



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 209 082** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) МПК⁷ **A 61 K 39/12, 39/193, C 12 N 7/01, 15/33, 15/62, A 61 P 31/12**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99120696/14, 02.03.1998
(24) Дата начала действия патента: 02.03.1998
(30) Приоритет: 28.02.1997 US 08/807,445
15.01.1998 US 09/007,664
(43) Дата публикации заявки: 20.07.2001
(46) Дата публикации: 27.07.2003
(56) Ссылки: US 5494671 A, 27.02.1996. WO 93/06214 A1, 01.04.1993. SCHLESINGER J.J. et al. New approaches to flavivirus vaccine development. Biotechnology. - 1992, v.20, p.289-307.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 28.09.1999
(86) Заявка РСТ: US 98/03894 (02.03.1998)
(87) Публикация РСТ: WO 98/37911 (03.09.1998)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой, рег. № 112

(71) Заявитель: ОРАВАКС, ИНК. (US), СЕНТ-ЛУИС ЮНИВЕРСИТИ (US)
(72) Изобретатель: ЧЕМБЕРС Томас Дж. (US), МОНЭТ Томас П. (US), ГУИРАКХОО Фаршад (US)
(73) Патентообладатель: ОРАВАКС, ИНК. (US), СЕНТ-ЛУИС ЮНИВЕРСИТИ (US)
(74) Патентный поверенный: Егорова Галина Борисовна

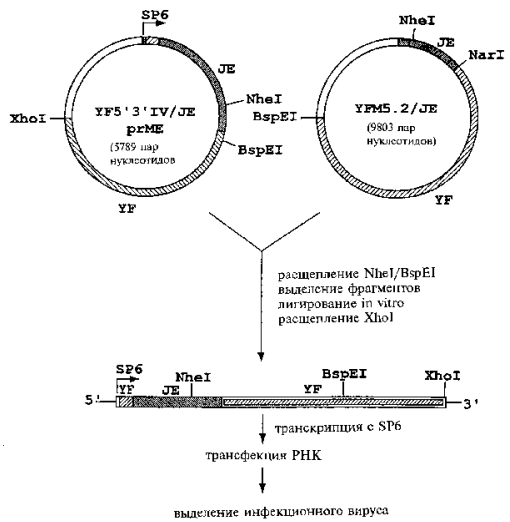
(54) ХИМЕРНЫЕ ФЛАВИВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ

(57) Изобретение относится к медицине и касается химерного живого инфекционного аттенуированного вируса, который применяется для создания химерных флавивирусных вакцин. Изобретение включает химерный живой инфекционный аттенуированный вирус, содержащий вирус желтой лихорадки, у которого нуклеотидная последовательность, кодирующая белок ргМ-Е, делетирована, укорочена или мутирована таким образом, что функциональный белок ргМ-Е не

экспрессируется, но при этом в геном вируса желтой лихорадки интегрирована нуклеотидная последовательность, кодирующая белок ргМ-Е второго, отличающегося, флавивируса таким образом, что белок ргМ-Е второго флавивируса экспрессируется, а также молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую этот вирус. Преимущество изобретения заключается в создании химерных вирусов, которые могут применяться в качестве живых аттенуированных вакцин. 3 с. и 15 з.п. ф-лы, 7 ил., 6 табл.

RU
2
2
0
9
0
8
2
C
2

RU
2
2
0
9
0
8
2
C
2



ФИГ. 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 209 082** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 39/12, 39/193, C 12 N**
7/01, 15/33, 15/62, A 61 P 31/12

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

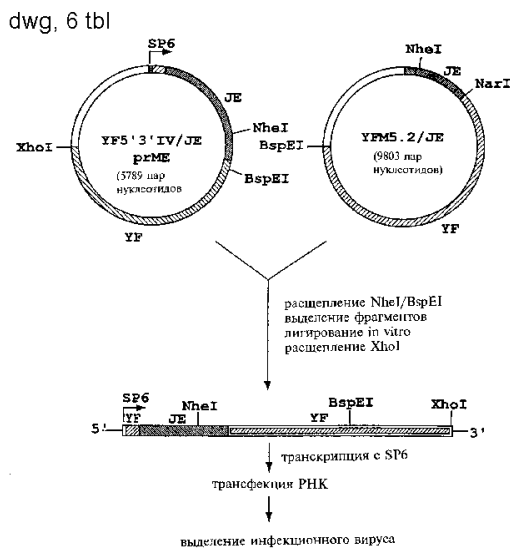
(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99120696/14, 02.03.1998
 (24) Effective date for property rights: 02.03.1998
 (30) Priority: 28.02.1997 US 08/807,445
 15.01.1998 US 09/007,664
 (43) Application published: 20.07.2001
 (46) Date of publication: 27.07.2003
 (85) Commencement of national phase: 28.09.1999
 (86) PCT application:
 US 98/03894 (02.03.1998)
 (87) PCT publication:
 WO 98/37911 (03.09.1998)
 (98) Mail address:
 129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
 OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
 Partnery", pat.pov. N.G.Lebedevoj, reg. № 112

