

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.06.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.06.1998 18.11.1998
29.01.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/089103 1998/108832
1999/117683**

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.06.2001**
(Věstník č. 6/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/13144**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/64068**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4635

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/12 A 61 P 31/12
A 61 K 39/145
A 61 K 39/155
A 61 K 39/17
A 61 K 39/205
A 61 K 35/76
A 61 K 45/00
C 12 N 7/00

(71) Přihlašovatel:

**MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE
CITY UNIVERSITY OF NEW YORK, New York, NY,
US;**

(72) Původce:

Palese Peter, Leonia, NJ, US;
García-Sastre Adolfo, New York, NY, US;
Muster Thomas, New York, NY, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcína

(57) Anotace:

Předmětem tohoto řešení jsou oslabené RNA viry s negativním řetězcem se sníženou schopností antagonizovat buněčnou interferonovou (IFN) odpověď, a použití těchto oslabených virů ve vakcíně a farmaceutických prostředcích. Řešení se také týká vývoje a použití IFN-deficientních systémů pro selekci těchto oslabených virů. Řešení se zvláště týká oslabených virů chřipky s modifikacemi genu NS1, které zmenšují nebo odstraňují schopnost produktu genu NS1 antagonizovat buněčnou odpověď IFN. Mutantní viry se replikují in vivo, ale vykazují sníženou patogenicitu, a proto jsou vhodné pro živé virové vakcíny a farmaceutické prostředky.

Vakcína

Oblast techniky

Předkládaný vynález se obecně týká oslabených RNA virů s negativním řetězcem s oslabenou schopností antagonizovat odpověď buněčného interferonu (IFN) a použití těchto oslabených virů ve vakcíně a farmaceutických prostředcích. Vynález se také týká vývoje a použití IFN-deficientních systémů pro selekci, identifikaci a množení takových oslabených virů.

V jednom konkrétním provedení se vynález týká oslabených virů chřipky s modifikacemi genu NS1, které zmenšují nebo odstraňují schopnost produktu genu NS1 antagonizovat buněčnou odpověď IFN. Mutantní viry se replikují in vivo, ale vykazují sníženou patogenicitu, a proto jsou vhodné pro použití ve vakcínách a farmaceutických prostředcích na bázi živých virů.

Dosavadní stav techniky

1. Virus chřipky

Třídy virů obsahující jednořetězcovou RNA genomu s negativním řetězcem se klasifikují do skupin s nesegmentovanými genomy (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae a virus Borské nemoci, Borna Disease Virus) nebo do skupin se segmentovanými genomy (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae a Arenaviridae). Třída Orthomyxoviridae popisovaná podrobněji níže a používaná v příložených příkladech zahrnuje viry chřipky typů A, B a C stejně jako viry Thogoto a Dhori, a virus lososí anémie.

Viriony chřipky se skládají z vnitřního ribonukleoproteinového jádra (šroubovicová nukleokapsida) obsahujícího genom jednořetězcové RNA, a vnější lipoproteinové obálky, která je uvnitř

opatřena proteinem matrice (M1). Segmentovaný genom viru chřipky A se skládá z osmi molekul (v případě chřipky typu C ze sedmi) lineárních jednořetězcových RNA s negativní polaritou, které kódují deset polypeptidů včetně: proteinů RNA-dependentní RNA polymerázy (PB2, PB1 a PA) a nukleoproteinu (NP), který tvoří nukleokapsidu; membránových proteinů matrice (M1, M2); dvou povrchových glykoproteinů, které vybíhají z obálky obsahující lipidy: hemagglutininu (HA) a neuraminidázy (NA); nestrukturního proteinu (NS1) a proteinu exportu jádra (NEP). Transkripce a replikace genomu probíhá v jádře a uspořádání probíhá pučením na plasmatické membráně. U virů může v průběhu smíšených infekcí docházet k přeuspořádání genů.

Virus chřipky se adsorbuje prostřednictvím HA na sialyloligosacharidy v glykoproteinech a glykolipidech buněčné membrány. Po endocytóze virionu dojde ke konformační změně v molekule HA uvnitř buněčného endosomu, což umožní membránovou fúzi a tím zahájení odstraňování obalu. Nukleokapsida migruje do jádra, kde se přepisuje virová mRNA. Virová mRNA se přepisuje jedinečným mechanismem, při kterém virová endonukleáza odštěpuje 5'-konec z buněčných heterologních mRNA, které potom slouží jako primery pro transkripci templátů virové RNA virovou transkriptázou. Transkripty končí v místech vzdálených 15 až 22 bází od konců svých templátů, kde sekvence oligo (U) působí jako signály pro přidání úseků poly (A). Z osmi takto vytvořených molekul virové RNA je šest monocystronní „zprávy“ (messages), které jsou překládány přímo do proteinů HA, NA, NP, a proteinů virové polymerázy PB2, PB1 a PA. Dva další transkripty podléhají sestřihu (splicing), přičemž vznikají dvě mRNA, které jsou překládány v odlišných čtecích rámcích za vytvoření M1, M2, NS1 a NEP. Jinými slovy, osm segmentů virové RNA kóduje deset proteinů. Devět strukturních a jeden nestrukturní. Souhrn genů chřipky a jejich proteinových produktů je ukázán v tabulce 1 níže.

Tabulka 1

Úseky genomické RNA viru chřipky a kódované polypeptidy^a

Úsek	Délka _b (nukleotidy)	Kódovaný polypeptid _c	Délka (aminokyseliny) _d	Molekuly na virion	Poznámka
1	2341	PB2	759	30-60	složka RNA transkriptázy; vazba na čepičku RNA hostitelské buňky
2	2341	PB1	757	30-60	složka RNA transkriptázy; iniciace transkripce
3	2233	PA	716	30-60	složka RNA transkriptázy
4	1778	HA	566	500	hemaglutinin; trimer; glykoprotein obalu; zprostředkuje přichycení na buňky
5	1565	NP	498	1000	nukleoprotein; asociovaný s RNA; strukturní složka RNA transkriptázy
6	1413	NA	454	100	neuraminidáza; tetramer; glykoprotein obalu
7	1027	M ₁	252	3000	protein matrice; tvoří vnitřek obalu
		M ₂	96	?	strukturní protein plasmatické membrány; rozštěpená mRNA
8	890	NS ₁	230		nestructurní protein; funkce neznámá
		NEP	121	?	protein exportu z jádra; rozštěpená mRNA

a upraveno z publikace R. A. Lamb a P. W. Choppin (1983),
Annual Review of Biochemistry, díl 52, 467 - 506.

b pro kmen A/PR/8/34

c stanoveno biochemickými a genetickými metodami

d určeno analýzou nukleotidové sekvence a sekvenace proteinů

Genom viru chřipky typu A obsahuje osm segmentů jednořetězcové RNA s negativní polaritou kódujících jeden nestrukturní a devět strukturních proteinů. Nestrukturní protein NS1 je přítomen v nadbytku v buňkách infikovaných virem chřipky, ale nebyl detekován ve virionech. NS1 je fosfoprotein, který se nachází v jádře v časně fázi infekce a v pozdějších fázích virového cyklu také v cytoplasmě (King a další, 1975, *Virology* 64: 378). Studie mutantů viru chřipky citlivých na teplotu (ts) nesoucích poškození genu NS ukazují na to, že protein NS1 je transkripční a posttranskripční regulátor mechanismů kterými je virus schopen inhibovat expresi genů hostitelské buňky a stimulovat syntézu virových proteinů. Podobně jako mnoho dalších proteinů, které řídí posttranskripční procesy, interaguje protein NS1 se specifickými sekvencemi a strukturami RNA. Uvádí se, že protein NS1 se váže na různé druhy RNA, včetně: vRNA, poly-A, U6 snRNA, 5' nepřekládané oblasti virových mRNA a dsRNA (Qiu a další, 1995, *RNA* 1: 304; Qiu a další, 1994, *J. Virol.* 68: 2425; Hatada Fukuda 1992, *J. Gen. Virol.* 73: 3325 - 9). Exprese proteinu NS1 z cDNA ve transfekovaných buňkách byla spojována s několika efekty: inhibicí nukleocytoplasmatického transportu mRNA, inhibicí štěpení pre-mRNA, inhibicí polyadenylace hostitelské mRNA a stimulací translace virové mRNA (Fortes, a další, 1994, *EMBO J.* 13: 704; Enami, a další, 1994, *J. Virol.* 68: 1432; de la Luna, a další, 1995, *J. Virol.* 69: 2427; Lu, a další, 1994, *Genes Dev.* 8: 1817; Park, a další, 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 28433; Nemeroff, a další, 1998, *Mol. Cell.* 1: 1991; Chen, a další, 1994, *EMBO J.* 18: 2273 - 83).

2. Oslabené viry

Inaktivované virové vakcíny se vyrábějí „usmrcením“ virového patogenu, například teplem nebo působením formaldehydu, takže již

není schopen replikace. Inaktivované vakcíny mají omezenou použitelnost, protože neposkytují dlouhodobou imunitu, a proto poskytují pouze omezenou ochranu. Alternativní přístup k výrobě virových vakcín zahrnuje použití oslabených živých virových vakcín. Oslabené viry jsou schopné replikace, ale nejsou patogenní, a proto poskytují dlouhotrvající imunitu s dosažením vyšší ochrany. Běžné metody pro výrobu oslabených virů však zahrnují náhodnou izolaci mutantů hostitelského kmene, z nichž mnohé jsou citlivé na teplotu; například virus se pasáže na nepřírodných hostitelích, a provede se selekce potomstva virů, přičemž se vybírají kmeny, které jsou imunogenní, ale ne patogenní.

Běžný substrát pro izolaci a množení virů chřipky pro účely vakcín jsou vejce s kuřecími embryi. Viry chřipky se typicky pěstují 2 až 4 dny při 37 °C ve vejcích stáří 10 až 11 dnů. Ačkoli většina lidských primárních izolátů virů chřipky typu A a B roste lépe v amniotickém vaku embrya, po dvou až třech pasážích se viry přizpůsobí růstu v buňkách alantoické dutiny, která je dostupná z vnějšku vejce (Murphy, B. R., a R. G. Webster, 1996, Orthomyxoviruses, str. 1397 - 1445, ve Fields Virology, Lippincott-Raven P. A.)

Technologie rekombinantní DNA a genetického inženýrství by teoreticky mohly poskytnout lepší způsob výroby oslabených virů, protože specifické mutace by mohly být libovolně vpravovány do virového genomu. Genetické změny požadované pro oslabení virů však dosud nejsou známy nebo předpověditelné. Obecně byly pokusy o použití technologie rekombinantní DNA pro vytvoření virových vakcín ponejvíce zaměřeny na produkci podjednotkových vakcín, které obsahují pouze proteinové podjednotky patogenu, které se účastní imunitní odpovědi, exprimované v rekombinantních virových vektorech, jako je virus vakcinie nebo bakulovirus. V poslední době byly techniky rekombinantní DNA použity při pokusu o výrobu delečních mutant herpetického viru nebo poliovirů, které napodobují oslabené viry

nalézané v přírodě, nebo známé mutanty z oblasti hostitele. Do roku 1990 nebylo možno provádět u RNA virů s negativními řetězci místně specifické manipulace vůbec a tyto typy virů tedy nemohly být upravovány metodami genetického inženýrství.

Dosud vyrobené oslabené živé viry chřipky nemusí být schopné potlačit odpověď interferonu u hostitele, ve kterém se replikují. Přestože mají tedy tyto viry prospěšné vlastnosti z hlediska imunogenicity a nepatogenicity, je obtížné jejich pomnožení v běžných substrátech pro účely výroby vakcín.

Navíc mohou mít oslabené viry vlastnosti z hlediska virulence, která je tak mírná, že neumožňuje vytvořit hostiteli dostatečnou imunitní odpověď, která by vyhověla následujícím podáním.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká oslabených virů s negativními řetězci, které mají sníženou schopnost antagonizovat buněčnou odpověď IFN, a použití těchto virů ve vakcíně a ve farmaceutických prostředcích. Mutantní viry se sníženou antagonistickou aktivitou IFN jsou oslabené, tj. jsou infekční, mohou se replikovat in vivo za poskytnutí subklinických hladin infekce, a nejsou patogenní. Proto jsou ideálními kandidáty na vakcíny založené na živých virech. Navíc mohou oslabené viry indukovat silnou odpověď IFN, která má in vivo další biologické důsledky, poskytnout ochranu proti následným infekčním onemocněním a/nebo indukovat antitumorové odpovědi. Proto mohou být oslabené viry využity farmaceuticky pro prevenci nebo léčení jiných infekčních onemocnění, rakoviny u jedinců s vysokým rizikem a/nebo onemocnění léčitelných IFN.

RNA viry s negativním řetězcem používané podle předkládaného vynálezu zahrnují jak segmentované, tak i nesegmentované viry; výhodná provedení zahrnují bez omezení virus chřipky, respirační

syncytiální virus (RSV), virus Newcastleského onemocnění (NDV), virus vesikulární stomatitidy (VSV), a virus parainfluenzy (PIV). Viry používané v rámci vynálezu mohou být zvoleny z kmenů vyskytujících se v přírodě, jejich variant nebo mutantů; mutagenizovaných virů (například vytvořených vystavením mutagennímu působení, opakovaným pasážováním a/nebo pasážováním v nepermissivních hostitelích); přeuspořádaných virů (reassortants) (v případě segmentovaných virových genomů); a/nebo virů upravených genetickým inženýrstvím (například použitím reverzně genetických technik) s požadovaným fenotypem, tj. sníženou schopností antagonizovat buněčnou odpověď IFN. Mutant nebo virus připravený metodami genetického inženýrství může být selektován na základě odlišného růstu v IFN-deficientních systémech proti IFN-kompetentním systémům. Například je možno vybrat viry, které rostou v IFN-deficientním systému, ale nerostou v IFN-kompetentním systému (nebo které rostou v IFN-kompetentním systému méně).

Takto vybrané oslabené viry mohou být samy o sobě použity jako účinná složka vakcíny nebo farmaceutických prostředků. Alternativně mohou být oslabené viry použity jako vektor nebo „kostra“ rekombinantně vyráběných vakcín. Z tohoto hlediska mohou být použity technologie „reverzní genetiky“ pro získání mutací nebo zavedení cizích epitopů do oslabeného viru, který by sloužil jako „rodičovský“ kmen. Tímto způsobem je možno navrhnout vakcíny pro imunizaci proti variantám kmenů nebo alternativně proti zcela odlišným infekčním činitelům, nebo antigenům onemocnění. Například oslabený virus může být upraven metodami genetického inženýrství tak, aby exprimoval neutralizační epitopy jiných vybraných kmenů. Alternativně mohou být do oslabeného mutantního viru vestavěny epitopy nebo viry jiné než RNA viry s negativním řetězcem (například gp160, gp120 nebo gp41 HIV). Alternativně je možno také do virů zabudovat metodami genetického inženýrství epitopy nevirových infekčních patogenů (například parazitů, bakterií nebo hub). V ještě další

alternativě mohou být vyrobeny vakcíny proti rakovině, například vložením tumorových antigenů do kostry oslabeného viru metodami genetického inženýrství.

V konkrétním provedení týkajícím se viru RNA se segmentovanými genomy mohou být použity pro přenos oslabeného fenotypu z rodičovského viru se segmentovanou RNA (přirozený mutant, mutagenizovaný virus nebo virus získaný metodou genetického inženýrství) na odlišný kmen viru (standardní typ viru, přírodní mutant, mutagenizovaný virus nebo virus získaný metodou genetického inženýrství) techniky přeuspořádání (reassortment).

Oslabené viry, které indukují silné odpovědi IFN u hostitelů, mohou být také použity ve farmaceutických prostředcích pro prevenci nebo léčeni jiných virových infekcí nebo onemocnění léčitelných IFN, jako je rakovina. V tomto smyslu může být tropismus oslabeného viru změněn tak, aby zacílil virus na požadovaný cílový orgán, tkáň nebo buňky in vivo nebo ex vivo. S použitím tohoto přístupu může být odpověď IFN indukována lokálně, v cílovém místě, a tím je možno zabránit nebo minimalizovat vedlejší účinky systémových léčení IFN. Z tohoto hlediska může být oslabený virus upraven metodami genetického inženýrství tak, aby expimoval ligand specifický pro receptor cílového orgánu, tkáně nebo buněk.

