



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2010117741/10**, 10.10.2008(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.10.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
10.10.2007 US 60/998,426(43) Дата публикации заявки: **20.11.2011** Бюл. № 32(45) Опубликовано: **27.08.2013** Бюл. № 24(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US 20050064394 A1**, 24.03.2005. **US**
20050118140 A1, 02.06.2005. **EP 0000882132 B1**,
19.10.2005. **US 6471965 B1**, 29.10.2002.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **11.05.2010**(86) Заявка РСТ:
US 2008/079494 (10.10.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/049138 (16.04.2009)

Адрес для переписки:

**119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулингз Интернэшнл Инк.", А.Ю.Соболеву**

(72) Автор(ы):

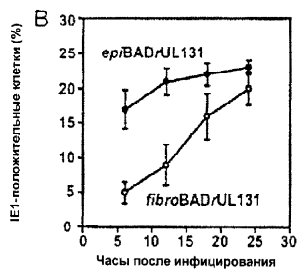
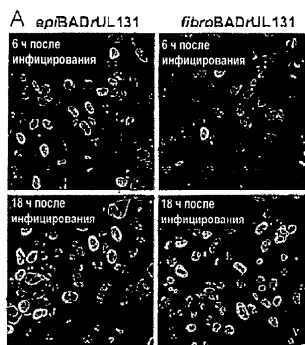
**ШЕНК Томас (US),
ВАНГ Дай (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**ЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ПРИНСТОН
ЮНИВЕСИТИ (US)****(54) ВАКЦИНА ПРОТИВ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области вакцинологии и клеточной биологии. Предложен способ получения вакцины против цитомегаловируса за счет выбора клеточного типа, в котором реплицируется этот вирус, вакцина и способ иммунизации особи против ЦМВ. 4 н.п. и 15 з.п. ф-лы, 6 ил, 6 табл., 1 пр.



Фиг. 1

RU 2 4 9 1 3 4 0 C 2

RU 2 4 9 1 3 4 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 7/00 (2006.01)*A61K 39/245* (2006.01)*A61P 31/22* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010117741/10, 10.10.2008**(24) Effective date for property rights:
10.10.2008

Priority:

(30) Convention priority:
10.10.2007 US 60/998,426(43) Application published: **20.11.2011 Bull. 32**(45) Date of publication: **27.08.2013 Bull. 24**(85) Commencement of national phase: **11.05.2010**(86) PCT application:
US 2008/079494 (10.10.2008)(87) PCT publication:
WO 2009/049138 (16.04.2009)

Mail address:

**119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, ehtazh 3,
"Goulingz Internehshnl Ink.", A.Ju.Sobolevu**

(72) Inventor(s):

**ShENK Tomas (US),
VANG Daj (US)**

(73) Proprietor(s):

ZE TRASTIZ OF PRINSTON JuNIVESITI (US)**(54) CYTOMEGALOVIRUS VACCINE AND METHOD FOR PREPARING IT**

(57) Abstract:

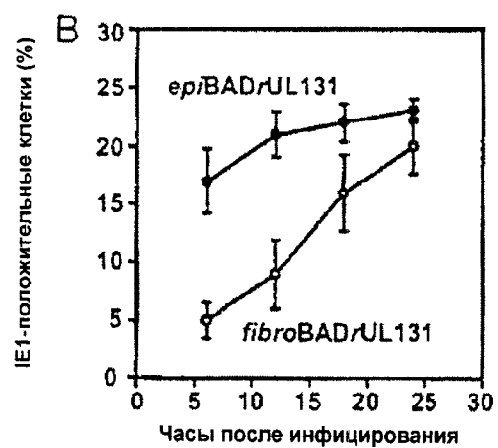
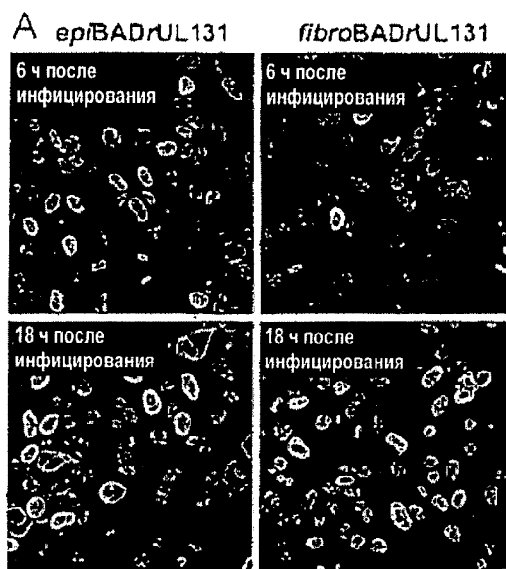
FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to vaccinology
and cell biology.

EFFECT: what is presented is a method for

preparing the cytomegalovirus vaccine ensured by
specifying a cell type wherein this virus replicates;
the vaccine and method for immunising an individual
against CMV.

19 cl, 6 dwg, 5 tbl, 1 ex



Фиг. 1

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области разработки вакцин. А именно, настоящее изобретение относится к способам увеличения диверсификации вакцин против цитомегаловируса за счет выбора клеточного типа, в котором реплицируется этот вирус, и применению цитомегаловируса, полученного этими способами, в разработке композиций вакцин.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, включая патенты, опубликованные заявки, технические и научные статьи цитируются на протяжении всего данного описания. Каждая из цитируемых публикаций включена в данный документ путем ссылки во всей полноте. Полные цитаты публикаций, указанных номерами ссылок в скобках или не цитируемых полностью в рамках данного описания, приведены в конце данного описания.

Цитомегаловирус представляет собой герпесвирус, в классификации отнесенный к членам бета-подсемейства герпесвирусов. Согласно Центру по контролю и профилактике инфекционных заболеваний цитомегаловирусная инфекция распространена у человека практически повсеместно, при этом по расчетам в США этим вирусом инфицировано 40-80% населения. Вирус распространяется преимущественно через биологические жидкости и часто передается от беременных женщин плоду или новорожденному. У большинства людей цитомегаловирусная инфекция протекает в латентной форме, хотя активация вируса может проявляться высокой лихорадкой, ознобами, повышенной утомляемостью, головной болью, тошнотой и спленомегалией.

Хотя большинство случаев цитомегаловирусных инфекций у человека протекают бессимптомно, у лиц с незрелой иммунной системой или иммунодефицитом, таких как новорожденные, ВИЧ-положительные, пациенты, перенесшие аллотрансплантацию, и онкологические пациенты, цитомегаловирусные инфекции могут вызывать проблемы. Цитомегаловирусная инфекция у таких лиц может вызывать тяжелые осложнения, включая пневмонию, гепатит, энцефалит, колит, увеит, ретинит, слепоту и нейропатию среди других пагубных последствий. Кроме того, цитомегаловирус является ведущей причиной врожденных аномалий. В настоящее время терапевтической или профилактической вакцины против цитомегаловирусной инфекции не существует.

Проникновение герпесвирусов в клетки представляет собой сложный процесс, который запускается адсорбцией и связыванием рецептора с последующим слиянием оболочки вируса с клеточной мембраной. Слияние происходит либо на плазматической мембране, либо на эндосомальной мембране. Например, вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) проникает преимущественно в В-лимфоциты путем эндоцитоза, опосредованного рецептором (1, 2). Однако он инфицирует эпителиальные клетки или трансформированные В-лимфоциты путем слияния оболочки вируса с плазматической мембраной (1). Вирус простого герпеса сливается с плазматической мембраной некоторых клеточных типов, а у других проникает путем эндоцитоза (3-6).

Человеческий цитомегаловирус инфицирует различные клеточные типы *in vivo*, включая эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты (7). Он сливается с плазматическими мембранами фибробластов (8), но в клетки пигментного эпителия сетчатки и эндотелиальные клетки пупочной вены он проникает путем эндоцитоза (9, 10).

Механизм, с помощью которого герпесвирусы «выбирают» путь проникновения, остается неясным. Принято считать, что пути проникновения в основном

определяются клеткой хозяина, но имеются и данные о роли гликопротеинов вириона, определяющих тропизм (11). Вирионы ВЭБ содержат два gH-комплекса, gH/gL и gH/gL/gp42 (12, 13), которые обладают взаимоисключающими функциями (11). Слияние с плазматической мембраной В-лимфоцитов опосредовано gH/gL/gp42 (14-16).

Но проникновение в эпителиальные клетки запускается gH/gL (11, 12, 17). Клеточный тип, в котором реплицируется ВЭБ, может менять его тропизм. Вирионы ВЭБ - производные В-лимфоцитов - содержат меньше gH-gL-gp42, чем вирионы - производные эпителиальных клеток. В итоге вирус, генерируемый В-лимфоцитами, является более инфекционным для эпителиальных клеток, а вирус - производное эпителиальных клеток - обладает тропизмом к В-лимфоцитам (18).

Человеческий цитомегаловирус также кодирует два gH/gL-комплекса: gH/gL/gO и gH/gL/pUL128/pUL130/ pUL131 (19, 20). gO-содержащий комплекс достаточен для инфицирования фибробластов, в то время как pUL128/pUL130/pUL131-содержащий комплекс необходим для инфицирования эндотелиальных и эпителиальных клеток (19-21). Лабораторный штамм AD 169 содержит только gH/gL/gO-комплекс в вирионах (19). Отсутствие второго gH/gL-комплекса обуславливает потерю тропизма к эпителиальным и эндотелиальным клеткам у лабораторных штаммов человеческого цитомегаловируса (19-22).

Имеется потребность в разнообразии и диверсификации вакцины против цитомегаловируса, а также в эффективных средствах контроля распространения и активации вируса, особенно у лиц с иммунодефицитом и беременных женщин. Настоящее изобретение отвечает этой потребности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения вакцин против цитомегаловируса. Этот способ включает культивирование вируса или изолятов цитомегаловируса в клеточных культурах отдельных клеточных типов с получением таким образом цитомегаловируса, кондиционированного клеточным типом, и получение вакцины против цитомегаловируса из цитомегаловируса, кондиционированного клеточным типом. В некоторых вариантах штамм или изолят цитомегаловируса является штаммом или изолятом человеческого цитомегаловируса. Для данного способа пригодны разнообразные клеточные типы, включая, но не ограничиваясь перечисленным, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты, нейроны, гладкомышечные клетки, макрофаги, дендритные клетки и стромальные клетки. В конкретном варианте выбранный клеточный тип представляет собой эпителиальную клетку.

Вышеупомянутый способ может дополнительно включать получение цитомегаловируса, кондиционированного клеточным типом или двумя или больше различными выбранными клеточными типами и комбинирование этих цитомегаловирусов для получения вакцины против цитомегаловируса. Иначе или дополнительно данный способ включает две или больше культуры клеток, содержащих выбранный клеточный тип или два или больше различных клеточных типа, и комбинирование всех полученных цитомегаловирусов для получения вакцины против цитомегаловируса.

В некоторых вариантах данный способ включает получение живой аттенуированной вакцины против цитомегаловируса. В других вариантах он включает получение инактивированной или убитой вакцины против цитомегаловируса. Еще в других вариантах он включает получение комбинированных вакцин, содержащих один или несколько живых аттенуированных вирусов, инактивированных вирусов и

другие иммуногенные компоненты, например, иммуногенные белки и пептиды цитомегаловируса и им подобные.

Вакцины против цитомегаловируса, которые получают вышеупомянутыми способами, также входят в объем настоящего изобретения.

Другой аспект настоящего изобретения относится к набору для осуществления способов настоящего изобретения. Такие наборы обычно включают упаковку, в которой содержатся один или несколько штаммов или клинических изолятов цитомегаловируса, клеточных культур одного или нескольких выбранных клеточных типов и инструкции по использованию клеточных культур и штаммов или изолятов цитомегаловируса для получения кондиционированного клеточным типом цитомегаловируса для применения в вакцине против цитомегаловируса.

Другой аспект настоящего изобретения включают композицию вакцин, включающую популяцию цитомегаловируса или компоненты вирионов данной популяции, смешанные с соответствующим фармацевтическим носителем или адъювантом, где популяцию цитомегаловируса выделяют из клеточной культуры выбранного клеточного типа. В одном варианте выбранный клеточный тип представляет собой эпителиальный клеточный тип. В одном варианте композиция вакцины включает человеческий цитомегаловирус.

В различных вариантах композиции вакцин популяция цитомегаловируса, выделенная из культуры эпителиальных клеток, характеризуется одним или несколькими особенностями в инфицированных впоследствии клетках хозяина, включая, но не ограничиваясь перечисленным: а) проникновение в клетки хозяина путем слияния с плазматическими мембранами клеток хозяина; б) более выраженное слияние клеток хозяина, опосредованное вирионом, по сравнению с эквивалентной популяцией цитомегаловируса, выделенного из культуры фибробластов; в) ускоренную репликацию вируса в клетках хозяина по сравнению с эквивалентной популяцией цитомегаловируса, выделенного из культуры фибробластов; г) индукцию клеточного ответа, включающего изменение экспрессии не менее чем в 2,5 раза генов, число которых примерно на две трети меньше чем при ответе, вызванном эквивалентной популяцией цитомегаловируса, выделенного из культуры фибробластов через 10 часа после инфицирования; или д) индукцию клеточного ответа, включающую изменение экспрессии одного или нескольких генов, как показано в таблице 2 и таблице 4 данного документа, при этом последние представлены в Банке генов под входящими номерами; AK094860, NM_145023, NM-133492, NM_001039580, NM_001004301, NM-001034, A1369525, AK123066, NM_005345, NM_020731, BC071797, NM-003414, NM_000800, NM_138467, AK090803, AL133118, NM-00165, BG001037, NM_024861, NM-001043, NM-016239, NM-001018084, NM-001037442, NM-017600, NM_022097, NM-175868, NM_032266, NM_003841, NM_005039, NM_145051, NM_004294, AW856073, NM_024050, AF085968, NM-080927, NM_022115, AK056703, NM_000808, NM-012377, NM_006793, NM_031466, NM_005185, NM-139173, BX360933, NM-016125, NM_002104, NM-032188, NM_004185, NM-004843 или NM-173550.

В некоторых вариантах композиция вакцины включает популяцию цитомегаловируса или компоненты его вириона, выделенные из клеточной культуры одного или нескольких выбранных клеточных типов. Например, популяция цитомегаловируса может быть выделена из эпителиальных клеток и клеток другого клеточного типа, такого как клеточный тип фибробластов. В других вариантах популяция цитомегаловируса включает два или несколько штаммов или клинических изолятов цитомегаловируса, выращенного в выбранном клеточном типе. Некоторые

варианты могут включать множество штаммов или клинических изолятов цитомегаловируса, выращенного в клеточных культурах множества различных клеточных типов.

В одном варианте композиции вакцины включает живую аттенуированную вакцину против цитомегаловируса. В другом варианте она включает инактивированную вакцину против цитомегаловируса. Еще в других вариантах композиция вакцины может быть комбинацией вакцин, включающей один или несколько штаммов живого аттенуированного вируса или его компонентов, инактивированный вирус или его компоненты и (или) другие иммуногенные пептиды или белки цитомегаловируса.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ иммунизации субъекта против цитомегаловируса, включающий введение данному субъекту композиции вакцины против цитомегаловируса, произведенной вышеупомянутыми способами и (или) включающими вышеупомянутые свойства. В одном варианте субъектом, которого предстоит иммунизировать, является человек.

Другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут понятны из рисунков, подробного описания и примеров, приведенных ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг.1. Кинетика экспрессии IE1 человеческого цитомегаловируса в клетках ARPE-19.

А) Инфицированные клетки (0,1 БОЕ/клетку) смешали в указанные сроки и окрасили на IE1 (зеленый цвет на цветной фотографии, светло-серый цвет на черно-белой фотографии), Sp100 (красный цвет на цветной фотографии, очень темный цвет на черно-белой фотографии) и ДНК (синий цвет на цветной фотографии, темно-серый цвет на черно-белой фотографии). Б) В различные сроки после инфекции (0,1 БОЕ/клетку) подсчитали процент IE1 - экспрессирующих клеток; результаты показаны на диаграмме.

Фиг.2. Электронно-микроскопический анализ проникновения человеческого цитомегаловируса в клетки ARPE-19. Частицы еpiBADrUL131 или fibroBADrUL131 (50 БОЕ/клетку) связывали с клетками при 4°C, а затем оставляли при 37°C на 15 мин, чтобы обеспечить интернализацию. Представлены репрезентативные рисунки.

Фиг.3. Влияние ингибиторов окисления эндосом и источника вириона на проникновение человеческого цитомегаловируса в клетки ARPE-19. Эксперименты проводили в трех копиях и подсчитывали число положительных клеток после обработки лекарственным средством в сравнении с необработанными культурами. А) Клетки предварительно обрабатывали NH₄Cl или бафломицином А (БФА) в течение 1 ч, инокулировали еpiBADrUL131 или fibroBADrUL131 (1 БОЕ/клетку) и через 16 ч окрашивали на IE1. Б) Клетки предварительно обрабатывали 50 моль NH₄Cl или 40 мМоль БФА в течение 1 ч, инокулировали BADrUL131 (0,1 БОЕ/клетку) или FIXwt (0,01 БОЕ/клетку) и через 16 ч окрашивали на IE1.

