



(51) МПК

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2001110116/13, 14.09.1999

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.09.1999

(30) Приоритет: 14.09.1998 US 09/152,845

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2003

(45) Опубликовано: 27.02.2006 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US 5716821 A, 10.02.1998.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную  
фазу: 16.04.2001(86) Заявка РСТ:  
US 99/21081 (14.09.1999)(87) Публикация РСТ:  
WO 00/15853 (23.03.2000)

Адрес для переписки:

129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ГАРСИА-САСТРЕ Адольфо (US),

ПАЛЕЗ Питер (US)

(73) Патентообладатель(и):

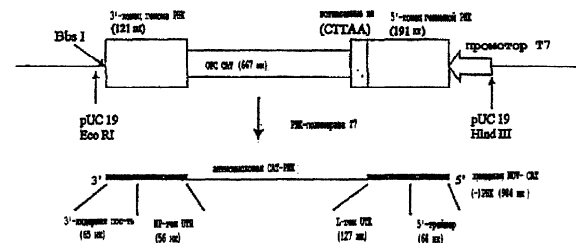
МАУНТ СИНАЙ СКУЛ ОФ МЕДСИН ОФ НЬЮ-  
ЙОРК ЮНИВЕРСИТИ (US)

## (54) СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РНК РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ И ВАКЦИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области генной инженерии. Предложены рекомбинантные молекулы РНК, способы получения рекомбинантной эукариотической клетки, способы получения химерного РНК-вируса, вакцинные препараты и иммуногенные композиции. Была сконструирована рекомбинантная матрица NDV-вирусной РНК с негативной цепью, которая может быть использована с вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой для экспрессии продуктов гетерологичных генов в соответствующих клетках-

хозяйевах. Предложенная группа изобретений может быть использована против патогенов и антигенов широкого ряда. 12 н. и 133 з.п. ф-лы, 8 ил.



ФИГ. 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2001110116/13, 14.09.1999**  
(24) Effective date for property rights: **14.09.1999**  
(30) Priority: **14.09.1998 US 09/152,845**  
(43) Application published: **20.07.2003**  
(45) Date of publication: **27.02.2006 Bull. 6**  
(85) Commencement of national phase: **16.04.2001**  
(86) PCT application:  
**US 99/21081 (14.09.1999)**  
(87) PCT publication:  
**WO 00/15853 (23.03.2000)**

Mail address:  
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,**  
**OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i**  
**Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):  
**GARSIA-SASTRE Adolfo (US),**  
**PALEZ Piter (US)**  
(73) Proprietor(s):  
**MAUNT SINAJ SKUL OF MEDSIN OF N'Ju-JORK**  
**JuNIVERSITI (US)**

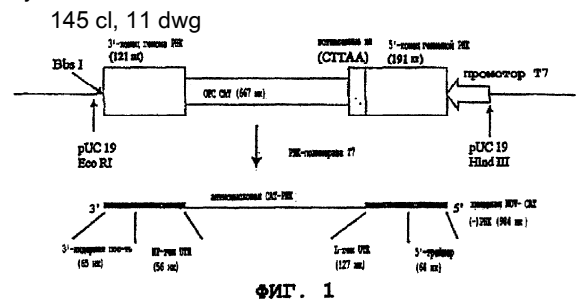
RU 2 270 864 C2

(54) **SYSTEMS FOR EXPRESSION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS RECOMBINANT RNA AND VACCINES**

(57) Abstract:  
FIELD: genetic engineering, medicinal virology, medicine.

SUBSTANCE: invention proposes recombinant RNA molecules, methods for preparing recombinant eukaryotic cell, methods for preparing chimera RNA virus, vaccine preparations and immunogenic compositions. The recombinant matrix NDV-viral RNA with negative chain has been constructed that can be used in viral RNA-dependent RNA polymerase for expression of products of heterologous genes in corresponding host-cells. Proposed group of inventions can be used against pathogens and

antigens of broad row.  
EFFECT: valuable properties of expression systems.



RU 2 270 864 C2

Настоящая заявка является частичным продолжением заявки №09/152845, поданной 14 сентября 1998 года, которая во всей своей полноте включена в настоящее описание в качестве ссылки.

#### 1. Введение

5 Настоящее изобретение относится к матрицам РНК рекомбинантного вируса ньюкаслской болезни, которые могут быть использованы для экспрессии продуктов гетерологичных генов в соответствующих системах клеток-хозяев и/или для  
10 конструирования рекомбинантных вирусов, которые экспрессируют, упаковывают и/или презентуют этот гетерологичный генный продукт. Эти продукты экспрессии и химерные вирусы могут быть использованы преимущественно в вакцинных препаратах. Настоящее изобретение также относится к генетически сконструированным рекомбинантным вирусам ньюкаслской болезни, содержащим модификации и/или мутации, которые делают этот рекомбинантный вирус подходящим для его использования в вакцинных препаратах, такие как аттенюированный фенотип или повышенная иммуногенность.

15 Настоящее изобретение относится к рекомбинантным вирусам ньюкаслской болезни, которые индуцируют интерфероновые и связанные с ним пути метаболизма. Настоящее изобретение относится к использованию вирусов и вирусных векторов ньюкаслской болезни против патогенов и/или антигенов широкого ряда, включая опухолеспецифические антигены. Настоящее изобретение продемонстрировано на примерах, в которых были  
20 сконструированы РНК-матрицы рекомбинантного вируса ньюкаслской болезни, содержащие гетерологичный ген, кодирующий последовательности в отрицательной полярности. Настоящее изобретение также относится к конструированию РНК-матриц рекомбинантного вируса ньюкаслской болезни, содержащих гетерологичный ген, кодирующий последовательности в положительной полярности. Такими  
25 последовательностями гетерологичного гена являются последовательности, происходящие от вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

#### 2. Предпосылки создания изобретения

Для управления экспрессией гетерологичных белков в системах клеток-хозяев был генетически сконструирован ряд ДНК-вирусов (например, вирус коровьей оспы,  
30 бакуловир и т.п.). Недавно аналогичные успехи были также достигнуты в конструировании РНК-вирусов с позитивной цепью (например, полиовируса). Считается, что продукты экспрессии этих конструкций, т.е. продукт гетерологичного гена или химерный вирус, который экспрессирует продукт гетерологичного гена, может быть использован в вакцинных препаратах (в субъединичных вакцинах или в вакцинах на основе  
35 полноразмерного вируса). Одним из недостатков использования вирусов, таких как вирус коровьей оспы, в целях конструирования рекомбинантных или химерных вирусов для их использования в вакцинах является отсутствие вариабельности в их главных эпитопах. Такое отсутствие вариабельности в вирусных штаммах налагает строгие ограничения на повторное использование химерных вакцин на основе вируса коровьей оспы,  
40 заключающиеся в том, что множество вакцинаций будет приводить к выработке у хозяина резистентности к этому штамму, так, что инокулированный вирус больше не сможет инфицировать хозяина. Поэтому заражение резистентного индивидуума химерными вакцинами не будет индуцировать стимуляцию иммунного ответа.

В противоположность этому, РНК-вирус с негативной цепью должен быть  
45 привлекательным кандидатом для конструирования химерных вирусов в целях их использования в вакцинах. РНК-вирус с негативной цепью, например вирус гриппа, является желательным потому, что он имеет широкую генетическую вариабельность, позволяющую конструировать вакцинные препараты широкого спектра, которые стимулируют иммунный ответ без риска развития толерантности. В последнее время  
50 конструирование инфекционных рекомбинантных или химерных РНК-частиц с негативной цепью было осуществлено с использованием вируса гриппа (см. патент США №5166057, Palese и др., который во всей своей полноте включен в настоящее описание в качестве ссылки).

## 2.1. Вирус ньюкаслской болезни

Семейства вирусов, содержащие оболочечную одноцепочечную РНК антисмыслового генома, классифицируют на группы, имеющие несегментированные геномы (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae), или на группы, имеющие сегментированные геномы (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae и Arenaviridae). К семейству Paramyxoviridae, 5 подробно описанному ниже и используемому в описанных здесь примерах, относится вирус ньюкаслской болезни (NDV), вирус парагриппа, вирус Сендай, обезьяний вирус 5 и вирус эпидемического паротита.

Вирус ньюкаслской болезни представляет собой оболочечный вирус, содержащий 10 линейный одноцепочечный несегментированный антисмысловый РНК-геном. Эта геномная РНК содержит гены в следующем порядке: 3'-NP-P-M-F-HN-L, более подробно описанные ниже. Эта геномная РНК также содержит лидерную последовательность у 3'-конца.

Структурные элементы данного вириона включают вирус с оболочкой, который представляет собой липидный бислой, происходящий из плазматической мембраны клетки. 15 Гликопротеин, гемагглютинин-нейраминидаза (HN), выступает из этой оболочки, благодаря чему этот вирус обладает гемагглютининовой и нейраминидазной активностью. Гибридный гликопротеин (F), который также взаимодействует с вирусной мембраной, сначала продуцируется как неактивный предшественник, а затем посттрансляционно отщепляется с образованием двух полипептидов, связанных дисульфидами. Активный белок F участвует в 20 проникновении NDV в клетки-хозяева путем облегчения слияния вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки-хозяина. Матриксный белок (M) участвует в сборке вируса и взаимодействует с вирусной мембраной, а также с нуклеокапсидными белками.

Главной субъединицей белка этого нуклеокапсида является нуклеокапсидный белок (NP), который наделяет этот капсид спиральной симметрией. В ассоциации с этим 25 нуклеокапсидом находятся белки P и L. Очевидно, что фосфопротеин (P), подвергаемый фосфорилированию, играет роль регулятора транскрипции и может также участвовать в метилировании, фосфорилировании и полиаденилировании. Ген L, который кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, необходим для синтеза вирусной РНК вместе с белком P. Белок L, который берет на себя почти половину кодирующей функции вирусного генома, 30 является наиболее крупным из этих вирусных белков и играет важную роль как в транскрипции, так и в репликации.

Репликация всех РНК-вирусов с негативной цепью, включая NDV, затруднена из-за отсутствия клеточного механизма, необходимого для репликации РНК. Кроме того, геном с 35 негативной цепью не может непосредственно транслироваться в белок, и сначала он должен транскрибироваться в копию (мРНК) с позитивной цепью. Следовательно, после внедрения в клетку-хозяина эта геномная РНК сама по себе не может синтезировать нужную РНК-зависимую РНК-полимеразу. Белки L, P и NP должны проникать в клетку вместе с геномом после инфицирования.

Была высказана гипотеза, что большинство вирусных белков или все эти белки, которые 40 транскрибируют мРНК NDV, также осуществляют репликацию вируса. Механизм, который регулирует альтернативную функцию (т.е. транскрипцию или трансляцию) того же компонента белков, не был точно идентифицирован, однако, очевидно, что он приводит к образованию избытка свободных форм одного или нескольких нуклеокапсидных белков, а в частности, NP. Сразу после проникновения вируса транскрипция инициируется белком L с 45 использованием антисмысловой РНК в нуклеокапсиде в качестве матрицы. Синтез вирусной РНК регулируется так, чтобы в процессе транскрипции он продуцировал моноцистронные мРНК.

После транскрипции вторым главным событием при инфицировании РНК-вирусами с 50 негативной цепью является репликация вирусного генома. Как и для других РНК-вирусов с негативной цепью, репликация вирусного генома в вирусе ньюкаслской болезни (NDV) опосредуется вирусспецифическими белками. Первыми продуктами репликативного синтеза РНК являются комплементарные копии (т.е. копии с положительной полярностью) РНК генома NDV (кДНК). Эти копии с плюс-цепями (антигеномы) отличаются от позитивных

мРНК-транскриптов по своей концевой структуре. В отличие от мРНК-транскриптов эти антигеномные кРНК не являются копированными и метилированными у 5'-конца и не являются усеченными и полиаденилированными у 3'-конца. кРНК имеют общий конец со своими негативными матрицами и содержат всю генетическую информацию в каждом геномном РНК-сегменте в комплементарной форме. кРНК служат в качестве матриц для синтеза вирусных NDV-геномов с негативной цепью (вРНК).

Геномы NDV с негативной цепью (вРНК) и антигеномы (кРНК) инкапсидируются нуклеокапсидными белками; при этом вирусными мРНК являются лишь неинкапсидированные виды РНК. Для NDV местом репликации, а также транскрипции вирусной РНК является цитоплазма. Сборка вирусных компонентов осуществляется в плазматической мембране клетки-хозяина и зрелый вирус высвобождается посредством отпочковывания.

## 2.2. Конструирование РНК-вирусов с негативной цепью

РНК-зависимые РНК-полимеразы вирусов животных были широко изучены в отношении многих аспектов структуры белка и реакционных условий. Однако элементы РНК-матрицы, которые стимулируют оптимальную экспрессию посредством полимеразы, могут быть изучены лишь благодаря предположению о существовании вирусных РНК-последовательностей. Такой анализ промоторов представляет определенный интерес, поскольку неизвестно, каким образом вирусная полимераза распознает специфические вирусные РНК из множества РНК, кодируемых хозяином и обнаруживаемых в инфицированной клетке.

Вирусы животных, содержащие плюс-смысловую геномную РНК, могут реплицироваться при введении плазмидной РНК в клетки путем трансфекции (например, Racaniello et al., 1981, *Science* 214:916-919; Levis et al., 1986, *Cell* 44:137-145). В случае полиовируса очищенная полимераза будет реплицировать геномную РНК в *in vitro*-реакциях, и при трансфекции этого плюс-смыслового РНК-препарата в клетки она становится инфекционной (Kaplan et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8424-8428). Однако элементы матрицы, которые служат в качестве транскрипционного промотора для кодируемой полиовирусом полимеразы, неизвестны, поскольку даже гомополимеры РНК могут быть копированы (Ward, et al., 1988, *J.Virol.* 62:558-562). Для продуцирования модели дефектных интерферирующих (ДИ) РНК для генома вируса Синдбис также были использованы транскрипты SP6. При введении РНК в инфицированные клетки она реплицируется и упаковывается. Было показано, что РНК-последовательности, которые ответственны за распознавание полимеразой вируса Синдбис и упаковку этого генома в вирусные частицы, составляют последовательность в 162 нуклеотидов (нк) с 5'-конца и 19 нуклеотидов с 3'-конца генома (Levis, et al., 1986, *Cell* 44:137-145). В случае вируса мозаики костра (BMV), растительного РНК-вируса с позитивной цепью, транскрипты SP6 были использованы для идентификации промотора как 134-нуклеотидного тРНК-подобного 3'-конца (Dreher & Hall, 1988, *J.Mol.Biol.*, 201:31-40). Было показано, что распознавание и синтез полимеразы зависят как от последовательности, так и от вторичных структурных признаков (Dreher et al., *Nature* 311:171-175).