Vynález je z části založen na objevu přihlašovatelů, že NS1 standardního typu viru chřipky funguje jako antagonist IFN tím, že NS1 inhibuje odpověď hostitelských buněk infikovaných virem zprostředkovanou IFN. Bylo zjištěno, že mutanty virů s chybějící aktivitou NS1 jsou silnými induktory buněčné odpovědi IFN, a bylo ukázáno, že mají in vivo oslabený fenotyp; tj. mutantní viry se replikují in vivo, ale mají snížené patogenní účinky. I když si autoři nepřejí být vázáni jakoukoli teorií nebo vysvětlením způsobu, jakým vynález pracuje, oslabené vlastnosti virů podle vynálezu jsou pravděpodobně způsobeny jejich schopností indukovat silnou buněčnou odpověď IFN

a jejich zmenšenou schopností antagonizovat odpověď IFN hostitele. Prospěšné vlastnosti oslabených virů podle předkládaného vynálezu však nemohou být připisovány výlučně účinkům na buněčnou interferonovou odpověď. K požadovanému oslabenému fenotypu mohou ovšem přispívat změny v dalších aktivitách spojených s NS1.

Mutantní viry chřipky s oslabenou antagonistickou aktivitou IFN se podle zjištění replikují in vivo za vytvoření titrů, které jsou dostatečné pro indukci imunologických a cytokinových odpovědí. Například vakcinace oslabeným virem chřipky snížila titr viru u zvířat, kterým byl následně zkušebně podán virus chřipky standardního typu. Ukázalo se, že oslabené viry chřipky mají také antivirové a antitumorové účinky. Předchozí infekce oslabeným virem chřipky inhibovala replikaci jiných kmenů viru chřipky standardního typu a jiných virů (jako virus Sendai), kterými byla embrya ve vejcích infikována. Inokulace oslabeného viru chřipky u zvířat, jimž byly vstříknuty tumorové buňky, snížila počet vytvořených ohnisek. Protože je známo, že virus chřipky indukuje odpověď CTL (cytotoxických T-lymfocytů), oslabený virus je velmi přitažlivým kandidátem na vakcíny proti rakovině.

Mutace, které zmenší, ale neodstraní antagonistickou aktivitu IFN viru jsou výhodné pro tvoření vakcín - takové viry mohou být selektovány na růst jak v konvenčních, tak i nekonvenčních substrátech, a na virulenci střední síly. Přihlašovatelé zvláště ukázali, že mutant NS1 se zkráceným C-koncem se replikuje na vysoké titry v substrátech deficientních na IFN, jako jsou 6- a 7-denní kuřecí embrya, stejně jako v alantoické membráně desetidenních kuřecích embryí, což je běžný substrát pro virus chřipky, který nedovolí růst mutantů viru chřipky, ve kterých došlo k deleci celého genu NS1 (dále označované jako ztrátové (knockout) mutanty). Replikace mutantu s NS1-C-koncovým zkrácením je však zmenšena u dvanáctidenních kuřecích embryí. Tento přístup umožňuje poprvé vytvořit a identifikovat živé oslabené RNA viry s negativním řetězcem, které mají změněnou,

ale nikoli odstraněnou antagonistickou aktivitu IFN, a které jsou schopné růst v substrátech vhodných pro přípravu vakcín. Tento přístup také poprvé umožňuje získat účinný selekční identifikační systém pro chřipku nebo jiné viry, které obsahují mutace poskytující změněnou, ale nikoli odstraněnou antagonistickou aktivitu interferonu.

Vynález se také týká použití IFN-deficientních systémů pro propagaci oslabených virů, které nemohou růst v běžných systémech, které se v současnosti používají pro výrobu vakcín. Termín „IFN-deficientní systémy“, jak se zde používá, označuje systémy, například buňky, buněčné linie a živočichy, jako jsou myši, kuřata, krocani, králíci, krysy apod., které neprodukují IFN nebo produkují nízké hladiny IFN, neodpovídají na IFN nebo na něj odpovídají méně efektivně, a/nebo jsou deficientní na aktivitu antivirových genů indukovaných IFN. Z tohoto hlediska přihlašovatelé identifikovali nebo navrhli celou řadu IFN-deficientních systémů, které mohou být použity, včetně bez omezení mladých kuřecích embryí, IFN-deficientních buněčných linií (jako jsou buňky VERO nebo buněčné linie získané metodami genetického inženýrství, jako jsou ztrátové mutanty STAT1). Alternativně mohou být kuřecí embrya nebo buněčné linie předem zpracovány sloučeninami, které inhibují systém IFN (včetně léčiv, protilátek, antisense řetězců, ribozymů atd.).

V dalším provedení se zahrnuje použití vajec deficientních na systém IFN, například vajec produkovaných STAT1-negativními ptáky, zvláště drůbeží, včetně bez omezení transgenních kuřat, kachen nebo kroců.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1. Virus delNS1 inhibuje replikaci viru chřipky viru a ve vejcích. Desetidenní kuřecí embrya byla očkována uvedenými pfu viru delNS1. O osm hodin později byla vejce infikována 10^3 pfu viru WSN.

Po dvou dnech inkubace při 37 °C byla oddělena alantoická kapalina a testem tvorby plaků na buňkách MDBK byly zjištěny titry viru WSN. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze dvou vajec.

Obr. 2. Indukce antivirové odpovědi u kuřecích embryí virem deINS1. Desetidenní kuřecí embrya byla očkována PBS (neošetřená kontrola) nebo 2×10^4 pfu viru deINS1 (ošetřeno deINS1). O osm hodin později byla vejce infikována 10^3 pfu viru chřipky A/WSN/33 (H1N1), viru chřipky A/PR8/34 (H+N1), viru chřipky A/X-31 (H3N2), viru chřipky B/Lee/40 nebo viru Sendai. Po dvou dnech inkubace byla alantoická kapalina sklizena a testem hemaglutinace byly zjištěny titry virů. Výsledky jsou průměrné hodnoty ze dvou vajec.

Obr. 3. Buňky CV1 byly transfekovány plasmidem exprimujícím IRF-3 fúzaný se zeleně fluoreskujícím proteinem (green fluorescent protein, GFP). To umožnilo zjištění lokalizace IRF-3 uvnitř buněk fluorescenční mikroskopií. V některých případech byl expresní plasmid NS1 kotransfekován v uvedených poměrech expresním plasmidem IRF-3. Buňky 24 hod po transfekci byly infikovány při vysokém MOI PR8 (WT) nebo virem deINS1, jak je označeno. Deset hodin po infekci byly buňky analyzovány ve fluorescenčním mikroskopu na lokalizaci IRF-3 GFP. Je ukázáno procento buněk vykazujících výlučně cytoplasmatickou lokalizaci (CYT) a jak cytoplasmatickou, tak i jadernou lokalizaci IRF-3 (Nuc+Cyt).

Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká vytváření, selekce a identifikace oslabených RNA virů s negativním řetězcem, které mají sníženou schopnost antagonizovat buněčnou odpověď IFN, a použití těchto virů ve vakcíně a farmaceutických prostředcích.

Tyto viry mohou mít segmentované nebo nesegmentované genomy a mohou být zvoleny z kmenů vyskytujících se v přírodě,

variant nebo mutantů; mutagenizovaných virů (získaných například expozicí UV záření, mutagenům a/nebo pasážováním); přeuspořádaných virů (v případě virů se segmentovanými genomy); a/nebo virů získaných metodami genetického inženýrství. Mutantní viry mohou být například vytvářeny přírodní variací, vystavením UV záření, expozicí chemickým mutagenům, pasážováním v nepermissivních hostitelích, přeuspořádáním (tj. souběžnou infekcí oslabeného segmentovaného viru dalším kmenem s požadovanými antigeny) a/nebo metodami genetického inženýrství (například použitím „reverzně genetických“ způsobů). Viry vybrané pro použití v rámci předkládaného vynálezu mají defektní IFN-antagonistickou aktivitu a jsou oslabené; jsou tedy infekční a mohou se replikovat *in vivo*, ale tvoří pouze nízké titry, což vede k subklinickým hladinám infekce, které jsou nepatogenní. Tyto oslabené viry jsou ideálními kandidáty na živé vakcíny. Ve výhodném provedení by měly být oslabené viry vybrané pro použití v rámci předkládaného vynálezu schopné indukovat silnou odpověď IFN hostiteli, což je vlastnost, která přispívá k vytvoření silné imunitní odpovědi při použití vakcíny, a což má další biologické důsledky, které způsobují užitečnost viru jako farmaceutického prostředku pro prevenci a/nebo léčení jiných virových infekcí nebo tvorby tumorů u jedinců s vysokým rizikem, nebo dalších onemocnění, která se léčí IFN.

Vynález je z části založen na celé řadě objevů a pozorování učiněných přihlašovatelem při práci s mutanty viru chřipky. Tyto principy však mohou být analogicky aplikovány a extrapolovány na jiné segmentované a nesegmentované RNA viry s negativními řetězci, včetně bez omezení paramyxovirů (virus Sendai, virus parainfluenzy, virus příušnic, virus Newcastlešské nemoci), morbilivirů (virus spalniček, virus psinky a virus dobytčího moru); pneumovirů (respirační syncytiální virus a bovinní respirační virus); a rhabdovirů (virus vezikulární stomatitidy a virus vztekliny).

IFN odpověď je za prvé důležitá pro potlačení virové infekce in vivo. Přihlašovatelé zjistili, že růst viru chřipky standardního typu A/WSN/33 v IFN-deficientních myších (myši STAT1-/-) vedl k infekci všech orgánů; tj. virová infekce nebyla omezena na plíce, jak je tomu u standardních myší, které vytvářejí odpověď IFN (Garcia-Sastre, a další, 1998, J. Virol. 72: 8550, zařazeno odkazem jako celek). Za druhé, přihlašovatelé zjistili, že NS1 viru chřipky funguje jako antagonist IFN. Přihlašovatelé objevili, že mutant viru chřipky s deletovaným celým genem NS1 (tj. „NS1 ztrátový“) nebyl schopen růst do vysokých titrů v IFN-kompetentních hostitelských buňkách, a mohl být propagován pouze v IFN-deficientních hostitelských buňkách. NS1-ztrátový virus vykazoval oslabený fenotyp (tj. byl letální u IFN-deficientní myši STAT1-/-, ale nikoli u myši standardního typu) a bylo zjištěno, že je silným induktorem odpovědi IFN v hostitelských buňkách (Garcia-Sastre, a další, 1998, Virology 252: 324 - 330, který se zařazuje ve svém celku odkazem). Předinfekce s NS1-ztrátovým mutantním virem snížila titry chřipky standardního typu a jiných virů (např. Sendai), kterými byla embrya navíc infikována. V dalším experimentu snížila infekce NS1-ztrátovým mutantem viru chřipky tvorbu ohnisek u zvířat, kterým byly naočkovány tumorové buňky. NS1-ztrátový virus chřipky tedy ukázal zajímavé biologické vlastnosti. NS1-ztrátové mutantní viry však nemohly být pomnožovány v běžných systémech pro výrobu vakcín. Aby bylo možno předejít tomuto problému přihlašovatelé použili a vyvinuli IFN-deficientní systémy, které umožňují produkci oslabeného viru s rozumnými výtěžky.

Navíc přihlašovatelé navrhli deleční mutanty NS1, u kterých nechybí celý gen. Překvapivě bylo zjištěno, že tyto mutanty NS1 mají fenotyp „meziprojektu“ - virus je možno pěstovat v běžných hostitelích používaných pro pomnožování viru chřipky (i když růst je lepší v IFN-deficientních systémech, kde se dosahuje vyšších titrů). Co je nejdůležitější, deleční mutanty jsou oslabené in vivo a indukují silnou odpověď IFN. Vakcinace NS1-zkrácenými mutanty viru chřipky vedla

k nízkým titrům viru u zvířat, kterým byl potom zkušebně podán virus standardního typu, a poskytovala ochranu proti onemocnění.

Předkládaný vynález se také týká substrátů navržených pro izolaci, identifikaci a růst virů pro účely vakcín. Popisují se zvláště substráty deficientní na interferon pro účinné pěstování mutantů viru chřipky. Podle předkládaného vynálezu je substrát deficientní na interferon takový substrát, který má nedostatečnou schopnost produkovat interferon, nebo na něj odpovídat. Substrát podle předkládaného vynálezu může být použit pro růst jakýchkoli virů, které mohou vyžadovat růstové prostředí deficientní na interferon. Tyto viry mohou bez omezení zahrnovat paramyxoviry (virus Sendai, virus parainfluenzy, virus příušnic, virus Newcastleské nemoci), morbiliviry (virus spalniček, virus psinky a virus dobytčího moru); pneumoviry (respirační syncytiální virus a bovinní respirační virus); a rhabdoviry (virus vezikulární stomatitidy a virus vztekliny).

Vynález se tako týká použití oslabeného viru podle vynálezu ve vakcínách a farmaceutických prostředcích pro viry nebo zvířata. Oslabené viry mohou být zvláště použity jako vakcíny proti širokému spektru virů a/nebo antigenů, včetně bez omezení antigenů variant kmenů, odlišných virů nebo jiných infekčních patogenů (například bakterií, parazitů a hub) nebo antigenů specifických proti tumorům. V dalším provedení mohou být oslabené viry, které inhibují virovou replikaci a tvorbu tumorů použity pro prevenci nebo léčení infekce (virovými nebo nevirovými patogeny) nebo tvorby tumorů nebo léčení onemocnění, pro které interferon přináší terapeutický prospěch. Pro zavádění prostředků s obsahem živého oslabeného viru do člověka nebo zvířete, u kterých má dojít k indukci imunitní nebo příslušné cytokinové odpovědi, může být použito různých metod. Sem patří bez omezení intranazální, intratracheální, orální, intradermální, intramuskulární, intraperitoneální, intravenózní a subkutánní cesty podávání. Ve výhodném provedení se oslabené viry podle předkládaného vynálezu formulují pro intranazální podávání.

Tvorba mutantů se změněnou antagonistickou aktivitou vůči IFN

Podle předkládaného vynálezu může být selektován a použit jakýkoli mutantní virus nebo kmen, který má sníženou antagonistickou aktivitu vůči IFN. V jednom provedení je možno provést selekci v přírodě se vyskytujícími mutantů nebo variant nebo spontánních mutantů, které mají sníženou schopnost antagonizovat buněčnou odpověď IFN. V dalším provedení je možno vytvářet mutantní viry vystavením viru působení mutagenů, jako je ultrafialové záření nebo chemické mutageny, nebo vícenásobným pasážováním a/nebo pasážováním v nepermissivních hostitelích. Pro selekci na mutanty s omezenou IFN-antagonistickou funkcí může být použit screening v diferenciálním růstovém systému. V případě virů se segmentovanými genomy může být oslabený fenotyp převeden do jiného kmene s požadovaným antigenem přeuspořádání, tj. společnou infekcí oslabeného viru a požadovaného kmene, a selekcí na přeuspořádané varianty vykazující oba fenotypy.