Фиг.4. Слияние клеток ARPE-19, индуцированное вирусом - производным эпителиальных клеток. А) Клетки инокулировали еpiBADrUL131 или fibroBADrUL131 (20 БОЕ/клетку) и затем держали в среде, содержащей 200 мкг/мл БФА. Через 16 ч после инфицирования получали фазовоконтрастные изображения. Б) Смесь репортерных и эффекторных клеток инфицировали еpiBADrUL131 или fibroBADrUL131 (20 БОЕ/клетку) при 4°C в течение 1 ч. Затем культуру держали при 37°C в течение 6 ч, после чего измеряли относительную активность люциферазы.

Фиг.5. Влияние pUL130-специфичного нейтрализующего антитела на инфекцию и проникновение человеческого цитомегаловируса. А) Вирусы - производные эпителиальных клеток или фибробластов - инкубировали с различными

концентрациями антитела к pUL130 и определяли остаточную инфективность. Б) Частицы вирусов - производных эпителиальных клеток или фибробластов - предварительно обрабатывали антителом к pUL130 в конечной концентрации 20 мкг/мл или фосфатным буфером, а затем адсорбировали на клетках ARPE-19 при 4°C в течение 1 ч. Клетки дважды отмывали холодным фосфатным буфером и экстрагировали вирусную ДНК, связанную с клетками, чтобы определить относительное число частиц, связанных с клетками. Или клетки оставляли при 37°C на 2 ч, чтобы обеспечить проникновение вируса. Вирионы, не проникшие в клетки, удаляли с помощью обработки ЭДТК-трипсином. Интернализированную вирусную ДНК впоследствии измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Фиг.6. Модуляция транскриптома ARPE-19 человеческим цитомегаловирусом, полученным в эпителиальных клетках и фибробластах. А) Диаграмма Венна отображает распределение генов, регулируемых различным образом, через 6 ч или 10 ч после инфицирования epiBADrUL131 или fibroBADrU1131 (3 БОЕ/клетку) по сравнению с симуляцией инфекции. Б) Изменения относительных концентраций РНК, измеренных с помощью ПЦР в режиме реального времени. Исследованные гены представляют собой ген гидрометилбилансинтазы (HMBS, NM_000190), ген 1, связанный с патогенезом GLI (глиома) (GLIPR, NM_006851), ген, связанный с пентраксином, быстро индуцируемый ИД-1 бета (PTX3, NM_002852), ген 2'-5'-олигоаденилатсинтетазы 3 (OAS3, NM_006187), ген белка 44, индуцируемого интерфероном (IFI44, NM_006417), гомолог В вирусного онкогена, связанного с ретикулоэндотелиозом, ген-энхансер ядерного фактора легкой цепи полипептида 3 в В-лимфоцитах (relB, NM_006509) и АТФ-связывающую кассету, подсемейство С (CFTR/MRP), член 3 (MRP3, NM_003786).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В тексте данного описания и формулы изобретения используются различные термины, связанные со способами и другими аспектами настоящего изобретения. Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимает специалист в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя на практике для тестирования настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, схожие или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, предпочтительны материалы и способы, описанные в данном документе. В описании настоящего изобретения и формуле изобретения будет использоваться следующая терминология. Следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания определенных вариантов и не налагает каких-либо ограничений.

Определения:

Согласно использованию в данном описании и приложенной формуле изобретения существительные в единственном числе включают и соответствующее множественное число, если содержание документа ясно не указывает иначе. Таким образом, например, термин «клетка» включает комбинацию двух или более клеток и так далее.

«Примерно», согласно использованию в данном документе, при употреблении в отношении измеряемой величины, такой как количество, длительность или так далее, означает колебания $\pm 20\%$, или $\pm 10\%$, или более предпочтительно $\pm 5\%$, и даже более предпочтительно $\pm 1\%$, и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ от указанной величины, так как такие колебания приемлемы для осуществления описанных способов.

Термины «амплификация», «репликация» и «культивирование» в данном документе

используются взаимозаменяемо и означают общий процесс введения вируса в клеточные культуры или инфицирование клеток вирусов в условиях, обеспечивающих репликацию вируса в клетках в соответствии с методиками, хорошо известными вирусологам и медико-биологам. В частности, эти термины используются в данном документе, для обозначения этапа способа, являющегося предметом изобретения, при котором цитомегаловирус «кондиционируют» путем культивирования в выбранном клеточном типе в качестве этапа, предшествующего использованию кондиционированного цитомегаловируса в получении вакцины.

«Биомолекулы» включают белки, полипептиды, нуклеиновые кислоты, липиды, полисахариды и все фрагменты, аналоги, гомологи, конъюгаты и производные перечисленных соединений.

«Клеточная культура» обычно означает клетки, взятые из живого организма и выращенные при контролируемых условиях («в культуре» или «культивированные»). «Первичная клеточная культура» представляет собой культуру клеток, тканей или органов, взятых непосредственно из организма(ов) до получения первой субкультуры. «Клеточная линия» означает культуру клеток, образованную путем получения одной или нескольких субкультур из первичной клеточной культуры.

«Кодирующий район» гена состоит из остатков нуклеотидов в кодирующей цепи гена и нуклеотидов некодирующей цепи гена, гомологичных или комплементарных соответственно кодирующему району молекулы мРНК, которая получается при транскрипции этого гена.

«Кодирующий район» молекулы мРНК также состоит из остатков нуклеотидов молекулы мРНК, комплементарных району антикодона молекул транспортной РНК в ходе трансляции молекулы мРНК, или кодирующих стоп-кодом. Таким образом, кодирующий район может включать остатки нуклеотидов, соответствующие аминокислотным остаткам, которые отсутствуют в зрелом белке, кодируемом этой молекулой мРНК (например, аминокислотные остатки в последовательности экспорта сигнала белка).

Термины «кондиционированный вирус», «кондиционированный клеточным типом вирус», «кондиционированный цитомегаловирус» или «кондиционированный клеточным типом цитомегаловирус» означает цитомегаловирус, который был культивирован к выбранному клеточному типу до его применения в получении вакцины, согласно способам, описанным в данном документе. Эти термины употребляются как аналоги термина «кондиционированная среда», который описывает питательную среду, в которой выращен определенный клеточный тип или клеточная линия, после чего этот тип или линия были удалены, и которая содержит компоненты или факторы, вырабатываемые клетками, что таким образом меняет функциональные свойства среды. В рамках настоящей заявки термин «кондиционированный вирус» также означает вирус, который культивировали в выбранном клеточном типе и затем отделили от этих клеток, где этот вирус впоследствии проявляет одно или несколько измененных функциональных свойств в результате культивирования в этом клеточном типе.

«Кодирующий» означает естественное свойство определенных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить матрицей для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, при этом «кодирующий» имеет определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК или мРНК) или определенную последовательность аминокислот и биологические свойства, обусловленные этой последовательностью. Таким образом,

ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей данному геному, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. И кодирующую цепь, нуклеотидная последовательность, которой идентична последовательности мРНК и обычно приводится в перечислении последовательностей, и некодирующую цепь, использующуюся как матрица для транскрипции гена или кДНК, можно назвать кодирующей белок или другие продукты данного гена или кДНК. Если не указано иначе, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные

последовательности, являющиеся вырожденными вариантами друг друга и кодирующими одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК, могут включать интроны.

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» употребляются в данном документе взаимозаменяемо, и эти термины означают количество соединения, состава, материала или композиции согласно описанию в данном документе, эффективное для достижения определенного биологического результата. Такие результаты могут включать, но не ограничиваться перечисленным, торможение вирусной инфекции согласно определению каким-либо методом, приемлемым для данной области техники.

Согласно употреблению в данном документе, «эндогенный» означает любой материал из или вырабатываемый в организме, клетке, ткани или системе.

«Экзогенный» означает любой материал, введенный извне или вырабатываемый вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин «экспрессия» согласно употреблению в данном документе означает транскрипцию и (или) трансляцию определенной нуклеотидной последовательности, запускающуюся промотором.

Согласно употреблению в данном документе «иммунизация» или «вакцинация» взаимозаменяемы и применяются в отношении профилактической иммунизации или вакцинации. «Терапевтическая вакцинация» означает вакцинацию пациента с цитомегаловирусной инфекцией.

«Выделенный» означает измененный или извлеченный из естественного состояния. Например, нуклеиновую кислоту или пептид, присутствующий естественным образом у живого животного, не «выделяют», но ту же самую нуклеиновую кислоту или пептид, частично или полностью отделенный от сопутствующих материалов в его естественном состоянии, «выделяют». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в значительно очищенной форме или могут существовать в окружении, отличающемся от естественного, таком как, например, клетка хозяина. Если в данном документе не указано иначе, белки, комплексы вирионов, антитела и другие биологические молекулы, относящиеся к предмету настоящего изобретения, являются выделенными или могут быть выделены.

Термин «пациент», «субъект», «особь» и так далее употребляются в данном документе взаимозаменяемо и означают какое-либо животное или его клетки, *in vitro* или *in situ*, которые можно инфицировать цитомегаловирусом. В некоторых вариантах, не налагающих ограничений, пациент, субъект или особь является человеком.

«Парентеральное» введение иммуногенной композиции или композиция вакцин включает, например, подкожное (п/к), внутривенное (в/в), внутримышечное (в/м) или внутригрудное (в/г) введение или пути введения.

Термин «полинуклеотид» согласно употреблению в данном документе определен

как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты - это полимеры нуклеотидов. Таким образом, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды согласно употреблению в данном документе являются взаимозаменяемыми. Специалист в данной области техники знает, что нуклеиновые кислоты являются полинуклеотидами, которые можно гидролизовать на мономерные «нуклеотиды». Мономерные нуклеотиды можно гидролизовать до нуклеозидов. Согласно употреблению в данном документе полинуклеотиды включают, но не ограничиваются перечисленным, все последовательности нуклеиновых кислот, которые получают любым путем, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленным, рекомбинантные методики, например, клонирование последовательности нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или клеточного генома с использованием методик клонирования или амплификации и им подобным и путем синтеза.

Согласно употреблению в данном документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и означают соединение, состоящее из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должны содержать по крайней мере две аминокислоты, и на максимальное число аминокислот, которые могут входить в белковую или пептидную последовательность, не налагается никаких ограничений. Полипептиды включают любой пептид или белок, состоящий из двух или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Согласно употреблению в данном документе этот термин означает и короткие цепочки, которые также обычно называют пептидами, олигопептидами и олигомерами в данной области техники, например, и длинные цепи, которые в данной области техники обычно называют белками, к которым относится множество типов. «Полипептиды» включают, например, биологически активные варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки, среди прочих. Полипептиды включают естественные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды и комбинации перечисленных.

«Фармацевтически приемлемый» означает те свойства и (или) вещества, которые приемлемы для пациента с фармацевтической и (или) токсикологической точки зрения и для фармацевтического химика, занимающегося производством, с физической и (или) химической точки зрения в отношении композиции, формы выпуска, стабильности, приемлемости для пациента и биодоступности. «Фармацевтически приемлемый носитель» означает среду, которая не влияет на эффективность или биологическую активность активного ингредиента(ов) и не является токсичным для хозяина, которому его вводят.

Термин «разовая упаковка» означает, что компоненты набора физически связаны в или с одной или несколькими емкостями и считаются единицей для производителя, дистрибьютора, продавца или потребителя. Емкости включают, но не ограничиваются перечисленным, пакеты, коробки, флаконы, упаковки в целлофановой оболочке, штемпелированные или прикрепленные другим путем компоненты или комбинации перечисленного. «Разовая упаковка» может также включать виртуальные компоненты. Например, набор может содержать краткие физические инструкции, имеющиеся в физической упаковке, и инструкции по доступу к более подробным инструкциям из виртуальной среды, такой как, например, Интернет-сайт.

Термин «терапевтический» согласно употреблению в данном документе означает лечение и (или) профилактику. Терапевтический эффект получают путем избежания, отсрочки, подавления, ремиссии или излечения патологического состояния, связанного

с цитомегаловирусной инфекцией.

Термин «лечение» согласно употреблению в контексте настоящего изобретения означает терапевтическое вмешательство, а также профилактические или сдерживающие меры в отношении заболевания или нарушения. Таким образом, например, термин «лечение» включает введение какого-либо агента до начала или после начала какого-либо заболевания или нарушения, что тем самым предупреждает или устраняет все симптомы заболевания или нарушения. В качестве другого примера введение этого агента после появления клинических проявлений заболевания для устранения симптомов включает «лечение» этого заболевания. Оно включает, например, предупреждение распространения цитомегаловируса в неинфицированных клетках организма. Фраза «подавление цитомегаловирусной инфекции» иногда используется в данном документе и означает метод, который включает снижение уровня инфекции у пациента цитомегаловирусом, как определяют средствами, известными врачам.

Описание:

Цитомегаловирус инфицирует множество клеточных типов *in vivo*, включая эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты. Как суммировано выше в материале о предпосылках, в различных исследованиях сообщается, что вирус сливается с плазматическими мембранами фибробластов, но проникает в клетки пигментного эпителия сетчатки и эндотелиальные клетки пупочной вены путем эндоцитоза. Из-за относительной простоты культивирования цитомегаловируса в культуре фибробластов по сравнению с культурами эпителиальных или эндотелиальных клеток исследования, такие как суммированные выше, проведены с использованием штаммов цитомегаловируса, культивированного в фибробластах. Также культура фибробластов - типичный наилучший клеточный тип для культивирования цитомегаловируса для клинических целей, таких как получение аттенуированных штаммов вируса для вакцин.

На сегодняшний день в соответствии с настоящим изобретением установлено, что клеточный тип, в котором образуются частицы цитомегаловируса, существенно влияет на поведение последующих циклов инфекции. Так, например, хотя выше указано, что цитомегаловирус проникает в эпителиальные клетки путем эндоцитоза, авторы настоящего изобретения продемонстрировали этот путь проникновения цитомегаловируса, культивированного в фибробластах, но не цитомегаловируса, выращенного в культуре эпителиальных клеток. Цитомегаловирус, выращенный в эпителиальных клетках, проникает в эпителиальные клетки преимущественно путем слияния с плазматической мембраной. Такой особый путь проникновения влечет ряд физиологических последствий: он влияет на кинетику, с которой распространяется инфекция, и значительно влияет на клеточный ответ на инфекцию. Например, вирус, выращенный в эпителиальных клетках, вызывает резко сниженный клеточный ответ по сравнению с клетками, инфицированными вирусом, выращенным в фибробластах. Многие клеточные противовирусные гены, экспрессирующиеся после инфекции вирусом, выращенным в фибробластах, не экспрессируются после инфекции, вызванной вирусом, выращенным в эпителиальных клетках. В результате цитомегаловирус, выращенный в эпителиальных клетках, должен теоретически вести себя иначе, чем вакцина, произведенная из цитомегаловируса, выращенного в фибробластах, что предлагает новый и неожиданный источник диверсификации в получении вакцины против цитомегаловируса. Аналогично культивирование цитомегаловируса в других клеточных типах, таких как эндотелиальные клетки или специализированные

клеточные типы, которые цитомегаловирус способен инфицировать (например, нейроны, другие клетки центральной или периферической нервной системы, гладкомышечные клетки, гепатоциты, стромальные клетки, макрофаги или дендритные клетки), должно давать дополнительные новые источники

5 диверсификации в получении вакцины против цитомегаловируса.

Итак, один аспект настоящего изобретения относится к способам получения вакцин против цитомегаловируса, где используется вариабельность, связанная с выбором клеточного типа, в котором предстоит культивировать вирус. Второй аспект

10 относится к набору для осуществления вышеописанных способов. Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции вакцин для профилактики или лечения цитомегаловирусной инфекции и способам иммунизации особи с использованием таких композиций. Различные варианты этих аспектов настоящего изобретения изложены ниже.

15 Способы получения вакцин против цитомегаловируса:

Эти способы согласно одному аспекту настоящего изобретения включают: 1) получение штамма или изолята цитомегаловируса; 2) культивирование этого штамма или изолята в клеточной культуре выбранного клеточного типа, и 3) извлечение

20 вирионов цитомегаловируса, полученного путем выращивания в этом клеточном типе (называемом в данном документе как «кондиционированный клеточным типом цитомегаловирус») для использования в получении вакцины против цитомегаловируса.

Клеточный тип, выбранный для культивирования цитомегаловируса до его использования в получении вакцины, может быть любой клеточной линией, восприимчивой к цитомегаловирусной инфекции и продуцирующей какое-либо количество вирусных частиц. Эти вирусные частицы могут быть

25 высокоинфекционными в некоторых анализах, или эти частицы могут проявлять низкую инфективность или не проявлять инфективность вовсе во многих анализах.