Антисмысловые РНК-вирусы не поддавались исследованию в отношении последовательности, требуемой для репликазы. Очищенная полимераза вируса везикулярного стоматита является активной лишь при транскрипции в том случае, когда вирусные рибонуклеопротеиновые комплексы (РНП) включаются в качестве матрицы (De & Banerjee, 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126:40-49; Emerson & Yu, 1975, *J.Virol.* 15:1348-1356; Natio & Ishihama, 1976, *J.Biol.Chem.* 251:4307-4314). Что касается вирусов гриппа, то сообщалось, что "голая" РНК, выделенная из вируса, была использована для восстановления РНП. Вирусные нуклеокапсидные и полимеразные белки подвергали гель-очистке и ренатурировали на вирусной РНК с использованием тиоредоксина (Szewczyk et al, 1988, *Proc.Natl.Acad.Sci., USA*, 85:7907-7911). Однако эти авторы не указывают ни на то, что активность этого препарата является специфичной для РНК-вируса гриппа, ни на то, что ими были проанализированы сигналы, которые

стимулируют транскрипцию.

Лишь недавно стало возможным выявить РНК-вирусы с негативной цепью путем использования рекомбинантных методов обратной генетики (патент США №5166057, Palease и др.). Хотя этот метод был сначала применен для конструирования геномов вируса гриппа (Luytjes et al, 1989, Cell 59: 1107-1113; Enami et al. 1990, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:11563-11567), однако, он был успешно применен к широкому ряду сегментированных и несегментированных РНК-вирусов с негативной цепью, включая вирус бешенства (Schnell et al. 1994, EMBO J. 13:4195-4203); респираторно-синцитиальные вирусы (Collins et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:9663-9667); и вирус Сендай (Park et al. 1991, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:5537-5541; Kato et al., 1996, Genes Cells 1:569-579). Однако этот способ можно еще применить к РНК-геномам вируса ньюкаслской болезни.

#### Краткое описание изобретения

Были описаны матрицы рекомбинантного РНК-вируса ньюкаслской болезни, которые могут быть использованы с РНК-зависимой РНК-полимеразой для экспрессии гетерологичных генных продуктов в соответствующих клетках-хозяевах и/или для спасения гетерологичного гена в вирусных частицах. В одном из вариантов своего осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантным вирусам ньюкаслской болезни, которые индуцируют интерфероновый и связанные с ним пути метаболизма. Настоящее изобретение относится к рекомбинантным вирусам ньюкаслской болезни, содержащим модификации, приводящие к фенотипам, которые делают эти рекомбинантные вирусы более подходящими для использования в вакцинных препаратах, например к аттенюированным фенотипам и фенотипам с повышенной иммуногенностью. В другом варианте своего осуществления настоящее изобретение относится к конструированию рекомбинантных вирусов и вирусных векторов ньюкаслской болезни, которые содержат гетерологичные гены, включая гены других вирусов, патогены, клеточные гены, опухолевые антигены и т.п.

В другом варианте своего осуществления настоящее изобретение относится к конструированию рекомбинантных вирусов и вирусных векторов ньюкаслской болезни для использования их в качестве вакцин. Настоящее изобретение относится к вакцинным препаратам, подходящим для введения человеку, а также для использования в ветеринарии. Вакцины настоящего изобретения могут быть сконструированы для введения домашним животным, включая кошек и собак; диким животным, включая лисиц и енотов; скоту и домашней птице, включая лошадей, крупный рогатый скот, овец, индеек и кур.

В еще одном варианте своего осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантным вирусным векторам ньюкаслской болезни и вирусам, которые были сконструированы так, чтобы они содержали мутантные вирусные гены ньюкаслской болезни или комбинации генов различных штаммов вируса ньюкаслской болезни. РНК-матрицы настоящего изобретения получают путем транскрипции соответствующих ДНК-последовательностей ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Полученные РНК-матрицы имеют отрицательную полярность и содержат соответствующие концевые последовательности, которые дают возможность аппарату синтеза вирусной РНК распознавать эту матрицу. Альтернативно, могут быть также использованы РНК-матрицы с положительной полярностью, содержащие соответствующие концевые последовательности, которые дают возможность аппарату синтеза вирусной РНК распознавать эту матрицу. Экспрессия из РНК-матриц с положительной полярностью может быть достигнута путем трансфекции плазмид, имеющих промоторы, распознаваемые ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Так, например, плазмидная ДНК, кодирующая положительные РНК-матрицы под контролем промотора T7, может быть использована в комбинации с системой вируса коровьей оспы T7.

Бицистронные мРНК могут быть сконструированы для достижения внутренней инициации трансляции вирусных последовательностей и осуществления экспрессии чужеродного белка, кодирующего последовательности от регулярного терминального сайта

инициации или наоборот. Альтернативно, чужеродный белок может быть экспрессирован от внутренней транскрипционной единицы, где данная транскрипционная единица имеет сайт инициации и сайт полиаденилирования. В другом варианте настоящего изобретения чужеродный ген встраивают в ген NDV, так, чтобы полученный экспрессированный белок

5 был слитым белком.

Матрицы рекомбинантной вирусной РНК ньюкаслской болезни настоящего изобретения могут быть использованы для трансфекции трансформированных клеточных линий, которые экспрессируют РНК-зависимую РНК-полимеразу и обеспечивают комплементацию. Альтернативно, плаزمид, экспрессирующаяся с соответствующего промотора, может быть

10 использована для трансфекции вирус-специфической (химерной) РНК. Комплементация может быть также достигнута с использованием вируса-помощника, который имеет РНК-зависимую РНК-полимеразу. Кроме того, для вируса ньюкаслской болезни также описана система вирус-независимой репликации. Минимальной подгруппой белков вируса ньюкаслской болезни, необходимых для специфической репликации и экспрессии вируса,

15 являются три белка, L, P и NP, которые могут быть экспрессированы из плазмид с помощью системы T7 вируса коровьей оспы. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, в случае, когда для получения вирусного генома используются плазмиды, кодирующие антигеномную копию генома NDV, минимальной подгруппой белков вируса ньюкаслской болезни, необходимых для специфической репликации и экспрессии

20 вируса, являются белки L и P. При транскрибировании антигеномной копии NDV первым транскрибируется полимеразный белок NP, а поэтому нет необходимости дополнительно вводить полимеразу NP in trans.

Продукты экспрессии и/или полученные химерные вирионы могут быть преимущественно использованы в вакцинных препаратах. Продукты экспрессии и

25 химерные вирионы настоящего изобретения могут быть сконструированы в целях создания вакцин против патогенов широкого ряда, включая вирусные антигены, опухолевые антигены и аутоантигены, вовлеченные в патогенез аутоиммунных заболеваний. В частности, химерные вирионы настоящего изобретения могут быть сконструированы для создания вакцин против ВИЧ, где иммуногенный полипептид от gp160 и/или от внутренних

30 белков ВИЧ встраивают в белок гликопротеина HN для конструирования вакцины, которая способна продуцировать как гуморальные, так и клеточно-опосредованные ответы у позвоночных. Использование рекомбинантного вируса ньюкаслской болезни в этих целях представляет особый интерес, поскольку вирус ньюкаслской болезни не является патогенным для человека. Кроме того, использование рекомбинантного вируса

35 ньюкаслской болезни для доставки опухолевых антигенов представляет особый интерес еще и тем, что этот вирус, как известно, обладает противоопухолевыми и иммунопотенцирующими свойствами.

Определения

Используемые в настоящем описании термины имеют следующие значения:

40 кРНК=антигеномная РНК

ВИЧ=вирус иммунодефицита человека

L=большой белок

M=матриксный белок (выстилает оболочку изнутри)

MDCK=клетки собачьей почки Madin Darby

45 MDBK=клетки коровьей почки Madin Darby

MЗ=множественность заражения

NA=нейраминидаза (гликопротеин оболочки)

NDV=вирус ньюкаслской болезни

NP=нуклеопротеин (ассоциированный с РНК и необходимый для

50 полимеразной активности)

NS=неструктурный белок (неизвестной функции)

нк=нуклеотид

PA, PB1, PB2=компоненты РНК-зависимой РНК-полимеразы

РНП=рибонуклеопротеин  
 рРНП=рекомбинантный РНП  
 вРНК=геномная вирусная РНК  
 WSN=вирус гриппа A/WSN/33

5 вирус WSN-НК=реассортантный вирус (псевдовирус), содержащий семь генов от вируса WSN и ген NA от вируса гриппа A/НК/8/68

Описание чертежей

10 Фиг.1. Схематическое представление минигена NDV. В верхней части изображена плаزمида PNDVCAT, включающая промотор T7; 5'-концевую последовательность (5'-конец геномной РНК, 191 нк); вставленные нуклеотиды (СТТАА); 667 нуклеотидов ОРС CAT; 3'-концевую последовательность (3'-конец геномной РНК, 121 нк); BbsI-сайт и сайты нуклеазы. В нижней части изображена химерная РНК NDV-CAT, полученная в результате *in vitro*-транскрипции. В результате NDV-амплификации и транскрипции химерного минигена NDV-CAT в трансфицированных клетках обнаруживалась CAT-активность.

15 Фиг.2А-С. Схематическое представление экспрессирующих векторов PTM1.

PTM1-NP кодирует белок NP NDV.

PTM1-P кодирует белок P NDV.

PTM1-L кодирует белок L NDV.

20 Фиг.3. РНК-последовательность 5'- и 3'-некодирующих концевых областей NDV (плюс-смысловых). Последовательности, расположенные у 5'-конца гена CAT, представляют собой 121 нуклеотид 5'-некодирующей концевой области плюс-смыслового генома NDV, содержащего 65 нк лидерной последовательности (жирный шрифт), за которыми расположены 56 нк гена NP UTR. Последовательности, находящиеся со стороны 3'-конца по отношению к гену CAT, представляют собой встроенные нуклеотиды *suuaa* (строчные буквы) и 191 нк некодирующей концевой области плюс-смыслового генома NDV, содержащего 127 нк UTR гена L, за которыми расположены 64 нк трейлерной области (жирный шрифт).

30 Фиг.4А-В. Схематическое представление структуры рекомбинантных клонов NDV. На Фиг.4В представлен инфекционный NDV, экспрессирующий Env и Gag ВИЧ. Верхняя панель: Env и Gag ВИЧ находятся между генами M и L. Нижняя панель: Env и Gag ВИЧ расположены со стороны 3'-конца по отношению к гену NP.

Фиг.5. Схематическое представление 3'- и 5'-концов NDV в виде первичной последовательности Kurilla et al., 1985 *Virology* 145:203-212 (3'-концы) и Yusoff et al., 1987 *Nucleic Acids Research* 15:3961 (5'-концы).

35 Фиг.6. Методы обратной генетики на основе плазмид для NDV-экспрессии чужеродного гена. Клетки инфицировали рекомбинантным вирусом коровьей оспы, экспрессирующим полимеразу T7. Кроме того, клетки трансфицировали 1) плазмидной ДНК, кодирующей белки L, NP и P NDV под транскрипционным контролем промотора T7 (pTM1-L, pTM1-NP и pTM1-P, соответственно) и 2) плазмидной ДНК, кодирующей химерный минигеном NDV-CAT под транскрипционным контролем промотора T7 (pT7-NDV-CAT-RB). Правильный 3'-конец минигена NDV-CAT достигается в результате расщепления, стимулированного последовательностью рибозима (RB). Амплификация и транскрипция химерного минигена NDV-CAT приводит к CAT-активности, обнаруживаемой в трансфицированных клетках. Некодирующие области у 3'- и 5'-концов минигена NDV-CAT показаны черными квадратами.

45 Фиг.7. Сохранение NDV с помощью синтетической ДНК. Клетки инфицировали рекомбинантным вирусом коровьей оспы, экспрессирующим полимеразу T7. Кроме того, клетки трансфицировали 1) плазмидными ДНК, кодирующими белки L, NP и P NDV под транскрипционным контролем промотора T7 (pTM1-L, pTM1-NP и pTM1-P, соответственно) и 2) плазмидной ДНК, кодирующей антигеном NDV под транскрипционным контролем промотора T7 (pT7-NDV±RB). Правильный 3'-конец антигена NDV-CAT получают в результате расщепления, стимулированного последовательностью рибозима (RB). Амплификация и транскрипция антигена NDV приводит к сохранению инфекционных

вирусов NDV. Некодирующие области у 3'- и 5'-концов антигена NDV показаны черными квадратами.

Фиг.8. NDV-экспрессия чужеродного гена, встроенного в виде внутренней транскрипционной единицы в антигене NDV. Клетки инфицировали рекомбинантным вирусом коровьей оспы, экспрессирующим полимеразу T7. Кроме того, клетки трансфицировали 1) плазмидной ДНК, кодирующей белки L, NP и P NDV под транскрипционным контролем промотора T7 (pTM1-L, pTM1-NP и pTM1-P, соответственно) и 2) плазмидной ДНК, кодирующей химерный антиген NDV-CAT под транскрипционным контролем промотора T7 (pT7-NDV-CAT-RB). В химерном антигене NDV-CAT открытая рамка считывания CAT заменяет природную открытую рамку считывания HN антигена дикого типа NDV. Правильный 3'-конец химерного антигена NDV-CAT достигается в результате расщепления, стимулированного последовательностью рибозима (RB). Амплификация и транскрипция химерного антигена NDV-CAT приводит к CAT-активности, обнаруживаемой в трансфицированных клетках. Некодирующие области у 3'- и 5'-концов химерного антигена NDV-CAT показаны черными рамками.

