад, 10^1 - 10^9 часток рекомбінантного вірусу, згідно даного винаходу ліофілізують в фосфотно-буферному сольовому розчині (PBS) в присутності 2% пептону та 1% альбуміну людини в ампулі, бажано в скляній ампулі. Або, вакцинні ін'єкції можуть бути одержані поступовою ліофільною сушкою вірусу в композиції. Ця композиція може додатково містити такі добавки як, манітол, декстрин, цукор, гліцин, лактозу або полівінілпіролідон або інші добавки такі як, антиоксиданти або інертний газ, стабілізатори або рекомбінантні протеїни (наприклад, сироватковий альбумін людини) придатні для введення *in vivo*. Типовий склад придатний для ліофільного сушіння рекомбінантного MVA містить 10 mM Tris-буферу, 140mM NaCl, 18.9г/л Декстрин (MM 36.000-40.000), 45г/л Сахарози, 0.108г/л моногідрату калієвої солі L-глутамової кислоти із pH 7.4. Потім скляна ампула запаювалася й могла зберігатися при температурі від 4°C до кімнатної протягом декількох місяців. Однак, доки нема потреби, ампули зберігаються при температурах нижче -20°C .

Для вакцинації або терапії ліофілізат може бути розведений у від 0,1 до 0,5мл водного розчину, переважно води, фізіологічного розчину або Tris-буферу, та введено системно або локально, наприклад, парентерально, внутрішньом'язево або іншим шляхом введення відомим обізнаному про-

фесіоналу. Спосіб введення, доза та кількість введення може бути оптимізована відомим чином особою обізнаною в даній галузі.

Отже, згідно відповідної реалізації, винахід відноситься до способу впливу, переважно індуквання імунологічної відповіді в живому тілі тварини, включаючи людину, що включає введення вірусу, композиції або вакцини, згідно даного винаходу тварині або людині, що лікується. Якщо рекомбінантний вірус є рекомбінантним MVA, вакцинні дози типово містять принаймні 10^2 , переважно, принаймні 10^4 , більш переважно, принаймні 10^6 , ще більш переважно, від 10^8 до 10^9 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose - доз інфікування тканинної культури) вірусу.

Також, винахід стосується способу введення, принаймні, двох кодуєчи послідовностей в клітині-мішені, що включає інфікування клітин-мішеней вірусом згідно даного винаходу. Клітини-мішені можуть бути клітинами в котрих вірус здатний реплікуватися або клітини які можуть бути інфіковані рекомбінантним вірусом, однак в котрих вірус не реплікується, таких як всі типи клітин людини у випадку рекомбінантного MVA.

Також винахід відноситься до способу одержання пептиду, протеїну та/або вірусу, що включає інфікування клітини-хазяїна рекомбінантним вірусом згідно даного винаходу, наступним культивуванням інфікованих клітин-хазяїнів за сприятливих умов, й після того наступним виділенням та/або збагаченням протеїну та/або вірусів вироблених вказаною клітиною-хазяїном. Якщо це призначено для вироблення, тобто, ампліфікації вірусу, згідно даного винаходу, клітина має бути клітиною, в якій вірус здатен реплікуватися, такою, як клітини CEF або BHK, у випадку рекомбінантного MVA. Якщо це призначено для вироблення пептиду/протеїну, кодованого даною кодуєчою послідовністю, експресія котрої контролюється промотором AT1 або його похідним, клітина може бути будь-якою клітиною, яка може бути інфікована рекомбінантним вірусом та яка дозволяє експресування пептиду/протеїну, кодованого поксвірусом.

Також, винахід стосується клітин інфікованих вірусом згідно даного винаходу.

Фіг.1 та Фіг.2: Схематичне представлення рекомбінантного векторів pBN70 (Фіг.1) та pBN71 (Фіг.2)

F1A137L = Фланк 1 регіону вставки;

F2A137L = Фланк 2 регіону вставки;

F2rpt = повтор Фланку 2;

prAT1 = промотор AT1;

pr7.5 = p7.5 промотор;

GUS = кодуєчого регіону GUS;

NS1 = NS1 кодуєчого регіону;

NPTII = неоміцинова резистентність;

IRES = зовнішній сайт рибосомального входу;

EGFP = регіон, що кодує протеїн посиленої зеленої флуоресценції;

AmpR = ген резистентності до ампіциліну.

Фіг.3: Аналіз RT-PCR для визначення експресії гену NS1 в клітинах інфікованих MVA-mBN30 (Фіг.3A) або MVA-mBN31 (Фіг.3B). В усіх випадках коли було проведено PCR праймер був специфічний до гену NS1.