Подходящие клеточные типы включают, но не ограничиваются перечисленным: 1) линии эпителиальных клеток, такие как ARPE-19, которая приведена в данном документе в качестве примера, и другие линии пигментного эпителия сетчатки, например, линия эпителиальных клеток K-1034 (Ando, Y. et al. 1997, Arch. Virol. 142(8): 1645-1658); HCMC - производное нормальной слизистой толстой кишки

30 человека (Smith, JD, 1986, J Virol. 60(2): 583-588); клетки кишечного эпителия Caco-2 (Esclatine. A., et al.. 2000, J. of Virol. 74 (1): 513-51); SW480, HCT1 16, HeLa, H 1299 и MCF-7 (в отношении последних пяти см. Wang. D. & T. Shenk, 2005. J.Virol. 79: 10330); 2) линии эндотелиальных клеток, такие как HMEC-I - линия эндотелиальных клеток

40 микрососудов человека, иммортализованных с помощью большого Т-антигена вируса SV-40 (Guetta. E. et al., 2001, Cardiovascular Research 50: 538-546); HUVEC и LMVEC (в отношении последних- двух см. Wang. D. & T. Shenk, 2005, J. Virol. 79: 10330); 3) нейроны, такие как SK-N-SH, SK-N-AS и IMR-32 (см. Wang, D. & T. Shenk, 2005. J. Virol. 79: 10330), а также первичные эпителиальные, эндотелиальные,

45 гладкомышечные клетки, макрофаги и дендритные клетки - производные различных тканей и органов.

Любой цитомегаловирус или комбинация цитомегаловирусов, приемлемая для разработки в качестве вакцины, пригодны для использования как источник

50 цитомегаловируса для данного способа постольку, поскольку их можно культивировать по крайней мере в одном выбранном клеточном типе. В одном варианте цитомегаловирус является человеческим цитомегаловирусом, или изолятом, которые был выделен ранее и охарактеризован, или новым изолятом человеческого

цитомегаловируса, или вирусом, подобным человеческого цитомегаловирусу. В другом варианте цитомегаловирус происходит от другого примата, включая, но не ограничиваясь перечисленным, шимпанзе (Davison, AJ et al. 2003, J. Gen. Virol. 84: 17-28) и макак-резус (Hansen. SG et al. 2003. J. Virol. 77:6620-36; Rivailler. P et al. 2006.

J. Virol. 80:4179-82). Этот цитомегаловирус может быть немодифицированным вирусом из выбранного источника, или он может быть химерным вирусом, полученным путем генетической модификации элементов двух или больше различных штаммов или изолятов цитомегаловируса.

Методики получения химерных вирусов известны в данной области техники. В этом отношении по крайней мере шесть штаммов человеческого цитомегаловируса клонированы как инфекционные бактериальные искусственные хромосомы (БИХ) и секвенированы (Murphy. E et al. 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 14976-14981.

Последовательности БИХ имеются в Банке генов под входящими номерами AC146999 (лабораторный штамм AD169, из которого получен вариант BADrUL131, описанный в данном документе); AC146851 (лабораторный штамм Towne); AC146904 (клинический изолят PH); AC146905 (подобный клиническому изоляту Toledo); AC 146906 (клинический изолят TR); и AC146907 (клинический изолят FIX). По крайней мере два

штамма человеческого цитомегаловируса секвенированы без предварительного клонирования в БИХ и имеются в Банке генов под входящими номерами BK000394 (лабораторный штамм AD 169) и AY446894 (клинический изолят Merlin). Весь геном штамма цитомегаловируса шимпанзе имеется в Банке генов под входящим номером AF480884. Также имеется геномная последовательность двух штаммов цитомегаловируса макак-резус (входящие номера AY186194 и DQ205516). Используя идеи, изложенные в настоящей заявке, специалист в данной области техники сможет использовать любую из вышеупомянутых последовательностей, или любую другую общедоступную последовательность цитомегаловируса для получения химерных цитомегаловирусов или цитомегаловируса, измененного каким-либо генетическим путем.

В соответствии с настоящим изобретением продемонстрировано, что лабораторные, штаммы цитомегаловируса, которые были многократно перевиты в фибробластах, можно успешно кондиционировать путем культивирования в выбранной клеточной линии. Например, как описано в примере в данном документе, BADrUL131 - БИХ-клон многократного перевитого штамма человеческого цитомегаловируса AD169, в котором изменен UL1310RF - введен путем электропорации в культуру фибробластов крайней плотности человека, и полученный вирус был амплифицирован однократно в линии эпителиальных клеток ARPE-19. Таким образом, различные варианты настоящего изобретения включают использование цитомегаловируса (или геномов цитомегаловируса), перевитых в клеточных типах, отличающихся от клеточного типа, выбранного для этапа кондиционирования. Например, штамм цитомегаловируса может быть многократно перевит в фибробластах, затем амплифицирован в эпителиальных клетках и впоследствии использован для получения вакцины. Понятно, что этот цитомегаловирус может быть амплифицирован и (или) культивирован на протяжении одного или нескольких циклов в выбранном клеточном типе.

В предпочтительных вариантах способы настоящего изобретения используются для получения живого аттенуированного цитомегаловируса для применения в качестве вакцины. Методики аттенуирования вирусов известны в данной области техники. Предпочтительно, чтобы аттенуированный цитомегаловирус проявлял сниженную

способность к инфективности, и (или) патогенности, включая латентное действие и активацию, но оставался способным вызывать иммунный ответ, который оказывает терапевтический эффект или защищает от цитомегаловирусной инфекции. Примеры аттенуированных штаммов цитомегаловирусов включают, но не ограничиваются

5 перечисленным, лабораторные штаммы, такие как AD169 и Towne, которые реплицируются практически только в фибробластах. Такие аттенуированные штаммы, которые создают генно-инженерными методами при необходимости, если требуется получить нужный поверхностный белок или белковые комплексы для

10 соответствующего тропизма, можно культивировать в эпителиальных клетках или фибробластах и впоследствии в эпителиальных клетках, как обсуждено выше, для использования в композиции вакцин настоящего изобретения.

Для аттенуирования цитомегаловируса можно использовать серийный пассаж в клеточных культурах, особенно в фибробластах. Многократный пассаж

15 инфицированных вирусом клеток хозяина проводят *in vitro* до тех пор, пока не будет достигнуто нужное аттенуирование вируса. Пассаж можно проводить при определенных параметрах внешней среды, таких как регулируемая температура, pH или влажность, чтобы выбрать вирусы со сниженной инфективностью или

20 патогенностью. Если используется такая методика аттенуирования, серийно перевитый вирус затем амплифицируют в выбранном клеточном типе на протяжении одного или нескольких пассажей для получения цитомегаловируса, предназначенного для применения в композиции вакцин настоящего изобретения.

Для аттенуирования вируса также можно использовать мутагенез. Например,

25 вирионы цитомегаловируса можно подвергнуть воздействию ультрафиолетового или ионизирующего излучения или химических мутагенов в соответствии с методиками, известными в данной области техники. Кроме их использования для получения химерных вирусов, рекомбинантные методики также можно применять для получения

30 вирионов аттенуированного цитомегаловируса. Например, для получения штаммов со сниженной инфективностью, патогенностью или латентностью можно использовать такие методики, как сайт-специфический мутагенез, замена гена или выключение гена. Пример модификации цитомегаловируса путем мутагенеза с выключением гена изложен в патенте WO/2007/038316, где описаны цитомегаловирусы с геномами с

35 делецией одного или нескольких генов, обуславливающих латентность, что проявляется в измененной способности проникать в клетку или поддерживать латентное состояние.

В других вариантах цитомегаловирусы, выделенные из выбранных клеточных культур, являются инактивированными или убитыми и используются в композиция

40 вакцин. Методики инактивации или получения убитых вирусов, например, с помощью таких химических соединений как формалин, хорошо известны в данной области техники. Специалисту в данной области техники будет понятно, что этот убитый или инактивированный цитомегаловирус будет состоять из всех или большей доли

45 компонентов вирусной частицы так, что в композиции вакцины за счет амплификации в выбранном клеточном типе будет поддерживаться диверсификация.

Способы настоящего изобретения можно использовать для создания комбинаций цитомегаловирусов, культивирующихся в различных выбранных клеточных типах,

50 таким образом обеспечивая дополнительную степень диверсификации производящимся вакцинам. В одном варианте для инфицирования одной или нескольких различных линий клеточных культур различных клеточных типов, например, клеток эпителия сетчатки и эндотелиальных клеток, используется один

изолят или штамм цитомегаловируса. Цитомегаловирус, полученный путем амплификации в соответствующих клеточных типах, затем комбинируют для использования в одной вакцине. В другом варианте, два или больше различных клинических изолята или штамма цитомегаловируса используют для инфицирования одной выбранной клеточной линии, и популяцию из множества штаммов или изолятов цитомегаловируса, полученную путем амплификации в этом клеточном типе, используют для получения вакцины. Еще в одном варианте для инфицирования двух и больше различных линий клеточных культур различных клеточных типов используются множественные изоляты или штаммы, и популяцию цитомегаловирусов, полученную путем амплификации в соответствующих клеточных типах, комбинируют для использования в этой вакцине.

Другой аспект настоящего изобретения относится к наборам для получения материалов вакцины против цитомегаловируса согласно вышеописанным способам. Эти наборы помещены в отдельные емкости в единице упаковки или в отдельных емкостях в виртуальной упаковке, согласно пути применения и компонентам набора, порциям клеточных линий одного или нескольких выбранных клеточных типов, а также одного или нескольких изолятов или штаммов цитомегаловируса, или векторов, несущих геномы таких штаммов цитомегаловируса, для введения и амплификации в выбранных культурах клеточных линий. Такие наборы также обычно содержат инструкции, или ссылки на инструкции, как осуществлять различные этапы данного способа. По желанию заказчика наборы также могут включать питательную среду и другие реагенты, пригодные для культивирования клеток и других манипуляций с вирусом.

Композиции вакцины и способы применения:

Другой аспект настоящего изобретения относится к иммуногенной композиции (именуемой в данном документе взаимозаменяемо композицией вакцины), состоящей из популяции цитомегаловируса или компонентов его вириона, смешанной с соответствующим фармацевтическим носителем или адъювантом, где цитомегаловирус получают путем культивирования в выбранном клеточном типе, например, культуре эпителиальных клеток. Как упомянуто выше, вакцины против цитомегаловируса прежде производили с использованием цитомегаловируса, культивированного в фибробластах. Однако в соответствии с настоящим изобретением продемонстрировано, что культивирование в эпителиальных клетках дает вирус, который отличается от вируса, культивированного в фибробластах, во многих отношениях. Вирус, полученный в эпителиальных клетках, преимущественно сливается с плазматической мембраной, в то время как вирус, культивированный в фибробластах, проникает путем эндоцитоза, опосредованного рецептором. Кроме того, вирионы, полученные в эпителиальных клетках, обладают более выраженной активностью в отношении слияния клеток хозяина без репликации вируса, чем частицы, полученные в фибробластах, что влияет на кинетику инфекции. Кроме того, две разновидности вируса запускают разные клеточные сигнальные ответы, о чем свидетельствуют различные изменения профиля транскрипции в инфицированных эпителиальных клетках.

В частности, цитомегаловирус, полученный путем культивирования в эпителиальных клетках, обладает одним или несколькими из следующих свойств по сравнению с эквивалентным штаммом или изолятом вируса, полученного путем культивирования в фибробластах. Во-первых, как упомянуто выше, их можно отличить по проникновению клетки хозяина путем слияния с плазматическими

мембранами клетки хозяина. Цитомегаловирус, полученный в эпителиальных клетках, также вызывает более выраженное слияние клеток хозяина, опосредованное вирионом, по сравнению с эквивалентной популяцией цитомегаловируса, выделенной из культуры фибробластов, а также более быструю репликацию в клетках хозяина по сравнению с эквивалентной популяцией цитомегаловируса, выделенной из культуры фибробластов. Кроме того, этот вирус вызывает менее выраженный клеточный ответ по сравнению с эквивалентным цитомегаловирусом, выращенным в фибробластах. Через 10 ч после инфекции примерно на две трети меньше генов (-50 против -150 генов) проявляет 2,5-кратное или больше изменение уровня экспрессии. Кроме того, цитомегаловирус, выращенный в эпителиальных клетках, можно охарактеризовать определенным профилем генов хозяина, чья экспрессия после инфекции изменяется (увеличивается или уменьшается). Такие профили экспрессии генов приведены в примере и могут включать изменение экспрессии одного или нескольких генов, представленных в Банке генов под входящими номерами: AK094860, NM_145023, NM-133492, NM_001039580, NM_001004301, NM-001034, A1369525, AK123066, NM_005345, NM_020731, BC071797, NM-003414, NM_000800, NM_138467, AK090803, AL133118, NM-00165, BG001037, NM_024861, NM-001043, NM-016239, NM-001018084, NM-001037442, NM-017600, NM_022097, NM-175868, NM_032266, NM_003841, NM_005039, NM_04505 1, NM_004294, AW856073, NM_024050, AF085968, NM-080927, NM_022115, AK056703, NM_000808, NM-012377, NM_006793, NM_031466, NM_005185, NM-139173, BX360933, NM-016125, NM_002104, NM-032188, NM_004185, NM-004843 или NM-173550.

В этом, аспекте, как и в предшествующих аспектах настоящего изобретения, цитомегаловирус или комбинация цитомегаловирусов, пригодных для разработки в качестве вакцины, подходят для использования в качестве источника вышеупомянутой популяции цитомегаловируса постольку, поскольку их можно вырастить по крайней мере в одной линии эпителиальных клеток или другом выбранном клеточном типе. В одном варианте цитомегаловирус является человеческим цитомегаловирусом или вирусом, подобным человеческому цитомегаловирусу. В другом варианте цитомегаловирус происходит от другого примата, включая, но не ограничиваясь перечисленным, шимпанзе и макаком-резус, как описано выше. Цитомегаловирус может быть немодифицированным из выбранного источника, или он может быть химерным вирусом, полученным путем генетической модификации или комбинации элементов двух или больше различных штаммов или изолятов цитомегаловирусов, как описано выше.

В предпочтительных вариантах композиция вакцин включает живой аттенуированный цитомегаловирус, который можно получить способами, описанными выше, все из которых известны специалисту в данной области техники. В других вариантах цитомегаловирус, выделенный из выбранных клеточных культур, является инактивированным или убитым и используются в композиции вакцины.

Композиция вакцины может включать комбинации различных штаммов или изолятов цитомегаловируса, который можно культивировать в одной культуре эпителиальных клеток или в нескольких различных культурах эпителиальных клеток, или в клетках другого клеточного типа, для обеспечения дополнительной диверсификации.

Кроме того, живой аттенуированный цитомегаловирус можно комбинировать с убитым или инактивированным цитомегаловирусом, или с иммуногенными компонентами цитомегаловируса для получения комбинации вакцины, например, живого аттенуированного цитомегаловируса, комбинированного с убитым высокой

температурой цитомегаловирусом, или комбинированного с материалом для субъединицы вакцин, или комбинации всех трех типов материалов. Примеры иммуногенных полипептидов цитомегаловируса и комплексов, пригодных для субъединицы вакцин, описаны в WO 2007/146024 под названием «Комплекс

5 поверхностных белков цитомегаловируса для использования в вакцинах и в качестве мишени для лекарственных средств».

Кроме того, композиция вакцины может включать один или несколько адъювантов. Адъювантом может быть любое вещество, усиливающее иммунный

10 ответ на антигены вакцины. Примеры адъювантов, пригодных для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, адъювант Фройнда, неполный адъювант Фройнда, сапонин, сурфактанты, такие как гексадециламин, октадециламин, лизолецитин, деметилдийодактадецил-аммония бромид, N,N-диоктадецил-N'-N-бис(2-гидроксиэтилпропандиамин), метоксигекса-

15 децил-глицерин, плуроновые полиолы, полианионы, такие как пиран, диэтиламиноэтил (ДЭАЭ) декстран, декстран-сульфат, полибрен, полиинозиновая полицитидиловая кислота, полиакриловая кислота, карбопол, этиленмалеиновая кислота, гидроксид алюминия, и алюминий-фосфатные пептиды, масляные или

20 углеводородные эмульсии и им подобные.

Вакцины можно выпускать в виде водных растворов, таких как водные или спиртовые, или в физиологически совместимых буферных растворах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор, включая фосфатный

25 буфер. Также вакцины можно выпускать в виде твердых форм, которые предназначены для превращения непосредственно перед применением в жидкие формы, пригодные для введения субъекту, например, путем разведения соответствующим наполнителем, таким как стерильная вода, солевой раствор или спирт.

Композиции вакцин также можно выпускать с использованием наполнителей, обеспечивающих пролонгированное высвобождение, или в виде депо-форм. Такие пролонгированные формы можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Так, например, вакцины

30 можно выпускать вместе с соответствующими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в соответствующем масле) или ионообменными смолами, или в виде трудно растворимых производных, например, в виде трудно растворимых солей. Липосомы и эмульсии можно использовать в качестве носителей, пригодных для применения с гидрофобными формами.