#### 5. Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантно сконструированным вирусам и вирусным векторам ньюкаслской болезни, экспрессирующим гетерологичные гены или мутированные гены вируса ньюкаслской болезни, или к комбинации вирусных генов, происходящих от различных штаммов вируса ньюкаслской болезни. Настоящее изобретение относится к конструированию и использованию матриц рекомбинантных РНК вируса NDV с негативной цепью, которые могут быть использованы с РНК-зависимой РНК-полимеразой для экспрессии гетерологичных генных продуктов в соответствующих клетках-хозяевах и/или для спасения гетерологичного гена в вирусных частицах. В одном из конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения гетерологичным генным продуктом является пептид или белок, происходящий из генома вируса иммунодефицита человека. РНК-матрицы настоящего изобретения могут быть получены либо *in vitro*, либо *in vivo* посредством транскрипции ДНК-последовательностей с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы, такой как полимеразы бактериофагов T7, T3, SP6 или эукариотическая полимеразы, такая как полимеразы I.

Рекомбинантные РНК-матрицы могут быть использованы для трансфекции стабильных/трансфицированных клеточных линий, которые экспрессируют белки, РНК-зависимые РНК-полимеразы, обеспечивая комплементацию, как показано в рабочих примерах, где РНК-транскрипты клонированной ДНК, содержащие кодирующую область, в антисмысловой ориентации, гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT), фланкированного 5'-концевыми и 3'-концевыми нуклеотидами РНК NDV-CL (штамма Калифорния/11914/1944-подобного штамма) (Meindl et al., 1974 *Virology* 58:457-463), были трансфицированы в клетки, экспрессирующие полимеразные белки NDV. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения для регенерации химерной NDV используют вирус-независимую систему репликации, в которой плазмидная ДНК, кодирующая геном или антигеном NDV, ко-экспрессируется с плазмидной ДНК, кодирующей минимальную подгруппу белков вируса ньюкаслской болезни для специфической репликации и экспрессии вируса, как было продемонстрировано в рабочем примере, описанном ниже.

Способность NDV к восстановлению *in vivo* позволяет сконструировать новые химерные вирусы NDV, которые экспрессируют чужеродные гены или которые экспрессируют мутантные гены NDV. Способность NDV к восстановлению *in vivo* также позволяет сконструировать новые химерные вирусы NDV, которые экспрессируют гены от различных штаммов NDV. Один из способов достижения этой цели заключается в модификации существующих генов NDV. Так, например, ген HN может быть модифицирован так, чтобы он содержал чужеродные последовательности в своих внешних доменах. Если эта гетерологичная последовательность имеет эпитопы или антигены патогенов, то эти химерные вирусы могут быть использованы для индуцирования протективного иммунного

ответа против этого патологического агента, от которого произошли эти детерминанты.

В соответствии с настоящим изобретением конструируют химерную РНК, в которой кодирующую последовательность, происходящую от кодирующей области gp160 вируса иммунодефицита человека, встраивают в кодирующую последовательность NDV, и в результате трансфекции этого химерного РНК-сегмента в клетке-хозяине, инфицированной вирусом NDV дикого типа, продуцируется химерный вирус. Кроме того, такой химерный вирус должен обладать способностью вырабатывать гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ у позвоночных. Настоящее изобретение также относится к индуцированию интерферонового и связанного с ним пути метаболизма рекомбинантными или химерными вирусами NDV.

Настоящее изобретение относится к использованию вирусных векторов и химерных вирусов данного изобретения для получения вакцин против вирусов и/или антигенов широкого ряда, включая опухолевые антигены. Вирусные векторы и химерные вирусы настоящего изобретения могут быть использованы для модуляции иммунной системы у субъекта путем стимуляции гуморального иммунного ответа, клеточного иммунного ответа или путем стимуляции толерантности к антигену. Используемый здесь термин "субъект" означает человек, приматы, лошади, коровы, овцы, свиньи, козы, собаки, кошки, птицы и грызуны. В случае доставки опухолевых антигенов настоящее изобретение может быть использовано для лечения субъектов с заболеваниями, склонными к иммуно-опосредованному отторжению, такими как несолидные опухоли или солидные опухоли небольшого размера. При этом, также считается, что описанная здесь доставка опухолевых антигенов вирусными векторами и химерными вирусами может быть использована для лечения после удаления солидных опухолей большого размера. Настоящее изобретение может быть также использовано для лечения субъектов с подозрением на злокачественную опухоль.

В целях неограничивающего описания настоящего изобретения оно может быть разделено на следующие стадии: (а) конструирование рекомбинантных РНК-матриц; (b) экспрессия гетерологичных генных продуктов с использованием рекомбинантных РНК-матриц; и (с) сохранение гетерологичного гена в рекомбинантных вирусных частицах. Для лучшего понимания предмета обсуждения настоящее изобретение описано в рабочих примерах с использованием NDV-CL (штамма Калифорния/11914/1944-подобного штамма), однако может быть использован и любой другой штамм NDV.

#### 5.1. Конструирование рекомбинантных РНК-матриц

Конкретный вариант осуществления настоящего изобретения заключается в идентификации заявителями правильной нуклеотидной последовательности 5'- и 3'-концов антисмысловых геномов РНК NDV. Нуклеотидная последовательность 5'- и 3'-концов антисмысловых геномов РНК NDV настоящего изобретения значительно отличается от ранее описанной последовательности 3'-конца NDV, показанной на Фиг.5. Идентификация правильной нуклеотидной последовательности 5'- и 3'-концов NDV позволила сначала сконструировать рекомбинантные NDV-РНК-матрицы с последующей экспрессией рекомбинантных РНК-матриц и сохранением рекомбинантных NDV-частиц. Настоящее изобретение охватывает не только 5'- и 3'-концы, имеющие нуклеотидную последовательность, показанную на Фиг.5, но оно также охватывает любые модификации или мутации, вносимые в эти концы или любые его фрагменты, которые еще сохраняют функцию концов вируса дикого типа, т.е. сигналы, необходимые для аппарата синтеза вирусной РНК для распознавания этой матрицы.

Последовательности, кодирующие гетерологичные гены и фланкированные комплементарной последовательностью сайта связывания с вирусной полимеразой/промотора, например последовательностью, комплементарной обоим 5'- и 3'-концам вируса NDV, могут быть сконструированы известными методами. Полученные РНК-матрицы могут обе иметь негативную полярность и содержать соответствующие концевые последовательности, способные синтезировать вирусный аппарат РНК для распознавания матрицы. Альтернативно, могут быть также использованы РНК-матрицы с позитивной

полярностью, содержащие соответствующие концевые последовательности, способные синтезировать вирусный аппарат РНК для распознавания матрицы. Рекомбинантные ДНК-молекулы, содержащие гибридные последовательности, могут быть клонированы и транскрибированы ДНК-зависимой РНК-полимеразой, такой как полимеразы бактериофагов 5 Т7, Т3, SP6 или эукариотическая полимеразы, такая как полимеразы I и т.п., для продуцирования *in vitro* или *in vivo* рекомбинантных РНК-матриц, которые имеют соответствующие вирусные последовательности, способствующие распознаванию вирусной полимеразой и ее активности.

В другом варианте настоящего изобретения в химерном вирусе настоящего изобретения 10 может быть сконструирована фактически любая гетерологичная последовательность, включая, но не ограничиваясь ими, антигены, такие как 1) антигены, которые характеризуют патоген; 2) антигены, которые характеризуют аутоиммунное заболевание; 3) антигены, которые характеризуют аллерген; и 4) антигены, которые характеризуют опухоль. Так, например, последовательностями гетерологичных генов, которые могут быть 15 сконструированы в химерных вирусах настоящего изобретения, являются, но не ограничиваются ими, эпитопы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такие как gp160; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg); гликопротеины вируса герпеса (например, gD, gE); VP1 полиовируса; и антигенные детерминанты невирусных патогенов, таких как бактерии и паразиты и др.

20 Антигены, которые характеризуют аутоиммунное заболевание, обычно происходят из клеточной поверхности, цитоплазмы, ядра, митохондрий и подобных элементов тканей человека, включая антигены, характерные для сахарного диабета, рассеянного склероза, системной красной волчанки, ревматоидного артрита, пернициозной анемии, болезни Аддисона, склеродермии, аутоиммунного атрофического гастрита, юношеского диабета и 25 дискоидной красной волчанки.

Антигены, которые являются аллергенами, обычно представляют собой белки или гликопротеины, включая антигены, происходящие из пыльцы, пыли, плесени, спор, перхоти, насекомых и пищи.

Антигены, которые характеризуют опухолевые антигены, обычно происходят от 30 клеточной поверхности, цитоплазмы, ядра, органелл и подобных элементов клеток опухолевой ткани. В качестве примеров могут служить антигены, характеризующие опухолевые белки, включая белки, кодированные мутированными онкогенами; вирусные белки, ассоциированные с опухолями; и гликопротеины. Опухоли включают, но не ограничиваются, злокачественные опухоли разных типов; злокачественных опухолей губы, 35 носоглотки, глотки и ротовой полости, пищевода, желудка, толстой кишки, прямой кишки, печени, желчного пузыря, поджелудочной железы, гортани, легких и бронхов; меланомы кожи, злокачественных опухолей молочной железы, шейки матки, матки, яичника, мочевого пузыря, почек, головного мозга и другие отделы нервной системы, щитовидной железы, предстательной железы и яичек; лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, 40 множественной миеломы и лейкоза.

В одном из вариантов осуществления изобретения гетерологичные последовательности происходят от генома вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), предпочтительно вируса иммунодефицита человека-1 или вируса иммунодефицита человека-2. В другом 45 предпочтительном варианте осуществления изобретения гетерологичные кодирующие последовательности могут быть встроены в кодирующую последовательность гена NDV, так, чтобы экспрессировался продукт химерного гена, который содержит гетерологичную пептидную последовательность в вирусном белке NDV. В этом варианте осуществления изобретения гетерологичные последовательности могут также происходить от генома вируса иммунодефицита человека, предпочтительно вируса иммунодефицита человека-1 50 или вируса иммунодефицита человека-2.

В случае, если указанные гетерологичные последовательности происходят от ВИЧ, то такими последовательностями могут быть, но не ограничиваются ими, последовательности, происходящие от гена *env* (то есть, последовательности, кодирующие

все или часть gp160, gp120 и/или gp41), гена pol (то есть, последовательности, кодирующие все или некоторые из ферментов, таких как обратная транскриптаза, эндонуклеаза, протеаза и/или интегразы), гена gag (то есть, последовательности, кодирующие все или часть p7, p6, p55, p17/18, p24/25), tat, rev, nef, vif, vpr, vpr и/или vpx.

5 В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения гетерологичными генными последовательностями, которые могут быть сконструированы в химерных вирусах, являются последовательности, кодирующие белки с иммунопотенцирующей активностью. Примерами иммунопотенцирующих белков являются, но не ограничиваются ими, цитокины, интерферон типа 1, гамма-интерферон, колониестимулирующие факторы, интерлейкин-1, -2, -4, -5, -6, -12.

Одним из методов конструирования этих гибридных молекул является встраивание гетерологичной кодирующей последовательности в ДНК-комплемент гена NDV так, чтобы эта гетерологичная последовательность была фланкирована вирусными последовательностями, необходимыми для вирусной полимеразной активности; т.е. сайтом связывания с вирусной полимеразой/промотором, далее называемым сайтом связывания с вирусной полимеразой, и сайтом полиаденилирования. В предпочтительном варианте осуществления изобретения гетерологичная кодирующая последовательность фланкируется вирусными последовательностями, которые включают промоторы репликации у 5'- и 3'-концов, последовательности начала и конца гена и сигналы упаковки, которые находятся у 5'- и/или у 3'-конца. В альтернативном методе для конструирования гибридной молекулы, олигонуклеотиды, кодирующие сайт связывания с вирусной полимеразой, т.е. комплемент 3'-конца или обоих концов вирусных геномных сегментов, могут быть лигированы с гетерологичной кодирующей последовательностью. Встраивание чужеродного гена или сегмента чужеродного гена в нужной последовательности некогда определялось присутствием соответствующих сайтов рестрикции в данной последовательности. Однако последние достижения в молекулярной биологии, в основном, решили эту проблему. Рестрикторные сайты могут быть легко введены в любой участок последовательности-мишени с использованием сайт-направленного мутагенеза (см. например, методы, описанные Kunkel, 1985, Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 82; 488). Варианты методов с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), описанные ниже, также позволяют осуществлять специфическую инсерцию последовательностей (т.е. сайтов рестрикции) и способствуют облегчению конструирования гибридных молекул. Альтернативно, ПЦР-реакции могут быть использованы для получения рекомбинантных матриц без клонирования. Так, например, ПЦР-реакции могут быть использованы для получения двухцепочечных ДНК-молекул, содержащих промотор ДНК-зависимой РНК-полимеразы (например, бактериофага T3, T7 или SP6) и гибридную последовательность, содержащую гетерологичный ген и сайт связывания с полимеразой NDV. Затем РНК-матрицы могут быть транскрибированы непосредственно из этой рекомбинантной ДНК. Еще в одном варианте осуществления изобретения рекомбинантные РНК-матрицы могут быть получены путем лигирования РНК, определяющей отрицательную полярность гетерологичного гена, с сайтом связывания вирусной полимеразы путем использования РНК-лигазы. Требования к последовательности для вирусной полимеразной активности и конструкции, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, описаны в нижеприведенных подразделах.

45 5.1.1. Встраивание гетерологичной генной последовательности в гены HN, P, NP, M, F, L  
Генные сегменты, кодирующие белки HN, P, NP, M, F или L, могут быть использованы для встраивания гетерологичных генных продуктов. Встраивание чужеродной генной последовательности в любой из этих сегментов может быть осуществлено либо путем полной замены вирусной кодирующей области на чужеродный ген, либо путем частичной замены. Полная замена, вероятно, может быть лучше всего осуществлена с использованием ПЦР-направленного мутагенеза. Для этого ПЦР-праймер А должен содержать от 5'- до 3'-конца: уникальный рестрикторный сайт, такой как рестрикторный сайт класса IIS (т.е. фермент "переключатель", который распознает

специфическую последовательность, но при этом расщепляет ДНК либо выше, либо ниже от этой последовательности); фрагмент нуклеотидов, комплементарный области NDV-гена; и фрагмент нуклеотидов, комплементарный карбоксиконцевой кодирующей части чужеродного генного продукта. ПЦР-праймер В должен содержать от 5' до 3'-конца: уникальный сайт рестриктирующего фермента; фрагмент нуклеотидной последовательности, комплементарной гену NDV; и фрагмент нуклеотидной последовательности, соответствующей 5'-кодирующей области чужеродного гена. После проведения ПЦР-реакции с использованием этих праймеров с клонированной копией чужеродного гена данный продукт может быть вырезан и клонирован с использованием уникальных рестрикционных сайтов. Гидролиз ферментом класса IIS и транскрипция очищенной фаговой полимеразой приводит к генерированию РНК-молекулы, содержащей точные нетранслированные концы гена NDV со вставкой чужеродного гена. В альтернативном варианте осуществления изобретения ПЦР-праймированные реакции могут быть использованы для получения двухцепочечной ДНК, содержащей промоторную последовательность бактериофага и гибридную генную последовательность, так, чтобы РНК-матрицы могли транскрибироваться непосредственно без клонирования.