V dalším provedení mohou být mutace zavedeny do RNA viru s negativním řetězcem jako je chřipka, RSV, NDV, VSV a PIV, metodami genetického inženýrství s použitím přístupu „reverzní genetiky“. Tímto způsobem je možné zavést do vakcinačních kmenů přírodní nebo jiné mutace, které kmenu propůjčují oslabený fenotyp. Metodami genetického inženýrství je například možné získat delece, inserce nebo substituce kódující oblasti genu odpovědného za IFN-antagonistické aktivity (jako je NS1 chřipky). Jsou možné také delece, substituce nebo inserce v nekódující oblasti genu, odpovědného za IFN-antagonistickou aktivitu. Metodami genetického inženýrství mohou také být získány mutace signálů odpovědných za transkripci, replikaci, polyadenylaci a/nebo sbalování genu odpovědného za IFN-antagonistickou aktivitu. Například v případě chřipky mohou takové modifikace bez omezení zahrnovat: substituci nekódujících oblastí

genu viru chřipky typu A nekódujícími oblastmi genu viru chřipky typu B (Muster, a další, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5177), záměny párů bází v nekódujících oblastech genu viru chřipky (Fodor, a další, 1998, J. Virol. 72: 6283), mutace v promotorové oblasti genu viru chřipky (Piccone, a další, 1993, Virus Res. 28: 99; Li, a další, 1992, J. Virol. 66: 4331), substituce a delece v řadě uridinových zbytků na 5'-konci genu viru chřipky ovlivňují polyadenylaci (Luo, a další, 1991, J. Virol. 65: 2861; Li, a další, J. Virol. 1994, 68 (2): 1245 - 9). Takové mutace, například promotoru, by mohly snížit expresi genu odpovědného za IFN-antagonistickou aktivitu. Mutace ve virových genech, které mohou regulovat expresi genu odpovědného za IFN-antagonistickou aktivitu, spadají také do rozsahu virů, které mohou být použity podle předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález se tako týká mutací segmentu genu NS1, které nemusí vést ke změněné IFN-antagonistické aktivitě nebo změněnému IFN-indukujícímu fenotypu, ale mohou vést spíše ke změněným virovým funkcím a oslabenému fenotypu, například změněná inhibice exportu mRNA obsahující poly(A) z jádra, změněná inhibice aktivace PKR sekvestrací dsRNA, změněný vliv na translaci virové RNA a změněná inhibice polyadenylace u hostitelské mRNA (viz Krug, Textbook of Influenza, Nicholson, a další. ed. 1998, 82-92, a tam uvedené odkazy).

Techniky reverzní genetiky zahrnují přípravu syntetických rekombinantních virových RNA, které obsahují nekódující oblasti viru RNA s negativním řetězcem, které jsou nezbytné pro rozpoznávání virovými polymerázami a pro signály sbalování nezbytné k vytvoření zralého virionu. Rekombinantní RNA jsou syntetizovány z rekombinantního templátu DNA a rekonstituovány in vitro purifikovaným komplexem virové polymerázy za vytvoření rekombinantních ribonukleoproteinů (RNP), které mohou být použity pro transfekci buněk. Účinnější transfekce se dosahuje, jestliže jsou proteiny virové polymerázy přítomny v průběhu transkripce

syntetických RNA buď in vitro nebo in vivo. Syntetické rekombinantní RNP mohou být vneseny zpět do infekčních virových částic. Následující techniky se popisují v US patentu No. 5,166,057 uděleném 24. listopadu 1992; v US patentu No. 5,854,037 uděleném 29. prosince 1998; v evropské zveřejněné patentové přihlášce EP 0702085A1, zveřejněné 20. února 1996; v US patentové přihlášce No. 09/152,845; v mezinárodních zveřejněných patentových přihláškách PCT WO 97/12032 zveřejněné 3. dubna 1997; WO 96/34625 zveřejněné 7. listopadu 1996; v evropské patentové zveřejněné přihlášce EP-A780475; WO 99/02657 zveřejněné 21. ledna 1999; WO 98/53078 zveřejněné 26. listopadu 1998; WO 98/02530 zveřejněné 22. ledna 1998; WO 99/15672 zveřejněné 1. dubna 1999; WO 98/13501 zveřejněné 2. dubna 1998; WO 97/06270 zveřejněné 20. února 1997; a EPO 780 47SA1 zveřejněné 25. června 1997, přičemž všechny tyto dokumenty se zařazují jako celek odkazem.

Oslabené viry vytvořené metodami reverzní genetiky mohou být použity v popisovaných vakcínách a farmaceutických prostředcích. Techniky reverzní genetiky mohou být také použity pro zavedení dalších mutací metodami genetického inženýrství do jiných virových genů důležitých pro výrobu vakcíny - tj. do oslabeného viru mohou být metodami genetického inženýrství zavedeny epitopy užitečných variant vakcinačního kmene. Do oslabeného řetězce mohou být metodami genetického inženýrství také alternativně zavedeny úplně cizí epitopy včetně antigenů odvozených z jiných virových nebo nevirových patogenů. Do oslabeného kmene mohou být metodami genetického inženýrství zavedeny například antigeny nepříbuzných virů jako je HIV (gp160, gp120, gp41), antigeny parazitů (například malárie), antigeny bakterií nebo hub nebo tumorové antigeny. Alternativně mohou být do chimerických oslabených virů podle předkládaného vynálezu zavedeny epitopy, které mění tropismus viru in vivo.

V odlišném provedení mohou být pro získání oslabených virů s požadovanými epitopy v segmentovaných RNA virech použity

kombinace technologií reverzní genetiky a technologií přeuspořádání. Například oslabený virus (vytvořený přirozenou selekcí, mutagenézí nebo metodami reverzní genetiky) a kmen nesoucí požadovaný epitop vakcíny (vytvořený přirozenou selekcí, mutagenézí nebo metodami reverzní genetiky) mohou být zavedeny společnou infekcí do hostitele, který umožňuje přeuspořádání segmentovaných genomů. Potom je možné provést selekci přeuspořádaných genotypů, které mají jak oslabený fenotyp, tak i obsahují požadovaný epitop.

V dalším provedení je mutovaným virem virus DNA (např. virus vakcinie, adenovirus, bakulovirus) nebo virus s pozitivním řetězcem RNA (např. poliovirus). V takových případech mohou být také použity techniky rekombinantní DNA, které jsou dobře známé v oboru (viz například US patent No. 4,769,330 Paoletti, US patent No. 4,215,051 Smith, z nichž oba jsou zařazeny ve svém celku odkazem.

Metodami genetického inženýrství podle předkládaného vynálezu může být získán jakýkoli virus, včetně bez omezení skupin uvedených v tabulce 2 níže.

Tabulka 2

Skupiny lidských a živočišných virů

Vlastnosti viru

Skupina viru

dsDNA

Poxviridae

s obalem

Irididoviridae

Herpesviridae

Bez obalu

Adenoviridae

Papovaviridae

Hepadnaviridae

ssDNA

Parvoviridae

bez obalu

dsRNA

Reoviridae

bez obalu

Birnaviridae

ssRNA s obalem

Togaviridae

Genom s pozitivním řetězcem	Flaviviridae
Bez kroku DNA při replikaci	Coronaviridae
	Hepatitis C Virus
S krokem DNA při replikaci	Retroviridae
Genom s negativním řetězcem	Paramyxoviridae
Nesegmentovaný genom	Rhabdoviridae
	Filoviridae
Segmentovaný genom	Orthomyxoviridae
	Bunyaviridae
	Arenaviridae
Bez obalu	Picornaviridae
	Caliciviridae

Použité zkratky: ds = dvojřetězcový; ss = jednořetězcový; s obalem = obsahují vnější lipidovou dvojvrstvu odvozenou z membrány hostitelské buňky; genom s pozitivním řetězcem = pro RNA viry, genomy, které jsou složeny z nukleotidových sekvencí, které se přímo překládají na ribozomech; = pro viry DNA, genomy, které jsou složeny z nukleotidových sekvencí stejných jako mRNA; genom s negativním řetězcem = genomy, které jsou složeny z nukleotidových sekvencí komplementárních k řetězci s pozitivním (kódujícím) řetězcem.

Ve výhodném provedení se předkládaný vynález týká virů chřipky získaných metodami genetického inženýrství, které obsahují delece a/nebo zkrácení genového produktu NS1. NS1-mutanty chřipky typu A a B jsou zvláště výhodné. V jednom přístupu se zachovávají části aminokoncové oblasti genového produktu NS1, zatímco dojde k deleci C-koncové oblasti genového produktu NS1. Konkrétní požadované mutace mohou být získány vložení nukleové kyseliny, delecí nebo mutací na příslušném kodonu. Zkrácené proteiny NS1 mají zvláště 1 až 60 aminokyselin, 1 až 70 aminokyselin, 1 až 80 aminokyselin, 1 až 90 aminokyselin (N-koncová aminokyselina je označena jako 1),

a s výhodou 90 aminokyselin; od 1 do 100 aminokyselin, a s výhodou 99 aminokyselin; od 1 do 110 aminokyselin; od 1 do 120 aminokyselin; nebo od 1 do 130 aminokyselin, a s výhodou 124 aminokyselin genového produktu NS1 standardního typu.

Předkládaný vynález se tako týká jakéhokoli viru chřipky získaného metodami genetického inženýrství, ve kterém byl genový produkt NS1 modifikován zkrácením nebo úpravou proteinu NS1, který propůjčuje mutantním virům následující fenotypy: schopnost virů růst do vysokých titrů v neobvyklých substrátech, jako jsou šesti až sedmidenní kuřecí embrya, nebo schopnost virů indukovat interferonovou odpověď hostitele. V případě virů chřipky typu A sem bez omezení patří viry se zkráceným NS1.

Předkládaný vynález zahrnuje jakékoli použití v přírodě se vyskytujících mutantních virů chřipky typu a nebo B s oslabeným fenotypem, stejně jako kmeny viru chřipky získané metodami genetického inženýrství tak, aby obsahovaly mutace odpovědné za oslabený fenotyp. Pro viry chřipky typu A sem bez omezení patří viry s NS1 o délce 124 aminokyselin (Norton, a další, 1987, Virology 156: 204 - 213, zařazeno jako celek odkazem). Pro viry chřipky typu B sem bez omezení patří viry se zkrácenou mutací NS1 obsahující 127 aminokyselin odvozených z N-konce (B/201) (Norton, a další, 1987, Virology 156: 204 - 213, zařazeno jako celek odkazem), a viry se zkrácenou mutací NS1 obsahující 90 aminokyselin odvozených z N-konce (B/AWBY-234) (Tobita, a další, 1990, Virology 174: 314 - 19, zařazeno jako celek odkazem). Předkládaný vynález zahrnuje použití v přírodě se vyskytujících mutantních analogů pro NS1/38, NS1/80, NS1/124, (Egorov, a další, 1998, J. Virol. 72 (8): 6437 - 41), stejně jako v přírodě se vyskytující mutanty A/Turkey/ORE/71, B/201 nebo B/AWBY-234.

Oslabený virus chřipky může být metodami genetického inženýrství dále upraven tak, aby exprimoval antigeny jiných

vakcinačních kmenů (například použitím metod reverzní genetiky nebo přeuspořádání). Alternativně může být získán metodou genetického inženýrství oslabený virus chřipky použitím reverzní genetiky nebo přeuspořádání s viry získanými metodami genetického inženýrství, pro expresi zcela cizích epitopů, například antigenů jiných infekčních patogenů, tumorových antigenů nebo cílených antigenů. Protože segment NS RNA je mezi osmi virovými RNA nejkratší, je možné, že bude NS RNA tolerovat delší inserce heterologních sekvencí než jiné virové geny. Navíc segment NS RNA řídí syntézu vysokých koncentrací proteinu v infikovaných buňkách, což může ukazovat na to, že by byl ideálním segmentem pro inserce cizích antigenů. Podle předkládaného vynálezu však může být pro inserci heterologních sekvencí použit jakýkoli z osmi segmentů virů chřipky. Jestliže se například požaduje prezentace povrchového antigenu, mohou být použity segmenty kódující strukturní proteiny, například HA nebo NA.

Selekční systém založený na omezení hostitele

Vynález zahrnuje způsoby selekce virů, které mají požadovaný fenotyp, tj. virů, které mají nízkou nebo žádnou IFN-antagonistickou aktivitu, ať už jsou získány z přírodních variant, spontánních variant (tj. variant, které se vyvinou při pomnožování viru), mutagenizovaných přírodních variant, přeuspořádaných virů a/nebo virů získaných metodami genetického inženýrství. U těchto virů je nejlepší provést screening testy rozdílného růstu, které porovnávají růst v IFN-deficientních a v IFN-kompetentních hostitelských systémech. Viry, které prokážou lepší růst v IFN-deficientních systémech ve srovnání s IFN-kompetentními systémy se vyberou. S výhodou se zvolí viry, které rostou v IFN-deficientních systémech do titrů alespoň o řád vyšších než v IFN-kompetentním systému.

Alternativně je možno provést screening virů použitím systémů s testováním IFN, například testovacích systémů založených na

transkripci, při kterých se exprese reporterového genu řídí promotorem reagujícím na IFN. Exprese reporterového genu v infikovaných buňkách ve srovnání s neinfikovanými buňkami může být měřena pro identifikaci virů, které účinně indukují odpověď IFN, ale které jsou neschopné antagonizovat odpověď IFN. Ve výhodném provedení se však používají pro selekci virů s požadovaným fenotypem testy rozdílného růstu, protože použitý hostitelský systém (IFN-kompetentní proti IFN-deficientnímu) vykonává příslušný selekční tlak.

Například růst viru (měřený titrem) může být porovnán v celé řadě buněk, buněčných linií nebo modelových zvířecích systémech, které exprimují IFN a složky odpovědi IFN proti buňkám, buněčným liniím nebo modelovým zvířecím systémům, které jsou deficientní na IFN nebo složky odpovědi IFN. Z tohoto hlediska je možno porovnat růst viru v buněčných liniích jako jsou buňky VERO (které jsou IFN-deficientní) proti buňkám MDCK (které jsou IFN-kompetentní). Alternativně mohou být IFN-deficientní buněčné linie odvozeny a vytvořeny ze zkřížených zvířat, nebo mohou být získány metodami genetického inženýrství tak, aby byly deficientní na systém INF (např. mutantní myš STAT1^{-/-}). Je možno měřit růst viru v těchto buněčných liniích ve srovnání s IFN-kompetentními buňkami, odvozenými například ze zvířat standardního typu (například myš standardního typu). V dalším provedení je možno upravit buněčné linie, které jsou IFN-kompetentní a o nichž je známo, že podporují růst viru standardního typu, metodami genetického inženýrství tak, aby byly IFN-deficientní (například ztrátové mutanty STAT1, IRF3, PKR, atd.). Je možno použít způsobů propagace virů v buněčných liniích dobře známých v oboru (viz například pracovní příklady dále). Je možno porovnávat růst viru ve standardní IFN-kompetentní buněčné linii proti buněčné linii IFN-deficientní, získané metodami genetického inženýrství.

Mohou být také použity zvířecí systémy. Například v případě chřipky je možno porovnávat růst v mladých, IFN-deficientních

kuřecích embryích, například přibližně šest až přibližně osm dnů starých, s růstem ve starších, IFN-kompetentních vejcích, o stáří například deset až dvanáct dnů. Pro tento účel mohou být použity techniky infekce a propagace ve vejcích známé v oboru (například viz pracovní příklady níže). Alternativně může být porovnáván růst v IFN-deficientní myši STAT1-/- s IFN-kompetentní myši standardního typu. V ještě další alternativě může být porovnáván růst v IFN-deficientních vejcích, poskytovaných například STAT1-/- transgenní drůbeží, s růstem v IFN-kompetentních vejcích vytvořených drůbeží standardního typu.

Pro účely screeningu však mohou být namísto geneticky manipulovaných systémů použity přechodné (tranzientní) IFN-deficientní systémy. Například hostitelský systém může být ošetřen sloučeninami, které inhibují produkci IFN a/nebo složky odpovědi IFN (například léčiva, protilátky proti IFN, protilátky proti receptoru IFN, inhibitory PKR, molekuly a antisense ribozymy atd). Růst viru může být porovnáván v IFN-kompetentních neošetřených kontrolách, a IFN-deficientních ošetřených systémech. Například starší vejce, která jsou IFN-kompetentní, mohou být ošetřena těmito léčivy před infekcí viru, u kterého se provádí screening. Růst se porovnává s růstem dosahovaným v neošetřených kontrolních vejcích stejného stáří. Metody screeningu podle předkládaného vynálezu poskytují jednoduchou a snadnou metodu systematického prozkoumávání pro identifikaci mutantních virů se sníženou IFN-antagonistickou aktivitou tím, že mutantní virus není schopen růst v prostředích reagujících na IFN ve srovnání se schopností mutantního viru růst v IFN-deficientních prostředích. Metody screeningu podle předkládaného vynálezu mohou být také použity pro identifikaci mutantních virů se změněnou, ale nikoli oslabenou antagonistickou aktivitou, měřením schopnosti mutantního viru růst jak v IFN-responsivních, například desetidenních embryích nebo buňkách MDCK, a v prostředích IFN-deficientních, například šesti až sedmidenních embryích nebo buňkách Vero.