35 Наполнители пролонгированного действия в зависимости от своей химической природы могут высвобождать антигены на протяжении периода от нескольких часов до нескольких суток и до нескольких недель или нескольких месяцев.

Композиции вакцины могут также включать один или несколько антиоксидантов. Примеры восстанавливающих агентов включают меркаптопропионилглицин, N-

45 ацетилцистеин, β-меркаптоэтиламин, глутатион, аскорбиновую кислоту и ее соли, сульфит или метабисульфит натрия и подобные соединения. В дополнительные антиоксиданты также могут быть включены натуральные антиоксиданты, такие как витамин Е, С, лютеин, ксантин, бета-каротин и минералы, такие как цинк и селен.

Композиции вакцин могут также включать дополнительные вещества, действующие как стабилизаторы, консерванты, буферы, увлажняющие агенты, эмульсифицирующие агенты, диспергирующие агенты и моносахариды, полисахариды и соли для контроля осмотического равновесия. Эти вакцины могут также дополнительно включать

50

молекулы иммуностимуляторов для усиления эффективности вакцины. Такие молекулы могут усиливать иммунный ответ, могут вызывать воспаление и могут быть каким-либо лимфокином или цитокином. Примеры цитокинов включают, но не ограничиваются перечисленным, интерлейкин (ИЛ) 1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-12, ИЛ-13, колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (КСФГМ), макрофагальный воспалительный фактор и им подобные.

Вакцины можно выпускать для и вводить путем инфузий или инъекций (внутривенно, внутриаартериально, внутримышечно, внутрикочно, подкожно, интратекально, интрадуоденально, интраперитонеально и тому подобное). Вакцины также можно вводить интраназально, вагинально, ректально, внутрь, местно, для введения на слизистую щеки, на слизистую или трансдермально.

Эффективную дозу антигена для лечения цитомегаловирусной инфекции можно определить эмпирически, с помощью методик, хорошо известных в данной области техники. Эффективная доза вакцины может зависеть от ряда показателей, включая, но не ограничиваясь перечисленным, размер, рост, вес, возраст, пол, общее состояние здоровья субъекта, тип формы выпуска, путь или методику введения, является ли вирус активным или латентным, страдает ли пациент вторичными инфекциями или другими сопутствующими заболеваниями.

Схемы применения вакцин тоже могут быть основаны на вышеупомянутых факторах. Вакцинацию можно проводить в любое время в течение жизни субъекта, от развития плода до взрослого состояния включительно. Для полной защиты может потребоваться дополнительное введение, или бустеры. Чтобы определить, достигнут ли достаточный уровень иммунной защиты, у пациента после вакцинации можно следить за сероконверсией и титром антител.

Следующий пример приведен для более подробного описания настоящего изобретения. Он предназначен для иллюстрации настоящего изобретения, но не налагает каких-либо ограничений.

ПРИМЕР

Человеческий цитомегаловирус использует два разных пути для проникновения в клетки пигментного эпителия сетчатки

Экспериментальные результаты, описанные в данном примере, демонстрируют, что человеческий цитомегаловирус, полученный в двух различных клеточных типах, проникает в эпителиальные клетки различными путями. Вирионы, образовавшиеся в эпителиальных клетках, проникают преимущественно путем слияния с плазматической мембраной, в то время как вирионы из фибробластов проникают путем рН-зависимого эндоцитоза. Эти две разновидности вируса вызывают существенно различающиеся клеточные ответы.

Материалы и методы

Биологические реагенты. Фибробласты крайней плоти человека (ФКПЧ) при пассаже от 10 до 15 раз держали в среде с 10% сывороткой новорожденного теленка. Фибробласты легких человеческого плода MRC-5 и клетки пигментного эпителия сетчатки ARPE-19 (Американская коллекция типов культур) при пассаже от 24 до 34 раз держали в среде с 10% сыворотки плода коровы. Клетки эпителия проксимальных почечных канальцев человека (чКЭППК) (Cambrex) выращивали в среде с 10% сыворотки плода коровы и использовали при пассаже от 4 до 5.

BADwt является производным БИХ-клона штамма человеческого цитомегаловируса AD169; BADrUL131 (19, 21) является производным BADwt, в котором изменен UL1310RF; BFXwt является производным БИХ-клона клинического

изолята человеческого цитомегаловируса VR1814. Вирусы готовили путем электропорации ДНК БИХ в ФКПЧ, и полученный вирус амплифицировали однократно в клетках ARPE-19 или ФКПЧ, если не указано иначе. Вирионы, не содержащие клеток, частично очищали путем центрифугирования через сорбитоловую прокладку и вновь взвешивали в бессывороточной среде. Титры вируса определяли с помощью анализа на плашке на клетках MRC-5. Нейтрализацию BADrUL131 оценивали с помощью анализа с восстановлением на плашке (19) с использованием очищенного моноклонального антитела к pUL130 (19).

Моноклональное антитело к IE1 IB12 описано ранее (21). Кроличье поликлональное антитело к Sp100 (Chemicon) использовали для визуализации ND10.

Электронная микроскопия. Клетки ARPE-19 подвергали воздействию вируса при 4°C в течение 1 ч, не связанный вирус удаляли двукратным промыванием холодным фосфатным буфером, добавляли питательную среду на 15 мин (37°C), клетки промывали фосфатным буфером, фиксировали и готовили для электронной микроскопии и просматривали под микроскопом FEI Tecnai-T12 при 80 кВ.

Анализ зависимости инфекции от окисления эндосом. Клетки ARPE-19 предварительно обрабатывали NH₄G или бафломицином A1 (БФА) Sigma) в течение 1 ч при 37°C, после чего через 16 ч инфицировали в присутствии ингибитора, культуры фиксировали в 2% формальдегиде и пермеабелизировали 0,1% Triton X-100. IE1 идентифицировали с помощью иммунофлуоресценции с использованием моноклонального антитела IB12 (21) и дополнительного антитела, конъюгированного с Alexa 546, и окрашивали ядра с помощью 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорида. Торможение рассчитывали в виде процента экспрессии IE1 в обработанных клетках относительно необработанных.

Анализ активности слияния белков вириона. Для анализа слияния клеток без репликации вируса клетки ARPE-19 выращивали до 90% слияния и инфицировали. Через 1 ч при 37°C инокулом удаляли, и добавляли среду, содержащую 200 мкг/мл фосфономуравьиной кислоты (ФМК), для торможения синтеза вирусной ДНК. Слияние отслеживали визуально, оценивая образование синцития.

Анализ с репортером люциферазой адаптировали для количественного анализа активности слияния вирионов. Репортерные и эффекторные клетки ARPE-19 готовили путем электропорации (90-95% эффективность) с использованием плазмиды, несущей ген люциферазы, регулируемый промотором T7, и плазмиды с полимеразой pCDNA3-17 соответственно. К 24 ч после инфицирования клетки смешивали в соотношении 1:1 и инкубировали при 37°C на протяжении еще 16 ч. Затем на смешанную популяцию воздействовали вирионами человеческого цитомегаловируса при 4°C в течение 1 ч, после чего монослой отмывали дважды холодным фосфатным буфером, а затем добавляли буферные растворы (фосфатный буфер с 10 мМоль 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты и 10 мМоль HEPES) до конечного pH в диапазоне от 4,5 до 8. Через 3 мин при 37°C буферные растворы удаляли и добавляли обычную питательную среду. Через 6 ч после инфицирования клетки лизировали и измеряли активность люциферазы с использованием люциферазной репортерной системы (Promega).

Анализ клеточных транскрипционных ответов. Слившиеся клетки ARPE-19 держали на бессывороточной среде на протяжении 24 ч, после чего проводили симуляцию инфицирования и настоящее инфицирование. Всю РНК экстрагировали через 6 или - 10 ч после инфицирования с использованием Тризола (Invitrogen) и очищали с помощью колонки RNeasy (Qiagen). Образцы РНК амплифицировали и метили (цианин-3) с

использованием набора Agilent для линейной амплификации флуоресценции при низком содержании РНК. Для учета вариабельности чипов метили (цианин-5) контрольную РНК (Clontech) и когибридизовали с зондами, приготовленными из клеток, подвергнутых симуляции инфицирования или инфицированных человеческим цитомегаловирусом. Гибридизацию проводили в двух копиях с наборами олигонуклеотидов Aligent human 44K. Наборы сканировали с использованием сканера Agilent с разрешением 5 микрон и изображения анализировали с помощью программы Agilent Feature Extraction для определения интенсивностей сигналов флуоресценции гибридизованных пятен и вычитания фона. Для нормализации и количественного определения относительных изменений РНК использовали программу Agilent GeneSpring GX.

Результаты

Вирионы, полученные в фибробластах, активируют немедленную-раннюю экспрессию генов в клетках ARPE-19 с кинетикой более медленной, чем вирионы, полученные в эпителиальных клетках. Штамм человеческого цитомегаловируса AD169 (BADwt) плохо реплицируется в эпителиальных клетках ARPE-19 из-за мутации в гене UL131 (10, 21). Репарация мутации в AD169 с получением BADrUL131 восстанавливает тропизм к эпителиальным клеткам (21), что обеспечивает выработку гликопротеинового комплекса вириона gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131, который требуется для успешного проникновения в эти клетки (19, 20).

BADrUL131, выращенный в эпителиальных клетках ARPE-19 (epiBADrUL131), запускает свою программу экспрессии генов в эпителиальных клетках быстрее, чем BADrUL131, выращенный в фибробластах КПЧ (fibroBADrUL131) (фиг.1А). Когда клетки ARPE-19 инфицировали epiBADrUL131, 17% клеток вырабатывали измеряемый белок IE1 через 6 ч после инфицирования. Выработка IE1 сопровождалась разрушением ND10 в ядре. В то же время инфицирование fibroBADrUL131 приводило к выработке IE1 только в 2,8% клеток ARPE-19 через 6 ч после инфицирования. Однако число вырабатывающих IE1 клеток со временем увеличивалось. Статистически значимых различий в проценте клеток ARPE-19, вырабатывающих IE1, через 24 ч после инфицирования вирусом, выращенным в двух клеточных типах, не отмечалось (фиг.1 В).

Вирионы, полученные из ФКПЧ, в отличие от вирионов, полученных в клетках ARPE-19, проникают в клетки ARPE-19 разными путями. Электронная микроскопия проникновения вируса проведена с тем, чтобы определить, являются ли различия кинетики накопления IE1 в случае вируса, выращенного в клетках ARPE-19, и вируса, выращенного в ФКПЧ, следствием некоего события, предшествующего началу экспрессии вирусных генов. Клетки ARPE-19, инкубированные с epiBADrUL131 или fibroBADrUL131, оставляли при 4°C, чтобы произошло прикрепление вируса к клеточной поверхности, а затем культуры помещали на 15 мин при 37°C, чтобы обеспечить интернализацию до подготовки к электронной микроскопии. В каждом образце исследовали 40-50 клеток, при этом по крайней мере в 90% клеток визуализировали целые вирионы или капсиды. Число вирусных частиц в каждой клетке колебалось от 2 до 8, при этом большинство клеток содержали 2-3 частицы.

В клетках ARPE-19, инфицированных epiBADrUL131, вирионы обнаруживались почти исключительно на клеточной поверхности, при этом 97% вирионов находились на апикальной мембране. Некоторые частицы располагались близко к клеткам, но на этом срезе признаков контакта не выявлено (фиг.2А, блок а), а другие визуализированы в процессе слияния с плазматической мембраной (фиг.2А, блоки b и

с). Капсиды рядом с внутренней поверхностью мембраны наблюдали редко; на самом деле обнаружено только два примера (фиг.2А, блоки d и e). Внутри клеток не обнаружено ни одного вириона в оболочке. Этот результат указывает, что еpiBADrUL131 проникает в клетки ARPE-19 путем слияния с плазматической мембраной. И наоборот, клетки, инфицированные fibroBADrUL131, содержали вирионы на клеточной мембране (65% от общего числа) и внутри клетки в везикулах (35% от общего числа) (фиг.2 В). Частицы внутри пузырьков были в оболочке, что указывало на их путь проникновения - эндоцитоз.

Также исследовано проникновение клинического изолята BFXwt, выращенного в фибробластах. Этот клинический изолят накапливался в везикулах в клетках ARPE-19 (фиг.2С), что свидетельствовало в пользу BADrUL131 в качестве модели проникновения в клетку клинического изолята человеческого цитомегаловируса.

Инфицирование клеток ARPE-19 вирусом, выращенным в фибробластах, но не в эпителиальных клетках, зависит от pH. Многие вирусы, которые проникают в клетку путем эндоцитоза (1, 4, 10), требуют окисления эндосом для того, чтобы оболочка вириона слилась с эндосомальной мембраной и высвободила капсид в цитоплазму. NH₄Cl, который забуферивает эндосомальный pH, и бафломицин А1 (БФА), который блокирует эндосомальный АТФазный протонный насос, исследованы на предмет их влияния на инфицирование клеток ARPE-19. После предварительной обработки тем или другим агентом клетки инфицировали и культивировали в среде, содержащей лекарственное средство, на протяжении дополнительных 16 ч. Успешное инфицирование оценивали количественно по числу IE1-положительных клеток. В соответствии с вышеописанным ультраструктурным анализом предварительная обработка тем или иным агентов оказывала лишь умеренный эффект на инфицирование еpiBADrUL131 (фиг.3А). В то же время оба агента тормозили выработку IE1 после инфицирования fibroBADrUL131 доза-зависимым образом, что указывало на зависимость проникновения вируса, выращенного в фибробластах, от окисления эндосом. Тот факт, что эти агенты слабо влияли на проникновение еpiBADrUL131, указывает, что торможение fibroBADrUL131 не является результатом токсического действия.

Затем было исследовано, проявляет ли вирус, выращенный в других типах эпителиальных клеток и фибробластах, те же самые свойства, что и вирионы, полученные в клетках ARPE-19 и ФКПЧ. Для инфицирования клеток ARPE-19 после обработки NH₄Cl или БФА использовали готовые вирусы из эпителиальных клеток чКЭППК и фибробластов MRC-5, и в этих клетках эффект ингибиторов оказался точно таким же, как в случае вируса, выращенного в клетках ARPE-19 или ФКПЧ (фиг.3В, левый блок). Таким образом, BADrUL131, полученные в двух различных типах фибробластов, оказались гораздо более чувствительными к ингибиторам, чем вирус, выращенный в двух различных линиях эпителиальных клеток.

Также исследовано влияние pH эндосом на проникновение клинического изолята BFXwt в клетки ARPE-19 (фиг.3В, правый блок). NH₄Cl или БФА существенно снижали число IE1 - положительных клеток ARPE-19, полученных с использованием BFXwt, выращенного в фибробластах, но после инфицирования BFXwt, выращенного в эпителиальных клетках, отмечено лишь слабое торможение.

Вирионы, полученные в эпителиальных клетках, обладают более выраженной активностью слияния, чем вирионы, полученные в фибробластах. Как и в случае других герпесвирусов, клинические изоляты стимулируют слияние клеток между

собой, что можно выявить уже через 3-5 ч после инфицирования. Быстрое образование синцития без синтеза новых белков вирусной оболочки указывает, что этот процесс запускается слиянием клеток без репликации вируса, когда вирионы в оболочке прямо стимулируют слияние клеток-мишеней. Поскольку BADrUL131, выращенные в

5 эпителиальных клетках против фибробластов, проникают в эпителиальные клетки разными путями, исследована возможность, что эти будут проявлять различную активность слияния клеток без репликации вируса.

Клетки ARPE-19, подвергнутые симуляции инфицирования, не проявляли признаков

10 образования синцития (фиг.4А), и синцитий редко обнаруживался после инфицирования fibroBADrUL131 (фиг.4В). Наоборот, после инфицирования еpiBADrUL131, слияние клеток между собой выявлялось уже через 6 ч после инфицирования, и 20-30% ядер агрегировались в синцитии к 24 ч после

15 инфицирования (фиг.4С). Клетки обрабатывали БФА, который блокирует прогрессирование до поздней стадии инфекции, поэтому слияние, должно быть, являлось результатом воздействия частиц еpiBADrUL131 и не вновь образованных белков вириона.

Анализ с репортером люциферазой использовали для количественной оценки

20 активности слияния вирусных частиц, а также влияния рН на слияния клеток без репликации вируса. Репортерные и эффекторные клетки получали плазмиду, содержащую ген люциферазы, контролируемый промотором Т7, или плазмиду с экспрессией РНК-полимеразы Т7. Два производных клеток ARPE-19 смешивали и по

25 выработке люциферазы количественно оценивали слияние клеток, зависимое от инфекции. еpiBADrUL131 неизменно вызывал более высокую активность слияния, чем fibroBADrUL131 (фиг.4Г). При рН 7-8 активность fibroBADrUL131 была в 3 раза ниже, чем активность еpiBADrUL131. Когда клетки обрабатывали буферными

30 растворами с низким рН после адсорбции вируса, обе разновидности вируса вызывали умеренное усиление слияния. BADwt в этом анализе слияние не вызывал.