#### 5.1.2. Встраивание гетерологичной генной последовательности в гены HN

Гемаагглютининовая и нейраминидазная активности NDV кодируются одним геном, HN. Белок HN является большим поверхностным гликопротеином этого вируса. Для ряда вирусов, таких как вирус гриппа, белки гемаагглютинин и нейраминидаза, как было продемонстрировано, содержат ряд антигенных сайтов. Следовательно, этот белок представляет собой потенциальную мишень для выработки гуморального иммунного ответа после инфицирования. Поэтому замена антигенных сайтов в HN на часть чужеродного белка может приводить к интенсивному гуморальному ответу против этого чужеродного пептида. Если последовательность встраивают в молекулу HN и она экспрессируется на внешней поверхности HN, то она становится иммуногенной. Так, например, пептид, происходящий от др160 ВИЧ, может заменять антигенный сайт белка HN, что приводит к выработке гуморального иммунного ответа. В другом способе чужеродная пептидная последовательность может быть встроена в антигенный сайт без делеции каких-либо вирусных последовательностей. Продукты экспрессии таких конструкций могут быть использованы в вакцинах против чужеродного антигена, что может реально решить обсуждаемую ранее проблему, связанную с размножением рекомбинантного вируса в вакцинированном хозяине. Интактная молекула HN с заменой только в антигенных сайтах может обеспечивать функцию HN, и тем самым позволяет конструировать жизнеспособный вирус. Поэтому этот вирус можно выращивать без каких-либо дополнительных хелперных функций. Во избежание опасности случайного ускользания этого вируса от "иммунологического надзора" этот вирус может быть также аттенуирован другими путями.

Для экспрессии белков на клеточной поверхности или для их высвобождения из клетки могут быть созданы другие гибридные конструкции. В качестве поверхностного гликопротеина HN имеет аминоконцевую отщепляемую сигнальную последовательность, необходимую для транспорта на поверхность клетки, и карбоксиконцевую последовательность, необходимую для мембранного закрепления. Для экспрессии интактного чужеродного белка на поверхности клетки может оказаться необходимым использовать эти HN-сигналы для создания гибридного белка. В этом случае гибридный белок может экспрессироваться как отдельный гибридный белок из дополнительного внутреннего промотора. Альтернативно, если сигналы транспорта присутствуют, а домен мембранного закрепления отсутствует, то этот белок может секретироваться из клетки.

#### 5.1.3. Конструирование бицистронной РНК и экспрессия гетерологичного белка

Бицистронная мРНК может быть сконструирована для внутренней инициации трансляции вирусных последовательностей и для экспрессии последовательностей, кодирующих чужеродный белок, от регулярного терминального сайта инициации. Альтернативно, может быть сконструирована бицистронная мРНК-последовательность, где

данная вирусная последовательность транслируется с регулярной терминальной открытой рамки считывания, а чужеродная последовательность иницируется с внутреннего сайта. Могут быть использованы некоторые последовательности внутреннего сайта связывания с рибосомой (IRES). Выбранные последовательности IRES должны быть достаточно короткими для того, чтобы они не препятствовали ограничению упаковки вируса ньюкаслской болезни. Таким образом, предпочтительно, чтобы длины IRES, выбранных для этого бицистронного подхода, составляли не более чем 500 нуклеотидов, а предпочтительно менее чем 250 нуклеотидов. Кроме того, предпочтительно, чтобы используемые IRES не имели общей последовательности или структурной гомологии с пикорнавирусными элементами. Предпочтительными элементами IRES являются, но не ограничиваются ими, IRES BiP млекопитающего и IRES вируса гепатита С.

Альтернативно, чужеродный белок может быть экспрессирован от новой внутренней транскрипционной единицы, где данная транскрипционная единица имеет сайт инициации и сайт полиаденилирования. В другом варианте настоящего изобретения чужеродный ген встраивают в ген NDV так, чтобы полученный экспрессированный белок был слитым белком.

### 5.2. Экспрессия продуктов гетерологичных генов с использованием рекомбинантной РНК-матрицы

Рекомбинантные матрицы, полученные как описано выше, могут быть использованы в различных способах для экспрессии продуктов гетерологичных генов в соответствующих клетках-хозяевах или для создания химерных вирусов, которые экспрессируют продукты гетерологичных генов. В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантная матрица может быть использована для трансфекции соответствующих клеток-хозяев, то есть, она может направлять экспрессию продукта гетерологичного гена на высоких уровнях. Системами клеток-хозяев, обеспечивающими высокий уровень экспрессии, являются стабильные клеточные линии, обеспечивающие вирусную инфекцию, такие как NDV-сверхинфицированные клеточные линии; клеточные линии, сконструированные для комплементации функций NDV и т.п.

В альтернативном варианте осуществления изобретения рекомбинантные матрицы могут быть использованы для трансфекции клеточных линий, которые экспрессируют вирусный полимеразный белок для экспрессии продукта гетерологичных генов. Для этой цели трансформированные клеточные линии, которые экспрессируют полимеразный белок, такой как белок L, могут быть использованы в качестве соответствующих клеток-хозяев. Клетки-хозяева могут быть аналогичным образом сконструированы для обеспечения других вирусных функций или дополнительных функций, таких как NP или HN.

В другом варианте осуществления изобретения вирус-помощник может способствовать продуцированию белка РНК-полимеразы клетками для осуществления экспрессии продукта гетерологичных генов.

В еще одном варианте осуществления изобретения клетки могут быть трансфицированы векторами, кодирующими вирусные белки, такие как белки NP, P и L. Примеры таких векторов проиллюстрированы на Фиг.2A-2C.

### 5.3. Получение химерного РНК-вируса с негативной цепью

Для получения химерного вируса, РНК, кДНК или РНК модифицированного вируса NDV, кодирующих геном NDV и/или чужеродные белки в плюс- или минус-смысловой цепи, могут быть использованы для трансфекции клеток, которые продуцируют вирусные белки и функции, необходимые для репликации и спасения вируса, или также являются инфицированным "родительским" вирусом NDV. В альтернативном способе плазмиды, содержащие геномную или антигеномную РНК NDV, дикого типа или модифицированную РНК NDV, могут быть ко-трансфицированы в клетках-хозяевах с плазмидами, кодирующими белки вирусной полимеразы, например, NP, P или L. В другом варианте осуществления изобретения плазмиды содержащие антигеномную РНК NDV могут быть ко-трансфицированы с плазмидами, кодирующими белки вирусной полимеразы P или L, поскольку белок полимеразы NP представляет собой первый белок, транскрибируемый в

антигеномной копии генома NDV, а поэтому нет необходимости дополнительно вводить полимеразу NP in trans.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для конструирования химерного вируса с негативной РНК-цепью может быть использован метод обратной генетики, который заключается в получении синтетических рекомбинантных вирусных РНК, которые содержат некодирующие области минус-цепь-РНК-вируса, которые имеют важное значение для распознавания вирусными полимеразами и для сигналов упаковки, необходимых для генерирования зрелого вириона. Синтетические рекомбинантные плазмидные ДНК и РНК могут быть реплицированы и "спасены" в инфекционных вирусных частицах любыми известными методами, описанными в патенте США №5166057, выданном 24 ноября 1992; в патенте США №5854037, выданном 29 декабря 1998; в публикации Европейского патента EP 0702085 A1, опубликованной 20 февраля 1996; в заявке на патент США рег. №09/152845; в публикациях Международных патентных заявок PCT WO 97/12032, опубликованных 3 апреля 1997; в WO 96/34625, опубликованной 7 ноября 1996; в публикации Европейского патента EP-A 780475; в WO 99/02657, опубликованной 21 января 1999; в WO 98/53078, опубликованной 26 ноября 1998; в WO 98/02530, опубликованной 22 января 1998; в WO 99/15672, опубликованной 1 апреля 1999; в WO 98/13501, опубликованной 2 апреля 1998; в WO 97/06270, опубликованной 20 февраля 1997; и в EPO 78047SA1, опубликованной 25 июня 1997, каждая из которых во всей своей полноте включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Существует ряд различных методов "обратной генетики", которые могут быть использованы для спасения РНК-вирусов с негативной цепью. Сначала рекомбинантные РНК синтезируют из рекомбинантной ДНК-матрицы и восстанавливают *in vitro* с использованием очищенного комплекса вирусной полимеразы с образованием рекомбинантных рибонуклеопротеинов (РНП), которые могут быть использованы для трансфекции клеток. В другом способе более эффективная трансфекция может быть достигнута в том случае, когда белки вирусной полимеразы присутствуют в процессе транскрипции синтетических РНК либо *in vitro*, либо *in vivo*. В этом способе синтетические РНК могут транскрибироваться из кДНК-плазмид, которые либо ко-транскрибируются *in vitro* с кДНК-плазмидами, кодирующими полимеразные белки, либо транскрибируются *in vitro* в присутствии полимеразных белков, то есть в клетках, в которых осуществляется временная или конститутивная экспрессия полимеразных белков.

В альтернативном варианте осуществления изобретения для конструирования аттенюированных вирусов, имеющих нужные эпитопы в сегментированных РНК-вирусах, может быть использована комбинация методов обратной генетики и методов реассортации. Так, например, аттенюированный вирус (генерированный благодаря естественному отбору, мутагенезу или методами обратной генетики) и штамм, несущий нужный вакцинный эпитоп (генерированный благодаря естественному отбору, мутагенезу или методами обратной генетики) могут быть ко-инфицированы в хозяевах, в которых может происходить реассортация сегментированных геномов. Затем могут выбраны реассортанты, которые представляют собой как аттенюированный фенотип, так и нужный эпитоп.

После реассортации могут быть выделены новые вирусы и их геномы могут быть идентифицированы посредством гибридизационного анализа. В других описанных здесь методах для спасения инфекционного химерного вируса продуцирование инфекционного химерного вируса может быть реплицировано в системах клеток-хозяев, которые экспрессируют полимеразный белок вируса NDV (например, в экспрессионных системах вирус/клетка-хозяин; трансформированных клеточных линиях, сконструированных для экспрессии в полимеразном белке, и т.п.). В этом случае необязательно использовать вирус-помощник, поскольку эта функция обеспечивается экспрессированными вирусными полимеразными белками.

В соответствии с настоящим изобретением для репликации и спасения химерных вирусов может быть использован любой известный метод. Один из этих методов предусматривает "поставку" вирусных белков и обеспечение функций, необходимых для

репликации *in vitro*, перед трансфекцией клеток-хозяев. В этом варианте изобретения вирусные белки могут поставляться в форме вируса дикого типа, вируса-помощника, очищенных вирусных белков или рекомбинантно экспрессируемых вирусных белков. Эти вирусные белки могут поставляться до, во время или после транскрипции синтетических кДНК или РНК, кодирующих данный химерный вирус. Эта полная смесь может быть использована для трансфекции клеток-хозяев. В другом методе вирусные белки и функции, необходимые для репликации, могут поставляться до или во время транскрипции синтетических кДНК или РНК, кодирующих данный химерный вирус. В таком варианте настоящего изобретения вирусные белки и функции, необходимые для репликации, обеспечиваются в форме вируса дикого типа, вируса-помощника, вирусных экстрактов, синтетических кДНК или РНК, которые экспрессируют вирусные белки, вводимые в клетку-хозяина путем инфицирования или трансфекции. Это инфицирование/трансфекция происходит перед или одновременно с введением синтетических кДНК или РНК, кодирующих химерный вирус.

В особенно предпочтительном способе клетки, сконструированные для экспрессии всех вирусных генов NDV, могут продуцировать инфекционный химерный вирус, который содержит нужный генотип, что исключает необходимость в выборе системы. Теоретически, можно заменить любой один из шести генов или часть любого одного из шести генов NDV на чужеродную последовательность. Однако необходимой частью этой парадигмы является способность данного дефектного вируса (дефектного из-за отсутствия или изменения нормального продукта вирусного гена) к размножению. Эта проблема может быть решена рядом возможных способов. В одном из этих способов вирус, имеющий мутантный белок, может быть выращен в клеточных линиях, которые конструируют для конститутивной экспрессии того же самого белка, но дикого типа. В соответствии с этим способом клеточная линия комплементирует мутацию в данном вирусе. Аналогичные методы могут быть использованы для конструирования трансформированных клеточных линий, которые конститутивно экспрессируют любой из генов NDV. Эти клеточные линии, которые были созданы для экспрессии вирусного белка, могут быть использованы для комплементации дефекта в рекомбинантном вирусе и тем самым для его размножения. Альтернативно, для размножения рекомбинантного вируса могут быть доступны некоторые системы круга природных хозяев.

В еще одном варианте осуществления изобретения вирусные белки и функции, необходимые для репликации, могут быть доставлены в качестве генетического материала в виде синтетических кДНК или РНК, так, чтобы они ко-транскрибировались с синтетическими кДНК или РНК, кодирующими химерный вирус. В особенно предпочтительном способе плазмиды, экспрессирующие химерный вирус и вирусную полимеразу и/или другие вирусные функции, ко-трансфицируют в клетки-хозяева, как описано в примерах.

Другой способ размножения рекомбинантного вируса может предусматривать совместное культивирование с вирусом дикого типа. Это может быть осуществлено просто путем взятия рекомбинантного вируса и ко-инфицирования клеток этим вирусом и другим вирусом дикого типа (предпочтительно вакцинным штаммом). Этот вирус дикого типа должен комплементировать продукт дефектного вирусного гена и способствовать росту как вируса дикого типа, так и рекомбинантного вируса. Альтернативно, для поддержания размножения рекомбинантного вируса может быть использован вирус-помощник.