А) М: маркер молекулярної маси; смуга 1: аналіз із плазмідною рBN70 (позитивний контроль); смуга 2: аналіз без додавання нуклеїнових кислот (негативний контроль); смуга 3: PCR із RNA виділеною з клітин ВНК інфікованих MVA-mBN30 без додавання зворотної транскриптази; смуга 4: RT-PCR із RNA виділеною з клітин ВНК інфікованих MVA-mBN30; смуга 5: PCR із RNA виділеною з клітин ВНК інфікованих MVA-BN без додавання зворотної транскриптази; смуга 6: RT-PCR із RNA виділеною з клітин ВНК інфікованих MVA-BN.

В) М: маркер молекулярної маси; смуга 1: PCR із RNA з клітин інфікованих mBN31; смуга 2: RT-PCR із RNA з клітин інфікованих різними рекомбінантними MVA які мають в геномі ген NS1; смуга 3: PCR із RNA з клітин інфікованих MVA-BN; смуга 4: PCR із RNA з клітин інфікованих BN31 (без додавання зворотної транскриптази); смуга 5: PCR із RNA з клітин інфікованих різними рекомбінантними MVA, які мають в геномі ген NS1 (без додавання зворотної транскриптази); смуга 6: PCR із RNA з клітин інфікованих MVA-BN (без додавання зворотної транскриптази); смуга 7: аналіз із плазмідною рBN71 (позитивний контроль); смуга 8: аналіз без додавання нуклеїнових кислот (негативний контроль);

Приклад

Наступний приклад глибше проілюструє даний винахід. Має бути добре зрозуміло особі обізнаній в даній галузі, що наданий приклад ні в якому разі не може бути тлумачено як обмеження застосовності технології наданої даним винаходом до цього прикладу.

Стабільна вставка двох чужорідних генів, регульованих промотором Соврох АТІ в одиночному сайті геному MVA

Метою цього прикладу було продемонструвати, що вставка двох чужорідних генів регульованих промотором АТІ є стабільною.

Наступний приклад демонструє стабільність рекомбінантного MVA, який містить у вірусному геномі дві копії промотору АТІ. Для цього промотор АТІ коров'ячої віспи було злито із геном GUS (Е. сої β-Глюкуронідаза) та неструктурним геном 1 (NS) вірусу тропічної лихоманки, відповідно. Для порівняння ген GUS також було злито із природним промотором вірусу коров'ячої віспи р7.5. АТІ промотор-NS1 гену експресійної касети, а також АТІ промотор-GUS гену експресійної касети або р7.5 промотор-GUS гену експресійної касети було вбудовано в рекомбінантний вектор, який містив послідовності гомологічні до геному MVA. (Фіг.1 та 2). В одержаних плазмідах рBN70 (АТІ промотор-NS1 гену експресійної касети та АТІ промотор-GUS гену експресійної касети) та рBN71 (АТІ промотор-NS1 гену експресійної касети та р7.5 промотор-GUS гену експресійної касети) експресійні касети були фланковані послідовностями гомологічними до послідовностей в геномі MVA в які були вставлені експресійні касети. Гомологічні послідовності спрямовували вставку експресійних касет в міжгенний регіон (IGR) 136-137 геному MVA. Клітини CEF були інфіковані MVA-BN та трансфіковані рBN70 та рBN71, відповідно. В клітинах гомологічна рекомбінація, що відбувалася між геномом MVA

та рекомбінаційною плазмідною призводила до появи рекомбінантних геномів MVA. Рекомбінанти були піддані декільком циклам бляшкової очистки й були пасажовані на клітини CEF (загальна кількість пасажів включаючи бляшкову очистку: 20). Рекомбінанти було перевірено на стабільність, експресію вставлених генів та послідовність рекомбінантного конструктів MVA, які містили два різних набори двох промоторів. Аналіз послідовності, PCR та функціональні тести показали, що рекомбінантні фрагменти вбудовано правильно та те, що вставки, навіть коли промотор АТІ було вбудовано двічі в геном, є стабільними та функціональними.

Матеріали:

Первинні клітини CEF; MVA-BN із титром 10^8 TC₅₀/мл; трансфекційний набір Effectene (Qiagen); клітинне культуральне середовище VP-SFM (Gibco BRL); G418 (Gibco BRL); DNA набір швидкого очищення крові Nucleospin (Macherey Nagel); полімераза Triple Master DNA (Eppendorf); Oligos (MWG); Набір для секвенування DCTS Quickstart (Beckman Coulter).