Путь проникновения не влияет на клеточный тропизм человеческого цитомегаловируса. Как обсуждалось выше, существует прецедент в отношении герпесвируса, когда отмечается склонность вируса проникать в определенный

35 клеточный тип в зависимости от клеток, в которых выращен инфекционный вирус. Это явление отличается от вышеописанного, т.е. когда две разновидности человеческого цитомегаловируса из двух разных клеточных типов проникают в

40 эпителиальные клетки путем разных механизмов. Тем не менее, нельзя было полностью исключить, что различные механизмы проникновения могут влиять на эффективность репликации и выход вируса, что проявляется в эффекте тропизма. По этой причине проведены эксперименты, чтобы выяснить, влияет ли путь

45 проникновения человеческого цитомегаловируса на бляшкообразование в эпителиальных клетках и фибробластах (табл.1). Исходный BADrUL131 получен в клетках ARPE-19, чКЭППК, ФКПЧ или MRC-5 и с ним проведен анализ на

бляшкообразование на клетках ARPE-19 or MRC-5 (табл.1). Хотя на клетках ARPE-19 получено несколько больше бляшек, чем на клетках MRC-5, ни вирус, выращенный в эпителиальных клетках, ни вирус, выращенный в фибробластах, не проявил

50 предпочтения в отношении бляшкообразования на каком-либо клеточном типе.

ТАБЛИЦА 1.

Титрование BADrUL131, выращенного в эпителиальных клетках или фибробластах, в клетках ARPE-19 и MRC 5 (×105)

Источник репликации ^а	Клетки-мишени	Соотношение ^б
----------------------------------	---------------	--------------------------

	ARPE-19	MRC5	
ARPE-19	8,8	3,4	2,6
чКЭППК	2,9	1,9	1,5
MRC5	4,3	2,7	1,6
ФКПЧ	6,8	2,7	2,5

^a 2×10⁵ БОЕ/клетку BADrUL131, первоначально титрованного в ФКПЧ, использованы для инфицирования клеток ARPE-19 или MRC5.

^b Соотношение титра ARPE-19 и титра MRC5.

Антитело, специфичное к pUL130, блокирует инфицирование ARPE-19 вируса, выращенного в эпителиальных клетках, и вируса, выращенного в фибробластах. Антитело, специфичное к pUL130, которое нейтрализует инфекцию эпителиальных клеток, вызванную человеческим цитомегаловирусом (19), оказалось способно блокировать инфекцию ARPE-19 при любом пути проникновения (фиг.5A). Оно тормозило инфекцию, вызванную обоими вирусами, доза-зависимым путем, хотя еpiBADrUL131 был несколько более чувствительным к нейтрализации, чем fibroBADrUL131. Способность этого антитела тормозить оба пути проникновения дополнительно свидетельствует в пользу вывода о том, что pUL130 - содержащий комплекс функционирует вне зависимости от того, происходит ли слияние с плазматической или эндосомальной мембраной.

Раньше уже сообщалось, что комплекс gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 необязателен для интернализации человеческого цитомегаловируса эндотелиальным и или эпителиальными клетками, так как в лабораторном штамме, в котором этот комплекс отсутствует, успешно подвергается эндоцитозу (10). Однако последующее слияние с эндосомальной мембраной и выход в цитоплазму требуют присутствия этого комплекса. В соответствии с этими более ранними данными антитело к pUL130 не блокировало связывание или интернализацию еpiBADrUL131, fibroBADrUL131 или BADwt в анализе с клетками ARPE-19 (фиг.5B). Однако общее количество интернализированного вируса, выращенного в фибробластах, было меньше, чем количество вируса, выращенного в эпителиальных клетках. Это может отражать сниженную скорость интернализации, что может соответствовать отсрочке в начале выработки IE1 вирусом, выращенным в фибробластах (фиг.1).

еpiBADrUL131 и fibroBADrUL131 индуцируют различные транскрипционные ответы в клетках ARPE-19. Как и многие другие вирусы, человеческий цитомегаловирус модулирует клеточную передачу сигнала в ходе проникновения. Одно последствие измененной передачи сигнала заключается в резком изменении клеточного транскриптома, что в большой мере обусловлено контактом гликопротеинов вириона в клетками хозяина.

Соответственно, исследовано влияние двух путей проникновения на транскрипционный ответ клеток ARPE-19. В клетках симулировали инфекцию или инфицировали их еpiBADrUL131 или fibroBADrUL131 и через 6 или 10 ч очищали всю РНК. Относительные концентрации РНК анализировали с помощью микронаборов и идентифицировали РНК инфицированных клеток, чья концентрация в 2,5 раза превышала количество в клетках, подвергнутых симуляции инфицирования (табл.2-5). Распределение РНК с повышенной или сниженной экспрессией отображено на диаграммах Венна на фиг.6A.

Таблица 2. По-разному транскрибируемые гены клеток ARPE-19, инфицированных еpiBADrUL131, через 6 ч после инфицирования

	Банк генов	Кратность изменений	Наименование гена
5	NM_020904	7,218	PEPPI
	AK124132	5,97	LOC340286
	AK074031	4,89	SLIM; FLJ34715
	NM_058188	4,658	PRED54; MGC149386; MGC149387
	NM_022047	4,578	IBP
	NM_020436	3,172	DRRS; HSAL4; ZNF797; MGC133050; dJ1112F19.1
10	NM_001165	3,049	API1; API2; MIHC; CIAP2- HAPI; HIAPI; MALT2; RNF49
	NM-001039580	3,011	ASAP; FLJ21159
	NM_000364	2,91	CMH2; TnTC; cTnT; CMPD2; MGC3889
	NM_005031	2,866	PLM; MGC44983
	L08436	2,825	CLP; FLJ43657; MGC19733
15	NM_145867	2,768	MGC33147
	AL133118	2,731	AL133118
	NM_001034	2,706	R2; RR2M
	NM_020943	2,674	KIAA1604
	BC039151	2,67	PABPCIL; FLJ42053; dJ1069P2.3
	NM_031217	2,659	DKFZP434G2226
20	NM_003425	2,61	KOX5; ZNF13
	NM_000499	2,58	AHII; AHRR; CPI 1; CYP1; PI-450; P450-C; P450DX
	NM_182751	2,578	CNA43; PRO2249; MGC 126776
	NM_144620	2,572	MGC14816; DKFZp31301122
	NM_020359	0,4	PLSCR2
	AF085968	0,396	AF085968
25	NM_053064	0,388	GN2
	NM_005039	0,38	PM; PMF; PMS; Ps 1 ; Ps 2; PRB1L; PRB1M
	NM_152525	0,373	FLJ25351; FLJ40332
	AK125975	0,365	FLJ43987
	NM_175868	0,365	MAGE6; MAGE3B; MAGE-3b; MGC52297
	NM_017600	0,358	DKFZp434M0331
30	NM_006650	0,355	CPX2: 921 -L; CPX-2; MGC1 38492
	NM_004294	0,343	RFI; MTTRFI; MGC47721
	NM_006434	0,343	CAP; FLAF2; R85FL; SH3D5: SORBI
	NM_031466	0,339	NIBP; TI; IBP: MGC4737; MGC4769: KIAA1 882
	NM_000808	0,324	MGC33793
	NM_012377	0,324	OR7C3; OR19-18; CIT-HSP-87M17
35	NM_001018084	0,31	NM_001018084
	NM_024050	0,304	DDAI; PCIA1; MGC2594
	NM_005185	0,299	CLP
	NM_022115	0,272	PFM15; ZNF298; C21orf83
	NM_016125	0,259	LOC51136; MGC1 11090
40	NM_004843	0,256	CRL1; TCCR; WSX1: 1L27R; zcytor1
	NM_004334	0,242	CD 157
	NM_004185	0,233	WNT13; XWNT2
	BX360933	0,229	SLC25A5
	NM_032188	0,222	MOF; hMOF; FLJ 14040
	NM_173550	0,221	FLJ39267; FLJ46740; MGC50805
45	NM_002104	0,162	TRYP2
	Мишени в микронаборах, которые гибридизовались с меченой РНК клеток ARPE-19, инфицированных еpiBADrUL131, сравнили с клетками, где симулировали инфицирование; перечислены зонды, где различия уровней составили больше 2,5 раз. Приведены обозначения в Банке генов, кратность изменений и наименования генов.		

50

Таблица 3. По-разному транскрибируемые гены клеток ARPE-19, инфицированных fibroBADrUL131, через 6 ч после инфицирования

	Банк генов	Кратность изменений	Наименование гена
5	NM_183040	15,03	SDY; DBND; HPS7; My031; FLJ30031; MGC20210; DKFZP564K192
	NM_00165	12,48	API1; API2; MIHC; C1AP2: HAPI1; HAPI1; MALT2; RNF49
	NM_002852	11,21	TSG-14; TNFAIP5
	NM_006509	7,008	I-REL
10	NM_139314	6,679	NL2; ARP4; FIAF; PGAR; HFARP; ppl 158; ANGPTL2
	NM_002982	5,977	HC11; MCAF; MCP1; MCP- 1; SCY A2; GDCF-2
	NM_025169	5,938	ZFP: ZNF64; ZKSCAN7; FLJ 12738
	NM_033066	5,144	DLG6; ALS2CR5
	NM_001946	4,971	MKP3; PYST1
	NM_000212	4,92	CD61;GP3 A; GPIIIa
15	NM_001673	4,214	TS11
	NM_004464	4,183	HBGF-5; Smag-82
	NM_021101	4,072	CLD1; SEMP1; ILVASC
	NM_006851	4,07	GLIPR: RTVP1; CRISP7
	AK094860	3,913	AK094860
	NM_052875	3,667	Pep8b; MGC10485
20	NM_005347	3,648	BIP; MIF2; GRP78; FLJ26106
	NM_022842	3,592	CD318;TRASK; SIMA135
	U16307	3,36	GLIPR; RTVPI; CRISP7
	NM_000800	3,335	AFGF; ECGF; FGFA; ECGFA; ECGFB
	NM_000800	3,306	HBGFI; GLIO703; ECGF-beta; FGF-alpha
	NM_198833	3,257	P18; CAP2
25	NM_002053	3,21	GBP1
	NM_058179	3,161	PSA; EPIP; PSAT; MGC1460
	NM_001004301	3,131	FLJ16542; FLJ34141
	NM_180989	3,117	ITR
	NM_000640	3,116	IL-13R; IL13BP; CD213A2
	NM_002658	3,09	ATF; UPA; URK; u-PA
30	NM_018284	3,076	FLJ10961: DKFZp686E0974; DKFZp686L15228
	NM_000201	3,022	BB2; CD54; P3.58
	NM_005923	3,007	ASK1: MEKK5; MAPK.KK5
	NM_018836	3,001	MOT8; SHREW1; SHREW-1; RP3-426F10.1
	NM_004556	2,971	IKBE
	NM_022044	2,955	SDF2L1
35	NM_006611	2,954	Ly49; KLRAtf; LY49L: Ly-49L; MGC 126520; MGC 126522
	NM_014314	2,935	RIG-I; FLJ13599; DKFZp434J1 111; DKFZp686N19181
	NM_003897	2,906	D1F2; IEX1; PRGI; D1F-2; GLY96; IEX-1; IEX-IL
	NM_006417	2,899	p44; MTA P44
	NM_006187	2,877	p100; MGC 133260
40	NR_002186	2,876	DKFZp58611420
	NM_033036	2,872	GAL3ST2; G AL3ST-3; MGC 142112; MGC 142114
	NM_014331	2,86	xCT; CCBRI
	NM_003786	2,831	MLP2; MRP3; ABC31; MOAT-D; cMOAT2; EST90757
	NM_001511	2,829	GROI; GROa; MGSA; NAP-3; SCYBI; MGSA-a; MGSA alpha
45	NM_000189	2,827	HKJI; HXK2; DK_FZp6S6M 1669
	NM_001901	2,821	CCN2; NOV2; HCS24; IGFBP8; MGC 102839
	NM_031217	2,811	DKPZP434G2226
	NM_002849	2,766	PTPRQ; EC-PTP; PCPTPI; PTP-SL; PTPBR7
	NM_019891	2,764	ERO1LB
50	NM_002234	2,745	HK2; HCK1; PCN1; HPCN1; KV 1.5; MGC117058; MGC117059
	NM_198569	2,739	DREG; VIGR; PS 1TP2

	NM_020799	2,726	AMSH-FP; AMSH-LP; ALMalpha; FLJ31524; KIAA1373 и т.д.
	NM_014632	2,726	KIAA0750; MICAL2PV1; MICAL2PV2
	NM_182920	2,721	FLJ42955; KIAA1312
	NM_003483	2,715	BABL; LIPO; HMGIC; HMGI-C
5	NM_133492	2,706	ACER1; MGC138327; MGC138329
	CR598364	2,633	ENST00000370238
	NM_000970	2,62	TXREB1; SHUJUN-2; TAXREB107
	NM_005444	2,617	RCD1; CNOT9; RCD1 +
	NM_194303	2,614	NM_194303
	NM_015359	2,612	ZIP 14; cigl9; LZT-Hs4; KIAA0062
10	NM_016354	2,608	POAT; OATPI; OATP-E; OATP4A1; OATPRPI; SLC21A12
	NM_015009	2,607	LNK3; SEMACAP3
	AK124941	2,602	AK124941
	NM_001548	2,602	G10P1; IFI56; ISG56; IFI-56; IFNII; RNM561; GARG-16
15	NM_145023	2,597	FLJ32762; DKFZp686N0559; RPI1-479G22.1
	NM_023070	2,592	FLJ34293; RPI1-656D10.1
	NM_001902	2,584	MGC9471
	NM_004233	2,563	BL11; HB15
	NM_020683	2,562	A3AR; AD026; ba552M1.5; RP11-552M11.7
	NM_031938	2,56	FLJ34464; B-DIOX-II
20	NM_152649	2,55	FLJ34389
	BC048263	2,543	LOC146909
	XM_210365	2,527	LOC284288
	NM_007107	2,515	TRAPG; SSR gamma
	NM_002837	2,513	PTPB; HPTPB; FLJ44133; MGC59935; HPTP-BETA;
25	NM_172345	2,505	NM_172345
	NM_002609	0,4	JTK12; PDGFR; CD140B; PDGFR1; PDGF-R-bcia
	NM_198353	0,4	KCTD8
	NM_003558	0,394	MSS4; STM7
	NM_001010911	0,392	ba418C1.3
	NM_017644	0,391	DRE1; FLJ25796
30	NM_052892	0,388	FLJ45333; DKFZp686J19100
	NM_175868	0,387	MAGE6; MAGE3B; MAGE-3b; MGC52297
	NM_007282	0,38	RZF; MGC13689
	NM_005185	0,38	CLP
	NM_021990	0,378	GABRE
	AK055156	0,375	FLJ30594; MGC120893; DKFZp761K2322
35	AF085968	0,375	AF085968
	NM_019555	0,371	GEF3; STA3; XPLN; MGCI18905; DKFZP434F2429
	NM_004294	0,368	RF1; MTTRF1; MGC47721
	NM_173039	0,365	AQPX1
	BU943730	0,364	BU943730
	NM_017600	0,364	DKFZp434M0331
40	NM_007282	0,36	RZF; MGC13689
	AL713743	0,357	FLJ42875; MGC35434; DKFZp761G0122
	NM_007314	0,347	ARG; ABLL
	AK056190	0,345	WHRN; CIP98; USH2D; KIAA1526; RP11-9M16.1; DKFZP434N0K
	NM_000372	0,345	OCA1A; OCA1A
45	BC015929	0,338	RVR; BD73; HZF2; EAR-Ir; Hs.37288
	NM_012377	0,328	OR7C3; OR19-18; CIT-I ISP-87M17
	NM_138440	0,324	SLITL2
	NM_001018084	0,317	NM_001018084
	NM_000808	0,311	MGC33793
	NM_033260	0,31	HFH1
50	NM_022160	0,309	DMO; MGC163307; MGC163309
	BC018597	0,308	BC018597

	NM_198404	0,305	bA321C24.3
	NM_024050	0,303	DDA1; PCIA1; MGC2594
	NM_031466	0,299	NIBP; TI; IBP; MGC4737; MGC4769; KIAA 1882
	NM_016831	0,287	GiG13
	NM_022115	0,251	PFM15; ZNF298; C21orf3
5	NM_016125	0,249	LOC51136; MGC111090
	NM_002104	0,242	TRYP2
	NM_013261	0,236	LEM6; PGCI; PGCI; PGC-Iv; PPARGCI; PGC-I (alpha)
	NM_002167	0,211	HEIR-1
	NM_032188	0,204	MOF; hMOF; FLJ14040
	BX360933	0,197	SLC25A5
10	NM_003862	0,194	ZFGF5; FGF-18
	NM_173550	0,148	FLJ39267; FLJ46740; MGC50805
	NM_004185	0,135	WNT13; XWNT2

Мишени в микронаборах, которые гибридизовались с меченой РНК клеток ARPE-19, инфицированных fibroBADrUL131, сравнили с клетками, где симулировали инфицирование; перечислены зонды, где различия уровней составили больше 2,5 раз. Приведены обозначения в Банке генов, кратность изменений и наименования генов.