В другом способе синтетические матрицы могут быть реплицированы в клетках, ко-инфицированных рекомбинантными вирусами, экспрессирующими полимеразный белок вируса NDV. Действительно, этот метод может быть использован для спасения рекомбинантного инфекционного вируса настоящего изобретения. Для этой цели полимеразный белок NDV может быть экспрессирован в любой экспрессионной системе "вектор/клетка-хозяин", включая, но не ограничиваясь ими, вирусные экспрессирующие векторы (например, вирус коровьей оспы, аденовирус, бакуловирус и т.п.) или клеточные линии, которые экспрессируют полимеразный белок (например, см., Krystal et al., 1986,

Proc.Natl. Acad. Sci., USA, 83:2709-2713). Кроме того, инфицирование клеток-хозяев, экспрессирующих все шесть белков NDV, может приводить к продуцированию инфекционных химерных вирусных частиц. Эта система должна исключить необходимость в выборе системы, поскольку все рекомбинантные вирусы должны иметь нужный генотип.

5 Следует отметить, что можно сконструировать рекомбинантный вирус без изменения жизнеспособности этого вируса. Эти модифицированные вирусы должны быть затем способны к размножению и не требуют функций вируса-помощника для их репликации.

5.4. Вакцинные препараты, полученные с использованием химерных вирусов

Настоящее изобретение относится к вакцинным препаратам, содержащим  
10 сконструированный РНК-вирус с негативной цепью в соответствии с настоящим изобретением. Настоящее изобретение относится к использованию модифицированных рекомбинантных вирусов NDV в вакцинных препаратах для обеспечения L-защиты от NDV-инфекции. В еще одном варианте рекомбинантные вирусы NDV настоящего изобретения могут быть использованы в качестве носителя для экспрессии чужеродных эпитопов,  
15 индуцирующих протективный ответ против любого из различных патогенов.

Настоящее изобретение относится к вакцинным препаратам для введения человеку и животным. В частности, настоящее изобретение относится к вакцинным препаратам, вводимым домашним животным, включая собак и кошек; диким животным, включая лисиц и енотов; скоту, включая крупный рогатый скот, лошадям и свиньям, овцам и козам, и  
20 домашней птице, включая кур и индеек.

Настоящее изобретение относится к вакцинным препаратам, которые могут быть использованы для лечения болезней птиц, вызываемых патогенами, включая NDV, вирус болезни Марека (MDV), вирус инфекционного заболевания слизистой сумки (IBDV), вирус инфекционного бронхита (IBV), вирус инфекционного бурсита, вирус анемии кур (CAV),  
25 вирус инфекционного лагинготрахеита (ILV), вирус птичьего лейкоза (ALV), вирус ретикулоэндотелиоза (RV) и вирус птичьего гриппа.

В другом варианте своего осуществления настоящее изобретение относится к вакцинным препаратам, которые могут быть использованы для лечения болезней домашних животных, вызываемых патогенами, включая вирус бешенства, вирус лейкоза  
30 кошек (FLV) и вирус собачьей чумы. В еще одном варианте своего осуществления настоящее изобретение относится к вакцинным препаратам, которые могут быть использованы для защиты скота от инфекции, вызываемой вирусом везикулярного стоматита, рабивирусом, вирусом чумы крупного рогатого скота, вирусом оспы свиней, и кроме того, для защиты диких животных от инфекции, вызываемой рабивирусом.

35 Атенюированные вирусы, генерированные методами обратной генетики, могут быть использованы в вакцине и в фармацевтических препаратах, описанных в данной заявке. Методы обратной генетики могут быть также использованы для конструирования дополнительных мутаций, вносимых в другие вирусные гены, имеющие важное значение для продуцирование вакцин, то есть в этом аттенюированном вирусе могут быть  
40 сконструированы эпитопы вариантов используемого вакцинного штамма. Альтернативно, в этом аттенюированном штамме могут быть сконструированы абсолютно чужеродные эпитопы, включая антигены, происходящие от других вирусных или невирусных патогенов. Так, например, в этом аттенюированном штамме могут быть сконструированы антигены неродственных вирусов, таких как ВИЧ (gp160, gp120, gp41), паразитарные антигены  
45 (например, малярии), бактериальные или грибковые антигены или опухолевые антигены. Альтернативно, в химерных аттенюированных вирусах настоящего изобретения могут быть сконструированы эпитопы, которые изменяют тропизм вируса *in vivo*.

Фактически, в химерных вирусах настоящего изобретения, используемых в вакцинах, может быть сконструирована любая последовательность гетерологичного гена.  
50 Предпочтительно, чтобы эпитопы, индуцирующие протективный иммунный ответ против любого из ряда патогенов, или антигены, которые связываются с нейтрализующими антителами, могли целиком или частично экспрессироваться химерными вирусами. Так, например, последовательности гетерологичных генов, которые могут быть

сконструированы в химерных вирусах настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются ими, гликопротеины вируса гриппа, а в частности, гемагглютинины H5 и H7, эпитопы вируса болезни Марека, эпитопы вируса инфекционного бурсита (IBDV), вируса инфекционного бронхита (IBV), вируса анемии кур (CAV), вируса инфекционного лагинготрахеита (ILV), вируса птичьего лейкоза (ALV), вируса ретиколоэндотелиоза (RV), вируса птичьего гриппа (AIV), рабивируса, вируса лейкоза кошек, вируса собачьей чумы, вируса везикулярного стоматита, вируса чумы крупного рогатого скота и вируса оспы свиней (см. работу Fields et al. (ed.), 1991, *Fundamental Virology*, Second Edition, Raven Press, New York, которая во всей своей полноте включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения последовательностями гетерологичных генов, которые могут быть сконструированы в химерных вирусах, являются последовательности, кодирующие белки с иммунопотенцирующей активностью. Примерами иммунопотенцирующих белков являются, но не ограничиваются ими, цитокины, интерферон типа 1, гамма-интерферон, колониестимулирующие факторы, интерлейкин -1, -2, -4, -5, -6, -12.

Кроме того, последовательностями гетерологичных генов, которые могут быть сконструированы в химерных вирусах настоящего изобретения для использования в вакцинах, являются, но не ограничиваются ими, последовательности, происходящие от вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), предпочтительно типа 1 или типа 2. В предпочтительном варианте осуществления изобретения в химерном NDV может быть сконструирован иммуногенный ВИЧ-пептид, который может быть источником антигена и который может быть затем использован для выработки иммунного ответа у позвоночных. Такими ВИЧ-пептидами могут быть, но не ограничиваются ими, последовательности, происходящие от гена *env* (то есть последовательности, кодирующие все или часть *gp160*, *gp120* и/или *gp41*), гена *pol* (то есть последовательности, кодирующие все или некоторые из ферментов, таких как обратная транскриптаза, эндонуклеаза, протеаза и/или интегразы), гена *gag* (то есть последовательности, кодирующие все или часть *p7*, *p6*, *p55*, *p17/18*, *p24/25*), *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpr* и/или *vpx*.

Другие гетерологичные последовательности могут происходить от поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg); поверхностных антигенов вируса гепатита А или С; гликопротеинов вируса Эпштейна-Барра; гликопротеинов вируса папилломы человека; гликопротеинов респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа, вируса Сендай, обезьяньего вируса 5 или вируса эпидемического паротита; гликопротеинов вируса гриппа; гликопротеинов вируса герпеса (например, *gD*, *gE*); VP1 полиовирусов; антигенных детерминант невирусных патогенов, таких как бактерии и паразиты, и т.п. В другом варианте осуществления изобретения могут быть экспрессированы все гены иммуноглобулина или их часть. Так, например, в химерных вирусах настоящего изобретения могут быть сконструированы переменные области антиидиотипических иммуноглобулинов, которые имитируют такие эпитопы.

Другие гетерологичные последовательности могут происходить от опухолевых антигенов, и полученные химерные вирусы могут быть использованы для выработки иммунного ответа против опухолевых клеток, приводящего к регрессии опухоли *in vivo*. Эти вакцины могут быть использованы в комбинации с другими терапевтическими схемами, включая, но не ограничиваясь ими, химиотерапию, лучевую терапию, хирургические операции, трансплантацию костного мозга и т.п., применяемыми для лечения опухолей. В соответствии с настоящим изобретением рекомбинантные вирусы могут быть сконструированы для экспрессии опухолеассоциированных антигенов (ТАА), включая, но не ограничиваясь ими, опухолевые антигены человека, распознаваемые Т-клетками (Robbins & Kawakami, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8:628-636; включена в настоящее описание в качестве ссылки), белки линии дифференцировки меланоцитов, включая *gp100*, *MART-1/MelanA*, *TRP-1 (gp75)*, тиразилазу; опухолеспецифические антигены, присутствующие в клетках широкого круга хозяев, *MAGE-1*, *MAGE-3*, *BAGE*, *GAGE-1*,

GAGE-1(?), N-ацетилглюкозаминилтрансферазу-V, p15; опухолеспецифические мутированные антигены,  $\beta$ -катенин, MUM-1, CDK4; немеланомные антигены для карциномы молочной железы, яичника, шейки матки и поджелудочной железы, HER-2/neu, вирус папилломы человека -E6, -E7, MUC-1.

5 Может быть приготовлена либо "живая" вакцина, либо вакцина на основе инактивированного рекомбинантного вируса. Вакцина на основе живого вируса может оказаться предпочтительной из-за его размножения в хозяине, что приводит к пролонгированной стимуляции такого же уровня и величины, которая происходит при естественных инфекциях, а поэтому эта вакцина обеспечивает значительный  
10 пролонгированный иммунитет. Вакцинные препараты на основе живого рекомбинантного вируса могут быть получены стандартными методами, предусматривающими размножение данного вируса в клеточной культуре или в аллантаоиде куриного эмбриона с его последующей очисткой. Кроме того, было продемонстрировано, что NDV является непатогенным для человека, и этот вирус является особенно подходящим для  
15 изготовления "живой" вакцины.

В связи с этим, при использовании генетически сконструированных NDV (векторов) для изготовления вакцин может оказаться желательным присутствие в этих штаммах признаков аттенуации. Введение соответствующих мутаций (например, делеций) в матрицы, используемые для трансфекции, могут привести к получению новых вирусов с признаками  
20 аттенуации. Так, например, специфические миссенс-мутации, которые ассоциируются с температурочувствительностью или адаптацией к низким температурам, могут приводить к делеционным мутациям. Эти мутации должны быть более стабильными, чем точковые мутации, ассоциированные с холодоустойчивыми и температурочувствительными мутантами, и частота их реверсии должна быть крайне низкой.

25 Альтернативно, могут быть сконструированы химерные вирусы с "суицидными" признаками. Такие вирусы должны проходить лишь один или несколько циклов репликации в данном хозяине. При использовании в качестве вакцины рекомбинантный вирус должен подвергаться ограниченному числу циклов репликации и индуцировать достаточный уровень иммунного ответа, но он не должен проникать в клетку хозяина-человека и  
30 вызывать заболевание. Рекомбинантные вирусы, у которых отсутствует один или несколько генов NDV, или в которых присутствуют мутированные гены NDV, не должны быть способными подвергаться последовательным циклам репликации. Дефектные вирусы могут быть продуцированы в клеточных линиях, которые перманентно экспрессируют такой(ие) ген(ы). Вирусы, у которых отсутствуют главные гены, будут реплицироваться в  
35 этих клеточных линиях, но при введении человеку-хозяину они будут неспособны завершать цикл репликации. При таком абортивном цикле эти препараты могут транскрибировать и транслировать определенное число генов, достаточное для индуцирования иммунного ответа. Альтернативно, может быть введено еще большее количество штаммов, так, чтобы эти препараты служили в качестве инактивированных  
40 ("убитых") вирусных вакцин. Для инактивированных вакцин предпочтительно, чтобы продукт гетерологического гена экспрессировался как вирусный компонент, так, чтобы данный генный продукт ассоциировался с вирионом. Преимущество таких препаратов заключается в том, что они содержат нативные белки и не подвергаются инактивации при  
45 обработке формалином или другими агентами, используемыми при изготовлении вакцин на основе "убитого" вируса. Альтернативно, мутированный NDV, полученный из кДНК, может быть сделан в высокой степени аттенуированным, так, чтобы он имел лишь несколько циклов репликации.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения инактивированные  
50 вакцинные препараты могут быть изготовлены стандартными методами с использованием "убитых" химерных вирусов. Инактивированные вакцины считаются "убитыми" в том смысле, что они имеют нарушенную инфекционность. В идеальном случае, инфекционность вируса нарушается без воздействия на его иммуногенность. Для изготовления инактивированных вакцин химерный вирус может быть выращен в клеточной

культуре или в аллантаоиде куриного эмбриона, очищен зональным ультрацентрифугированием, инактивирован формальдегидом или  $\beta$ -пропиолактоном и собран в пул. Полученную вакцину обычно инокулируют внутримышечно.

5 Для усиления иммунного ответа инактивированные вирусы могут быть изготовлены с использованием подходящего адъюванта. Такими адъювантами могут быть, но не ограничиваются ими, минеральные гели, например гидроксид алюминия; поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы Плурионки, полианионы; пептиды; масляные эмульсии; и адъюванты, потенциально приемлемые для введения человеку, такие как BCG и *Corynebacterium parvum*.

10 Вышеописанные вакцинные препараты могут быть введены множеством способов, включая, но не ограничиваясь ими, пероральное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, подкожное и интраназальное введение. Может оказаться предпочтительным, чтобы данный вакцинный препарат на основе химерного вируса был введен естественным путем, по которому обычно происходит заражение патогеном, для  
15 которого была разработана данная вакцина.

6. Пример: экспрессия и упаковка чужеродного гена с использованием рекомбинантного NDV

20 Описана экспрессия гена хлорамфеникол-трансферазы (CAT) с использованием минигенома NDV. Минигеном NDV получали с использованием рNDVCAT, рекомбинантной плазмиды, содержащей ген CAT. Плаزمида рNDVCAT представляет собой плазмиду рUC19, содержащую в следующем порядке: промотор T7; 5'-конец геномной РНК NDV, содержащей 191 нуклеотид некодирующей РНК-последовательности NDV; 5 вставленных нуклеотидов (3'CTTAA); полную кодирующую последовательность гена хлорамфеникол-трансферазы (CAT) в обратном и комплементирующем порядке; 3'-конец геномной РНК-последовательности NDV, содержащей 121 нуклеотид некодирующей РНК-последовательности NDV; BbsI-сайт клонирования и несколько рестрикционных сайтов, позволяющих осуществлять транскрипцию матрицы. рNDVCAT может быть  
25 транскрибирована с использованием полимеразы T7 для создания РНК с фланкирующими ее смысловыми последовательностями вируса ньюкаслской болезни вокруг гена CAT в  
30 обратной ориентации.