Методи:

Рекомбінаційні вектори рBN70 та рBN71 (Фіг. 1 та 2) були клоновані згідно стандартних протоколів, відомих особі, обізнаній в даній галузі.

5×10^5 клітин CEF було висіяно на кожну реакцію трансфекції в лунки 6-лункової планшетки та витримано в VP-SFM протягом ночі при 37°C та 5% CO₂. Клітини були інфіковані MVA-BN (моі 1.0) в 0.5мл VP-SFM на лунку та інкубовано протягом 1 години при кімнатній температурі в шейкері. Трансфекція лінеаризованої рBN70 та 71 була проведена, як описано в протоколі виробника (Qiagen).

Отримані рекомбінантні віруси були пасажовані декілька разів за селективних умов (G418, 300нг/мл) та були виділені одиночні бляшки, ампліфіковані та тестовані допоки не було генеровано очищені клони. Аналізований вірус було остаточно пасажовано 20 разів.

Результати:

1. Конструювання рекомбінантних вірусів

Були створені два рекомбінантні MVA, що експресуються NSI-та GUS-послідовностями під контролем двох різних промоторних комбінацій (АТІ-NS1/АТІ-GUS або АТІ-NS1/р7.5-GUS). Ці послідовності разом із селекційною касетою IRES/EGFP (internal ribosome entry site/enhanced green fluorescent protein - зовнішній сайт входу рибосоми/протеїн посиленої зеленої флуоресценції) були вставлені в 136-137 сайт IGR (міжгенний регіон між ORF A136L та A137L геному MVA) геному MVA, згідно методів, відомих особі, обізнаній в даній галузі. Ці віруси були очищені та пасажовані 20 разів за селективних умов. Обидва рекомбінантні MVA були ампліфіковані до рівня первинної сировини (1×10^7 см² в бутлі). Послідовність промотору АТІ в цьому прикладі відповідає послідовності SEQ ID.: No.1.

2. Експресія кодуєчого регіону EGFP

Для визначення функціональності вставленого тестового гену в IGR 136-137 проводили флуоресцентні спостереження протягом пасажування. Як-

би вставлений ген не був функціональним, то не спостерігалася б експресія EGFP. ВНК інфіковані MVA-mBN30 та MVA-mBN31 ясно вказують на те, що ген вставлений в 136-137 IGR був транскрибований.

3. PCR аналіз 136-137 IGR MVA-mBN30 та MVA-mBN31

Для виключення вмісту можливих пустих векторів в сайті IGR 136-137 та для перевірки вмісту у вірусному геномі вставок очікуваного розміру було проведено аналіз PCR. Для цього були застосовані праймери, які зв'язувалися із регіонами, що фланкують сайти вставки. Очікуваними були смуги PCR для праймерів, які зв'язувалися у Фланку 1 та 2, які були наступними (i) 3.4kb для рекомбінантного MVA-mBN30, (ii) 3.5kb для рекомбінантного MVA-mBN31 та (iii) 212 бр для пустого вектора MVA-BN. Смуги очікуваного розміру були виявлені для MVA-mBN30 та MVA-mBN31, що вказує на те, що рекомбінанти мають очікувану геномну структуру. Не було знайдено вірусів дикого типу в жодному з протестованих зразків MVA-mBN30 або MVA-mBN31DNA. Також, контроль порожніх векторів MVA-BN (порожній вектор) вказав на очікуваний 212bp продукт в обох рекомбінантах MVA. В негативному контролі не було виявлено сигналу. Таким чином, ефективна селекція та розділення рекомбінантних векторів від порожніх векторів MVA-BN було одержано селекційним тиском.

4. Секвенування регіону 136-137

Результати секвенування вказують на те, що промотори mBN31 та mBN30 та промотор GUS були вставлені без змін в парах основ в сайті IGR 136-137. Для NS1 в mBN30 також не було виявлено змін в послідовності пар основ. В mBN31 NS1 мали місце чотири точкові мутації в послідовності пар основ (позиція 1315: С замість G, позиція 1582: G замість A, позиція 1961: А замість С та позиція 1963: G замість Т). Дві з них (в позиціях 1582 та 1963) не призводили до змін в амінокислотах. Незалежно від незначних відхилень з результатів секвенування чітко зрозуміло, що обидва рекомбінанти, mBN31 та mBN30, містять цілі послідовності NS1. Більше того, з даних секвенування можна зробити висновок, що ген NS1 стабільно включений в рекомбінант, mBN30 який містить два промотори АТІ. Експерименти демонструють стабільність рекомбінантів, хоча у вірусний геном включено дві ідентичні промоторні послідовності.