Таблица 4. По-разному транскрибируемые гены клеток ARPE-19, инфицированных еpiBADrUL131, через 10 ч после инфицирования

	Банк генов	Кратность изменений	Наименование гена
20	AK094860	5,688	AK094860
	NM_145023	4,19	FLJ32762; DKFZp686N0559; RPI 1-479G22.1
	NM_133492	3,456	ACER1; MGC128327; MGC138329
	NM_001039580	3,352	ASAP; FLJ21159
	NM_001004301	2,982	FLJ 16542; FLJ34141
25	NM_001034	2,911	R2; RR2M
	A1369525	2,764	A1369525
	AK123066	2,753	AK123066
	NM_005345	2,729	HSP72; HSPA1 ; HSPA1B; HSP70-1
	NM_020731	2,712	AHH; AHHR; KIAA1234
	BC071797	2,631	BC071797
30	NM_003414	2,609	HZF2
	NM_000800	2,576	AFGF; ECGF; FGFA; ECGFA; ECGFB; HBGFI; GLIO703; и т.д.
	NM_138467	2,571	Clorf171; FLJ40918
	AK090803	2,557	SRip35; FLJ 14459; FLJ33484; FLJ41221; RP11-63L7.3
	AL133118	2,529	AL133118
35	NM_001165	2,508	AIP1; AP12; MIHC; CIAP2; HAPI; HAPI; MALT2; RNF49
	BG001037	0,392	TXNRD1
	NM_024861	0,388	FLJ22671; MGC150431; MGC150432
	NM_001043	0,385	NET; NAT1; NET1; SLC6A5
40	NM_016239	0,384	DFNB3; MYO15; DKFZp686N18198
	NM_001018084	0,383	NM_001018084
	NM_001037442	0,381	RIPX; KIAA0871
	NM_017600	0,377	DKFZp434M0331
	NM_022097	0,369	LOC63928
	NM_175868	0,356	MAGE6; MAGE3B; MAGE-3b; MGC52297
45	NM_032266	0,342	DKFZp434G118; DKFZp781D2023
	NM_003841	0,342	LIT; DCRUTRID; CD263; TRAILR3; MGC149501; MGC149502
	NM_005039	0,339	PM; PMF; PMS; Ps 1; Ps 2; PRBIL; PRBIM
	NMJ45051	0,339	MGC4734; FLJ31197
	NM_004294	0,336	RF1; MTTRF1; MGC47721
	AVV856073	0,335	AW856073
50	NM_024050	0,327	DDA1; PCIA1; MGC2594

	AF085968	0,327	AF085968
	NM_080927	0,318	ESDN; CLCP1
	NM_022115	0,317	PFM15; ZNF298; C21orf83
	AK056703	0,309	LOC219731
	NM_000808	0,301	MGC33793
5	NM_012377	0,299	OR7C3; OR19-18; CIT-HSP-87M17; AOP1; MER5;
			AOP-1; SP-22; PRO1748; MGC24293
	NM_006793	0,298	MGC104387
	NM_031466	0,289	NIBP; TI; IBP; MGC4737; MGC4769; KJAA1882
	NM_005185	0,286	CLP
	NM_139173	0,286	MGC131641
10	BX360933	0,28	SLC25A5
	NM_016125	0,269	LOC51136; MGC111090
	NM_002104	0,251	TRYP2
	NM_032188	0,248	MOF; hMOF; FLJ14040
	NM_004185	0,245	WNT13; XWNT2
	NM_004843	0,237	CRL1; TCCR; WSX1; IL27R; zeytorl
15	NM_173550	0,208	FLJ39267; FLJ46740; MGC50805

Мишени в микронаборах, которые гибридизовались с меченой РНК клеток ARPE-19, инфицированных еpiBADrUL131, сравнили с клетками, где симулировали инфицирование; перечислены зонды, где различия уровней составили 2,5 раза и больше. Приведены обозначения в Банке генов, кратность изменений и наименования генов.

20 Таблица 5. По-разному транскрибируемые гены клеток ARPE-19, инфицированных fibroBADrUL131, через 10 ч после инфицирования

	Банк генов	Кратность изменений	Наименование гена
25	AK094860	11,26	AK094860
	NM_033066	8,751	DLG6; ALS2CR5
	NM_145023	6,529	FLJ32762; DKFZp686N0559; RP11-479G22.1
	NM_152377	4,463	FLJ44073; MGC34837
	NM_002310	4,386	SWS; SJS2; STWS; CD118
	NR_001279	4,051	LOC164380; MGC26611; MGC26924
30	NM_005345	4,008	HSP72; HSPA1; HSPA1B; IISP70-1
	NM_006417	3,879	p44; MTAP44
	NM_017638	3,783	p28b; FLJ20045
	NM_001165	3,695	AIP1; AIP2; VIIHC; CIAP2; HAIPI; HIAPI; MALT2; RNF49
	NM_000640	3,659	IL-13R; IL13BP; CD213A2
35	KM_001673	3,313	TS11
	NM_002526	3,274	NT; eN; NT5; NTE; eNT; CD73; E5NT
	NM_003786	3,244	MLP2; MRP3; ABC31; MOAT-D; cMOAT2; EST90757
	NM_005527	3,229	hum70t; HSP70-HOM
	NM_018372	3,224	RIF1; FLJ11269; RP11-96K19.1
	NM_133492	3,16	ACER1; MGC138327; MGC138329
40	NM_033160	3,101	FLJ32813; MGC35232; DKFZp572C163
	DB318210	3,094	DB318210
	NM_182751	3,093	CNA43; PRO2249; MGC 126776
	NM_180989	3,089	ITR
	NM_005345	3,048	HSP72; HSPA1; HSPA1B; HSP70-1
	NM_005345	3,029	HSP72; HSPA1; HSPA1 B; HSP70-1
45	NM_000212	2,993	CD61; GP3A; GPIIIa
	NM_145867	2,991	MGC33147
	NM_021813	2,976	BACH2
	NM_006187	2,943	p100; MGC133260
	CR594200	2,942	LOC643837
	NM_012419	2,941	RGS22; RGS-17; hRGS17
50	AF038194	2,923	AF038194
	NM_018664	2,921	SNFT; BATF3; JUNDMI

	NM_017577	2,907	FLJ35862; FLJ40464
	NM_144633	2,887	ELK; ELK1; elk3; Kvl2.1
	NM_144620	2,86	MGC 14816; DKfZp31301122
	NM_001004301	2,859	FLJ16542; FLJ34141
5	NM_002852	2,847	TSG-14; TNFAIP5
	NM_007107	2,839	TRAPG; SSR gamma
	NM_032778	2,836	NfDIG; NO52; MINA53; FLJ 14393; DKfZp762O1912
	NM_032523	2,828	ORP6; FLJ36583; MGC59642
	NM_005515	2,808	HB9; SCRA1; HOXHB9
	NM_002201	2,804	CD25; I1EM45
	NM_152649	2,799	FLJ34389
10	NiM_033036	2,794	GAL3ST2; GAL3ST-3; MGC142112; MGC142114
	NM_006509	2,791	IREL
	NM_004233	2,789	BLI 1; HB15
	NM_180989	2,772	ITR
	NM_020988	2,735	GNAO; G-ALPHA- α ; DKfZp686O0962
	U16307	2,687	GLIPR; RTVPI; CR1SP7
15	NM_003706	2,672	CPLA2-gamma; DKfZp586C0423
	NM_153689	2,662	FLJ38973
	NM_000800	2,653	AFGF; ECGF; FGFA; ECGI' A; ECGFB; HBGFI ; GLIO703; etc
	BC043212	2,643	LOC402125
	NM_002670	2,619	I-PLASTIN
20	NM_152408	2,614	FLJ35779; MGC120442; MGC120443; MGC120444
	NM_198951	2,613	TG2; TGC
	NM_012329	2,595	MMA; PAQR11
	NM_001009954	2,589	FLJ20105; MGC131695
	NM_032228	2,585	FAR1; FLJ22728\$ FLJ33561
	AI369525	2,584	AI369525
25	NM_004170	2,583	EAAC1; EAAT3
	NM_002930	2,571	RIN; RJBA; ROC2
	AK023856	2,569	LOC339803
	NM_024525	2,558	FLJ22584
	NM_152649	2,553	FLJ34389
30	NM_181795	2,552	PRKACN2; FLJ23817
	BC039151	2,549	PABPC1L; FLJ42053; dJ1069P2.3
	NM_006547	2,525	IMP3; KOCI; IMP-3; VICKZ3; DKfZp686F1078
	NM_000641	2,521	AGIFtIL-II
	NM_145306	2,506	C10orO5
	AK021804	0,398	AK021804
35	NM_007211	0,397	HoJ-I; Cl 2orQ
	NM_203434	0,397	MGC70833; bA247A12.2
	NM_000362	0,397	SFD; K222; K222TA2; HSMRK222
	AK056703	0,395	LOC219731
	NM_003558	0,395	MSS4; STM7
	NM_016831	0,394	GIG 13
40	NM_024861	0,394	FLJ22671; MGC 150431; MGC150432
	BF514513	0,393	BF514513
	NR_002S19	0,392	MALAT- 1
	NM_002609	0,391	JTK12; PDGFR; CD140B; PDGFR1; PDGF-R-beta
	NM_018027	0,391	FRMD4; FLJ 10210; KIAA 1294; bA295P9.4
	NM_001010911	0,39	bA418C1.3
45	AW444553	0,389	FAM84B
	AK056190	0,388	WHRN; CIP98; USH2D; KIAA 1526; RPI 1-9MI 6.1
	NM_175868	0,385	MAGE6; MAGE3B; MAGE-3b; MGC52297
	AB051431	0,385	KIAA1644; MGC125851; MGC125852
	NM_001003683	0,384	HCAM1; HSPDE1A; MGC26303
	NM_004294	0,384	RF1; MTTRF1; MGC47721
50	NM_006516	0,383	GLUT; GLUT1; MGC141895; MGC141896
	BX 104999	0,382	BX 104999

	AL713743	0,381	FLJ42875; MGC35434: DKFZp761G0122
	NM_000322	0,381	RDS: RP7; rd2; AVMD; PRPH; AOFMD; TSPAN22
	NM_007314	0,381	ARG; ABLL
	NM_018371	0,376	ChGn; FLJI 1264; bcta4GalNAcT
	NR_002802	0,376	TncRNA
5	DB527271	0,376	DB527271
	NM_006393	0,374	LNEBL; bA56H7.1; MGCI 19746; MGCI 19747
	NM_013989	0,372	D2; 5DII; ScFY; TXDI2
	NM_017600	0,37	DKFZp434M0331
	BC011595	0,369	NMB; HGFIN
	AF085968	0,366	AF085968
10	BC018597	0,365	BCOI 8597
	NM_014729	0,362	TOX1; KIAA0808
	NM_001003940	0,362	FLJ00065
	NM_000372	0,358	OCA1A; OCA1A
	NM_019555	0,358	GEF3; STA3; XPLN; MGCI 18905; DKFZP434F2429
	NM_022115	0,357	PFM15; ZNF298; C21orf83
15	NM_198353	0,355	KCTD8
	NM_032434	0,355	KIAA1 805; MGCI 11046
	AK055386	0,355	AK055386
	NM_006933	0,352	SMIT; SMIT2
	CR622110	0,35	CR622110
	AW856073	0,347	AW856073
20	NM_015074	0,345	KLP; CMT2; CMT2A; CMT2A1; HMSNII
	NM_032866	0,342	JACOP; FLJ 14957; KIAA 1749; MGC 138254
	NM_012377	0,342	OR7C3; OR19-18: CIT-I ISP-87M17
	NM_005261	0,341	KIR; MGC26294
	AK023391	0,339	AK023391
	NM_002214	0,339	ITGB8
25	NM_182728	0,339	LAT2; LPI-PCI
	NM_024050	0,338	DDAI; PCIA 1; MGC2594
	NM_005185	0,338	CLP
	NM_016613	0,337	AD021; AD036: FLJ38155; DKFZp434L142
	NM_000782	0,336	CP24; CYP24; MGC 126273; MGC 126274; P450-CC24
	NM_001624	0,335	ST4
30	NM_007282	0,333	RZF; MGC 13689
	NM_001037442	0,327	RIPX; KIAA0871
	NM_004318	0,32	BAH; HAAH; JCTN; junctin; CASQ2BP1
	BU943730	0,32	BU943730
	NM_205849	0,319	FLJ40182
	NM_000808	0,315	MGC33793
35	NM_033260	0,313	HFHI
	NM_000916	0,309	OT-R
	NM_032188	0,309	MOF; hMOF; FLJ 14040
	BX360933	0,306	SLC25A5
	NM_014351	0,304	NST; BRSTL1; SULTX3; BR-STL-I: MGC40032;
			DJ388M5.3; etc
40	NM_002167	0,3	HEIR-I
	NM_001033086	0,29S	(U631M13.5; RPI 1-189J1.1
	NM_000372	0,292	OCA1A; OCA1A
	NM_001002926	0,289	TWISTNB
	AK094143	0,288	C14orf78; KIAA2019
45	NM_004466	0,287	GPC5
	NM_031466	0,276	NTBP; TI; IBP; MGC4737; MGC4769; KIAA1 882
	NM_013261	0,271	LEM6; PGCi; PGCIA; PGC-Iv; PPARGCl; PGC- 1
			(alpha)
	NM_000693	0,267	ALDH6; RALDH3; ALDI 11 A6
	NM_016125	0,26	LOC51136; MGCI 1090
50	AK124390	0,23	AK 124390
	NM_002104	0,228	TRYP2

NM_005341	0,209	HKR3; pp9964
NM_173082	0,202	FLJ27258; FLJ37625; FLJ45012
NM_173550	0,191	FLJ39267; FLJ46740; MGC50805
NM_004185	0,133	WNT13; XWNT2
NM_021727	0,0415	CYB5RP; LLCDL3

5

Мишени в микронаборах, которые гибридизовались с меченой РНК клеток ARPE-19, инфицированных fibroBAdrUL131, сравнили с клетками, где симулировали инфицирование; перечислены зонды, где различия уровней составили 2,5 раза и больше. Приведены обозначения в Банке генов, кратность изменений и наименования генов.

10

Мишени в микронаборах, которые гибридизовались с меченой РНК клеток ARPE-19, инфицированных fibroBAdrUL131, сравнили с клетками, где симулировали инфицирование; перечислены зонды, где различия уровней составили 2,5 раза и больше. Приведены обозначения в Банке генов, кратность изменений и наименования генов.

15

Через 6 ч после инфицирования epiBAdrULB1 концентрации 47 РНК изменились по сравнению с клетками с симуляцией инфекции, и 121 РНК изменились в клетках, инфицированных fibroBAdrUL131, по сравнению с клетками с симуляцией инфекции.

20

Набор измененных РНК значительно отличался у двух этих вирусов; только 19 РНК изменились после инфицирования либо epiBAdrUL131, либо fibroBAdrUL131. Однако возможны несколько случаев, когда ген изменяется под воздействием одного вируса

25

в 2,5 раза и больше, а другой вирус вызывает более умеренные изменения, не превышающие точку отсечения, изучение данных обнаружило, что это встречается нечасто. Через 10 ч после инфицирования число РНК в клетках хозяина под воздействием epiBAdrUL131 изменилось лишь немного (50 РНК), в то время как после инфицирования fibroBAdrUL131 отмечалось более существенное увеличение (153 РНК).

30

В более поздние сроки число РНК, измененных обоими вирусами, увеличивалось в незначительной степени (28 РНК). Результаты анализов с микронаборами подтверждены с помощью ПЦР в режиме реального времени для одной РНК, которая не изменилась, и для шести РНК, измененных за счет инфекции (фиг.6 В).

35

Для дальнейшего сравнения изменений концентрации РНК под воздействием fibroBAdrUL131 против epiBAdrUL131 результаты, полученные с микронаборами, профильтровали по перечню генов, состоящего из четырех групп Онтологии генов: взаимодействие хозяин-возбудитель (GO:0030383), межклеточное взаимодействие (GO:0007154), жизненный цикл вируса (GO:0016032) и межклеточная передача сигнала (GO:0007267). Почти одна треть РНК (70 из 222), которые изменились больше чем в 2,5 раза под воздействием fibroBAdrUL131, присутствовали в объединенной группе (табл.6). При этом только 86 РНК, индуцированных epiBAdrUL131, обнаружены в этих четырех группах Онтологии генов. Эти две разновидности вируса существенно различались по транскрипционному ответу на инфицирование эпителиальных клеток.