(71) Applicant:
 ORAVAKS, INK. (US),
 SENT-LUIS JuNIVERSITI (US)
 (72) Inventor: ChEMBERS Tomas Dzh. (US),
 MONEhT Tomas P. (US), GUIRAKKhOO Farshad
 (US)
 (73) Proprietor:
 ORAVAKS, INK. (US),
 SENT-LUIS JuNIVERSITI (US)
 (74) Representative:
 Egorova Galina Borisovna

(54) CHIMERIC FLAVIVIRAL VACCINES

(57) Abstract:
 FIELD: medicine, virology, molecular biology. SUBSTANCE: invention relates to chimeric living infectious attenuated virus that is used for the development of chimeric flaviviral vaccines. Invention comprises chimeric living infectious attenuated virus including yellow fever virus where its nucleotide sequence encoding protein prM-E is deleted, truncated or mutated that results to block of expression of the functional protein prM-E. Also, genome of yellow fever virus comprises the incorporated nucleotide sequence encoding protein prM-E of the second distinguishing flavivirus such as that protein prM-E of the second flavivirus is expressed and nucleic acid molecule encoding this virus. The advantage of invention involves the development of chimeric viruses that can be used as living attenuated vaccines. EFFECT: valuable properties of vaccines. 18 cl, 7



ФИГ. 1

RU 2 209 082 C2

RU 2 209 082 C2

Настоящее изобретение касается аттенуированных вирусов, применимых в качестве вакцин против заболеваний, вызываемых флавивирусами.

Некоторые представители семейства флавивирусов представляют реальную или потенциальную угрозу здоровью населения планеты в целом. Например, японский (или комариный) энцефалит является серьезной проблемой для здоровья населения, включая миллионы жителей Дальнего Востока, подвергающихся риску этого заболевания. Вирус лихорадки денге при частоте до 100 миллионов случаев первичной лихорадки денге и более 450 тысяч случаев геморрагической лихорадки денге в мире является одним из наиболее серьезных заболеваний человека, передаваемых членистоногими переносчиками. Другие флавивирусы также обуславливают ряд эндемичных заболеваний различной природы и способны завоевывать новые регионы вследствие изменений климатических условий, динамики популяций переносчиков и нарушений естественной среды, обуславливаемых деятельностью человека. Эти флавивирусы включают, например, вирус энцефалита Сент-Луиса, который вызывает спорадическое, но серьезное острое заболевание на среднем востоке, юго-востоке и западе США; вирус западного Нила, который вызывает лихорадочное состояние, сопровождающееся острым энцефалитом, которое широко распространено в Африке, на Среднем Востоке, в бывшем СССР и в части районов Европы; вирус энцефалита долины Мюррей, который обуславливает локальную нейропатологию, распространен в Австралии; и вирус клещевого энцефалита, который распространен на территории бывшего Советского Союза и в Восточной Европе, где распространены его переносчики - иксодовые клещи, - который вызывает тяжелую форму энцефалита в этом регионе.

Вирус гепатита С (HCV) является еще одним членом семейства флавивирусов: он характеризуется организацией генома и параметрами размножения, сходными, но не идентичными по сравнению с описанными выше флавивирусами. Вирус HCV по большей части передается по парентеральному типу, он обуславливает хронический гепатит, который может перерасти в цирроз печени и гепатоклеточную карциному, а в США является ведущей причиной таких поражений печени, которые определяют необходимость ортотопической трансплантации печени.

Семейство вирусов Flaviviridae обособлено от альфавирусов (таких как WEE, VEE, EEE, SFV и т.п.) и в настоящее время насчитывает три рода - собственно флавивирусы, пестивирусы и вирусы гепатита С. Полностью сформировавшиеся зрелые вирионы флавивирусов состоят из трех структурных белков - оболочечного (Е), капсидного (С) и мембранного (М), а также семи неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5). У незрелых флавивирусов, обнаруживаемых в инфицированных клетках, выявлен премембранный белок (prM), который является предшественником белка М.