5. Аналіз експреси гену NS1 та гену GUS в рекомбінантах mBN30 та mBN31

Описані вище дані PCR та послідовності вказують на те, що ген NS1 та ген GUS містяться в геномі рекомбінантів MVA-mBN30 та 31. Для перевірки експресії цих генів з вірусного геному були проведені RT-PCR регіону NS1 та функціональний тест, а також підрахунок вироблених протеїнів GUS.

5.1 RT PCR регіону NS1

Цей експеримент було виконано для демонстрації того, що рекомбінанти MVA-mBN30 та mBN31, які містять ген NS1, вставлений в сайт IGR 136-137 функціонально експресує NS1 як mRNA. Клітини ВНК були інфіковані вірусами MVA-mBN30 та mBN31, відповідно. RNA була виділена з цих

клітин й використана для аналізу RT-PCR. Результати чітко вказують на те, що NS1 експресується з обох вірусів в інфікованих клітинах ВНК. Забруднення вірусною DNA може бути виключено, оскільки не було виявлено жодного сигналу PCR, коли було пропущено етап оберненої транскрипції. Водний контроль був негативним та для плазмідного позитивного контролю обох вірусів було виявлено чисті смуги PCR (Фігура 3).

5.2 Вимірювання активності GUS

Для того, щоб продемонструвати експресію GUS було вбудовано в MVA-mBN30 та mBN31 після 20 циклів пасажування GUS активність була визначена кількісно. Таблиця 1 чітко вказує на те, що GUS було експресовано в обох рекомбінантних вірусах, тоді як експресія GUS не була визначена MVA-BN без вставки.

Розведення	1:2	1:10	1:100
mBN30	0,968	0,224	0,022
mBN31	0,414	0,089	0,012
BN	0,007	0,007	0,007

Таблиця 1: Вимірювання активності GUS в MVA-mBN30, MVA-mBN31 та MVA-BN після 20 пасажів. MVA-mBN30 та MVA-mBN31 були загалом пасажовані 20 разів. Клітини були інфіковані обома рекомбінантними вірусами й зібрані після 24 годин в Лізіному буфері. Активність GUS визначалася згідно методів, відомих особі, обізнаній в даній галузі. Значення активності були визначенні за абсорбцією при 415 нм. Значення <0,05 та >2,0 було виключено.

Критерії якості:

PCR аналіз IGR 136-137

Не повинні спостерігатися доріжки в смугах негативного контролю, в позитивному контролі повинні спостерігатися лише доріжки очікуваного розміру. Для MVA-BN очікуваним є фрагмент 212bp.

Секвенування та PCR регіону IGR 136-137

Ампліфікація PCR вірусної DNA-мішені із праймерами повинна виявляти одиничний фрагмент очікуваної довжини. Збирання послідовностей має давати в результаті одну цілісну послідовність, що представляє фрагмент DNA очікуваної довжини. Короткі одноланцюгові розтягнення беруться до уваги, якщо в даному регіоні не трапляються мутації. До того ж, кінці цілісної послідовності можуть бути лише одноланцюговими, беручи до уваги гетерологічну природу продуктів ампліфікації PCR. Послідовність тестового зразка має показувати гомологію $\geq 97\%$ до стандартної послідовності або відповідної послідовності з бази даних.

RT-PCR для NS1

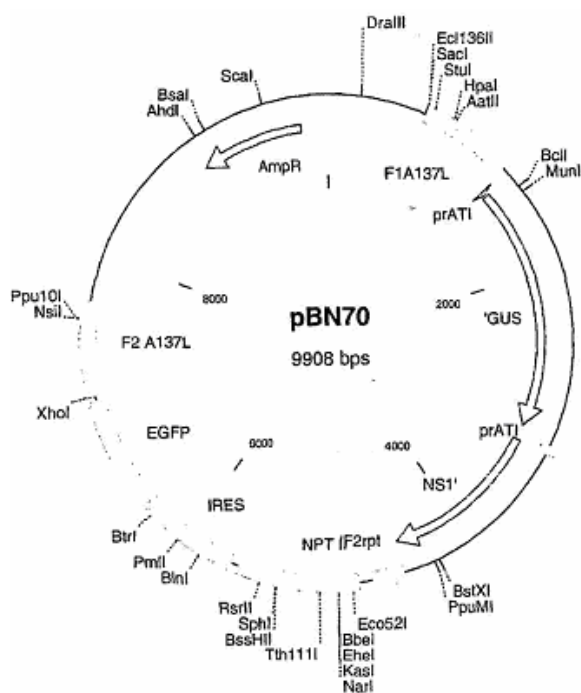
Не повинні спостерігатися доріжки в смугах негативного контролю, в позитивному контролі повинні спостерігатися лише доріжки очікуваного розміру. Для pBN71 очікуваним є 909bp фрагмент та для pBN70 очікуваним є 907bp фрагмент.