45

50

Таблица 6. Концентрации РНК, модулированные fibroBADrUL131

	Банк генов	Кратность изменений через 6 ч после инфицирования	Кратность изменений через 10 ч после инфицирования	Наименование гена
5	NM_006509	7,008	2,791	I-RELNL2; ARP4; FIAF; PGAR; HFARP; ppl 158;
	NM_139314	6,679	2,067	ANGPTL2
	NM_002982	5,977	nc	HCI 1 ; MCAF; MCPI ; MCP- 1 ; SCYA2; GDCF-2; и т.д.
10	NM_000212	4,92	2,993	CD61 ; GP3A; GPIIIa
	NM_002310	nc	4,386	SWS; SJS2; STWS; CD118
	NM_004464	4,183	2,264	HBGF-5; Smag-82
	NM_021101	4,072	nc	CLDI ; SEMP 1 ; ILVASC
	NM_006851	4,07	2,364	GLIPR; RTVPI ; CR1SP7
15	NM_005347	3,648	nc	BIP; MIF2; GRP78; FLJ26106
	U16307	3,36	2,687	GLIPR; RTVP 1 ; CR1SP7
	NM_000800	3,335	2,115	AFGF; ECGF; FGFA; ECGFA; ECGFB; HBGF 1 ; etc
	NM_002526	nc	3,274	NT; eN; NT5; NTE; eNT; CD73; E5NT
	NM_005527	nc	3,229	hum70t; HSP70-HOM
20	NM_002053	3,21	nc	GBPI
	NM_180989	3,117	nc	ITR
	NM_000640	3,116	3,659	IL-13R; 1L 13BP; CD213A2
	NM_002658	3,09	nc	ATF; UPA; URK; u-PA
	NM_180989	nc	3,089	ITR
	NM_018284	3,076	2,185	FLJ 10961; DKFZp686E0974; DKFZp686L 15228
25	NM_005345	nc	3,048	HSP72; HSPA1; HSPA1B; IISP70-1
	NM_000201	3,022	nc	BB2; CD54; P3.58
	NM_004556	2,971	nc	IKBE
	NM_006611	2,954	2,263	Ly49; KLRA#; LY49L; Ly-49L; MGC126520; и т.д.
30	NM_014314	2,935	2,071	DKFZp686N19181
	NM_003897	2,906	nc	DIF2; IEX1; PRG1; DIF-2; GLY96; IEX-1; IEX-IL
	NM_006417	2,899	3,879	p44; MTAP44
	NM_144633	nc	2,887	ELK; ELK1; elk3; Kv12.1
	NM_006187	2,877	2,943	p 100; MGC 133260
35	NM_032778	nc	2,836	MDIG; NO52; MINA53; FLJ 14393; DKFZp762O1912
				MLP2; MRP3; ABC31; MOAT-D; cMOAT2
	NM_003786	2,831	3,244	EST90757
40	NM_001511	2,829	nc	GROI; GROa; MGSA; NAP-3; SCYBI; MGSA-a; etc
	NM_001901	2,821	nc	CCN2; NOV2; HCS24; IGFBP8; MGC 102839
	NM_002849	2,766	nc	PTPRQ; EC-PTP; PCPTPI ; PTP-SL; PTPBR7
45	NM_002234	2,745	nc	HK2; HCKI; PCNI; HPCNI; KV1.5; MGC1 17058; etc
	NM_198569	2,739	2,182	DREG; VIGR; PS 1TP2
	NM_000970	2,62	nc	TXREBI; SHUJUN-2; TAXREB107
	NM_198951	nc	2,613	TG2; TGC
	NM_015359	2,612	nc	Z1P14; cig19; LZT-Hs4; KIAA0062
50	NM_001548	2,602	nc	GIOP1; IFI56; ISG56; IF1-56; IFNAJ1; RNM561; и т.д.
	NM_112329	nc	2,595	MMA; PAQR11

	NM_002930	nc	2,571	RIN; RIBA; ROC2
	NM_004233	2,563	2,789	BLI1; HB15
	NM_020683	2,562	nc	A3 AR: AD026; bA552M 11.5: RP 11 - 552M 11.7
5	NM_181795	nc	2,552	PRKACN2; FLJ23817
	NM_006547	nc	2,525	IMP3; KOCI; IMP-3; VICKZ3; DKFZp686F1078
	NM_000641	nc	2,521	AGIF; IL-II
	NM_172345	2,505	nc	NM_172345
	NM_012419	2,359	2,941	RGSZ2; RGS-17; hRGS17
10	NM_020988	2,188	2,735	GNAO; G-ALPHA-o; DKFZp686O0962
	NM_002201	2,028	2,804	CD25; HEM45
	NM_004318	0,495	0,32	BAH; HAAH; JCTN; junctin; CASQ2BP1
	NM_013989	0,492	0,372	D2: 5DII: SelY; TXDI2
	NM_005261	0,468	0,341	KIR: MGC26294
	NM_000916	0,434	0,309	OT-R
15	NM_014351	0,408	0,304	NST; BRSTL1; SULTX3; BR-STL- 1; MGC40032; etc
	NM_002609	0,4	0,391	JTK12; PDGFR; CD140B; PDGFRI; PDGF-R-beta
	NM_007211	nc	0,397	HoJ-I; C1 2orf2
	NM_001003683	nc	0,384	HCAM1; HSPDEIA; MGC26303
20	NM_006516	nc	0,383	GLUT; GLUT1; MGC141895; MGC141896
	NM_000322	nc	0,381	RDS; RP7; rd2; AVMD; PRPII; AOFMD; TSPAN22
	NM_021990	0,378	0,49	GABRE
	NM_018371	nc	0,376	ChGn; FLJ1 1264; beta4GalNAcT
25	NM_019555	0,371	0,358	GEF3; STA3; XPLN; MGCI 18905; DKFZP434F2429
	NM_007314	0,347	0,381	ARG; ABLL
	NM_002214	nc	0,339	ITGB8
	NM_182728	nc	0,339	LAT2; LPI-PCI
	BC015929	0,338	0,453	RVR; BD73; HZF2; EAR-Ir; lls.37288
30	NM_016831	0,287	0,394	GIG 13
	NM_013261	0,236	0,271	LEM6; PGCI ; PGCI A; PGC- I v; PPARGC I ; elc
	NM_003862	0,194	nc	ZFGF5; FGF- 18

Объединили четыре группы Онтологии генов: взаимодействие хозяин-возбудитель (GO:0030383), межклеточное взаимодействие (GO:0007154), жизненный цикл вируса (GO:0016032) и межклеточная передача сигнала (GO:0007267). Набор из 9276 генов использовали для фильтрации результатов анализов с наборами клеток ARPE-19, инфицированных fibroBAdrUL131. Указаны идентификаторы генов в Банке генов и наименования генов вместе с кратностью индукции или репрессии через 6 и 10 ч после инфицирования. Зонды, которые не изменились больше чем в 2,5 раза, обозначены «nc» - отсутствие изменений.

Обсуждение

Эпителиальные клетки ARPE-19 можно инфицировать человеческим цитомегаловирусом двумя путями: слияния с плазматической мембраной или эндоцитоза с последующим слиянием с эндосомальной мембраной. Оба пути проникновения запускают продуктивную инфекцию. Путь проникновения зависит от клеточного типа, в котором был культивирован вирус. Человеческий цитомегаловирус из эпителиальных клеток проникает в клетки первым путем, а вирус, культивированный в фибробластах, проникает вторым путем. Этот вывод следует из ультраструктурного анализа и разной чувствительности инфекции к агентам, блокирующим окисление эндсом. Тот факт, что вирус, выращенный в эпителиальных клетках, вызывает слияние клеток без репликации вируса в большей мере, чем вирус, выращенный в фибробластах, дополнительно свидетельствует в пользу точки зрения о том, что эти две разновидности вируса взаимодействуют с клетками ARPE-19 двумя

кардинально отличающимися путями. Важно, что оба пути проникновения требуют функции рUL130, так как антитело к рUL130 нейтрализовало инфицирование вирусом, полученный тем или иным путем. Комплекс gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 действует на плазматической мембране клеток ARPE-19, если инфицирующий вирус выращен в эпителиальных клетках, и на эндосомальной мембране, если вирус выращен в фибробластах. Нейтрализованный вирус в эндосоме не способен «сбежать» и, видимо, следует той же судьбе, что и AD169, в котором отсутствует рUL130-содержащий комплекс и который накапливается в эндосомах эпителиальных клеток без запуска продуктивной инфекции (10).

Вирус, выращенный в фибробластах, вызывает накопление белка IE1 в клетках ARPE-19 после некоторой задержки по сравнению с вирусом, выращенным в эпителиальных клетках, и это предполагает, что в некотором смысле проникновение путем эндоцитоза происходит медленнее, чем проникновение путем слияния с плазматической мембраной. Многие вирионы видны в эндосомах, но капсиды в цитоплазме не видны после проникновения вируса, выращенного в фибробластах, и капсиды редко находят в цитоплазме клеток, инфицированных вирусом, который был выращен в эпителиальных клетках. Очевидно, вирионы задерживаются на некоторое время в эндосомах, но как только капсид освобождается от оболочки и достигает цитоплазмы, он быстро разрушается.

Как различаются вирионы человеческого цитомегаловируса, полученного в двух клеточных типах? Видимо, проявлением различий служат различия активности в отношении слияния клеток без репликации вируса. Не только еpiBADrUL131 более эффективно индуцируют слияние клеток, чем fibroBADrUL131, но и низкий pH усиливает активность обеих разновидностей вируса. Без каких-либо намерений быть связанными или ограниченным любым объяснением механизма, возможно, слияние мембран требует пороговой активности слияния. Способность антитела к рUL130 нейтрализовать обе разновидности вируса указывает, что они обе зависят от комплекса gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 при слиянии, поэтому спланированы эксперименты, предназначенные для проверки гипотезы о том, что вирусы содержат разные количества этого комплекса. Проведены анализы нескольких его компонентов и обнаружено, что несколько большее соотношение (примерно 2-кратное) gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 к gH/gL/gO имелось в частицах еpiBADrUL131 по сравнению с частицами fibroBADrUL131. Уровни gB, pp28 и pp65 у обеих разновидностей вируса были схожи.

Существует прецедент у ВЭБ в отношении продукции вируса с различными количествами gH-комплекса: частицы, продуцированные В-лимфоцитами, имеют дефицит gH/gL/gp42 (18). Однако могут участвовать и другие факторы. Возможно, меняется компонент комплекса, который не исследован в анализах. Или же соотношение gH-комплекса и одного или нескольких дополнительных гликопротеиновых комплексов вириона может влиять на активность слияния. Наконец, возможно, что некий неидентифицированный клеточный белок, поступающий из вирионов, когда они образуются в эпителиальных клетках или фибробластах, изменяет этот комплекс.

Имеются ли физиологические последствия двух путей проникновения? еpiBADrUL131 и fibroBADrUL131 вызывают значительно различающиеся клеточные транскрипционные открыты после инфицирования клеток ARPE-19. Если предположить, что различия обусловлены вирионами или вирионами в совокупности с определенными связанными с ними клеточными факторами, эксперимент с

микронаборами демонстрирует поразительные отличия транскрипционного ответа на инфекцию. Эндоцитоз тесно связан с регуляцией передачи сигнала молекулами клеточной поверхности. В итоге, возможно, что вирус влияет на передачу сигнала и клеточный транскриптом по разному, если он проникает путем слияния с
 5 плазматической мембраной или же путем эндоцитоза. Различия в передаче сигнала, вероятно, влекут за собой физиологические последствия, которые не выявляются в клеточных культурах, такие как влияние на распространение вируса, уход от иммунного ответа или вирулентность.

10 Литература

1. Miller. N. & Hutt-Fletcher, L.M. (1992) J Virol 66, 3409-14.
2. Nemerow. G.R. & Cooper. N.R. (1984) Virology 132, 186-98.
3. Nicola. A.V., Hou. J., Major, E.O. & Straus, S.E. (2005) J Virol 79, 7609-16.
4. Nicola, A.V., McEvoy, A.M. & Straus, S.E. (2003) J Virol 77, 5324-32.
- 15 5. Milne. R.S., Nicola. A.V., Whitbeck, J.C. Eiscnberg. R.J. & Cohen. G.H. (2005) J Virol 79S 6655-63.
6. Wittels. M. & Spear. P.G. (1991) Virus Res 18, 271-90.
7. Plachter. B., Sinzger, C & Jahn, G. (f 996) Adv Virus Res 46, 195-261.
8. Compton, T., Nepomuceno. R.R. & Nowlin, D.M. (1992) Virology 191, 387-95.
- 20 9. Bodaghi. B., Goureau. O., Zipeto, D., Laurent, L., Virelizier. J.L. & Michelson. S. (1999) JImmunol 162, 957-64.
10. Ryckman, B.J., Jarvis. M.A., Drummond, D.D., Nelson. J.A. & Johnson. D.C. (2006) J Virol 80, 710-22.
- 25 11. Wang. X., Kenyon. W.J., Li, Q., Mullberg, J, & Hutt-Fletcher, L.M. (1998) J Virol 72, 5552-8.
12. Li, Q., Turk. S.M. & Hutt-Flelcher, L.M. (1995) 7 Virol 69, 3987-94.
13. Hutt-Fletcher, L.M. & Lake. C.M - (2001) Curr Top Microbiol hmmmol 258, 51-64.
- 30 14. Haan. K.M. Kwok. W, W., Longnecker. R, & Speck, P. (2000) J Virol 1A, 2451-4.
15. Haan. K.M. & Longnecker. R. (2000) Proc Nat! Acad Sci USA 97, 9252-7.
16. Li, Q., Spriggs, M.K., Kovats. S., Turk, S. ML Comeau. M.R., Nepom. B. & Hutt-Fletcher, L.M. (1997) J Virol 71, 4657-62,
17. Wang. X. & Hutt-Fletcher, L. M. (1998) J Virol 72, 158-63.
- 35 18. Borza. C M. & Hutt-Fletcher. L.M. (2002) Nat Med 8, 594-9.
19. Wang. D. & Shenk. T. (2005) ProcNatI AcadSci USA 102, 18153-8.
20. Adler. B., Scrivano. L., Ruzcics, Z., Rupp, B., Sinzger. C. & Kosziiowski. U. (2006) J Gen Virol 87, 2451-2460.
- 40 21. Wang, D. & Shenk, T. (2005) J Virol 79, 10330-8.
22. Hahn. G., Revello, M.G., Patrone, ML. Percivalle. E., Campanini. G., Sarasini, A., Wagner, M., Gallina, A., Milanesi, G., Koszinowski, U., Baldanti, F. & Gerna. G. (2004) J Virol 78, 10023-33.

Настоящее изобретение не ограничивается вариантами, изложенными в описании и
 45 приведенными в качестве примеров, но оно включает изменения и модификации, находящиеся в объеме формулы изобретения, приведенной в приложении.

Формула изобретения

- 50 1. Способ получения вакцины против цитомегаловируса, отличающийся тем, что:
 - а) штамм или изолят цитомегаловируса (ЦМВ) пассируют в культуре клеток первого выбранного клеточного типа; и
 - б) амплифицируют штамм или изолят ЦМВ в клетках второго выбранного

клеточного типа, получая тем самым ЦМВ, кондиционированный клеточным типом, причем клетки первого и второго типа являются различными; и

в) из цитомегаловируса, кондиционированного клеточным типом, получают вакцину против цитомегаловируса.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что штамм или изолят ЦМВ является штаммом или изолятом человеческого ЦМВ.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что первый и второй выбранные клеточные типы выбирают из группы, состоящей из эпителиальных клеток, эндотелиальных клеток, фибробластов, нейрональных клеток, гладкомышечных клеток, макрофагов, дендритных клеток и стромальных клеток.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что первый выбранный клеточный тип представляет собой фибробласт, и второй выбранный клеточный тип представляет собой эпителиальную клетку.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что ЦМВ, кондиционированный клеточным типом, культивируют в клетках двух или более различных вторых выбранных клеточных типов и комбинируют ЦМВ, кондиционированный клеточным типом, для получения вакцины против ЦМВ.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно пассируют и амплифицируют второй и последующий штамм или изолят ЦМВ и комбинируют ЦМВ, кондиционированный клеточным типом, для получения вакцины против ЦМВ.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что получают живую аттенуированную вакцину против ЦМВ.

8. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что дополнительно включает инактивацию или убийство ЦМВ с получением тем самым инактивированной или убитой вакцины против ЦМВ, причем инактивированный или убитый ЦМВ получают химической обработкой или тепловой обработкой вируса.

9. Вакцина против ЦМВ, полученная способом по любому из пп.1-8.

10. Композиция вакцины для вакцинации против ЦМВ, содержащая эффективное количество популяции цитомегаловируса (ЦМВ), смешанной с соответствующим фармацевтическим носителем или адъювантом, причем популяция ЦМВ является пассированной в клетках первого выбранного клеточного типа и амплифицированной в клетках второго выбранного клеточного типа.

11. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что второй выбранный клеточный тип представляет собой эпителиальную клетку.

12. Композиция вакцины по п.10, отличающаяся тем, что ЦМВ является человеческим ЦМВ.

13. Композиция вакцины по п.12, отличающаяся тем, что первым выбранным клеточным типом является клеточный тип фибробластов.

14. Композиция вакцины по п.10, отличающаяся тем, что популяция ЦМВ включает два или больше штаммов или клинических изолятов ЦМВ, амплифицированных в культуре эпителиальных клеток.