Длина РНК парамиксовируса может быть главным фактором, определяющим уровень репликации РНК, причем репликация генома осуществляется наиболее эффективно в том случае, если полный ряд нуклеотидов является кратным 6. Для NDV, тот факт, играет ли  
35 это правило шести важную роль для репликации, был оценен путем генерирования минирепликонов CAT различных длин, отличающихся 1-5 нуклеотидами. Способностью индуцировать высокую CAT-активность обладала только одна конструкция, геном которой делится на шесть.

6.1. Конструирование минигенома вируса ньюкаслской болезни

40 Для конструирования минигенома NDV, описанного выше, была использована следующая стратегия. 5'-концевая последовательность геномной РНК NDV была получена с помощью RACE (Gibco, BRL) стандартными методами. В качестве матрицы для RACE-реакции служила геномная РНК, выделенная из вирионов NDV (NDV-CL: штамма Калифорния/11914/1944-подобного). Как показано на Фиг.3, эта концевая последовательность содержала 64 нуклеотида трейлерной последовательности плюс 127  
45 нуклеотидов нетранслируемой области гена L. Непосредственно возле последовательности вируса из 191 нуклеотида была встроена последовательность из 5 нуклеотидов (3'CTTAA). Ген CAT содержал 667 нуклеотидов открытой рамки считывания CAT, которая была расположена между вирусными 5'- и 3'-концевыми некодирующими областями. Для получения 3'-концевой области последовательности NDV была  
50 использована ОТ-ПЦР. Матрица для ОТ-ПЦР-реакции представляла собой *in vitro* полиаденилированную геномную РНК NDV. Как показано на Фиг.3, 3'-концевая область из 121 нуклеотида состояла из 56 нуклеотидов не транслируемой области гена NP и из 65 нуклеотидов лидерной последовательности. Полученная конструкция минигенома NDV

показана на Фиг.1. Нуклеотидные последовательности 3'- и 5'-некодирующей концевой области показаны на Фиг.3.

#### 6.2. Конструирование плазмид, экспрессирующих NP, P & L NDV

Как описано в разделе 5, транскрипция или репликация РНК-генома с негативной цепью 5 требует участия некоторых вводимых вирусом белковых компонентов, включая белок L, белок P и белок NP. Для облегчения экспрессии из минигенома NDV гены, кодирующие каждый из белков L, P и NP, клонировали в экспрессирующие векторы рТМ1, проиллюстрированные на Фиг.2А-С. Экспрессирующие векторы рТМ1 содержат промотор Т7, несколько сайтов клонирования для инсерции нужного гена (L, P или NP), терминатор Т7, сайт инициации репликации рUC19 и ген резистентности к ампициллину. Для конструирования экспрессионных плазмид полноразмерную ДНК нуклеопротеина (NP), фосфопротеина (P) и полимеразы (L) NDV получали путем амплификации с помощью ОТ-ПЦР. Эти ДНК клонировали в вектор, экспрессирующий полимеразу Т7 рТМ1, соответственно (Фиг.2А-С).

#### 15 6.3. РНК-транскрипция минигенома NDV

Транскрипцию РНК из плазмиды, содержащей минигеном NDV, осуществляли с помощью набора Ribomax kit (Promega), как описано в соответствующих руководствах. Для проведения транскрипции 1 мкг плазмиды, содержащей минигеном NDV (рNDVCAT), расщепляли ферментом BstI. Затем линейаризованную плазмиду использовали в качестве матрицы для реакции транскрипции (2 часа, 37°C). Для удаления ДНК-матрицы полученную 20 реакционную смесь обрабатывали ДНКазой без РНКазы (15 мин при 37°C) и очищали путем экстракции фенолом-хлороформом с последующим осаждением этанолом.

#### 6.4. Трансфекции клеток

Клетки Cos-1 или клетки 293Т культивировали на 35 мм-чашках и инфицировали вирусом-помощником rVV Т7 при множественности заражения (МЗ) приблизительно в течение 1 часа, а затем проводили трансфекцию. Затем клетки трансфицировали экспрессирующими векторами, кодирующими белки NP, P и L NDV. В частности, трансфекции осуществляли с использованием DOTAP (Boehringer Mannheim). После инфицирования вирусом-помощником клетки трансфицировали рТМ1-NP (1 мкг), рТМ1-P (1 мкг) и рТМ1-L (0,1 мкг) в течение 4 часов. Контрольные трансфекции без L-белка осуществляли на параллельной серии клеток с использованием рТМ1-NP (1 мкг), рТМ1-P (1 мкг) и модели рТМ1-L (0 мкг). После 4-часового инкубирования клетки подвергали РНК-трансфекции с использованием 0,5 мкг химерной NDV-CAT(-)-РНК (см. Фиг.1). После РНК-трансфекции клетки оставляли для инкубирования на 18 часов. Затем клеточные лизаты собирали для проведения САТ-анализа. 35

#### 6.5. САТ-анализы

САТ-анализы проводили в соответствии со стандартными процедурами, которые представляли собой адаптированные процедуры Gorman et al., 1982, Mol.Cell.Biol.2:1044-1051. Эти анализы основаны на использовании 10 мкл <sup>14</sup>С-хлорамфеникола (0,5 мКи; 8,3 нМ; NEN), 20 мкл 40 мМ ацетил-СоА (Boehringer) и 50 мкл клеточных экстрактов в 0,25 М Трис-буфере (рН 7,5). Время инкубирования составляло 16-18 часов. 40

#### 6.6. Результаты

В каждой клеточной линии, трансфицированной векторами, экспрессирующими NP, P, L и химерной NDV-CAT-РНК, высокие уровни экспрессии САТ были получены через 18 часов после инфицирования. Кроме того, контрольные трансфицированные клетки, не содержащие L-белка, не экспрессировали САТ. 45

### 7. Сохранение инфекционных NDV-вирусов с использованием РНК, происходящей от специфической рекомбинантной ДНК

Эксперименты, описанные в подразделах, приведенных ниже, продемонстрировали сохранение инфекционного NDV с использованием РНК, происходящей от специфических рекомбинантных ДНК. РНК, соответствующие химерной NDV-CAT-РНК, могут быть использованы для иллюстрации того, что 191 нуклеотид 5'-концевого и 121 нуклеотид 3'-концевого нуклеотидов вирусной РНК содержат все сигналы, необходимые для 50

транскрипции, репликации и упаковки смоделированных РНК NDV. РНК, содержащие все транскрипционные единицы геномов NDV, могут экспрессироваться из трансфицированных плазмид. Таким образом, эта технология позволяет конструировать инфекционные вирусы NDV с использованием клонов кДНК и сайт-специфического мутагенеза их геномов. Кроме того, эта технология может позволять конструировать инфекционные химерные NDV-вирусы, которые могут быть использованы в качестве эффективных векторов для экспрессии генов в тканевой культуре, у животных или у человека.

8. Пример: Рекомбинантный вирус ньюкаслской болезни, содержащий эпитоп gp160 антигена ВИЧ, встроенный в геном NDV

В описанном здесь примере конструируют химерный NDV для экспрессии гетерологичного антигена, происходящего от gp160 ВИЧ. Эксперименты, описанные в подразделах, приведенных ниже, продемонстрировали использование рекомбинантной матрицы РНК для генерирования химерного NDV, который экспрессирует пептид, происходящий от gp160 ВИЧ в геноме NDV, а затем использование этого химерного NDV для выработки гуморального и клеточно-опосредованного иммунного ответа у позвоночных.

#### 8.1. Конструирование плазмиды

Рекомбинантные клоны кДНК NDV, экспрессирующие белки gp160 ВИЧ, могут быть сконструированы различными известными способами. Так, например, как показано на Фиг.4, белки Env и Gag ВИЧ могут быть встроены в NDV в ряде положений. В одном из примеров белки Env и Gag встраивают между генами M и L. В другом примере белки Env и Gag встраивают у 3'-конца по отношению к гену NP (между лидерной последовательностью и NP). Альтернативно, эти ВИЧ-белки могут быть встроены между белками оболочки NDV (HN и F) у 3'-конца. Эти белки могут быть также встроены в любой из генов NDV или между ними.

#### 8.2. Генерирование инфекционного химерного вируса

Трансфекция РНК, происходящей от плазмиды, содержащей рекомбинантный геном NDV, может быть проведена в клетках, таких как COS, 293 MDBK, а отбор инфекционного химерного вируса может быть проведен, как описано ранее. См. патент США №5166057, который во всей своей полноте включена в настоящее описание в качестве ссылки. Полученная РНК может быть трансфицирована в клетки, инфицированные вирусом дикого типа, с использованием стандартных процедур трансфекции. После трансфекции супернатант может быть собран и использован в различных разведениях для инфицирования свежих клеток в присутствии антисыворотки против NDV. Этот супернатант может быть также использован для проведения анализа на образование бляшек в присутствии той же самой антисыворотки. Затем этот "спасенный" вирус может быть очищен, охарактеризован и использован, например, для продуцирования антител.

#### 8.3. Ингибирование гемагглютинации и анализы на нейтрализацию вируса

Анализ на ингибирование гемагглютинации (ИГ) осуществляли, как описано ранее (Palmer, D.F. et al, 1975, Immunol. Ser.6:51-52). Моноклональные антитела (2G9, 4B2, 2F10, 25-5) получали стандартными методами с использованием моноклонального антитела против gp120 человека. Асцитическую жидкость, содержащую моноклональные антитела, обрабатывали рецептор-разрушающим ферментом, описанным ранее (Palmer, D.F. et al, 1975, Immunol. Ser. 6:51-52).

Для анализа на нейтрализацию вируса клетки в чашках диаметром 30 мм инфицировали вирусом. После адсорбции в течение 1 часа добавляли агаровый слой, содержащий антитело в различных разведениях. Через 72 часа после инфицирования монослой клеток окрашивали 0,1%-ным кристаллическим фиолетовым.

#### 8.4. Иммунизация

6-Недельных мышей BALB/C инфицировали либо путем аэрозольного введения вируса, либо иммунизировали внутрибрюшинно (i.p.) 10 мкг очищенного вируса. Для всех бустер-иммунизаций внутрибрюшинно вводили 10 мкг очищенного вируса. Сыворотку собирали

через 7 дней после каждой иммунизации.

#### 8.5. Радиоиммуноанализ

Радиоиммуноанализ проводили, как описано ранее (Zaghouani H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5645-6549). Для этого микротитровальные планшеты сенсibilизировали 5 мкг/мл конъюгата "пептид-BSA", насыщенного 2% BSA в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), и инкубировали с различными разведениями сыворотки. Связанные антитела обнаруживали с использованием  $^{125}\text{I}$ -меченной каппа-цепи антимышиного моноклонального антитела.

#### 8.6. Радиоиммунопреципитация

Т-клеточную линию H9 человека подвергали острому заражению вирусом ВИЧ. Через четыре дня после инфицирования  $5 \times 10^7$  инфицированных клеток метили  $^{35}\text{S}$ -цистеином,  $^{35}\text{S}$ -метионином и  $^3\text{H}$ -изолейцином при  $2 \times 10^6$ /мл в среде, содержащей 100 мкКи каждого изотопа на один мл. Через 20 часов после метаболического мечения радиоактивные вирионы осаждали путем центрифугирования в течение 1 часа при 45000 об/мин. Затем осадок ресуспендировали в 1,0 мл буфера для лизиса, содержащего 1% Тритон X-100 и 2 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF). Приблизительно 20 мкл сыворотки или 0,5 мкг моноклонального антитела (в 20 мкл PBS) и 175 мкл лизата вириона инкубировали в течение ночи при 4°C в 0,5 мл буфера для иммунопреципитации, содержащего 0,5% додецилсульфата натрия (ДСН), 1 мг/мл BSA, 2% Тритона X-100 и 50 мМ фосфатата натрия (pH 7,4). Комплексы антиген-антитело подвергали связыванию со сферами "белок А - сефароза", и анализировали с помощью электрофореза на 10% полиакриламидном геле с ДСН.

#### 8.7. Анализы на нейтрализацию ВИЧ-1

Анализ на нейтрализацию *in vitro* осуществляли, как описано ранее (Nara, P.L. et al., 1987, AIDS Res. Hum. Retroviruses 3:283-302). Для этого серийные двукратные разведения термоинактивированной сыворотки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со 150-200 синцитий-образующих единиц вируса ВИЧ, продуцированного в клетках H9. Смесь вируса/сыворотки инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 50000 клетками СЕМ, обработанными DEAE-декстраном (подвергнутыми адгезии к поверхности микротитровальных чашек с использованием поли-L-лизина) или с суспензионной культурой, содержащей 50000 клеток H9. После адсорбции вируса несвязанный вирус удаляли и в каждую лунку добавляли 200 мкл среды. Через четыре дня после инфицирования 50 мкл среды супернатанта брали для количественной оценки вирусного белка p24<sup>gag</sup> (Coulter Source, Inc.). Титры нейтрализации подсчитывали путем сравнения с контрольными лунками, содержащими лишь один вирус, и выражали как обратную величину от самого высокого разведения сыворотки, при котором число синцитий снижается более чем на 50%, или при котором синтез p24 ингибируется более чем на 50%.

#### 8.8. Индуцирование ЦТЛ-ответа

Мышей BALB/c иммунизировали 0,2 мл суспензионной вирусной культурой, содержащей  $10^7$  б.о.е. химерного вируса NDV. Через 7 дней выделяли клетки селезенки и снова стимулировали *In vitro* в течение 5 дней с облученными клетками селезенки, взятыми как таковые или сенсibilизированными иммуногенными пептидами, в присутствии 10% конкавалина А в супернатанте, как было описано ранее (Zaghouani H. et al., 1992, J.Immunol. 148:3604-3609).

#### 8.9. Анализ на цитолиз

Клетки-мишени, сенсibilизированные пептидами, подвергали мечению  $\text{Na}^{51}\text{Cr}_4$  (100 мкКи/ $10^6$  клеток) в течение 1 ч при 37°C. После двукратной промывки эти клетки трансфицировали в 96-луночные планшеты с V-образным дном, затем добавляли эффекторные клетки и инкубировали при 37°C в 7%  $\text{CO}_2$ . Через четыре часа супернатант собирали и оценивали. Максимальное высвобождение хрома определяли путем инкубирования клеток с детергентом 1% Nonidet P40. Процент специфического лизиса подсчитывали по следующей формуле: [(им./мин образцов - им./мин спонтанного

высвобождения)/(им./мин максимального высвобождения - им./мин спонтанного высвобождения)] $\times 100$ .