Například viry chřipky ukazující alespoň o jeden řád nižší titry v desetidenních vejcích, ve srovnání s šesti až sedmidenními vejci, jsou považovány za částečně neschopné antagonizovat odpověď IFN, a proto jsou přijatelnými kandidáty na vakcínu.

Metody selekce podle vynálezu také zahrnují identifikaci těch mutantních virů, které indukují odpovědi IFN. V souladu s metodami selekce podle vynálezu je možno měřit indukci odpovědi IFN testováním úrovně exprese IFN nebo exprese cílových genů nebo reporterových genů indukovaných IFN po infekci mutantním virem nebo aktivaci transaktivátoru, který se účastní exprese IFN a/nebo odpovědi IFN.

V ještě dalším provedení selekčních systémů podle vynálezu je možno určit indukci odpovědi IFN měřením fosforylovaného stavu složek biochemické cesty IFN po infekci testovaným mutantním virem, například IRF-3, který je fosforylován jako odpověď na dvojřetězcovou RNA. Jako odpověď na IFN typu I jsou rychle na tyrozinech fosforylovány Jak1 kináza a TyK2 kináza, podjednotky receptoru IFN, STAT1 a STAT2. Pro určení, zda mutantní virus indukuje odpovědi IFN, se tedy infikují buňky, jako buňky 293, testovaným mutantním virem a po infekci se buňky lyzují. Složky biosyntézy IFN, jako je kináza Jak1 nebo kináza TyK2, se imunoprecipitují z lyzátů infikované buňky s použitím specifických polyklonálních sér nebo protilátek, a stav s fosforylovaným tyrozinem kinázy se určí metodami imunologického přenosu s antifosfotyrosinovou protilátkou (viz např. Krishnan, a další, 1997, Eur. J. Biochem. 247: 298 - 305). Zvýšený fosforylovaný stav jakékoli ze složek biosyntézy IFN po infekci mutantním virem by ukazoval na indukci odpovědi IFN mutantním virem.

V ještě dalším provedení zahrnují selekční systémy podle vynálezu měření schopnosti vázat specifické sekvence DNA nebo translokace transkripčních faktorů indukované jako odpověď na

virovou infekci, například IRF3, STAT1, STAT2 atd. Zvláště STAT1 a STAT2 jsou fosforylovány a přemísťovány z cytoplasmy do jádra jako odpověď na IFN typu I. Schopnost vázat specifické sekvence DNA nebo přemísťování transkripčních faktorů je možno měřit technikami známými odborníkům v oboru, například testem posunu elektromobility v gelu, barvením buněk apod.

V ještě dalším provedení selekčních systémů podle vynálezu je možno zjišťovat indukci odpovědi IFN měřením IFN-dependentní transkripční aktivace po infekci testovaným mutantním virem. V tomto provedení je možno analyzovat expresi genů, o kterých je známo, že jsou indukovány IFN, například Mx, PKR, 2-5-oligoadenylátsyntetáza, hlavní histokompatibilní komplex (MHC) třídy I, apod. přičemž se používají způsoby známé odborníkům v oboru, jako jsou northernový přenos, westernový přenos, PCR atd.).

Alternativně se metodami genetického inženýrství upraví testovací buňky jako jsou lidské embryonální ledvinové buňky nebo buňky lidského osteogenního sarkomu tak, aby přechodně nebo konstitučně exprimovaly reporterové geny, jako je luciferázový reporterový gen nebo reporterový gen chloramfenikoltransferázy (CAT), pod řízením prvku odpovědi stimulovaného interferonem, jako je promotor genu ISG-54K stimulovaného IFN (Bluyssen, a další, 1994, Eur. J. Biochem. 220: 395 - 402). Buňky se infikují testovaným mutantním virem a míra exprese reporterového genu se porovnává s expresí v neinfikovaných buňkách nebo buňkách infikovaných virem standardního typu. Zvýšení míry exprese reporterového genu po infekci testovaným virem by naznačovalo, že testovaný mutantní virus indukuje odpověď IFN.

V ještě dalším provedení zahrnují selekční systémy podle vynálezu měření indukce IFN zjištěním, zda extrakt z buňky nebo vejce infikovaných testovaným mutantním virem je schopen propůjčovat ochrannou aktivitu proti virové infekci. Konkrétněji se skupiny

desetidenních kuřecích embryí infikují testovaným mutantním virem nebo virem standardního typu. Přibližně 15 až 20 hodin po infekci se sklídí alantoická kapalina a testuje se na aktivitu IFN určením nejvyššího ředění, které se ještě vyznačuje ochranným účinkem proti infekci VSV v buňkách tkáňové kultury, jako jsou buňky CEF.

Pomnožování viru v růstových substrátech deficientních na interferon

Vynález také zahrnuje způsoby a IFN-deficientní substráty pro růst a izolaci v přírodě se vyskytujících nebo metodami genetického inženýrství získaných mutantních virů, které mají změněnou antagonistickou aktivitu vůči IFN. IFN-deficientní substráty, které mohou být použity pro podporu růstu oslabených mutantních virů zahrnují bez omezení v přírodě se vyskytující buňky, buněčné linie, zvířata nebo embrya ve vejcích, která jsou IFN-deficientní, například buňky Vero, mladá embrya ve vejcích; rekombinantní buňky nebo buněčné linie, které jsou upraveny metodami genetického inženýrství tak, aby byly IFN-deficientní, tedy například IFN-deficientní buněčné linie odvozené ze STAT1-ztrátové myši nebo jiných transgenních zvířat upravených podobnými zásahy genetického inženýrství; embrya ve vejcích získaná od IFN-deficientních ptáků, zvláště drůbeže (například kuřat, kachen, krocanů) včetně hejn, která jsou křížena tak, aby poskytovala IFN-deficientní nebo transgenní ptáky (například STAT1-ztrátové). Alternativně je možno metodami genetického inženýrství upravit hostitelský systém, buňky, buněčné linie, vejce nebo zvířata tak, aby exprimovaly transgeny kódující inhibitory systému IFN, například dominantně-negativní mutanty, jako je STAT1 s chybějící vazebnou doménou DNA, antisense RNA, ribozymy, inhibitory produkce IFN, inhibitory signálů IFN a/nebo inhibitory antivirových genů indukovaných IFN. Mělo by být zřejmé, že zvířata, která jsou křížena nebo metodami genetického inženýrství upravena tak, aby byla IFN-deficientní, budou mít do určité míry oslabenou imunitu,

a měla by být udržována v kontrolovaném prostředí bez přístupu onemocnění. Měla by být tedy prováděna vhodná opatření (včetně použití antibiotik ve výživě) pro omezení rizika expozici infekčním činitelům transgenních IFN-deficientních zvířat, jako jsou hejna vyšlechtěných slepic, kachen, krocanů atd. Alternativně je možno působit na hostitelský systém, například buňky, buněčné linie, vejce nebo zvířata sloučeninou, která inhibuje produkci IFN a/nebo biochemickou cestu syntézy IFN, například léky, protilátkami, antisense molekulami, ribozymovými molekulami cílenými na gen STAT1 a/nebo antivirovými geny indukovanými IFN.

Podle předkládaného vynálezu zahrnují nezralá kuřecí embrya vejce, která jsou stará do deseti dnů, ale již ne deset dnů, s výhodou šesti až devítidenní vejce; a vejce, která uměle napodobují nezralá vejce stárí méně než 10 dnů získaná změnami podmínek růstu, například změnami inkubačních teplot; působením chemických látek; nebo jakoukoli jinou změnou, která poskytuje vejce se zpomaleným vývojem, takže systém IFN vejce není zcela vyvinutý ve srovnání s vejci stárí 10 až 12 dnů.

Přírodní IFN-deficientní substráty

V jednom provedení se předkládaný vynález týká pěstování v přírodě se vyskytujících a metodami genetického inženýrství získaných mutantních virů v neobvyklých substrátech, jako jsou nezralá embrya ve vejcích, u kterých ještě nedošlo k vyvinutí systému IFN. Nezralá embrya ve vejcích se normálně používají pro pěstování viru pro svůj křehký stav a malý alantoický objem. Předkládaný vynález zahrnuje pěstování mutantních virů v embryích ve vejcích starých méně než 10 dnů; s výhodou pěstování mutantních virů v embryích ve vejcích starých 8 dnů a nejvýhodněji ve vejcích starých 6 až 8 dnů.

Předkládaný vynález také zahrnuje způsoby pěstování a izolace mutantních virů se změněnou IFN-antagonistickou aktivitou v buňkách a buněčných liniích, které v přirozeném stavu nemají biosyntézu IFN nebo mají deficientní biosyntézu IFN nebo mají deficientní systém IFN, například nízké hladiny exprese IFN ve srovnání s buňkami standardního typu. Ve zvláště výhodném provedení se předkládaný vynález týká způsobů pěstování mutovaných virů se změněnou antagonistickou aktivitou IFN v buňkách Vero.

IFN-deficientní substráty získané metodami genetického inženýrství

Předkládaný vynález se týká metod pěstování a izolace mutovaných virů se změněnou IFN-antagonistickou aktivitou v IFN-deficientním substrátu získaném metodami genetického inženýrství. Předkládaný vynález zahrnuje transgenní ptáky, u kterých je mutován gen nezbytný pro funkci systému IFN, například STAT1, kteří mohou klást vejce, která jsou IFN-deficientní. Předkládaný vynález dále zahrnuje transgenní ptáky, kteří exprimují dominantně-negativní transkripční faktory, například STAT1 s chybějící vazebnou doménou DNA, ribozymy, antisense RNA, inhibitory produkce IFN, inhibitory signálů IFN a inhibitory antivirových genů indukovaných jako odpověď na IFN. Při použití vajec z IFN-deficientních transgenních ptáků je prospěšné to, že při pěstování viru mohou být použita běžná desetidenní vejce, která jsou stabilnější a mají větší objem v důsledku jejich větší velikosti. V ještě dalším provedení mohou být upravovány metodami genetického inženýrství buněčné linie tak, aby byly IFN-deficientní. Předkládaný vynález zahrnuje buněčné linie, ve kterých jsou mutovány geny nezbytné pro syntézu IFN, geny účastníci se biosyntézy IFN a/nebo antivirový gen nebo geny indukované IFN, například STAT1.

Předkládaný vynález poskytuje rekombinantní buněčné linie nebo zvířata, zvláště ptáky, u kterých byl přerušen jeden nebo více genů

nezbytných pro biosyntézu IFN, například interferonový receptor, STAT1 atd., tj. jsou tímto způsobem „ztrátové“; rekombinantním zvířetem může být jakékoli zvíře, ale ve výhodném provedení jde o ptáka, například kuře, krocana, slepici, kachnu atd. (viz např. Sang, 1994, Trends Biotechnol. 12: 415; Perry, a další, 1993, Transgenic Res. 2: 125; Stern, C. D., 1996, Curr. Top Microbiol. Immunol. 212: 195 - 206; a Shuman, 1991, Experientia 47: 897, kteří poskytují přehled týkající se produkce transgenních ptáků, přičemž každý z těchto odkazů je zařazen ve svém celku). Taková buněčná linie nebo zvíře mohou být vytvořeny jakýmkoli způsobem známým v oboru pro přerušování genu nebo chromozomu buňky nebo zvířete. Tyto techniky zahrnují bez omezení pronukleární mikroinjekci (Hoppe & Wagner, 1989, US patent No. 4,873,191); přenos genu do zárodečných linií zprostředkovaný retrovirem (Van der Putten, a další, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 82: 6148 - 6152); cílené působení na geny v embryonálních kmenových buňkách (Thompson, a další, 1989, Cell 56: 313); elektroporaci embryí (Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1803); a přenos genů zprostředkovaný spermatem (Lavitrano, a další, 1989, Cell 57: 717); atd. Přehled těchto technik je uveden v článku Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171, který je ve svém celku zařazen odkazem.

Konkrétně STAT1-ztrátová zvířata mohou být produkována podporou homologní rekombinace mezi genem STAT1 ve svém chromozomu a exogenním genem STAT1, u kterého bylo dosaženo biologické neaktivity (s výhodou vložením heterologní sekvence, například genu pro rezistenci na antibiotika). Homologní rekombinační metody pro přerušování genů v myším genomu se poskytují například v Capecchi (1989, Science 244: 1288) a Mansour, a další (1988, Nature 336: 348).

Ve stručnosti, celý nebo část STAT1-genomického klonu se izoluje z genomické DNA ze stejného druhu, jakého je ztrátová buňka nebo zvíře. STAT1-genomický klon může být izolován jakýmkoli

v oboru známým způsobem pro izolaci agenomických klonů (například testováním genomické knihovny sondou odvozenou ze sekvence STAT1, jako jsou sekvence poskytované v Meraz, a další, 1996, Cell 84: 431; Durbin, a další, 1996, Cell 84: 443, a tam uvedených odkazech). Jakmile je již genomický klon izolován, celek nebo část tohoto klonu se zavede do rekombinantního vektoru. S výhodou část klonu zavedená do vektoru obsahuje alespoň část exonu genu STAT1, tj. obsahuje kódující sekvenci proteinu STAT1. Potom se sekvence, která není homologní se sekvencí STAT1, s výhodou pozitivně selekci zjistitelný marker jako je gen kódující rezistenci na antibiotika, zavede do exonu genu STAT1. Tento marker vhodný pro selekci se s výhodou operativně připojí k promotoru, výhodněji ke konstitutivnímu promotoru. Nehomologní sekvence se zavede kdekoli v kódující sekvenci STAT1, což přeruší aktivitu STAT1, například v poloze, kde bylo ukázáno, že bodové mutace nebo i jiné mutace inaktivují funkci proteinu STAT1. Pro příklad, ale bez omezení, je možno nehomologní sekvenci vložit do kódující sekvence pro část proteinu STAT1 obsahující veškerou nebo část kinázové domény (například nukleotidová sekvence kódující alespoň 50, 100, 150, 200 nebo 250 aminokyselin kinázové domény). Marker umožňující pozitivní selekci je s výhodou gen rezistence na neomycin (*neo* gen) nebo hygromycin (*hygro* gen). Promotorem může být jakýkoli promotor známý v oboru, například promotor fosfoglycerátkinázy (PGK) (Adra, a další, 1987, Gene 60: 65 - 74), promotor PolII (Soriano, a další, 1991, Cell 64: 693 - 701), nebo promotor MC1, který je syntetickým promotorem navrženým pro expresi kmenových buněk odvozených z embryí (Thomas & Capecchi, 1987, Cell 51: 503 - 512). Použití markeru umožňujícího selekci, jako je gen rezistence na antibiotika, umožní selekci buněk, které mají v sobě obsažen cílový vektor (například exprese produktu *neo* genu propůjčuje rezistenci na G418 a exprese *hygro* genu propůjčuje rezistenci na hygromycin).

Ve výhodném provedení se mimo inzert genomického klonu STAT1 množí marker umožňující negativní selekci pro dosažení negativní selekce na homologní, na rozdíl od nehomologní rekombinace vektoru. Takovým markerem umožňujícím negativní selekci je gen HSV thymidinkinázy (HSV-*tk*), jehož exprese způsobí citlivost buněk na gancyklovir. Marker umožňující negativní selekci je s výhodou pod řízením promotoru, jako je například bez omezení promotor PGK, promotor PolII nebo promotor MC1.