После связывания вирионов на рецепторах клеток-хозяев белок Е

претерпевает необратимое конформационное преобразование под воздействием кислой среды эндосом, вследствие чего обуславливается связывание бислоя оболочки вириона и эндоцитозных пузырьков, в результате вирусный геном переходит в цитоплазму клетки-хозяина. Вирусы клещевого энцефалита (ТВЕ), содержащие prM, являются некомпетентными по такому связыванию: это определяет то, что протеолитическое расщепление предшественника prM является необходимым для появления компетентных по связыванию вирионов и обладающих полной инфекционностью вирусов (Guirakhoo, et al., 1991, J. General Virol, 72, Pt. 2:333-338). Воздействием хлоридом аммония на поздних этапах вирусной репликации были получены вирусы энцефалита долины Мюррей (MVE), содержащие prM: было показано, что они некомпетентны по слиянию. При использовании специфичных по последовательности пептидов и моноклональных антител было показано, что пропептид prM взаимодействует с аминокислотами 200-327 в составе белка Е. Такое взаимодействие является необходимым для защиты белка Е от необратимой конформационной перестройки, определяемой процессом созревания в кислых пузырьках в экзоцитозном метаболическом механизме (Guirakhoo et al., 1992, Virology, 191:921-931).

Расщепление предшественника prM с образованием белка М происходит незадолго до выхода вирионов с участием фурино-подобной клеточной протеазы (Stadler et al., 1997, J. Virol, 71:8475-8481), что является необходимым для включения гемагглютинационной активности, фузогенной активности и инфекционности самих вирионов. Белок М отщепляется от своего полипептидного предшественника (prM) за консенсусной последовательностью R-X-R/K-R (где X - произвольная аминокислота, K - лизин, R - аргинин) и включается в состав липидной вирусной оболочки вместе с белком Е.

Последовательности, по которым происходит процессинг, являются консервативными не только у флавивирусов, но также и в составе белков других, не близкородственных вирусов, таких как белки PE2 коронавируса мышей, PE2 альфавирусов, HA вирусов гриппа и р160 ретровирусов. Расщепление полипептида-предшественника является существенным для инфекционности вируса, но не для образования его вирионов. Было показано, что в случае с вирусной химерой TBE/денге-4 изменение сайта процессинга prM приводит к снижению нейровирулентности этой химеры (Pletnev et al., 1993, J. Virol. 67:4956-4963), что согласуется с более ранними данными о том, что эффективный процессинг предшественника prM является необходимым для проявления полной инфекционности (Guirakhoo et al., 1991, цит. выше; 1992, цит. выше; Heinz et al., 1994, Virology, 198:109-117). Антитела к полипептиду prM могут опосредовать проявление иммунитета, очевидно, благодаря нейтрализации выходящих вирионов, включающих непроцессированный prM. Сайт

протеолитического расщепления белка PE2 вируса VEE (включает 4 аминокислоты) был делегирован с применением направленного мутагенеза у инфекционного клона (Smith et al., 1997, ASTM Meet., Dec. 7-11). Делеционные мутанты реплицировались с высокой эффективностью, а белки PE2 инкорпорировались в состав вирионов. При анализе этого мутанта у нечеловекообразных обезьян и было показано проявление 100%-ной сероконверсии и проявление защищенности всех иммунизированных обезьян от летального исхода.

Изобретение представляет химерные живые инфекционные аттенуированные вирусы, которые включают:

(a) первый вирус желтой лихорадки (например, штамма 17D), представляющий живой аттенуированный вакцинный вирус, в геноме которого нуклеотидная последовательность, кодирующая белок ргМ-Е либо делетирована, либо укорочена, либо мутирована таким образом, что функциональный белок ргМ-Е первого флавивируса не экспрессируется; и

(b) интегрированная в геном первого флавивируса нуклеотидная последовательность, кодирующая вирусный оболочечный компонент (белки ргМ-Е) второго, отличающегося флавивируса, таким образом, что белок ргМ-Е второго флавивируса экспрессируется из состава измененного генома первого флавивируса.