#### 9. Внутриклеточная экспрессия химерной NDV-CAT-PHK

Для увеличения эффективности экспрессии минигеномов NDV конструировали плазмиду (pT7-NDV-CAT-RB) для внутриклеточной экспрессии NDV-CAT-PHK. Это было достигнуто путем встраивания рибозима, происходящего от вируса гепатита дельта, непосредственно после конца 3'-некодирующей области NDV-CAT-PHK. Ко-трансфекция pTM1-NP, pTM1-P, pTM1-L и pT7-NDV-CAT-RT в клетки 293, 293T, COS1, CV1 или в фибробласты куриного эмбриона (CEF), которые были предварительно инфицированы rVV-N7 или модифицированным вирусом коровьей оспы Анкара, экспрессирующим полимеразу T7 (MVA-T7), приводила к высоким уровням CAT-активности (Фиг.6). CAT-активность была приблизительно в 100-1000 раз выше, чем активность, достигаемая прямой PHK-трансфекцией NDV-CAT-PHK.

10. Сохранение инфекционного вируса NDV с использованием PHK, происходящей от специфической рекомбинантной ДНК

Для спасения рекомбинантного вируса от вирус-независимой плазмидной системы осуществляли сборку плазмиды, обеспечивающей внутриклеточную экспрессию полноразмерного антигена NDV. кДНК NDV подвергали ОТ-ПЦР в некоторых участках очищенной PHK Калифорния-подобного штамма NDV (NDV-CL) (Meindl et al., 1974, Virology 58:457-463). кДНК-фрагменты лигировали и собирали в плазмиду с промотором T7 и рибозим-фланкирующими последовательностями, в результате чего получали pT7-NDV+RB. Молчащую мутацию, создающую новый рестрикционный XmaI-сайт, встраивали в открытую рамку считывания L pT7-NDV+RB. Монослои клеток CEF в чашках диаметром 10 см инфицировали MVA-T7 при множественности заражения приблизительно 0,1. Через один час клетки трансфицировали (подвергали липофекции) 2,4 мкг pTM1-NP, 1,2 мкг pTM1-P, 1,2 мкг pTM1-L и 1,5 мкг pT7-NDV+RB. После 8-часового инкубирования при 37°C добавляли свежую среду. Через 20 часов после трансфекции добавляли ингибитор вируса коровьей оспы araC при конечной концентрации 60 мкг/мл. Через два дня после трансфекции добавляли свежую среду, содержащую 100 мкг/мл araC. На 4-й день после трансфекции супернатант от трансфицированных клеток использовали для инокуляции аллантаоисного мешка 10-дневных куриных яиц с эмбрионами. После двухдневного инкубирования при 37°C собирали аллантаоисную жидкость, которая, как было обнаружено посредством гемагглютинации, была положительной на присутствие NDV-CAT-вируса. Анализ PHK, выделенный в результате спасения вируса, подтверждал присутствие вставленного XmaI-сайта, что свидетельствовало о том, что этот вирус происходит от клонированной плазмидной кДНК. Схематическое представление процедуры спасения показано на Фиг.7.

#### 11. Экспрессия чужеродного гена из внутреннего цистрона химерного генома NDV

Плазмиду pT7-NDV+CAT/RN-RB конструировали путем замены открытой рамки считывания HN в кДНК NDV-CL на открытую рамку считывания CAT. В некодирующие области добавляли дополнительные нуклеотиды для того, чтобы полная длина нуклеотидной последовательности полученной химерной PHK NDV могла делиться на шесть. Ко-трансфекция pT7-NDV+CAT/RN-RB вместе с pTM1-NP, pTM1-P и pTM1-L в монослои CEF, которые были инфицированы ранее вирусом MVA-T7, приводила к CAT-активности, которая была измерена на 2-ой день после трансфекции (Фиг.8). Эти результаты продемонстрировали, что можно использовать NDV в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов, клонированных как транскрипционные единицы в геноме NDV.

Объем настоящего изобретения не ограничен описанными конкретными вариантами его осуществления, которые приводятся лишь в целях иллюстрации отдельных аспектов изобретения, и любые конструкции, вирусы или ферменты, которые являются функционально эквивалентными, входят в объем данного изобретения. Действительно, каждому специалисту очевидно, что в соответствии с вышеприведенным описанием и

сопровождающими его чертежами в настоящее изобретение могут быть внесены различные модификации помимо тех вариантов, которые были проиллюстрированы и описаны в данной заявке. Такие модификации также должны входить в объем прилагаемой формулы изобретения.

5 Все работы, цитированные в данной заявке, во всей своей полноте включены в настоящее описание в качестве ссылки.

#### Формула изобретения

1. Рекомбинантная молекула РНК, применимая для получения химерного вируса  
10 ньюкаслской болезни, содержащая сайт связывания, специфичный для РНК-направленной РНК-полимеразы вируса ньюкаслской болезни, функционально присоединенный к вирусной РНК, содержащей гетерологичную последовательность РНК, и содержащийся в 3'-некодирующей фланкирующей области РНК-генома вируса ньюкаслской болезни,  
15 приведенной на фигуре 3, или в модифицированных или мутированных вариантах или фрагментах 3'-некодирующей фланкирующей области, сохраняющей функцию 3'-некодирующей фланкирующей области дикого типа.

2. Рекомбинантная молекула РНК по п.1, где указанная гетерологичная РНК кодирует антиген или эпитоп вируса иммунодефицита человека-1 или вируса иммунодефицита человека-2.

20 3. Рекомбинантная молекула РНК по п.1, где указанная гетерологичная РНК кодирует антиген или эпитоп гена env вируса иммунодефицита человека-1 или вируса иммунодефицита человека-2.

4. Рекомбинантная молекула РНК, применимая для получения мутированного вируса ньюкаслской болезни, содержащая сайт связывания для РНК-направленной РНК-  
25 полимеразы вируса ньюкаслской болезни, функционально присоединенный к гену вируса ньюкаслской болезни, содержащему мутацию, приводящую к аттенуации фенотипа, и сайт связывания полимеразы содержится в 3'-некодирующей фланкирующей области РНК-генома вируса ньюкаслской болезни, приведенной на фигуре 3, или в модифицированных или мутированных вариантах или фрагментах 3'-некодирующей фланкирующей области,  
30 сохраняющей функцию 3'-некодирующей фланкирующей области дикого типа.

5. Способ получения рекомбинантной эукариотической клетки, предусматривающий трансфекцию клетки-хозяина нуклеотидными последовательностями, кодирующими рекомбинантную молекулу NDV по п.1 и РНК-полимеразный белок NDV.

6. Способ получения химерного РНК-вируса с отрицательной цепью,  
35 предусматривающий трансфекцию клетки-хозяина нуклеотидными последовательностями, кодирующими рекомбинантный NDV, и выделение указанного химерного вируса из культуры.

7. Способ по п.6, где РНК-вирус с отрицательной цепью содержит вирусную РНК, содержащую гетерологичную последовательность РНК, содержащую обратный комплемент  
40 кодирующей последовательности из генома вируса ньюкаслской болезни, функционально присоединенный к сайту связывания полимеразы РНК-вируса с отрицательной цепью.

8. Способ по п.6, где указанная гетерологичная РНК кодирует антиген или эпитоп вируса иммунодефицита человека-1 или вируса иммунодефицита человека-2.

9. Способ по п.8, где указанная гетерологичная РНК кодирует антиген или эпитоп гена  
45 env вируса иммунодефицита человека-1 или вируса иммунодефицита человека-2.

10. Способ по п.6, где указанная гетерологичная РНК содержится в гене HN вируса ньюкаслской болезни.

11. Вакцинный иммуногенный препарат, содержащий генетически сконструированный вирус ньюкаслской болезни, имеющий модификации, которые приводят к аттенуации  
50 фенотипа, и физиологически приемлемый наполнитель.

12. Вакцинный препарат по п.11, где указанная модификация происходит от природного мутанта.

13. Вакцинный, иммунопотенцирующий или противоопухолевый препарат, содержащий

генетически сконструированный химерный вирус ньюкаслской болезни, геном которого кодирует гетерологичный эпитоп, и физиологически приемлемый наполнитель.

14. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген.

5 15. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от вируса иммунодефицита человека, вируса ньюкаслской болезни, вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса болезни Марека, вируса инфекционного заболевания слизистой сумки, вируса инфекционного бронхита, вируса инфекционного бурсита, вируса анемии кур, вируса инфекционного лагинготрахеита, вируса птичьего лейкоза, вируса ретикулоэндотелиоза, вируса бешенства, вируса кошачьей чумы, вируса везикулярного стоматита, вируса чумы крупного рогатого скота или вируса оспы свиней.

16. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является иммунопотенцирующий белок.

15 17. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является опухолевый антиген.

18. Препарат по п.13, содержащий живой реплицирующийся вирус ньюкаслской болезни.

19. Препарат по п.13, содержащий убитый инактивированный вирус ньюкаслской болезни.

20 20. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от вируса Эпштейна-Барр, вируса папилломы человека, вируса парагриппа, вируса Сендай, обезьяньего вируса 5, вируса эпидемического паротита, полиовируса, вируса кошачьего лейкоза, вируса собачьей чумы, вируса гепатита В, вируса гепатита А, вируса гепатита С или вируса герпеса.

21. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от gp160 ВИЧ.

25 22. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от gp120 ВИЧ.

23. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от gp41 ВИЧ.

24. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от рo1 ВИЧ.

25. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от обратной транскриптазы ВИЧ.

30 26. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от эндонуклеазы ВИЧ.

27. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от протеазы ВИЧ.

28. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от tat ВИЧ.

29. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от rev ВИЧ.

30. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от nef ВИЧ.

35 31. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от vif ВИЧ.

32. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от vpr ВИЧ.

33. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от vpr ВИЧ.

34. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от vpx ВИЧ.

40 35. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от поверхностного антигена вируса гепатита В.

36. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от поверхностного антигена вируса гепатита А.

37. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от поверхностного антигена вируса гепатита С.

45 38. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от гемагглютинина вируса гриппа.

39. Препарат по п.14, где указанный вирусный антиген происходит от гликопротеида вируса герпеса.

50 40. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является бактериальный антиген.

41. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является паразитарный антиген.

42. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является антиген

возбудителя малярии.

43. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является грибковый антиген.

44. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является аутоантиген.

5 45. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является аллерген.

46. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса иммунодефицита человека.

47. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса ньюкаслской болезни.

10 48. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса гриппа.

49. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген респираторно-синцитиального вируса.

15 50. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса болезни Марека.

51. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса инфекционного заболевания слизистой сумки.

52. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса инфекционного бронхита.

20 53. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса инфекционного бурсита.

54. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса анемии кур.

25 55. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса инфекционного лагинготрахеита.

56. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса птичьего лейкоза.

57. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса ретикулоэндотелиоза.

30 58. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса бешенства.

59. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса кошачьей чумы.

35 60. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса везикулярного стоматита.

61. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса чумы крупного рогатого скота.

62. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса оспы свиней.

40 63. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса Эпштейна-Барр.

64. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса папилломы человека.

45 65. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса парагриппа.

66. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса Сендай.

67. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген обезьяньего вируса 5.

50 68. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген полиовируса.

69. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса кошачьего лейкоза.

70. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса собачьей чумы.

71. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса гепатита В.

5 72. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса гепатита А.

73. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса гепатита С.

10 74. Препарат по п.13, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса герпеса.

75. Иммуногенная композиция, содержащая генетически сконструированный вирус ньюкаслской болезни, имеющий модификации, которые приводят к аттенуации фенотипа.

76. Композиция по п.75, где указанная модификация происходит от природного мутанта.

15 77. Иммуногенная композиция, содержащая генетически сконструированный химерный вирус ньюкаслской болезни, геном которого кодирует гетерологичный эпитоп.

78. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген.

20 79. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от вируса иммунодефицита человека, вируса ньюкаслской болезни, вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса болезни Марека, вируса инфекционного заболевания слизистой сумки, вируса инфекционного бронхита, вируса инфекционного бурсита, вируса анемии кур, вируса инфекционного лагинготрахеита, вируса птичьего лейкоза, вируса ретикулоэндотелиоза, вируса бешенства, вируса кошачьей чумы, вируса везикулярного стоматита, вируса чумы крупного рогатого скота или вируса оспы свиней.

25 80. Композиция по п.77, содержащая живой реплицирующийся вирус ньюкаслской болезни.

81. Композиция по п.77, содержащая убитый инактивированный вирус ньюкаслской болезни.

30 82. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от вируса Эпштейна-Барр, вируса папилломы человека, вируса парагриппа, вируса Сендай, обезьяньего вируса 5, вируса эпидемического паротита, полиовируса, вируса кошачьего лейкоза, вируса собачьей чумы, вируса гепатита В, вируса гепатита А, вируса гепатита С или вируса герпеса.

83. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от gp160 ВИЧ.

35 84. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от gp120 ВИЧ.

85. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от gp41 ВИЧ.

86. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от рo1 ВИЧ.

87. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от обратной транскриптазы ВИЧ.

40 88. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от эндонуклеазы ВИЧ.

89. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от протеазы ВИЧ.

90. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от tat ВИЧ.

91. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от rev ВИЧ.

45 92. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от nef ВИЧ.

93. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от vif ВИЧ.

94. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от vpr ВИЧ.

95. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от vpr ВИЧ.

96. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от vpx ВИЧ.

50 97. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от поверхностного антигена вируса гепатита В.

98. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от поверхностного антигена вируса гепатита А.

99. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от поверхностного антигена вируса гепатита С.

100. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от гемагглютинаина вируса гриппа.

5 101. Композиция по п.78, где указанный вирусный антиген происходит от гликопротеида вируса герпеса.

102. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является бактериальный антиген.

10 103. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является паразитарный антиген.

104. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является антиген возбудителя малярии.

105. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является грибковый антиген.

15 106. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является аутоантиген.

107. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является аллерген.

108. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса иммунодефицита человека.

20 109. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса ньюкаслской болезни.

110. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса гриппа.