Jestliže dojde k homologní rekombinaci, části vektoru homologní s genem STAT1 stejně jako nehomologní inzert uvnitř sekvencí genu STAT1, jsou vloženy do genu STAT1 v chromozomu, a zbytek vektoru se ztratí. Protože je tedy marker umožňující negativní selekci mimo oblast homologie s genem STAT1, buňky u nichž došlo k homologní rekombinaci (nebo jejich potomstvo), nebudou obsahovat marker umožňující negativní selekci. Jestliže je například markerem umožňujícím negativní selekci gen HSV-*tk*, buňky, ve kterých došlo k homologní rekombinaci, nebudou exprimovat thymidinkinázu a přežijí expozici gancykloviru. Tento postup umožňuje selekci buněk, ve kterých došlo k homologní rekombinaci, na rozdíl od nehomologní rekombinace, při které je pravděpodobné, že marker umožňující negativní selekci je rovněž zahrnut do genomu spolu se sekvencemi STAT1 a markerem umožňujícím pozitivní selekci. Buňky, ve kterých došlo k nehomologní rekombinaci, by nejpravděpodobněji exprimovaly thymidinkinázu a byly by citlivé na gancyklovir.

Jakmile se připraví cílový vektor, je linearizován restrikcí enzymem, pro který existuje jedinečné místo v cílovém vektoru, a linearizovaný vektor se zavede do kmenových buněk odvozených z embrya (ES) (Gossler, a další, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9065 -9069) jakýmkoli způsobem známým odborníkům v oboru, například elektroporací. Jestliže cílový vektor obsahuje marker umožňující pozitivní selekci a marker umožňující negativní protiselekci, mohou být buňky ES, ve kterých došlo k homologní rekombinaci,

selektovány inkubací v selektivních médiích. Například jestliže jsou markery umožňujícími selekci gen rezistence na *neo* a gen HSV-*tk*, buňky se vystaví působení G418 (například přibližně 300 µg/ml) a gancykloviru (například přibližně 2 µM). Pro potvrzení skutečnosti, že přerušené sekvence STAT1 se homologně rekombinovaly do genu STAT1 v genomu buněk ES, je možno použít jakýkoli způsob zjištění genotypu známý v oboru, například bez omezení analýzu Southernovým přenosem. Protože restriční mapa genomického klonu STAT1 je známa a známa je i kódující sekvence STAT1 (viz Meraz, a další, 1996, Cell 84: 431; Durbin, a další, 1996, Cell 84: 443 - 450, a všechny tam uvedené reference), je možno určit velikost konkrétního restričního fragmentu nebo produktu amplifikace PCR vytvořených z DNA jak přerušených, tak i nepřerušených alel. Testováním restričního fragmentu nebo produktu PCR, jejichž velikost je odlišná mezi přerušeným a nepřerušeným genem STAT1, je tedy možno určit, zda došlo pro přerušení genu STAT1 k homologní rekombinaci.

Buňky ES s přerušeným lokusem STAT1 mohou být tedy zavedeny do blastocyst mikroinjekcí a potom mohou být blastocysty implantovány do děloh pseudopregnantní myši použitím rutinních technik. Zvířata, která se vyvinou z implantovaných blastocyst, jsou chimerická na přerušené alely. Chimeričtí samci mohou být zkříženi se samicemi a křížení může být navrženo tak, že přenos alely je svázán s přenosem určité barvy srsti. Přenos v zárodečné linii alely může být potvrzen Southernovým přenosem nebo analýzou PCR jak bylo popsáno výše, provedenými s genomickou DNA izolovanou ze vzorků tkáně.

Substráty s přechodnou deficiencí na IFN

Na buňky, buněčné linie, zvířata nebo vejce je možno předem působit sloučeninami, které inhibují systém IFN. Podle předkládaného vynálezu mohou být sloučeniny inhibující syntézu IFN nebo aktivitu

exprese složek systému IFN použity pro působení na hostitele, tedy například sloučeniny inhibující syntézu IFN, aktivitu IFN, receptor IFN, jiné cíle v cestě přenosu signálu IFN, nebo které inhibují aktivitu antivirových genů indukovaných IFN. Příklady sloučenin, které mohou být použity podle předkládaného vynálezu, zahrnují bez omezení molekuly nukleových kyselin, protilátky, peptidy, látky s antagonistickými účinky na receptor IFN, inhibitory biosyntézy STAT1, inhibitory PKR apod. Podle předkládaného vynálezu patří mezi molekuly nukleových kyselin antisense molekuly, ribozomy a trojšroubovicové molekuly, jejichž cílem jsou geny kódující nezbytné složky systému IFN, například STAT1. Molekuly nukleových kyselin také zahrnují nukleotidy kódující dominantně negativní mutanty složek systému IFN; například před infekcí mutantním virem mohou být buňky transfekovány DNA kódující zkrácený, signálování neschopný mutant receptoru IFN.

Dominantně negativní mutanty, které mohou být použity podle předkládaného vynálezu pro inhibici biosyntézy IFN, zahrnují kináza-deficientní verze Jak1, TyK2 nebo transkripční faktory postrádající DNA-vazebné domény STAT1 a STAT2 (viz např. Krishnan, a další, 1997, Eur. J. Biochem. 247: 298 - 305).

Vakcíny

Vynález zahrnuje vakcíny obsahující oslabené RNA viry s negativním řetězcem se sníženou schopností antagonizovat buněčnou odpověď IFN a vhodnou pomocnou látku. Virus použitý ve vakcíně může být zvolen z mutantů nebo variant vyskytujících se v přírodě, mutagenizovaných virů nebo virů získaných metodami genetického inženýrství. Oslabené kmeny segmentovaných virů RNA mohou být také vytvořeny technikami přeuspořádání nebo použitím kombinace přístupu reverzní genetiky a technik přeuspořádání. Mezi varianty vyskytující se v přírodě patří viry izolované z přírody stejně

jako varianty vytvořené spontánně v průběhu propagace viru, které mají sníženou schopnost antagonizovat buněčnou odpověď IFN. Samotný oslabený virus může být ve vakcíně také použit jako účinná složka. Alternativně může být oslabený virus použit jako vektor nebo „kostra“ rekombinantně vyrobených vakcín. Z tohoto hlediska mohou být pro dosažení mutací nebo zavedení cizích antigenů do oslabeného viru použitého ve vakcíně využity rekombinantní techniky jako je reverzní genetika (nebo pro segmentované viry kombinace reverzní genetiky a techniky přeuspořádání). Tímto způsobem mohou být navrženy vakcíny pro imunizaci proti variantám kmenů nebo alternativně proti úplně odlišným infekčním činitelům nebo antigenům onemocnění.

Do virů podle předkládaného vynálezu pro použití ve vakcínách může být v podstatě vložena jakákoli heterologní genová sekvence. S výhodou mohou být exprimovány virem nebo jako část virů epitopy, které indukují ochrannou imunitní odpověď na jakýkoli druh patogenů nebo antigenů, které vážou neutralizační protilátky. Například mezi heterologní genové sekvence, které mohou být zavedeny do virů podle předkládaného vynálezu pro použití ve vakcínách patří bez omezení epitopy viru lidské imunodeficiency (HIV) jako je gp120; povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg); glykoproteiny herpes viru (například gD, gE); VP1 polioviru; antigenní determinanty nevirových patogenů jako jsou bakterie a paraziti. V dalším provedení mohou být exprimovány veškeré imunoglobulinové geny nebo jejich část. Do virů podle předkládaného vynálezu mohou být například vneseny variabilní oblasti antiidiotypických imunoglobulinů, které napodobují tyto epitopy. V ještě dalším provedení mohou být exprimovány antigeny spojené s tumory.

Je možno vytvořit buď živou rekombinantní virovou vakcínu nebo inaktivovanou rekombinantní virovou vakcínu. Živá vakcína může být výhodná, protože multiplikace v hostiteli vede k prodloužené stimulaci podobného druhu a velikosti jako v případě přirozených infekcí,

a proto poskytuje dobrou, dlouhotrvající imunitu. Výroba těchto živých rekombinantních virových vakcín může být prováděna běžnými způsoby, včetně pomnožování viru v buněčné kultuře nebo v zárodečném vaku kuřecího embrya, a následnou purifikací.

Mezi vakcíny mohou patřit RNA viry s negativními řetězci upravené metodami genetického inženýrství, které mají mutace v genu NS1 nebo analogickém genu, včetně bez omezení zkrácených mutantů NS1 chřipky popsanych v pracovních příkladech dále. Vakcíny je také možno sestavit použitím přírodních variant, jako je přírodní varianta chřipky typu A A/turkey/Ore/71 nebo B/201 a B/AWBY-234, což jsou přirozené varianty chřipky typu B. Jestliže se vakcíny formulují jako živé virové vakcíny, mělo by být použito množství v rozmezí přibližně 10^4 pfu až přibližně 5×10^6 pfu na dávku.

Pro zavádění vakcín popisovaných výše je možno použít mnoho způsobů, mezi které patří bez omezení intranazální, intratracheální, orální, intradermální, intramuskulární, intraperitoneální, intravenózní a subkutánní cesty. Může být výhodné zavádět virovou vakcínu přirozenou cestou infekce patogenu, pro který je vakcína navržena, nebo přirozenou cestou infekce rodičovského oslabeného viru. Jestliže se použije vakcína založená na živém viru chřipky, může být výhodné zavádět vakcínu přirozenou cestou infekce virem chřipky. K tomuto účelu může být s výhodou použita schopnost viru chřipky indukovat živou sekreční a buněčnou imunitní odpověď. Například infekce respiračního traktu viry chřipky může indukovat silnou sekreční imunitní odpověď, například v urogenitálním systému, se současnou ochranou proti vyvolávajícímu agens konkrétního onemocnění.

Vakcína podle předkládaného vynálezu obsahující 10^4 - 5×10^6 pfu mutantních virů se změněnou IFN-antagonistickou aktivitou by mohla být podána jednou. Alternativně by mohla být vakcína podle předkládaného vynálezu, obsahující 10^4 - 5×10^6 pfu mutantních virů se změněnou IFN-antagonistickou aktivitou, podána dvakrát nebo

třikrát s intervalem 2 až 6 měsíců mezi dávkami. Alternativně by mohla být vakcína podle předkládaného vynálezu, obsahující 10^4 - 5×10^6 pfu mutantních virů se změněnou IFN-antagonistickou aktivitou, podávána tak často, jak je zapotřebí u živočicha, s výhodou savce, a ještě výhodněji člověka.

Farmaceutické prostředky

Předkládaný vynález zahrnuje farmaceutické prostředky obsahující mutantní viry se změněnou IFN-antagonistickou aktivitou pro použití jako antivirové prostředky nebo antitumorové prostředky, nebo jako prostředky proti onemocněním citlivým na IFN. Farmaceutické prostředky mohou být použitelné jako preventivní protivirové léky a mohou být podávány jednotlivci s rizikem infekce nebo jedinci, u kterého se očekává expozice viru. Například v případě, že dítě přijde domů ze školy, kde je vystaveno několika spolužákům s chřipkou, by mohl rodič podat protivirový farmaceutický prostředek podle vynálezu sobě, dítěti a jiným členům rodiny pro prevenci virové infekce a následného onemocnění. Lidé cestující do částí světa, kde převažuje určité infekční onemocnění (například hepatitida A, malárie atd.) mohou být ošetřeni rovněž.

Alternativně mohou být farmaceutické prostředky použity pro léčení tumorů nebo pro prevenci tvorby tumorů, například u pacientů s rakovinou, nebo u pacientů s vysokým rizikem vyvinutí nádorů nebo rakoviny. Například pacienti s rakovinou mohou být ošetřeni pro prevenci další tvorby tumorů. Alternativně mohou být ošetřeni pacienti, u kterých se očekává expozice karcinogenům; jedinci, kteří se účastní čištění životního prostředí, a kteří mohou být vystaveni znečišťujícím látkám (například azbestu). Alternativně mohou být ošetřeni před expozicí i potom jednotlivci, kteří mohou být vystaveni ozáření, například pacienti vystavení vysokým dávkám záření, nebo pacienti, kteří musí brát karcinogenní léky. Použití oslabených virů podle

předkládaného vynálezu jako antitumorových látek je založeno na objevu přihlašovatelů, že oslabený mutantní virus chřipky obsahující delecii ve svém IFN-antagonistickém genu, je schopen snižovat tvorbu nádorů u myší. Antitumorové vlastnosti podle vynálezu mohou alespoň z části souviset se schopností indukovat IFN a odpovědi IFN. Alternativně mohou být antitumorové vlastnosti oslabených virů podle předkládaného vynálezu spojeny s jejich schopností specificky růst v tumorových buňkách a usmrcovat je, protože je známo, že mnohé tumorové buňky jsou deficientní v systému IFN. Bez ohledu na molekulární mechanismus nebo molekulární mechanismy odpovědné za antitumorové vlastnosti mohou být viry podle vynálezu použity pro léčení tumorů nebo pro prevenci tvorby tumorů.

Předkládaný vynález dále zahrnuje mutantní viry se změněným IFN-antagonistickým fenotypem, které jsou zacíleny na specifické orgány, tkáně a/nebo buňky v těle pro indukci lokálních terapeutických nebo profylaktických účinků. Jednou výhodou tohoto přístupu je, že viry indukující IFN podle předkládaného vynálezu jsou zaměřeny na specifická místa, například místa tumoru, pro indukci IFN místně specifickým způsobem, čímž se dosahuje terapeutický účinek lépe než indukci IFN systémově, což může vést k toxickým účinkům.

Mutantní viry indukující IFN podle předkládaného vynálezu mohou být získány metodami genetického inženýrství použitím způsobů popsaných v přihlášce pro expresi proteinů nebo peptidů, které by zaměřily viry na konkrétní místo. Ve výhodném provedení by byly viry indukující IFN zaměřeny do míst tumorů. V takovém provedení mohou být mutantní viry sestaveny tak, aby exprimovaly kombinační místo protilátky rozpoznávající antigen specifický pro tumor s antigenem, čímž dojde k zacílení IFN-indukujícího viru na tumor. V ještě dalším provedení, kdy cílový tumor exprimuje receptor pro hormon jako jsou tumory prsní žlázy nebo vaječníků, které exprimují estrogenové receptory, může být virus indukující IFN upraven metodami genetického inženýrství tak, aby exprimoval

příslušný hormon. V ještě dalším provedení, kdy cílový hormon exprimuje receptor růstového faktoru, například VEGF, EGF nebo PDGF, může být IFN-indukující virus sestrojen tak, aby exprimoval příslušný růstový faktor nebo jeho části. Podle vynálezu mohou být tedy viry indukující viry IFN upraveny tak, aby exprimovaly jakýkoli produkt cílového genu, včetně peptidů, proteinů jako jsou enzymy, hormony, růstové faktory, antigeny nebo protilátky, které budou fungovat tak, že virus zaměří do místa, ve kterém je zapotřebí antivirového, antibakteriálního, antimikrobiálního nebo protirakovinného působení. Mezi způsoby zavádění patří bez omezení intradermální, intramuskulární, intraperitoneální, intravenózní, subkutánní, intranazální, epidurální a orální cesty. Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být podávány jakoukoli vhodnou cestou, například infuzí nebo jednorázovou injekcí, absorpcí přes epitelální nebo mukokutánní výstelky (například ústní sliznice, rektální a střevní sliznice atd.) a mohou být podávány spolu s jinými biologicky účinnými látkami. Podávání může být systémové nebo místní. Navíc může být ve výhodném provedení žádoucí zavádět farmaceutické prostředky podle vynálezu vhodným způsobem do plic. Může být také použito plicního podávání, například použitím inhalátoru nebo nebulizéru, a formulace s prostředkem usnadňujícím tvorbu aerosolu.

V konkrétním provedení může být žádoucí podávat farmaceutické prostředky podle vynálezu místně do oblasti, kde je zapotřebí léčení; toho může být dosaženo například bez omezení lokální infuzí při chirurgickém zákroku, místním podáním, například spolu s náplastí na ránu po chirurgickém zákroku, injekcí nebo pomocí katétru, nebo pomocí čípku nebo implantátu, kde uvedený implantát může být porézní, neporézní nebo gelový materiál, včetně membrán jako jsou sialastické membrány nebo vlákna. V jednom provedení je možno podávání provádět přímou injekcí v místě (nebo bývalém místě) maligního tumoru nebo neoplastické nebo preneoplastické tkáně.