Таким образом, химерный вирус включает гены и кодируемые продукты, необходимые для внутриклеточного размножения, относящиеся к первому флавивирусу, и гены и кодируемые продукты оболочки второго флавивируса. Следовательно, вирус, содержащий все антигенные детерминанты, ответственные за индукцию нейтрализующих антител, в результате заражения химерным вирусом, в этом случае будет генерировать антитела только в отношении второго флавивируса.

Предпочтительным живым вирусом, предназначенным для использования в качестве первого флавивируса в составе химеры по настоящему изобретению, является вирус желтой лихорадки. По крайней мере одна из известных вакцин использует такой живой ослабленный вирус: эта вакцина известна под маркой YF17D и используется для вакцинации человека уже более 50 лет. Вакцина YF17D охарактеризована в большом числе публикаций, включая материалы Смитберна с соавт. и Фристоуна (Smithburn et al., 1956, "Yellow Fever Vaccination", World Health Org., p. 238; Freestone, 1995, In "Vaccines", 2d ed., eds Plotkin et al., W. B. Saunders, PA). Кроме того, вирус желтой лихорадки был изучен на генетическом уровне (Rice et al., 1985, Science, 229:726-733), а также представлялась информация о соотношении генетических и фенотипических параметров (Marchevsky et al., 1995, Amer. J. Trop. Med. Hyg., 52:75-80).

Предпочтительными флавивирусами для использования в качестве второго флавивируса в химерах по настоящему изобретению, соответственно, являющиеся источниками иммунизирующего антигена, являются вирус японского энцефалита (JE), вирус лихорадки денге (DEN, например,

любой из типов денге 1-4), вирус энцефалита долины Мюррей (MVE), вирус энцефалита Сент-Луиса (SLE), вирус лихорадки западного Нила (WNV), вирус клещевого энцефалита (TBE) и вирус гепатита С (HCV). Кроме того, флавивирусами, пригодными для использования в качестве второго флавивируса, являются вирус Куньинь, вирус центрально-европейского энцефалита, вирус весенне-летнего клещевого энцефалита, вирус повассанской лихорадки, вирус киасанурской лесной болезни и вирус омской геморрагической лихорадки. У предпочтительного химерного вируса по настоящему изобретению последовательность, кодирующая белок ргМ-Е второго флавивируса, используется для замещения последовательности, кодирующей белок ргМ-Е, в составе генома первого живого вируса желтой лихорадки. У предпочтительного химерного вируса последовательность, кодирующая белок ргМ-Е, является производной от ослабленного вирусного штамма, такого как вакцинный штамм. Также, как это будет описано далее, область ргМ в составе такого белка может нести мутацию, которая предотвращает процессинг с образованием зрелого мембранного белка.

Также настоящее изобретение представляет способы предотвращения или лечения флавивирусной инфекции у млекопитающих, таких как человек, путем введения химерного флавивируса по настоящему изобретению этому млекопитающему, использование химерных флавивирусов по настоящему изобретению при приготовлении лекарственных препаратов, предназначенных для профилактики и лечения флавивирусных инфекций, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих химерные флавивирусы по настоящему изобретению, и способы производства химерных флавивирусов по настоящему изобретению.

Изобретение имеет ряд преимуществ. Например, благодаря тому что химерные вирусы по настоящему изобретению являются живыми и способными к размножению, они могут быть использованы для формирования долговременного иммунитета. Поскольку эти вирусы включают в геноме репликационные гены аттенуированного вируса (например, вируса желтой лихорадки штамма 17D), то химерный вирус аттенуирован до такой степени, которая делает его безопасным при использовании в отношении человека.

Другие параметры и преимущества настоящего изобретения будут ясны из нижеследующего подробного описания, чертежей и формулы изобретения.

Фиг. 1 схематически представляет этапы генетических манипуляций, которые были осуществлены с целью конструирования химерного вируса по настоящему изобретению, включающего вирус желтой лихорадки и вирус японского энцефалита (YF/JE).

Фиг. 2 показывает кривые роста химерных вирусов YF/JE по настоящему изобретению в клеточных культурах, пригодных для получения человеческой вакцины.

Фиг. 3 - график, показывающий сравнение роста вирусов RMS (Research Master Seed, YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂) и YF-Vax в клетках линии

MRC-5.

Фиг.4 - график и таблица, показывающие результаты анализа нейровирулентности химерного вируса YF/JE по настоящему изобретению, проведенного на мышах.

Фиг.5 является схематическим представлением двухплазмидной системы, предназначенной для создания химерного вируса YF/DEN-2. По сути, эта стратегия соответствует той стратегии, которая описана в связи с созданием химерного вируса YF/JE.