Висновки:

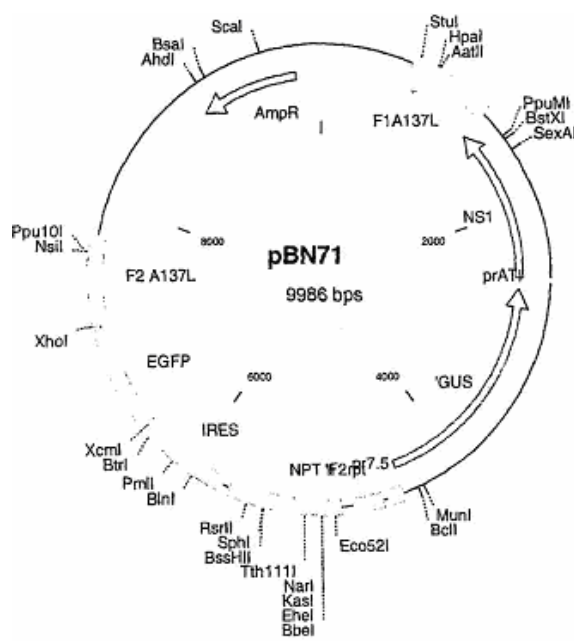
Після 20 пасажів у селективних умовах, PCR аналіз 136-137 міжгенного регіону показав відсутність забруднення пустими векторами MVA-mBN31 (ATI-NS1/p7.5-GUS) або MVA-mBN30 (ATI-NS1/ATI-GUS). Для MVA-mBN30 PCR показав, що не відбулося гомологічної рекомбінації в АТІ сайті. MVA-

mBN30 та mBN31 було протестовано (1) фінальною PCR для того, щоб продемонструвати, що матеріал не містить пустих векторів, та що обидва гени залишаються вбудованими, навіть коли обидва знаходяться під одним і тим же промотором у одному і тому ж IGR сайті (для mBN30), (2) секвенуванням регіону для того, щоб продемонструвати, що послідовність незмінна (3) функціональною

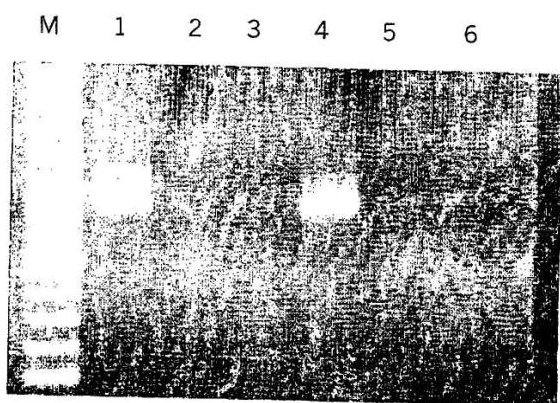
експресією GUS кількісним GUS аналізом та RT-PCR для NS1. Результати досліджень показують, що подвійні вставки двох різних генів у один і той самий IGR під контроль одного і того ж промотору не дають в результаті рекомбінаційних подій у промоторному сайті навіть після великої кількості пасажів. Обидва вбудованих гени продемонстрували, що вони є такими, що експресуються.



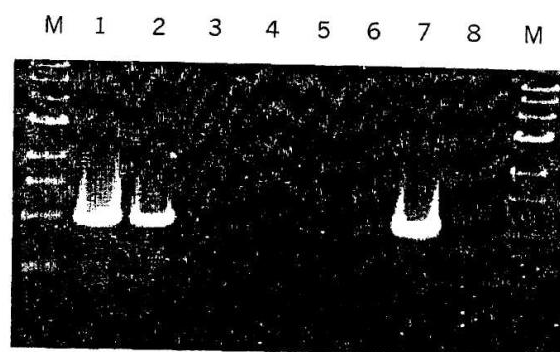
ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3А



ФІГ. 3В