V ještě dalším provedení může být farmaceutický prostředek dodáván systémem s řízeným uvolňováním. V jednom provedení může být použito dávkovací čerpadlo (viz Langer, výše; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald, a další, 1980, Surgery 88: 507; Saudek, a další, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). V dalším provedení mohou být použity polymerní materiály (viz Medical Applications of Controlled Release, Langer a Wise (ed.), CRC Pres, Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen a Ball (ed.), Wiley, New York (1984); Ranger & Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; viz též Levy, a další, 1985, Science 228: 190; During, a další, 1989, Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howard, a další, 1989, J. Neurosurg. 71: 105). V ještě dalším provedení může být systém s řízeným uvolňováním umístěn v blízkosti cíle prostředku, například plic, čímž je zapotřebí pouze části systémové dávky (viz například Goodson, 1984, v Medical Applications of Controlled Release, výše, díl 2, str. 115 - 138). Další systémy s řízeným uvolňováním se diskutují v přehledu Langer (1990, Science 249: 1527 - 1533).

Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují terapeuticky účinné množství oslabeného viru a farmaceuticky přijatelný nosič. Ve specifickém provedení znamená termín „farmaceuticky přijatelný“ schválení orgánem státní správy pro kontrolu léčiv nebo orgánem uvedeným například v US lékopisu nebo jiném obecně uznávaném lékopisu pro použití u živočichů a zvláště u lidí. Termín „nosič“ označuje ředidlo, adjuvans, pomocnou látku nebo vehikulum, se kterými se farmaceutický prostředek podává. Jako kapalně nosiče mohou být také použity solné roztoky a vodné roztoky dextrózy a glycerolu, zvláště v případě roztoků určených pro injekce. Vhodné farmaceutické pomocné látky zahrnují škrob, glukózu, laktózu, sacharózu, želatinu, slad, rýži, mouku, křidu, silikagel, stearan sodný, glycerolmonostearát, talek, chlorid sodný, sušené odstředěné mléko,

glycerol, propylenglykol, vodu, ethanol apod. Tyto prostředky mohou mít formu roztoků, suspenzí, emulzí, tablet, pilulek, kapslí, prášků, formulací s prodlouženým uvolňováním apod. Prostředky mohou být formulovány jako čípky. Orální prostředky mohou obsahovat standardní nosiče jako jsou mannitol, laktóza, škrob, stearan hořečnatý, sodná sůl sacharinu, celulóza, uhličitan hořečnatý apod. ve farmaceutické čistotě. Příklady vhodných farmaceutických nosičů se popisují v publikaci „Remington's Pharmaceutical Sciences“, E. W. Martin. Tyto prostředky budou obsahovat terapeuticky účinné množství léčebné látky, s výhodou ve vyčištěné formě, spolu s vhodným množstvím nosiče, za získání formy vhodné pro řádné podávání pacientovi. Formulace by měla vyhovovat způsobu podávání.

Množství farmaceutického prostředku podle vynálezu, které bude účinné při léčení konkrétního onemocnění nebo stavu, bude záviset na povaze onemocnění nebo stavu pacienta a může být určeno standardními klinickými postupy. Navíc může být pro lepší identifikaci optimálních rozmezí dávek použit test in vitro. Přesná dávka, která má být použita ve formulaci, bude také záviset na způsobu podávání a vážnosti onemocnění nebo poruchy, a měla by být určena rozhodnutím ošetřujícího lékaře podle stavu každého pacienta. Vhodná rozmezí dávek pro podávání však budou obecně přibližně 10^4 - 5×10^6 pfu a mohou být podávána jednou nebo vícekrát v intervalech podle potřeby. Farmaceutické prostředky podle vynálezu, obsahující 10^4 - 5×10^6 pfu mutantních virů se změněnou IFN-antagonistickou aktivitou, mohou být podávány intranazálně, intratracheálně, intramuskulárně nebo subkutánně. Účinné dávky mohou být extrapolovány z křivek závislosti odpovědi na dávce odvozených z testovacích modelů na zvířatech nebo z experimentů in vitro.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Tvorba a charakterizace mutantních virů chřipky typu A se zkráceným NS1

Materiály a metody

Virus chřipky A/PR/8/34 (PR8) byl pomnožen v desetidenních kuřecích embryích při teplotě 37 °C. Virus chřipky A 25A-1, přeuspořádaný virus obsahující segment NS z kmene A/Leningrad/134/47/57 adaptovaný na chlad a ostatní geny z viru PR8 (Egorov, a další, 1994, Vopr. Virusol. 39: 201 - 205; Shaw, a další, 1996, v Options of the control of influenza III, ed. Brown, Hampson Webster (Elsevier Science) str. 433 - 436) byl pěstován v buňkách Vero při 34 °C. Virus 25A-1 je v savčích buňkách teplotně senzitivní, a byl použit jako pomocný virus pro získání transfekčního viru NS1/99. Pro pěstování viru chřipky byly použity buňky Vero a buňky MDCK udržované v minimálním esenciálním médiu (MEM) s obsahem 1 µg/ml trypsinu (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Buňky Vero byly také použity pro selekci, purifikaci plaků a titraci viru NS1/99. Buňky MDCK byly udržovány v DMEM (Dulbecco's minimal essential medium) s obsahem 10 % teplem inaktivovaného fetálního telecího séra. Buňky Vero byly pěstovány v médiu AIM-V (Life Technologies, Grand Island, NY).

Plasmid pT3NS1/99, obsahující formu NS1 zkrácenou na C-konci o délce 99 aminokyselin, byl získán následujícím způsobem. Nejprve byl plasmid pPUC19-T3/NS PR8, obsahující úplná gen NS viru PR8 obklopený promotorem T3 RNA polymerázy a restrikčním místem BpuAI, amplifikován metodou reverzní PCR (Ochman, a další, 1988, Genetics 120: 621 - 623) s použitím vhodných primerů. Získaná cDNA obsahující zkrácený gen NS1 byla fosforylována, štěpena Klenowovým fragmentem, samoligována a pomnožena v *E. coli* kmen TG1. Konstrukt získaný po vyčištění byl nazván pT3NS1/99 a jeho struktura byla ověřena sekvenováním. Plasmidy pro expresi proteinů NP, PB1,

PB2 a PA viru PR8 (pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2 a pHMG-PA) byly popsány dříve (Pleschka, a další, 1996, J. Virol. 70: 4188 - 4192). Plasmid pPOLI-NS-RB byl vyroben substitucí otevřeného čtecího rámce CAT plasmidu pPOLI-CAT-RT (Pleschka, a další, 1996, J. Virol. 70: 4188 - 4192) RT-PCR produktem odvozeným z kódující oblasti genu NS viru chřipky A/WSN/33 (WSN). Tento plasmid exprimuje segment NS-specifické virové RNA viru WSN pod řízením zkráceného promotoru lidské polymerázy I.

Tvorba viru NS1/99 byla provedena ribonukleoproteinovou (RNP) transfekcí (Luytjes, a další, 1989, Cell 59: 1107 - 1113). Ribonukleoproteiny (RNP) byly vytvořeny transkripcí T3 RNA polymerázou z pT3NS1/99 linearizovaného BpuAI v přítomnosti purifikovaného nukleoproteinu a polymerázy viru chřipky 25A-1 (Enami, a další, 1991, J. Virol. 65: 2711 - 2713). Komplexy RNP byly transfekovány do buněk Vero, které byly před tím infikovány virem 25A-1. Transfekované buňky byly inkubovány 18 hod při 37 °C a supernatant byl dvakrát pasážován v buňkách Vero při 40 °C a vyčištěn pomocí plaků třikrát v buňkách Vero potažených agarovým překrývacím médiem při 37 °C. Izolovaný virus NS1/99 byl analyzován RT-PCR použitím specifických primerů. Transfekční virus standardního typu byl vytvořen následujícím způsobem: Buňky Vero v miskách o průměru 35 mm byly transfekovány plasmidy pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2, pHMG-PA a pPOLI-NS-RB, jak bylo popsáno výše (Pleschka, a další, 1996, J. Virol. 70: 4188 - 4192). Dva dny po transfekci byly buňky infikovány 5×10^4 pfu viru delNS1 a inkubovány ještě dva dny při 37 °C. Buněčný supernatant byl jednou pasážován v buňkách MDCK a dvakrát v kuřecích embryích. Transfekční viry byly klonovány metodou limitního zředění ve vejcích. Genomová RNA z purifikovaného transfekčního viru NS1/99 byla analyzována elektroforézou na polyakrylamidovém gelu, jak bylo popsáno výše (Zheng, a další, 1996, Virology 217: 242 - 251). Expres zkráceného proteinu NS1 virem NS1/99 byla oveřena imunoprecipitací značených

infikovaných buněčných extraktů použitím králíčího polyklonálního antiséra proti NS1.

Alantoická dutina kuřecích embryí ve stáří 6, 10 a 14 dnů byla zaočkována přibližně 10^3 pfu PR8, NS1/99 nebo delNS1 (ve kterém je deletovaný celý gen NS1), vejce byla inkubována při 37 °C 2 dny a viry přítomné v alantoické kapalině byly titrovány testem hemaglutinace (HA).

Skupiny pěti myší BALB/c (Taconic Farms) byly zaočkovány intranazálně 5×10^6 pfu, $1,5 \times 10^5$ pfu, nebo 5×10^3 pfu viru A/PR/8/34 (PR8) standardního typu nebo viru NS1/99. Očkování bylo prováděno v anestézii s použitím 50 μ l MEM s obsahem vhodného počtu jednotek schopných tvořit plaky příslušného viru. Zvířata byla denně pozorována a když se značně zhoršil stav byla usmrcena. V následujícím experimentu byla všem myším, které přežily, podána o čtyři týdny později dávka 100 LD₅₀ viru PR8 standardního typu. Všechny postupy byly prováděny podle metodiky NIH péče o laboratorní zvířata a jejich použití.

Výsledky: oslabení virů chřipky typu A delecemi NS1

Přihlašovatelé již ukázali, že virus chřipky typu A, u kterého byla provedena delece genu NS1 (delNS1 virus) je schopen růst do titrů přibližně 10^7 pfu/ml v buňkách deficientních na produkci interferonu typu I (IFN), jako jsou buňky Vero. Tento virus však nebyl schopen replikace a nemohl způsobovat onemocnění u myší (Garcia-Sastre, a další, 1998, Virology 252: 324). Naopak virus delNS1 byl schopen růstu a usmrcování myší STAT1^{-/-}. Tyto výsledky ukázaly, že protein NS1 viru chřipky typu A je faktorem virulence, který se účastní inhibice antivirových odpovědí hostitele zprostředkovaných IFN typu I. Následující experimenty byly prováděny pro zjištění, zda by bylo možno vytvořit viry chřipky, které by měly vlastnosti z hlediska virulence někde mezi standardním typem a viry delNS1 delecí částí

genu NS1, a zda by mohly mít některé z těchto virů optimální vlastnosti pro použití jako živé oslabené vakcíny proti virům chřipky, tj. stabilitu a vhodné vyvážení mezi oslabením, imunogenicitou a růstem v substrátech vhodných pro přípravu vakcín, jako jsou kuřecí embrya.

Pro testování této hypotézy byl vytvořen virus chřipky A/PR/8/34 (PR8), ve kterém byl modifikován gen NS1 s cílem řídit expresi zkráceného proteinu NS1 obsahujícího pouze 99 aminokyselin na aminovém konci spolu s 230 aminokyselinami proteinu NS1 standardního typu. Tento virus (NS1-99) byl získán transfekcí RNP metodami genetického inženýrství získaného genu NS s použitím 25A-1 pomocného viru jak bylo popsáno dříve (Garcia-Sastre, a další, 1998, *Virology* 252: 324). Analýza exprese NS1 v buňkách infikovaných virem odhalila zkrácenou povahu proteinu NS1 viru NS1-99.

Byla analyzována schopnost virů delNS1, NS1-99 a PR8 standardního typu růst v kuřecích embryích různého stáří. Podstata tohoto experimentu je založena na tom, že schopnost embryí ve vejcích syntetizovat a odpovídat na IFN typu I za vhodné stimulace závisí na stáří. Jak schopnost indukce IFN, tak i schopnost reagovat začínají ve stáří přibližně 10 dnů, a potom s věkem exponenciálně vzrůstají (Sekellick, a další. 1990, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 997; Sekellick & Marcus, 1985 *J. Interferon Res.* 5: 657). Použití vajec různého stáří tedy představuje jedinečný systém pro testování schopnosti různých virů inhibovat odpovědi IFN. Vejce stáří 6, 10 a 14 dnů byla inokulována přibližně 10^3 pfu virů PR8, NS1-99 nebo delNS1 inkubovaných při 37 °C 2 dny, a potom byly viry přítomné v alantoické tekutině titrovány testem hemaglutinace (HA). Jak je ukázáno v tabulce 3, zatímco viry standardního typu rostly na podobné titry HA v embryích ve stáří 6, 10 a 14 dnů, virus delNS1 se replikoval do detekovatelného titru HA pouze ve vejcích stáří 6 dnů. Naopak virus NS1-99 ukazoval chování na rozmezí mezi virem delNS1 a virem standardního typu, a byl schopen růst do vysokých titrů HA podobných

titrům viru standardního typu ve vejcích stáří 10 dnů, ale ne již ve vejcích starých 14 dnů.

Tabulka 3

Replikace viru v kuřecích embryích

Virus	Stáří vajec	Titr ¹ zjištěný hemaglutinací		
		6 dnů	10 dnů	14 dnů
WT PR8 ²		2,048	4,096	1,071
NS1/99		N.D. ³	2,048	<2
delNS1		64	<2	<2

¹ Titry znamenají nejvyšší zředění, při kterém dojde k hemaglutinační aktivitě.

² Virus chřipky A/PR/8/34 standardního typu.

³ Nebylo stanoveno.

Vlastnosti viru NS1-99 z hlediska oslabení byly dále studovány u myší. K tomuto účelu byly skupiny pěti myší BALB/c intranazálně infikovány 5×10^6 pfu, $1,5 \times 10^5$ nebo $1,5 \times 10^3$ pfu virů PR8 standardního typu nebo NS1-99. Myši potom byly monitorovány v průběhu tří týdnů na přežití. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. Virus NS1-99 měl hodnotu LD50 alespoň o tři řády vyšší než byla hodnota u viru standardního typu.

Tabulka 4Oslabení viru NS1-99 u myši

Virus	Infekční dávka (pfu)	Počet zvířat, která přežila		
		5×10^6	$1,5 \times 10^5$	5×10^3
WT PR8 ¹		1/5	1/5	1/5
NS1-99		3/5	5/5	5/5

¹ Virus chřipky A/PR/8/34 standardního typu.

Příklad 2: Vytvoření a charakterizace NS1-zkrácených mutant u viru chřipky typu BMateriály a metody

Podrobnosti experimentu jsou podobné jako v příkladu 1. Dva mutantní viry chřipky typu B, B/610B5B/201 (B/201) a B/AWBY-234, o délce 127-aminokyselin, popřípadě 90 aminokyselin (proteiny NS1 zkrácené na C-konci) (Norton, a další, 1987 Virology 156: 204; Tobita, a další, 1990, Virology 174: 314) byly odvozeny z koinfekčních experimentů ve tkáňové kultuře zahrnující viry B/Yamagata/1/73 (B/Yam) a A/Aichi/2/68 v přítomnosti protilátky anti-A (H3N2). Růst mutantních virů chřipky v embryích ve vejcích různého stáří byl porovnáván se schopností růstu rodičovského viru B/Yam, který má protein NS1 o délce 281 aminokyselin standardního typu. Vejce stáří 6, 10 a 14 dnů byla očkována přibližně 10^3 pfu B/Yam, B/201 nebo B/AWBY-234, inkubována při 35 °C 2 dny a viry přítomné v alantoické kapalině byly titrovány testem HA.

Potom byly vlastnosti z hlediska oslabení virů B/201 a B/AWBY-234 určovány u myši. Skupiny tří myši BALB/c byly intranazálně infikovány 3×10^5 pfu viru B/YAM standardního typu nebo mutantních virů B/201 a B/AWBY/234 a schopnost těchto virů replikovat se byla

určována měřením titrů virů v plicích tři dny po infekci, protože virus B/Yam standardního typu nevyvolává u myší zjevné známky onemocnění.