Фиг. 6 является схематическим представлением структуры модифицированных клонов YF, сконструированных по делетированию части белка NS1 и (или) экспрессии чужеродных белков под контролем собственного сайта входа в рибосому (IRES). Фигура показывает только часть E/NS1 генома вируса. Стоп-кодон внедрен в участок, кодирующий C-конец оболочечного белка E. Трансляция по направлению вниз инициируется в пределах межгенной открытой рамки считывания (ORF) действием фактора IRES-1, тем самым определяя экспрессию чужеродных белков (например, белков E1 и (или) E2 вируса HCV). Второй фактор IRES (IRES-2) контролирует инициацию трансляции неструктурного сегмента вируса желтой лихорадки, с которого экспрессируются плотно упакованные укороченные белки NS1 (например, NS1del-1, NS1del-2 или NS1del-3). Размер делеции в составе NS1 обратно пропорционален размеру ORF, соединенной с IRES-1.

Фиг.7 - график, показывающий ответ по нейтрализации антител у мышей, иммунизированных химерной вакциной YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂.

Настоящее изобретение представляет химерные флавивирусы, которые могут быть использованы в вакцинации против флавивирусных инфекций. Конструирование и анализ химерных флавивирусов по настоящему изобретению, таких как химер, состоящих из вируса желтой лихорадки и вируса японского энцефалита (JE), вируса лихорадки денге 1-4 (DEN 1-4), вируса энцефалита долины Мюррей (MVE), вируса энцефалита Сент-Луиса (SLE), вируса лихорадки западного Нила (WN), вируса клещевого энцефалита (TBE) и вируса гепатита С (HCV) осуществляли следующим образом.

Флавивирусные белки получали путем трансляции единственной длинной открытой рамки (кодирующей, например, структурные белки - капсидный (С), предшествующий мембранного (pr-M) и оболочечный (Е), а также неструктурные белки) и затем путем серии посттрансляционных процессинговых этапов протеолитического расщепления. Химерные флавивирусы по настоящему изобретению, как это обсуждалось выше, характеризуются замещением последовательностей, кодирующих белки pr-M и E одного флавивируса, последовательностями, кодирующими белки pr-M и E другого флавивируса. Таким образом, создание таких химерных флавивирусов включает формирование новых комбинаций капсидных и премембранных белков, с одной стороны, и оболочечных и неструктурных белков (NS1), с другой стороны, происходящих от двух

разных флавивирусов. Расщепление между участками каждой из этих двух групп белков (С и pr-M, с одной стороны, и E и NS1) происходит в ходе естественного протеолитического процессинга флавивирусных белков и нуждается в наличии сигнальных последовательностей, фланкирующих данное соединение сайтов расщепления.

Предпочтительно, чтобы в составе химерных флавивирусов по настоящему изобретению вирусные сигнальные последовательности обеспечивали химерам существенную стабильность на таком уровне, чтобы точное по месту расщепление белков между сегментами С/pr-M и E/NS1 было эффективным. Эти сигнальные последовательности, поддерживающие химеры, описаны ниже. С другой стороны, любая из многочисленных известных сигнальных последовательностей может быть использована при конструировании так, чтобы в составе химер соединять последовательности, кодирующие белки С и pr-M или E и NS1 (см., например, von Heijne, 1983, Eur. J. Biochem., 133:17-21; von Heijne, 1985, J. Mol. Biol., 184: 99-105), или, например, используя известные регуляторные последовательности, специалист в данной области техники может сконструировать дополнительные сигнальные последовательности, которые могут быть использованы в химерах по настоящему изобретению. Обычно, например, сигнальная последовательность должна включать в качестве своего последнего остатка аминокислоту с небольшой незаряженной боковой цепью, такую как аланин, глицин, серин, цистеин, треонин или глутамин. Другие требования, предъявляемые к сигнальным последовательностям, хорошо известны в данной области техники (см., например, von Heijne, 1983, цит. выше; von Heijne, 1985, цит. выше). Также сигнальные последовательности любого вируса, входящего в состав химеры, могут быть сохранены полностью или сохранены в той степени, которая обеспечит точное расщепление.