25 111. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген респираторно-синцитиального вируса.

112. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса болезни Марека.

113. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса инфекционного заболевания слизистой сумки.

30 114. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса инфекционного бронхита.

115. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса инфекционного бурсита.

35 116. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса анемии кур.

117. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса инфекционного лагинготрахеита.

118. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса птичьего лейкоза.

40 119. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса ретикулоэндотелиоза.

120. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса бешенства.

45 121. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса кошачьей чумы.

122. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса везикулярного стоматита.

123. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса чумы крупного рогатого скота.

50 124. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса оспы свиней.

125. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса Эпштейна-Барр.

126. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса папилломы человека.

127. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса парагриппа.

5 128. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса Сендай.

129. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген обезьяньего вируса 5.

10 130. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген полиовируса.

131. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса кошачьего лейкоза.

132. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса собачьей чумы.

15 133. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса гепатита В.

134. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса гепатита А.

20 135. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса гепатита С.

136. Композиция по п.77, где указанным гетерологичным эпитопом является вирусный антиген вируса герпеса.

137. Рекомбинантная молекула РНК, применимая для получения химерного вируса ньюкаслской болезни, функционально присоединенная к гетерологичной  
25 последовательности РНК и содержащая сигнальные последовательности, необходимые для NDV-опосредованной репликации и транскрипции, и сайт связывания РНК-полимеразы вируса ньюкаслской болезни, содержащийся в 3'- и 5'-некодирующих фланкирующих областях РНК-генома вируса ньюкаслской болезни, приведенных на фигуре 3, или в модифицированных или мутированных вариантах или фрагментах 3'- и 5'-некодирующих  
30 фланкирующих областей, сохраняющих функцию 3'- и 5'-некодирующих фланкирующих областей дикого типа.

138. Рекомбинантная молекула РНК по п.137, где указанная гетерологичная РНК кодирует вирусный антиген.

139. Рекомбинантная молекула РНК по п.138, где указанный вирусный антиген  
35 происходит от вируса иммунодефицита человека, вируса ньюкаслской болезни, вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса болезни Марека, вируса инфекционного заболевания слизистой сумки, вируса инфекционного бронхита, вируса инфекционного бурсита, вируса анемии кур, вируса инфекционного лагинготрахеита, вируса птичьего лейкоза, вируса ретикулоэндотелиоза, вируса птичьего гриппа, вируса  
40 бешенства, вируса кошачьей чумы, вируса везикулярного стоматита, вируса чумы крупного рогатого скота или вируса оспы свиней.

140. Рекомбинантная молекула РНК, применимая для получения мутированного вируса ньюкаслской болезни, содержащая сигнальные последовательности, необходимые для NDV-опосредованной репликации и транскрипции, и сайт связывания РНК-полимеразы  
45 вируса ньюкаслской болезни, содержащийся в 3'- и 5'-некодирующих фланкирующих областях РНК-генома вируса ньюкаслской болезни, приведенных на фигуре 3, или в модифицированных или мутированных вариантах или фрагментах 3'- и 5'-некодирующих фланкирующих областей, сохраняющих функцию 3'- и 5'-некодирующих фланкирующих областей дикого типа, где указанная молекула РНК содержит мутацию и функционально  
50 связана с геном вируса ньюкаслской болезни.

141. Способ получения рекомбинантной эукариотической клетки, предусматривающий трансфекцию клетки-хозяина нуклеотидными последовательностями, кодирующими рекомбинантную молекулу NDV по п.137 или 140 и РНК-полимеразные белки Р и L NDV.

142. Способ получения химерного РНК-вируса с отрицательной цепью, предусматривающий трансфекцию клетки-хозяина нуклеотидными последовательностями, кодирующими рекомбинантную РНК по п.137 или 140 и вирусные функциональные элементы, необходимые для репликации и транскрипции, и выделение указанного химерного вируса из культуры.

143. Способ по п.142, где указанная гетерологичная РНК кодирует вирусный антиген.

144. Способ по п.143, где указанный вирусный антиген происходит от вируса иммунодефицита человека, вируса ньюкаслской болезни, вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса болезни Марека, вируса инфекционного заболевания слизистой сумки, вируса инфекционного бронхита, вируса инфекционного бурсита, вируса анемии кур, вируса инфекционного лагинготрахеита, вируса птичьего лейкоза, вируса ретикулоэндотелиоза, вируса птичьего гриппа, вируса бешенства, вируса кошачьей чумы, вируса везикулярного стоматита, вируса чумы крупного рогатого скота или вируса оспы свиней.

145. Способ по п.142, где указанная гетерологичная РНК содержится в гене HN вируса ньюкаслской болезни.

20

25

30

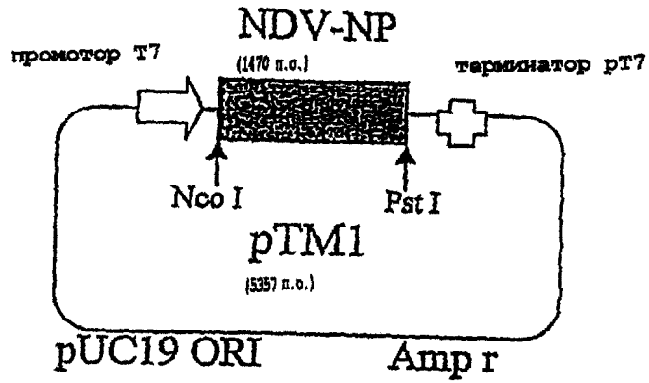
35

40

45

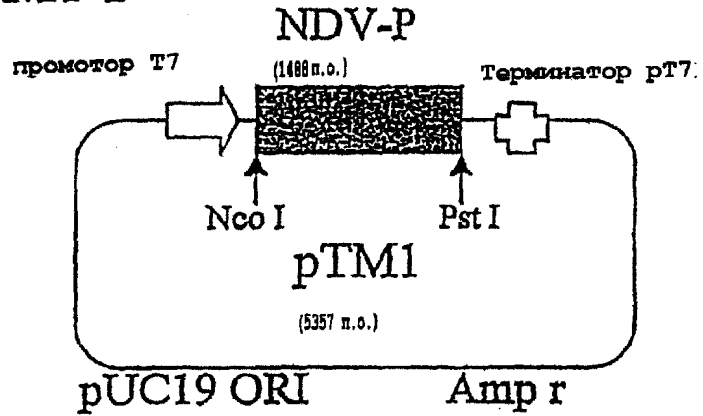
50

pTM1-NP



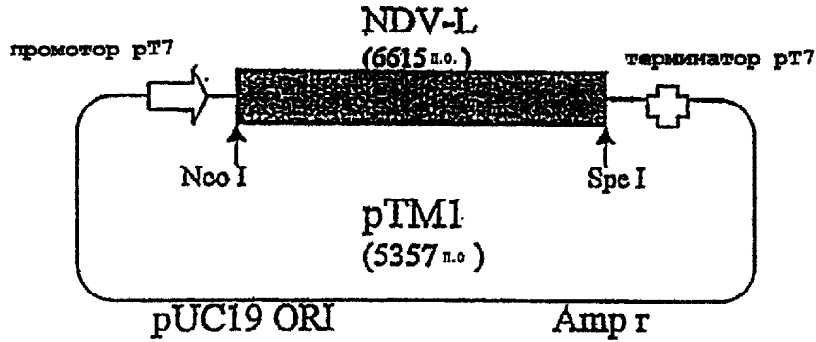
ФИГ. 2А

pTM1-P



ФИГ. 2В

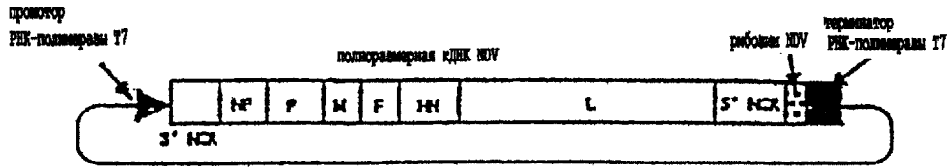
pTM1-L



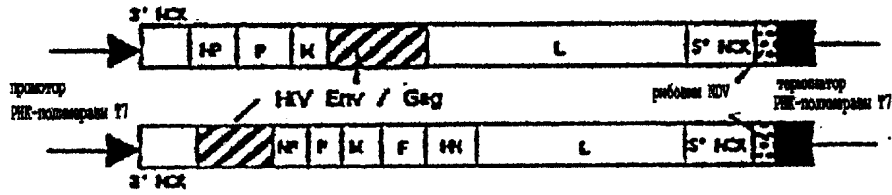
ФИГ. 2С

5' ACCA AACAGAGAAUCCGVAAAGGUAACGVUAAAAGCGAAGGAGCAAUUGAAGUCGCACGGG  
 UAGAAGGGUGUAAUUCGAGUGCGAGCCCGAAGCACAACUCGAGAAAGCCUUCACCAAC-  
 ----- ген CAT (667 нк) ----- CUUAA  
 CGACAAUCACAUUUAUAGGCUCUUCUUCUGGCCAAUUGUAUCUUGUUGAUUUUAUUAUA  
 CUAUGUUAGAAAAAGUUGAACUCCGACUCUUAAGGACUCGAACUCGAACUCAAUAAAUGU  
 CUUAGAAAAAGAUUGCACAGUUAUUCUUGAGUGUAUCUUGUCAUUCACCAAAUCUUGU  
 UUGGU-3'

ФИГ. 3



ФИГ. 4А



ФИГ. 4В

```

1   TGGTTTGTCTCTTAGGCATTCATGCAATTTTTCGCTTCCTCGTTAACTT   50
1   TGGTTTGTCTCTTAGGCATTCATGCAATTTTTCGCTTCCTCGTTAACTT   50
    *****
51  CAGCGTGCCCATCTTCCACACTTAGAGCTCACGCTCGGGCTTCGTGTTTG   100
51  CAACGTGCCCATCTTCCACACTTAGAGCTCACGCTCGGGCTTCGTGTTTG   100
    ** *****
101 AGCTCTTTCGGAAGAtGGTTG      121
101 AGCTCTTTCGGAAGACGGTTG     121
    *****

```

5'-конец

```

1   ACCAAACAAGATTTGGTGAATGACLAGACTACACTCAAGAATAACTGTG   50

51  cgcaatcttttctAAGACATTTATTTGAGTTCGAGTTCGAGTTCCTAAGG   100
    nnnnnnAAGACATTTATTTGAGTTCGAATTCGAGCTCTAAGG
    *****

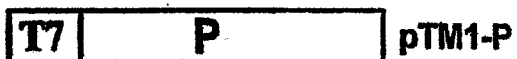
101 AGTCGGAGTTCAACTTTTTTCTAACATAGTATGATTAATCAACAAGGAT   150
    AGTCGGAGTTCAATTTTTTCTAACATAGTATGATTAATCAACAAGGAT
    *****

151 ACAAATGGCCAGAAAAGGAGCCTATTAATATGTGATTGTCC      191
    ACAAATGGCCAGAAAAGGAGCCTATTAATATGTGATTTTCC
    *****

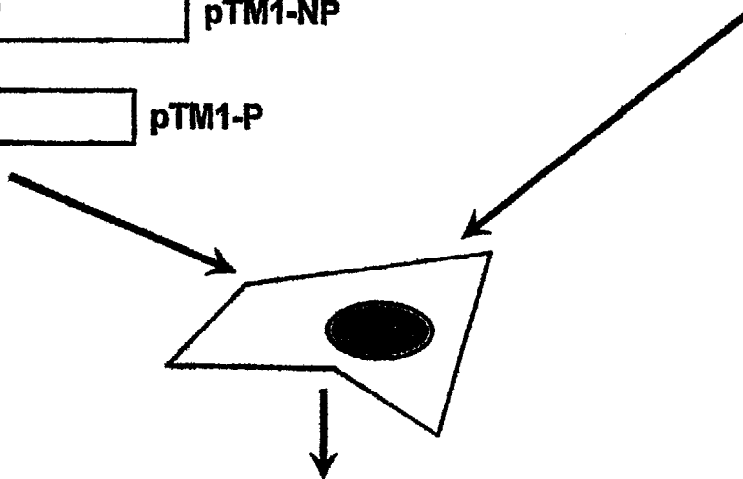
```

ФИГ. 5

ДНК



вирус коровьей оспы  
(полимераза T7)

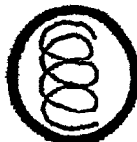
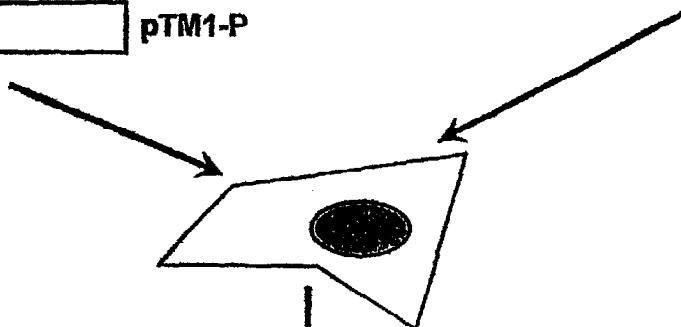


САТ-активность

ФИГ. 6



вирус  
коровьей оспы  
(полимераза T7)



NDV

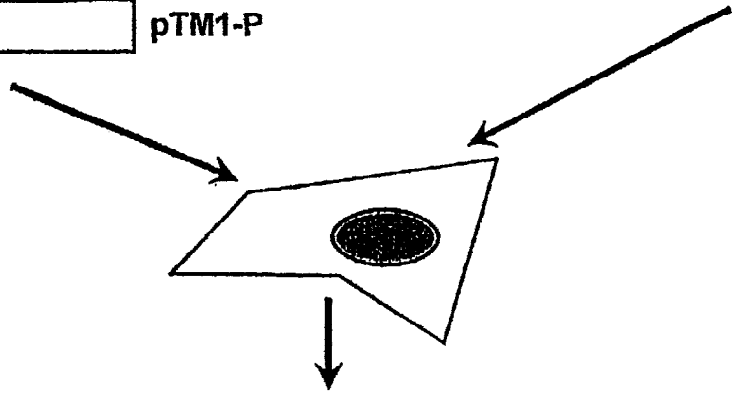
ФИГ. 7



pT7-NDV+-CAT/HN-RB



вирус коровьей оспы  
(полимераза T7)



CAT-активность

ФИГ. 8