Výsledky

Tabulka 5

Replikace viru chřipky typu B v kuřecích embryích

Virus	Stáří vajec	Titř zjištěný hemaglutinací		
		6 dnů	10 dnů	14 dnů
B/Yam		362	256	<2
B/201		32	<2	<2
B/AWBY-234		8	<2	<2

Výsledky zjišťování růstu virů chřipky typu B standardního typu nebo mutantních v kuřecích embryích ukázané v tabulce 5 dokazují, že jako v případě viru typu A, zkrácení NS1 na karboxylovém konci viru chřipky typu B odpovídá za nižší výtěžek replikace u starších kuřecích embryí, které se vyznačují účinnou odpovědí IFN. Toto zjištění ukazuje, že NS1 viru chřipky typu B se také účastní inhibice odpovědi u hostitele, a že delece v genu NS1 viru chřipky typu B vede k oslabenému fenotypu.

Výsledky experimentů s replikací u myší se uvádějí v tabulce 6. Titry virů B/201 a B/AWBY-234 byly přibližně o tři řády nižší než titry B/Yam, což ukazuje, že zkrácení karboxykoncové domény NS1 viru chřipky typu B odpovídá za oslabený fenotyp u myší.

Tabulka 6Replikace viru chřipky typu B v plicích u myši

Virus	Titry v plicích 3 dny po infekci (pfu/plíci)		
B/Yam	2×10^4	1×10^4	3×10^4
B/201	30	<10	60
B/AWBY-234	<10	40	<10

Ochrana proti infekci virem chřipky standardního typu u myši imunizovaných viry chřipky typu A a B obsahujícími delece ve svých proteinech NS1

Aby bylo možno zjistit, zda jsou myši imunizované oslabenými viry chřipky typu A a B obsahujícími zkrácené proteiny NS1 proti zkušebnímu podávání odpovídajících virů standardního typu, byl proveden následující experiment. Myši BALB/c byly imunizovány intranazálně virem A/NS1-99 a o tři týdny později byly infikovány stonásobkem 100 LD₅₀ viru chřipky A/PR/8/34 standardního typu. Imunizovaná zvířata byla chráněna před úmrtím, zatímco všechna kontrolní zvířata po podání zahynula (viz tab. 7). Ve druhém experimentu byly myši BALB/c intranazálně imunizovány viry chřipky typu B B/201 nebo B/AWBY-234 exprimujícími zkrácené proteiny NS1. O tři týdny později byl myším podán v množství 3×10^5 pfu virus chřipky standardního typu B/Yam/1/73. Protože tento kmen viru chřipky typu B neindukuje u myši příznaky onemocnění, stupeň ochrany byl určen měřením titrů viru v plicích 3 dny po podání. Zatímco nevakcinovaná kontrolní zvířata měla titry přibližně 10^4 pfu/plíce, v plicích imunizovaných zvířat nebyly viry detekovány (viz tab. 8). Tato zjištění ukazují, že viry chřipky typu A stejně jako typu B, obsahující modifikované geny NS1, jsou schopny indukovat u myši imunitní odpověď, která zcela chrání proti následnému podání viru standardního typu.

Tabulka 7

Přežívání myši imunizovaných virem chřipky A/NS1-99 po testovacím podání stonásobku LD₅₀ viru chřipky A/PR/8/34 standardního typu

Imunizační dávka viru A/NS1-99	Počet myši, které přežily/celkový počet
5 x 10 ⁶ pfu	3/3
1,5 x 10 ⁵ pfu	4/4
PBS	0/5

Tabulka 8

Titry virů v plicích myši imunizovaných virem chřipky B/201 a B/AWBY-234 po testovacím podání 3 x 10⁵ pfu viru chřipky B/Yamagata/73 standardního typu

Imunizační dávka	Titry v plicích (pfu/plíce)
3 x 10 ⁵ pfu B/201	<10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹
3 x 10 ⁵ pfu B/AWBY-234	<10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹
PBS	2,5 x 10 ⁴ , 1 x 10 ⁴ , 1,7 x 10 ⁴ , 3 x 10 ⁵ , 5 x 10 ⁵

Příklad 3: Indukce interferonu typu I v embryích ve vejcích infikovaných virem deINS1

Schopnost viru deINS1, tj. viru chřipky A postrádajícího gen NS1, indukovat sekreci IFN typu I v kuřecích embryích byla zjišťována v následujícím experimentu. K tomuto účelu byla infikována desetidenní kuřecí embrya 5 x 10³ pfu virů deINS1 nebo PR8 standardního typu. Osmnáct hodin po inkubaci při 37 °C byla sklizena alantoická tekutina a dialyzována proti kyselému pH přes noc, aby se inaktivovaly infekční viry. Po zpracování pomocí kyselého pH byly vzorky dialyzovány proti PBS a potom byly testovány na aktivitu IFN stanovením nejvyššího ředění s ochrannými účinky proti infekci VSV

(přibližně 200 pfu) v buňkách CEF. Výsledky uvedené v tabulce 9 ukazují, že v nepřítomnosti NS1 jsou viry chřipky typu A silnějšími induktory IFN.

Tabulka 9

Indukce IFN ve vejcích

Virus	IFN (U/ml)
PR8	<16, <16
delNS1	400, 400
mock	<16, <16

Příklad 4: Antivirová aktivita viru delNS1

Eliminace IFN-antagonistického (NS1) genu z chřipky typu A může u viru vést ke schopnosti indukovat vysoké hladiny IFN. V takovém případě bude virus delNS1 „interferovat“ s replikací virů senzitivních na interferon. Aby bylo možno testovat tuto možnost, přihlašovatelé testovali schopnost viru delNS1 inhibovat replikaci viru chřipky A/WSN/33, běžně používaného laboratorního kmene viru chřipky (WSN), ve vejcích. Jak je vidět na obr. 1, působení pouze dvou pfu viru delNS1 bylo schopno snížit konečné titry viru WSN v alantoické tekutině o jeden řád. Navíc vedlo působení 2×10^4 pfu viru delNS1 k prakticky úplnému zastavení replikace WSN ve vejcích. Virus delNS1 byl také schopen interferovat s replikací jiných kmenů virů chřipky typu A (H1N1 a H3N2), viru chřipky typu B a odlišných virů jako virus Sendai ve vejcích (obr. 2).

Na základě těchto výsledků přihlašovatelé dále zjišťovali schopnost viru delNS1 interferovat s replikací viru chřipky standardního typu u myši. I když léčení IFN typu I v tkáňové kultuře zabrání replikaci viru chřipky typu A in vitro, ošetření myši IFN není schopné replikaci virů chřipky zabránit (Haller, 1981, Current Top

Microbiol. Immunol. 92: 25 - 52). Tak je tomu u většiny inbredních kmenů myši kromě myši A2G. Myši A2G stejně jako značná část divokých myši (přibližně 75 %) obsahují alespoň jednu intaktní alelu Mx1, zatímco většina laboratorních kmenů jsou Mx1-/- (Haller, 1986, Current Top Microbiol. Immunol. 127: 331 -337). Protein Mx1, který je homologem lidského proteinu MxA (Aebi, 1989, Mol. Cell. Biol. 11: 5062), je silným inhibitorem replikace viru chřipky (Haller, 1980, Nature 283: 660). Tento protein není exprimován konstitutivně, ale jeho exprese je indukována transkripčně interferonem typu I. Myši A2G tedy mohou být použity pro testování schopnosti induktorů IFN stimulovat antivirovou odpověď proti virům chřipky typu A (Haller, 1981, Current Top Microbiol. Immunol. 92: 25 - 52).

Přihlašovatelé intranazálně infikovali osm čtyřtýdenních myši A2G 5×10^6 pfu vysoce patogenního izolátu viru chřipky A/PR/8/34 (Haller, 1981, Current Top Microbiol. Immunol. 92: 25 - 52). Polovina myši dostala intranazálně 5×10^6 pfu delNS1 o 24 hodin dříve, než došlo k infekci PR8. Další čtyři myši byly ošetřeny samotným PBS. Byly monitorovány změny tělesné hmotnosti a přežívání. Tyto výsledky ukazují, že působení delNS1 bylo schopno chránit myši A2G proti úmrtí indukovanému virem chřipky a tělesnému úbytku. Stejně ošetření nebylo účinné u myši Mx1-/-, což ukazuje, že mechanismus ochrany před viry byl zprostředkován Mx1, tj. IFN.

Příklad 5: Antitumorové vlastnosti viru delNS1 u myši

Protože bylo zjištěno, že IFN typu I a/nebo induktory IFN typu I mají antitumorové vlastnosti (Belardelli a Gresser, 1996 Immunology Today 17: 369 - 372; Qin, a další, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 14411 - 14416), je možné, že léčení tumorů virem delNS1 by mohlo zprostředkovat ústup tumoru. Alternativně by mohl mít virus delNS1 onkolitické vlastnosti, tj. může být schopen specificky růst a zabíjet tumorové buňky, u kterých je známo, že mnoho z nich má deficiencie

v systému IFN. Aby bylo možno testovat antitumorovou aktivitu viru deINS1, byl proveden následující experiment s použitím buněčné linie vyššího karcinomu CT26.WT v modelu tumoru u myší, zjišťujícím plicní metastázy (Restifo, a další, 1998 Virology 249: 89 - 97). 5×10^5 buněk CT26.WT bylo intravenózně vstříknuto dvanácti myším BALB/c stáří 6 týdnů. Polovina myší byla intranazálně ošetřena 10^6 pfu viru deINS1 každých 24 hodin ve dnech 1, 2 a 3 po inokulaci. Dvanáct dnů po injekci tumoru byly myši usmrceny a byly počítány metastázy v plicích. Jak je ukázáno v tabulce 10, ošetření deINS1 způsobilo podstatný úbytek plicních metastáz u myší.

Tabulka 10

Antitumorová aktivita viru deINS1 v myších BALB/C, kterým byly podány tumorové buňky CT26.WT

	Počet metastáz v plicích	
	Podání PBS	Podání deINS1
Myš 1	>250	120
Myš 2	>250	28
Myš 3	>250	9
Myš 4	>250	6
Myš 5	>250	2
Myš 6	>250	1

Příklad 6: Protein NS1 inhibuje translokaci IRF-3 v průběhu infekce virem chřipky

Dále popisované výsledky ukazují, že protein NS1 viru chřipky je odpovědný za inhibici odpovědi typu I IFN proti viru, a že mutace/delece v tomto proteinu vedou k získání oslabených virů v důsledku zvýšení odpovědi IFN při infekci. Je známo, že syntéza IFN

typu I při virové infekci může být spuštěna dvojřetězcovou RNA (dsRNA). IRF-3 je transkripční faktor, který se obvykle nachází v inaktivní formě v cytoplazmě savčích buněk. Dvojřetězcová RNA indukuje fosforylaci (aktivaci) transkripčního faktoru IRF-3, což vede k jeho přemístění do jádra, kde indukuje transkripci specifických genů včetně genů kódujících IFN typu I (Weaver, a další, 1998, Mol. Cell. Biol. 18: 1359). Pro zjištění, zda NS1 chřipky působí na IRF-3, byla monitorována lokalizace IRF-3 v buňkách CV1 infikovaných virem PR8 standardního typu nebo virem delNS1 chřipky typu A. Obr. 3 ukazuje, že v buňkách infikovaných PR8 je translokace IRF-3 minimální (v méně než 10 % buněk). Naopak přibližně 90 % buněk infikovaných delNS1 ukázalo nukleární lokalizaci IRF-3. Bylo možné částečně inhibovat translokaci IRF-3 v buňkách infikovaných delNS1 expresí NS1 z plasmidu in trans. Výsledky ukazují, že NS1 viru chřipky typu A je schopen inhibovat translokaci IRF-3 u buněk infikovaných virem. Je pravděpodobné, že NS1 viru chřipky zabrání aktivaci IRF-3 zprostředkované dsRNA sekvestrací dsRNA vytvořené během infekce virem, což vede k inhibici syntézy IFN.

Předkládaný vynález není omezen konkrétními provedeními popisovanými v příkladech, která se považují pouze za jednotlivé ilustrace určitých aspektů vynálezu; do rozsahu předkládaného vynálezu spadají jakékoli konstrukty nebo viry, které jsou funkčně ekvivalentní. Odborníkům v oboru budou z předchozího popisu a výkresů samozřejmě zjevné různé modifikace vynálezu, navíc k ukázaným a popsáním provedením. Také tyto modifikace mají spadat do rámce přiložených nároků.

U různých zde citovaných odkazů jsou jejich obsahy zařazeny ve svém celku.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vakcína, vyznačující se tím, že obsahuje oslabený RNA virus s negativním řetězcem s interferon-antagonistickým fenotypem, který (a) je odpovědný za oslabení, a (b) umožňuje při pomnožování za stejných podmínek oslabenému viru růst na vyšší titry v interferon-deficientních hostitelských systémech ve srovnání s interferon-kompetentními hostitelskými systémy; a fyziologicky přijatelnou pomocnou látku.
2. Vakcína podle nároku 1, vyznačující se tím, že oslabený virus je zvolený z virů vyskytujících se v přírodě, mutagenizovaných virů nebo virů získaných přeuspořádáním.
3. Vakcína podle nároku 1, vyznačující se tím, že oslabený virus je zvolený z mutantů získaných metodami genetického inženýrství.
4. Vakcína podle nároku 3, vyznačující se tím, že oslabený virus je chimérním virem, který exprimuje epitop cizího patogenu.
5. Vakcína podle některého z nároků 1, 2, 3 nebo 4, vyznačující se tím, že oslabeným virem je virus chřipky.

6. Vakcína, vyznačující se tím, že obsahuje oslabený virus chřipky, který má mutaci v genu NS1 odpovědnou za oslabený fenotyp, a fyziologicky přijatelnou pomocnou látku.
7. Vakcína podle některého z nároků 1, 2, 3 nebo 4, vyznačující se tím, že oslabeným virem je respirační syncytiální virus.
8. Vakcína podle některého z nároků 1, 2, 3 nebo 4, vyznačující se tím, že oslabeným virem je virus parainfluenzy.
9. Vakcína podle některého z nároků 1, 2, 3 nebo 4, vyznačující se tím, že oslabeným virem je virus vezikulární stomatitidy.
10. Vakcína podle některého z nároků 1, 2, 3 nebo 4, vyznačující se tím, že oslabeným virem je virus Newcastleské nemoci.
11. Vakcína podle nároku 1, vyznačující se tím, že interferon-deficientní hostitelský systém je STAT1 negativní, a interferon-kompetentní hostitelský systém je STAT1 pozitivní.
12. Vakcína podle nároku 5, vyznačující se tím, že interferon-deficientním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 6 až 8 dnů, a interferon-kompetentním

hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 10 až 12 dnů.

13. Vakcína podle nároku 8, vyznačující se tím, že interferon-deficientním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 6 až 8 dnů, a interferon-kompetentním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 10 až 12 dnů.
14. Vakcína podle nároku 9, vyznačující se tím, že interferon-deficientním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 6 až 8 dnů, a interferon-kompetentním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 10 až 12 dnů.
15. Vakcína podle nároku 10, vyznačující se tím, že interferon-deficientním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 6 až 8 dnů, a interferon-kompetentním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 10 až 12 dnů.
16. Vakcína podle nároku 1 nebo 11, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.
17. Vakcína podle nároku 12, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-

deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.

18. Vakcína podle nároku 13, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.
19. Vakcína podle nároku 14, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.
20. Vakcína podle nároku 15, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.
21. Vakcína podle nároku 5, vyznačující se tím, že koncentrace oslabeného viru chřipky je přibližně 10^4 až přibližně 5×10^6 pfu na dávku.
22. Vakcína podle nároku 6, vyznačující se tím, že koncentrace oslabeného viru chřipky je přibližně 10^4 až přibližně 5×10^6 pfu na dávku.

23. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje oslabený RNA virus s negativním řetězcem
s interferon-antagonistickým fenotypem, který (a) je odpovědný
za oslabení, a (b) umožňuje při pomnožování za stejných
podmínek oslabenému viru růst na vyšší titry v interferon-
deficientních hostitelských systémech ve srovnání s interferon-
kompetentními hostitelskými systémy; a fyziologicky přijatelnou
pomocnou látku.
24. Farmaceutický prostředek podle nároku 23,
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e oslabený virus je
zvolený z virů vyskytujících se v přírodě, mutagenizovaných
virů nebo virů získaných přeuspořádáním.
25. Farmaceutický prostředek podle nároku 23,
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e oslabený virus je
zvolený z mutantů získaných metodami genetického
inženýrství.
26. Farmaceutický prostředek podle nároku 25,
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e oslabený virus je
chiméřním virem, který exprimuje epitop cizího patogenu.
27. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 23, 24, 25
nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e oslabeným
virem je virus chřipky.

28. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje oslabený virus chřipky, který má mutaci v genu
NS1 odpovědnou za oslabený fenotyp, a fyziologicky
přijatelnou pomocnou látku.
29. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 23, 24, 25
nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e oslabeným
virem je respirační syncytiální virus.
30. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 23, 24, 25
nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e oslabeným
virem je virus parainfluenzy.
31. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 23, 24, 25
nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e oslabeným
virem je virus vezikulární stomatitidy.
32. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 23, 24, 25
nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e oslabeným
virem je virus Newcastlešské nemoci.
33. Farmaceutický prostředek podle nároku 23,
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e interferon-deficientní
hostitelský systém je STAT1 negativní, a interferon-
kompetentní hostitelský systém je STAT1 pozitivní.
34. Farmaceutický prostředek podle nároku 27,
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e interferon-deficientním
hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 6 až 8

dnů, a interferon-kompetentním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 10 až 12 dnů.

35. Farmaceutický prostředek podle nároku 30, vyznačující se tím, že interferon-deficientním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 6 až 8 dnů, a interferon-kompetentním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 10 až 12 dnů.

36. Farmaceutický prostředek podle nároku 31, vyznačující se tím, že interferon-deficientním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 6 až 8 dnů, a interferon-kompetentním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 10 až 12 dnů.

37. Farmaceutický prostředek podle nároku 32, vyznačující se tím, že interferon-deficientním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 6 až 8 dnů, a interferon-kompetentním hostitelským systémem je kuřecí embryo stáří přibližně 10 až 12 dnů.

38. Farmaceutický prostředek podle nároku 23 nebo 33, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.

39. Farmaceutický prostředek podle nároku 34, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru

pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.

40. Farmaceutický prostředek podle nároku 35, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.

41. Farmaceutický prostředek podle nároku 36, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.

42. Farmaceutický prostředek podle nároku 37, vyznačující se tím, že titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-deficientním hostitelském systému je alespoň o řád vyšší než titr oslabeného viru pomnoženého v interferon-kompetentním hostitelském systému.

43. Farmaceutický prostředek podle nároku 27, vyznačující se tím, že koncentrace oslabeného viru chřipky je přibližně 10^4 až přibližně 5×10^6 pfu na dávku.

44. Farmaceutický prostředek podle nároku 28, vyznačující se tím, že koncentrace

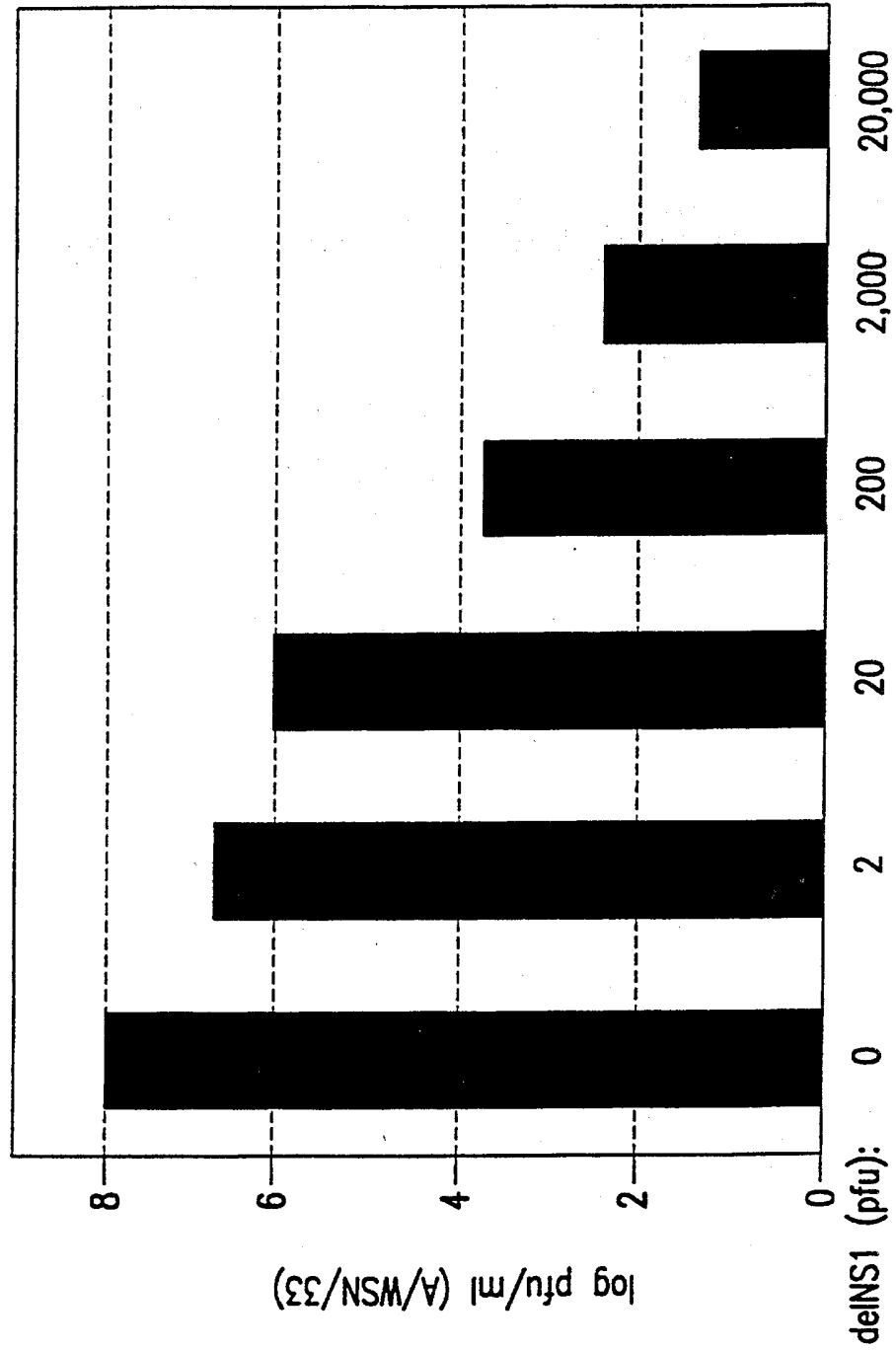
oslabeného viru chřipky je přibližně 10^4 až přibližně 5×10^6 pfu na dávku.

45. Oslabený virus chřipky obsahující modifikovaný gen NS1 a změněný interferon-antagonistický fenotyp.
46. Oslabený virus chřipky podle nároku 45, ve kterém je gen NS1 modifikovaný nebo zkrácený na karboxylovém konci.
47. Oslabený virus chřipky podle nároku 45, ve kterém je gen NS1 modifikovaný na aminovém konci.
48. Oslabený virus chřipky podle nároku 45, kterým je virus NS1/99.
49. Způsob vakcinace pacienta, který zahrnuje podávání vakcíny podle nároku 1 nebo 6 pacientovi v účinné dávce pro vyvolání imunitní odpovědi.
50. Způsob prevence infekčního onemocnění u pacienta, který zahrnuje podávání farmaceutického prostředku podle nároku 23 nebo 28 pacientovi v účinné dávce pro indukci buněčné interferonové odpovědi.
51. Způsob léčení nebo prevence tumorů u pacienta, který zahrnuje podávání farmaceutického prostředku podle nároku 23 nebo 28 pacientovi v účinné dávce pro indukci buněčné interferonové odpovědi nebo onkolýzy.

26.02.01

1/3

2000-9635

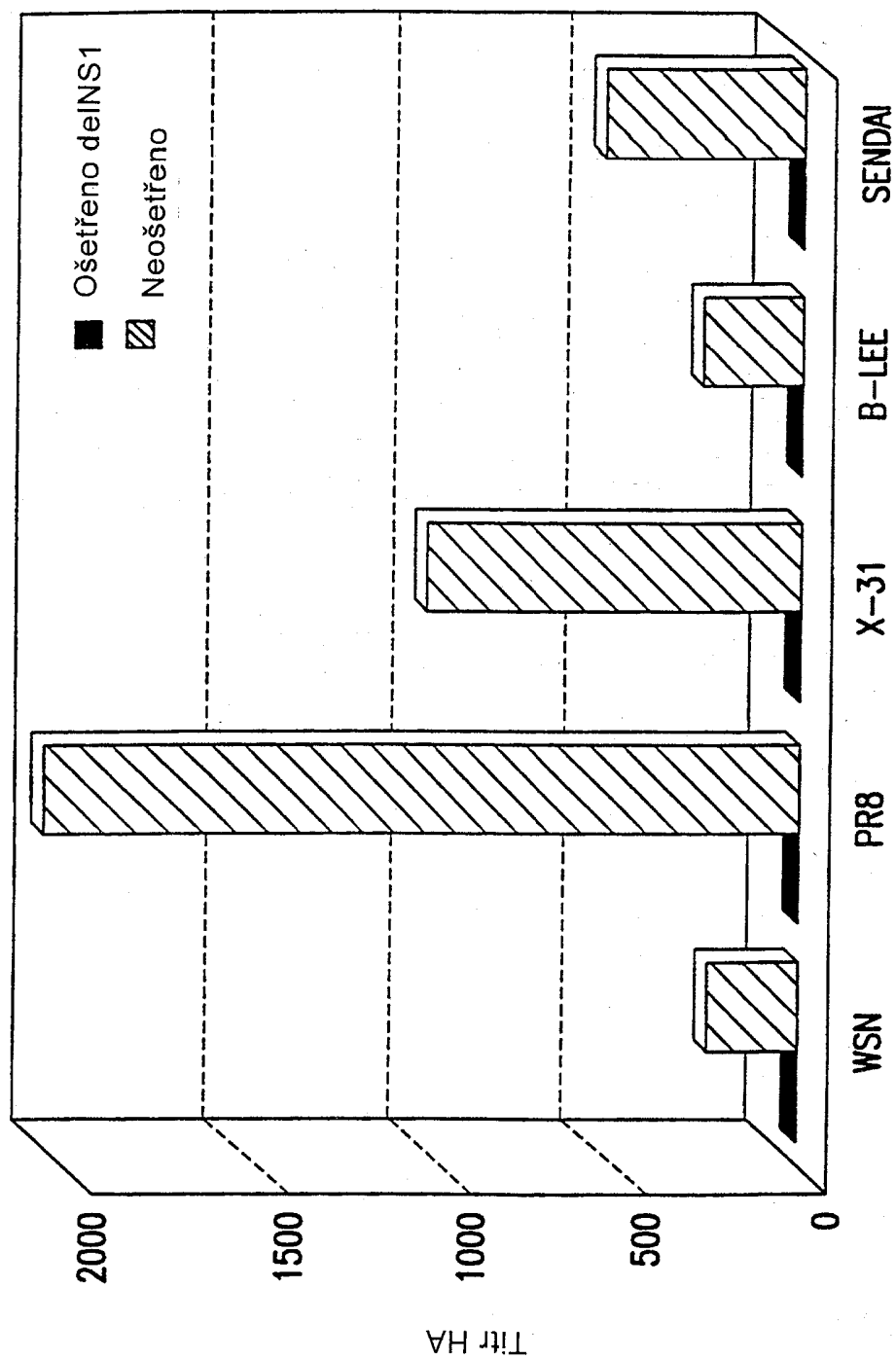


Obr. 1

26.03.01

2000-4635

2/3

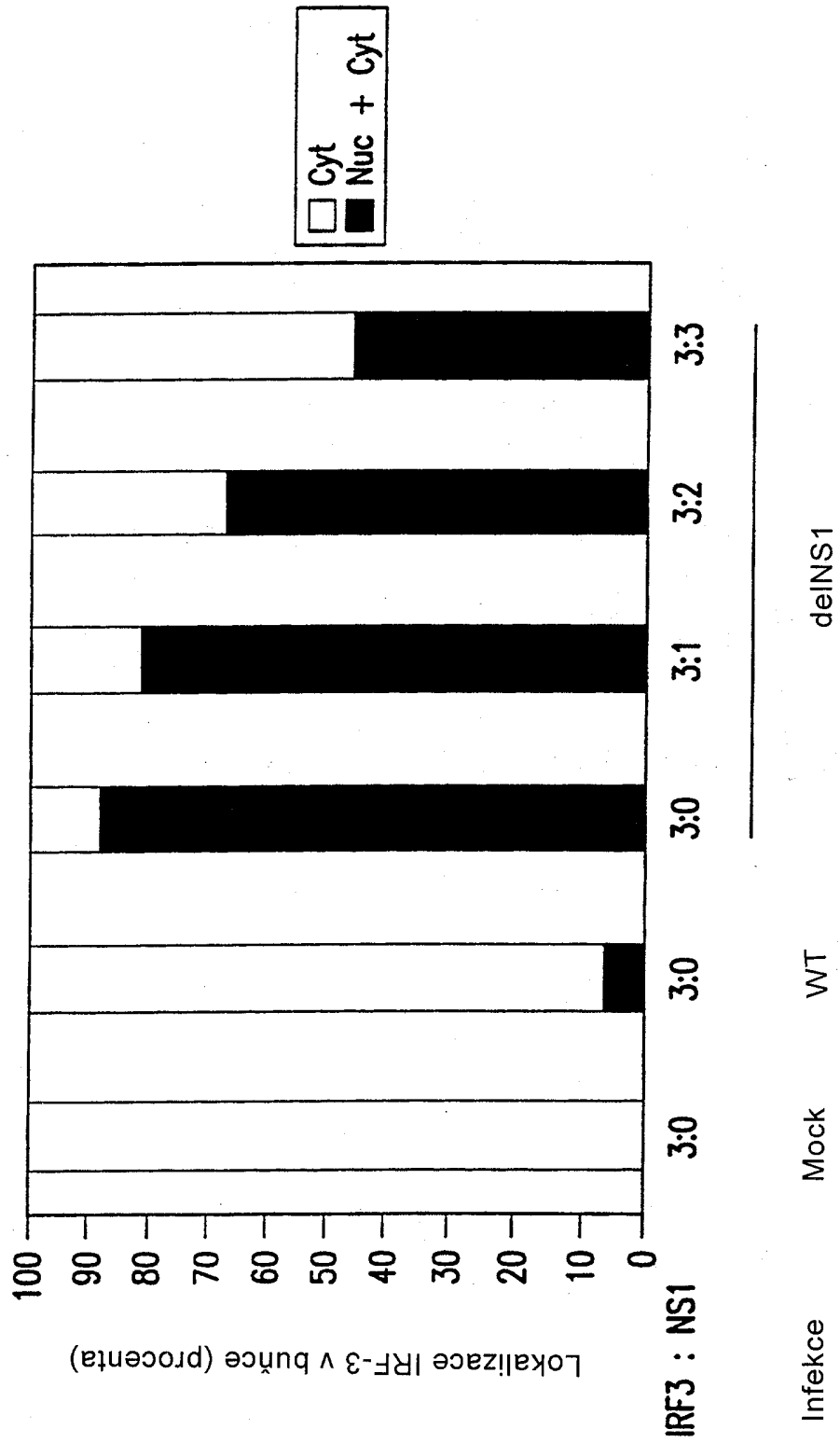


Obr. 2

26.02.01

2000-4635

3/3



Obr. 3