Конструирование матриц кДНК для создания химерного вируса YF/JE

Получение полноразмерных матриц кДНК для химер YF/JE по настоящему изобретению, описанное ниже, основано на стратегии, сходной с той, которую ранее использовали разработчики процесса регенерации YF17D из материала кДНК при молекулярно-генетическом изучении процесса размножения вируса желтой лихорадки. Эта стратегия описана, например, Несторовичем с соавт. (Nestorowicz et al., 1994, Virology, 199:114-123).

Вкратце, получение химеры YF/JE по настоящему изобретению включает следующее. Геномные последовательности вируса желтой лихорадки встраивают в состав двух плазмид (YF5'3'IV и YFM5.2), которые кодируют последовательности YF от нуклеотидов 1-2276 и 8279-10861 (YF5'3'IV) и от 1373-8704 (YFM5.2) (Rice et al., 1989, New Biologist, 1:285-296). Полноразмерные матрицы кДНК получают путем лигирования подходящих рестрикционных фрагментов, полученных на материале этих плазмид. Данный способ является наиболее пригодным

с точки зрения обеспечения стабильной экспрессии последовательностей YF и получения РНК-транскриптов, обладающих высоким уровнем специфической инфекционности.

Стратегия заявителей, использовавшаяся ими при конструировании химер, включает замещение последовательностей вируса YF в составе плазмид YF5'3'IV и YFM5.2 соответствующими последовательностями из генома JE от начала белка ргМ (478-й нуклеотид; 128-я аминокислота) через сайт расщепления E/NS1 (2452-й нуклеотид; 817-я аминокислота). В дополнение к клонированию кДНК JE были необходимы некоторые этапы, обеспечивающие встраивание или уничтожение рестрикционных сайтов в состав последовательностей и YF, и JE, нужных для осуществления лигирования *in vitro*. Структура матрицы, предназначенной для регенерирования химерного вируса YF(C)/JE (ргМ-E), показана на фиг.4. С применением сходной стратегии была сконструирована вторая химера, кодирующая полный структурный компонент (С-ргМ-E) вируса японского энцефалита.

Молекулярное клонирование структурного компонента вируса JE

Клоны аутогенных генов, кодирующих структурные белки вируса японского энцефалита, были получены на материале штамма JE SA₁₄₋₁₄₋₂ (живой аттенуированный вакцинный штамм вируса JE), потому что биологические характеристики и молекулярные параметры этого штамма хорошо изучены (см., например, Eckels et al., 1988, Vaccine, 6:513-518; вирусный штамм JE SA₁₄₋₁₄₋₂ доступен из Центра по контролю за заболеваниями в Форт-Коллинзе, Колорадо и из Арбовирусного исследовательского центра Йельского университета, Нью-Хейвен, Коннектикут, США, которые являются официальными в США референсными центрами изучения арбовирусов Всемирной организации здравоохранения). Был получен вирусный штамм JE SA₁₄₋₁₄₋₂, находящийся на культивационном уровне PDK-5: его пересеивали в клетки LLC-MK₂ с целью получения большого количества вируса, необходимого для клонирования кДНК. Исползованная заявителями стратегия включала клонирование структурного сегмента в двух частях, которые перекрываются по рестрикционному сайту NheI (1125-й нуклеотид генома JE), который затем может быть использован для осуществления лигирования *in vitro*.

Пулы РНК экстрагировали из монослойных культур инфицированных клеток LLC-MK₂ и синтез первой цепи антисмысловой кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы с антисмысловым праймером (нуклеотиды 2456-2471 нуклеотидной последовательности генома JE), несущего сгруппированные рестрикционные сайты XbaI и NarI, необходимые, соответственно, для клонирования сначала в состав вектора рBluescript-II KS(+) и затем в состав плазмиды YFM5.2 (NarI). После синтеза первой цепи кДНК проводили амплификацию с помощью ПЦР последовательности JE в нуклеотидах 1108-2471, используя те же антисмысловой праймер и смысловой праймер (нуклеотиды 1108-1130 нуклеотидной последовательности генома

JE), включающие сгруппированные рестрикционные сайты XbaI и NsiI, необходимые для клонирования в составе, соответственно, рBluescript и YFM5.2 (NarI). Последовательности JE были верифицированы путем рестрикционного расщепления и прямого нуклеотидного секвенирования. Нуклеотидная последовательность генома JE в нуклеотидах 1-1130 была получена с помощью ПЦР-амплификации кДНК негативной цепи JE с использованием антисмыслового праймера, соответствующего нуклеотидам 1116-1130 генома JE, и смыслового праймера, соответствующего нуклеотидам 1-18 генома JE: оба они содержат сайты рестрикции EcoRI. Полученные ПЦР-фрагменты клонировали в состав рBluescript, а последовательности JE верифицировали путем прямого нуклеотидного секвенирования. Все указанное вместе представляет клонирование последовательности генома JE в нуклеотидах 1-2471 (аминокислоты 1-792).