15. Композиция вакцины по любому из пп.10-14, отличающаяся тем, что вакцина является живой аттенуированной вакциной против ЦМВ.

16. Композиция вакцины по любому из пп.10-14, отличающаяся тем, что дополнительно предусматривает инактивацию или убийство ЦМВ с получением тем самым инактивированной или убитой вакцины против ЦМВ, причем инактивированный или убитый ЦМВ получают химической обработкой или тепловой обработкой вируса.

17. Способ иммунизации особи против ЦМВ, включающий введение особи композиции вакцины против ЦМВ, включающей популяцию цитомегаловируса, смешанную с соответствующим фармацевтическим носителем или адъювантом, причем популяция ЦМВ является пассированной в первом выбранном клеточном

5

типе и амплифицированной во втором выбранном клеточном типе.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что второй выбранный клеточный тип представляет собой эпителиальную клетку.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что особь является человеком.

10

15

20

25

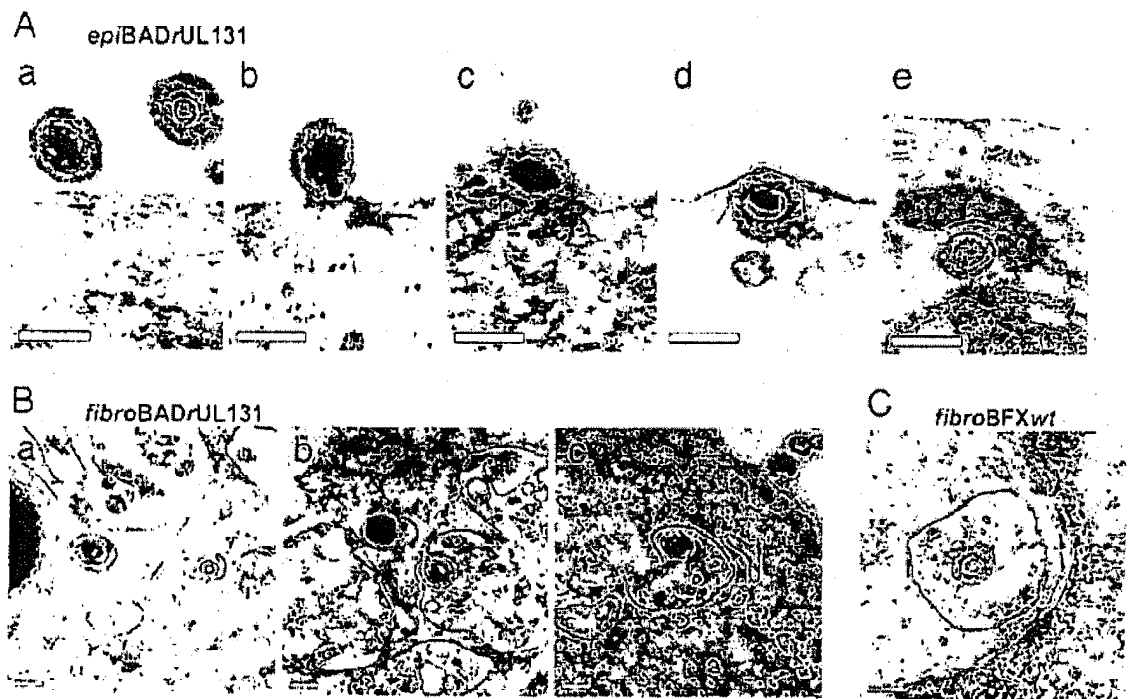
30

35

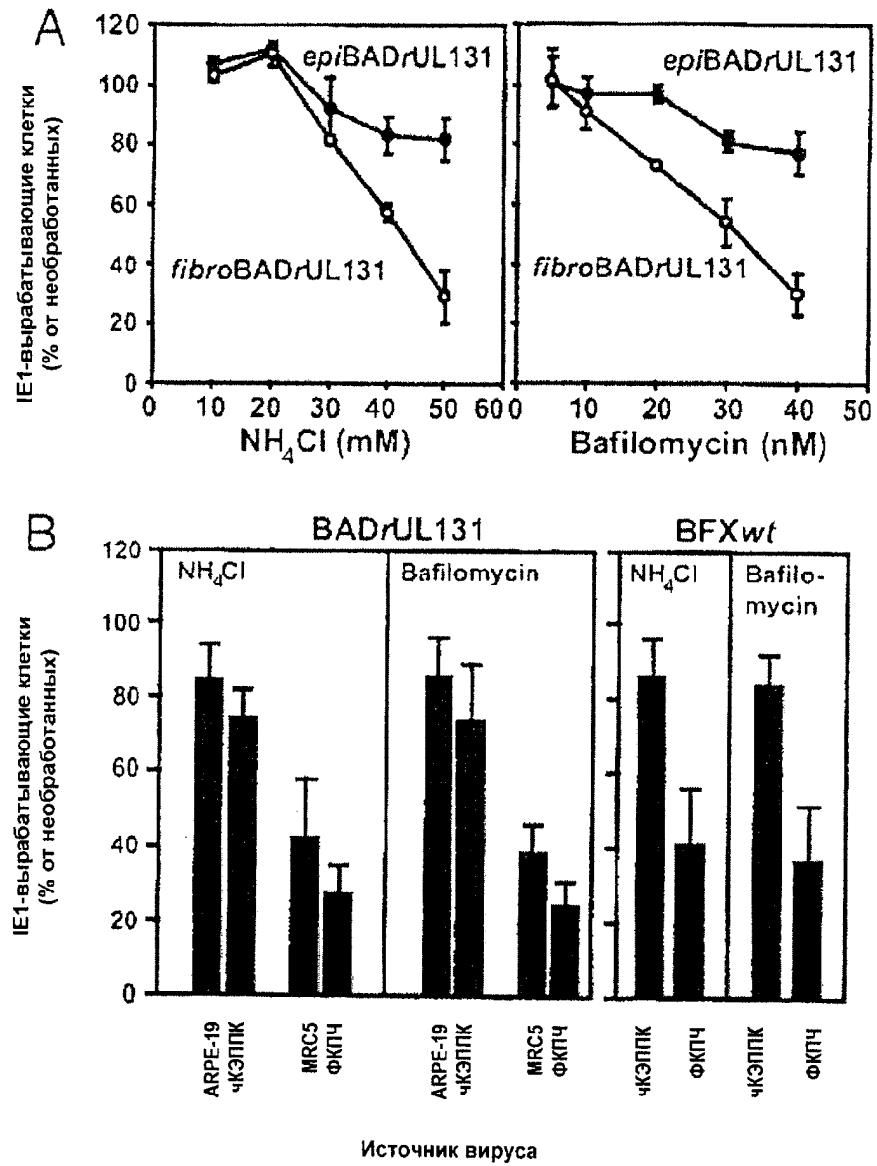
40

45

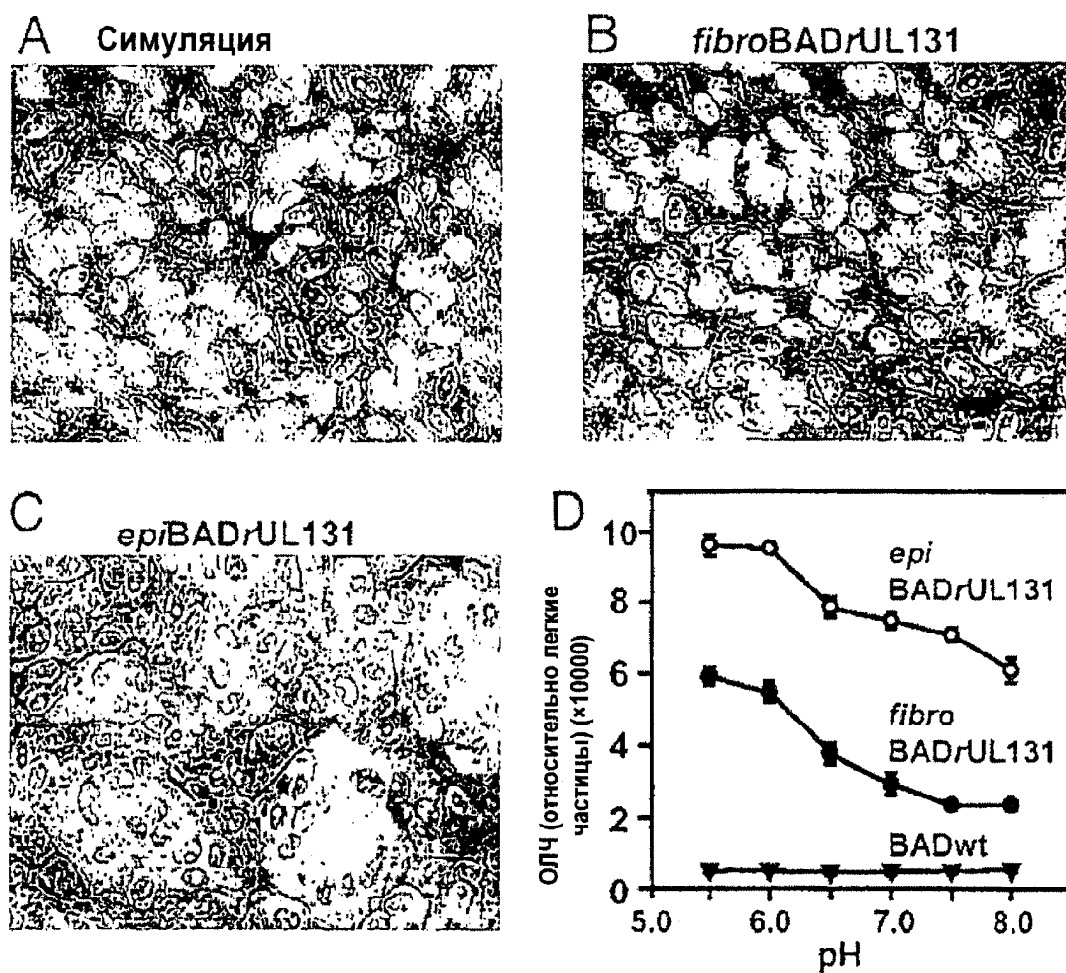
50



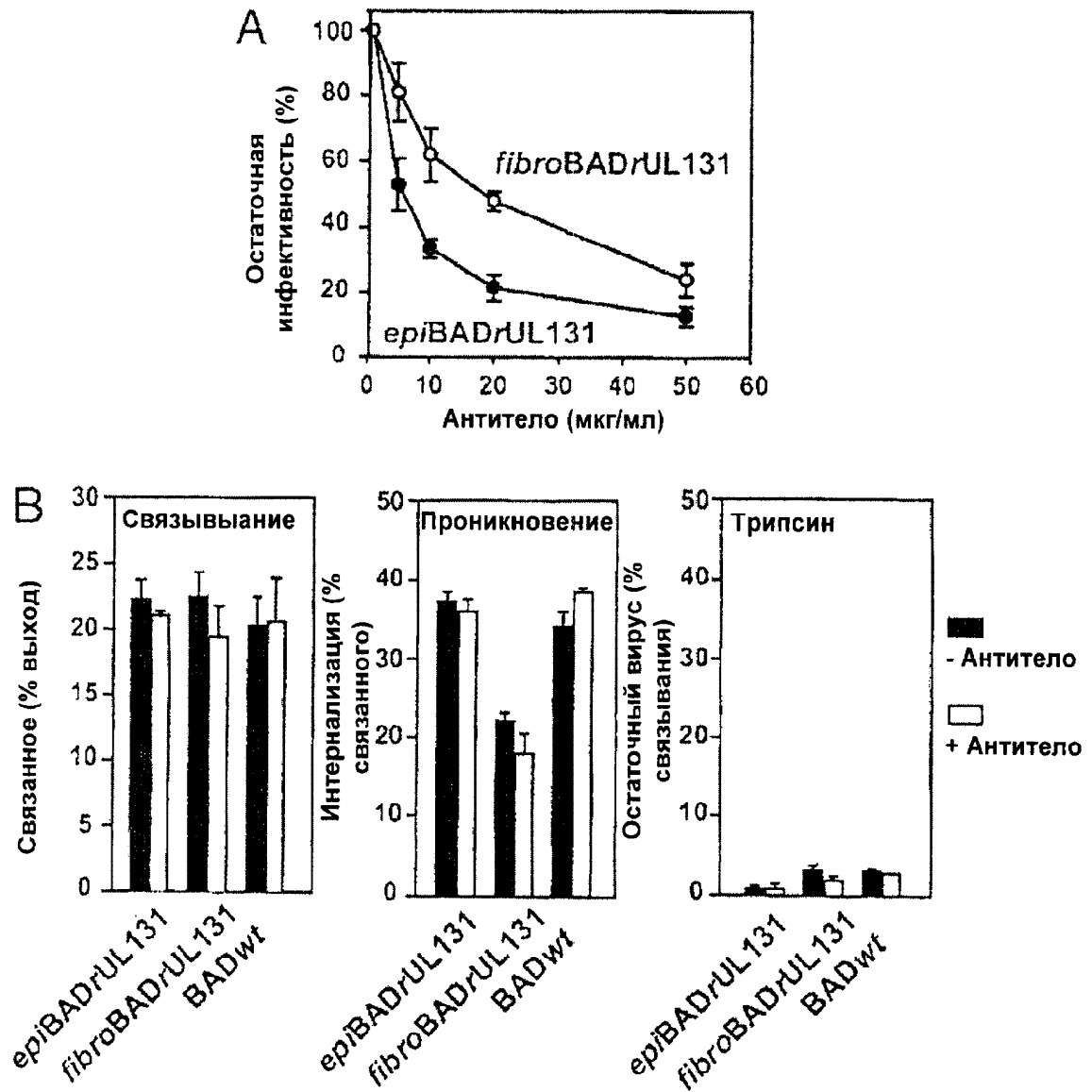
Фиг. 2



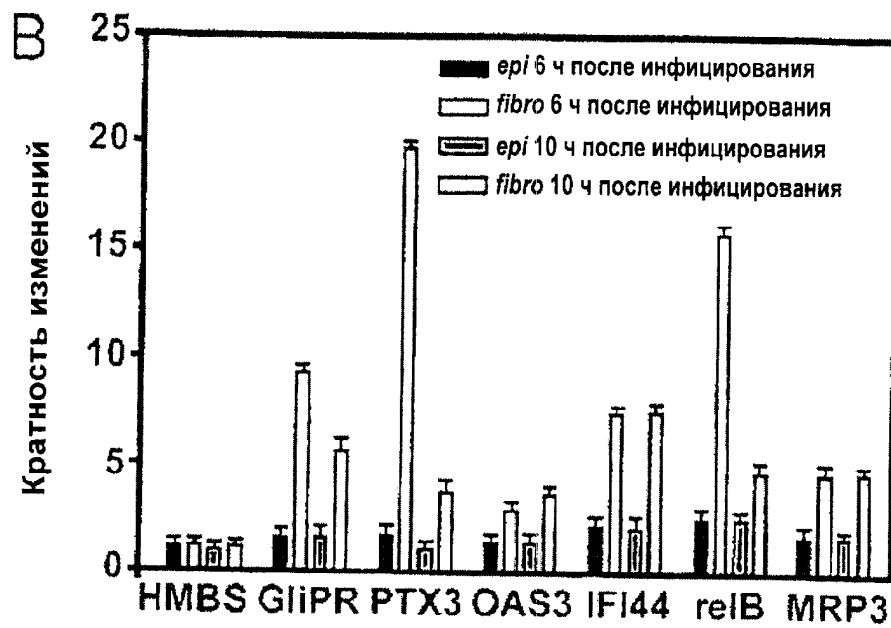
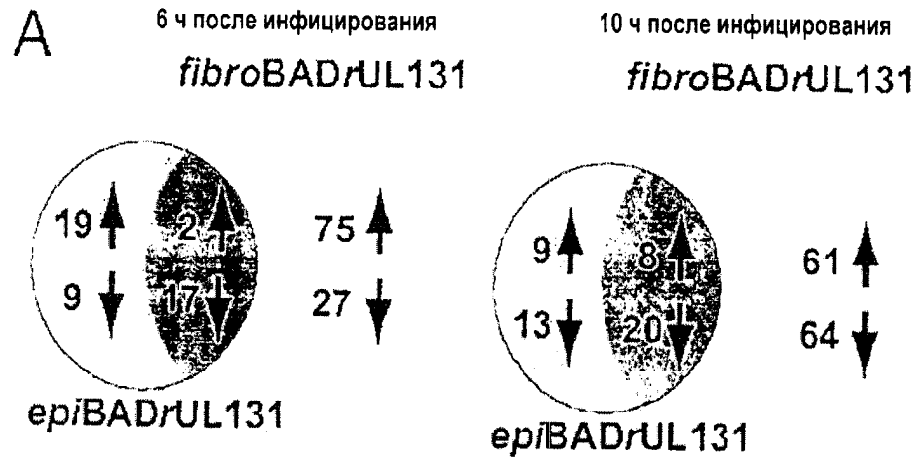
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6