Конструирование производных вариантов YF5'3'IV/JE и YFM5.2/JE

Для включения С-концевой части оболочечного белка JE в сайт расщепления YF E/NS1, уникальный рестрикционный сайт NarI был внесен в состав плазмиды YFM5.2, с использованием

олигонуклеотид-направляемого мутагенеза сигнальной последовательности в пределах сайта расщепления E/NS1 (нуклеотиды YF 2447-2452; аминокислоты 816-817) с получением YFM5.2 (NarI). Транскрипты, считанные с таких матриц, несущих такое изменение, тестировали по их инфекционности: они проявили специфическую инфекционность, сходную с родительскими матрицами (приблизительно 100 бляшкообразующих единиц на 250 нг транскрипта). Последовательность JE в нуклеотидах 1108-2471 была субклонирована из состава нескольких независимо полученных ПЦР-клонов рBluescript/JE в состав плазмиды YFM5.2 (NarI) с использованием уникальных рестрикционных сайтов NsiI и NarI. Клоны YF5'3'IV/JE, включающие 5'-нетранспируемый сегмент вируса желтой лихорадки (нуклеотиды 1-118), соседствующий с участком кодирования ргМ-E JE, были получены с помощью ПЦР-амплификации.

Для получения последовательностей, включающих соединение капсидного кода YF и белка ргМ JE, антисмысловый праймер, охватывающий этот сегмент, был использован наряду со смысловым праймером, соответствующим нуклеотидам 6625-6639 в составе YF5'3'IV, с целью формирования ПЦР-фрагментов, которые затем использовали в качестве антисмысловых праймеров для ПЦР в сочетании со смысловыми праймерами, комплементарными последовательности вектора рBluescript, расположенными выше сайта рестрикции EcoRI, с целью амплификации последовательности JE (кодируемой в обратной ориентации в составе вектора рBluescript) от 477-го нуклеотида (N-конец белка ргМ) через имеющийся внутри сайт рестрикции NheI до 1125-го нуклеотида. Получаемые в результате ПНР-фрагменты встраивали в плазмиду YF5'3'IV с

использованием рестрикционных сайтов NotI и EcoRI. Эта конструкция включает промотор SP6, предваряющий 5'-нетранслируемый сегмент YF, и далее такую последовательность: коды YF (C) JE (prM-E), также включая рестрикционный сайт NheI (1125-й нуклеотид JE), необходимый для лигирования *in vitro*.

Конструирование YFM5.2 и YF5'3'IV, включающих рестрикционные сайты, необходимые для лигирования *in vitro*

С целью использования рестрикционного сайта NheI в пределах последовательности, кодирующей оболочечный белок JE, в качестве сайта лигирования *in vitro*, избыточный сайт NheI в составе плазмиды YFM5.2 (5459-й нуклеотид) был удален. Это обеспечивалось бессмысловой мутацией последовательности YF по нуклеотиду 5461 (T->C: аминокислотный смысл - аланин, 1820-я аминокислота). Этот сайт включали в состав YFM5.2 путем лигирования подходящих рестрикционных фрагментов, а в состав YFM5.3(NarI)/JE вносили путем замены фрагмента Nsil/NarI, кодирующего химерную последовательность YF/JE.

Для создания уникального 3'-рестрикционного сайта, предназначенного для лигирования *in vitro*, сайт BspEI был сформирован так, чтобы располагаться ниже сайта AatII, в норме используемого для создания полноразмерных матриц на материале плазмид YF5'3'IV и YFM5.2. (В последовательности, кодирующей структурные компоненты вируса JE, присутствуют множественные рестрикционные сайты AatII, что не позволяет использовать их для целей лигирования *in vitro*). Сайт рестрикции BspEI создавали путем бессмыслового мутирования 8581-го нуклеотида YF (A->C: аминокислотный смысл - серин, 2860-я аминокислота) и вносили в состав YFM5.2 путем замены подходящих рестрикционных фрагментов. Уникальный рестрикционный сайт вносили в состав YFM5.2/JE путем замены фрагмента XbaI/SphI, а в состав плазмиды YF5'3'IV/JE(prM-E) путем 3-компонентного лигирования подходящих рестрикционных фрагментов, происходящих из этих исходных плазмид и из производной плазмиды YFM5.2 (BspI) с deletированной последовательностью YF, находящейся между сайтами EcoRI в нуклеотидах 1 и 6912.

Обмен кДНК JE-Nakayama в состав химерных плазмид YF/JE

Из-за неочевидности того, способен ли правильно функционировать полученный с помощью ПЦР структурный сегмент JE SA₁₄₋₁₄₋₂ в контексте последовательностей химерного вируса, заявители использовали кДНК клона, представляющего штамм Nakayama вируса японского энцефалита, который был детально исследован в экспериментах по экспрессии и по его способности индуцировать выработку иммунитета к нему (см., например, McIida et al., 1987, Virology, 158:348-360; штамм JE-Nakayama доступен из Центра по контролю за заболеваниями в Форт-Коллинзе, Колорадо и из Арбовирусного исследовательского центра Йельского университета, Нью-Хейвен, Коннектикут, США). кДНК JE-Nakayama встраивали в состав химерных плазмид YF/JE с использованием имеющихся

рестрикционных сайтов (HindIII к PvuII и BpmI к MunI) с целью замещения полного участка, кодирующего prM-E в составе двухплазмидной системы, за исключением единственной аминокислоты в 49-м положении (серин), которую оставляли интактной с целью использования рестрикционного сайта NheI для лигирования *in vitro*. Полный сегмент JE в клоне Nakayama был секвенирован с целью проверки аутентичности замещающей кДНК (табл. 2).

Создание полноразмерных матриц кДНК, РНК-трансфекция и получение инфекционных вирусов

Процедуры создания полноразмерных кДНК-матриц в принципе соответствуют тому, что описано Райсом с соавт. (Rice et al., 1989, New Biologist, 1: 285-296) (см. фиг.1). В случае химерных матриц плазмиды YF5'3'IV/JE(prM-E) и YFM5.2/JE расщепляют рестриктазами NheI/BspEI и лигирование *in vitro* проводят с использованием 50 нг очищенных фрагментов в присутствии ДНК-лигазы фага T4. Продукты лигирования линейаризуют с помощью XhoI для обеспечения свободной транскрипции. Транскрипты с промотора SP6 синтезируют с использованием 50 нг очищенной матрицы (количественный контроль осуществляют включением меченного ³H-УТФ) и целостность РНК проверяют с использованием электрофореза в неденатурирующем агарозном геле. Выход колеблется в пределах 5-10 мкг РНК на 1 реакцию при использовании данной процедуры, причем большинство материала представлено полноразмерными транскриптами. Трансфекцию РНК-транскриптов в присутствии катионных липосом осуществляют так, как это описано Райсом с соавт. (цит. выше) для YF17D. В исходных экспериментах были использованы клетки LLC-MK₂ для трансфекции и количественного определения вируса, на материале которых заявители определяли пригодность этих клеток для размножения вируса и бляшкообразования тестированием родительских штаммов YF и JE. В табл. 1 показаны типичные результаты трансфекционных экспериментов с использованием липофектина (Gibco/BRL) в качестве трансфекционного носителя. Также клеточные линии Vero были использованы для получения инфекционных популяций вирусов, оценки меченых белков и нейтрализационных тестов.

Секвенирование нуклеотидной последовательности химерных кДНК-матриц Для идентификации точных последовательностей оболочечного белка штамма SA₁₄₋₁₄₋₂ и Nakayama проводили анализ нуклеотидной последовательности плазмид, включающих химерную кДНК YF/JE, в отношении клонов JE-сегмента. Различия между нуклеотидными последовательностями у этих конструкций в сравнении с опубликованными последовательностями (McAda et al., cit. выше) показаны в табл. 2.

Структурная и биологическая характеристика химерных вирусов YF/JE Геномная структура химерных вирусов YF/JE, полученных в экспериментах по трансфекции, была проверена с использованием метода полимеразной цепной реакции с ревертированием в

отношении вирусной РНК, выделенной из монослоев инфицированных клеток. Эти эксперименты проводят с целью предотвращения вероятности того, что популяции вирусов были загрязнены в ходе процедуры трансфекции. Для этих экспериментов вирусы первого пассажа были использованы для инициирования цикла заражения с целью предотвращения любых артефактов, которые могут быть вызваны присутствием остаточной трансфицированной вирусной РНК. Общие пулы РНК, экстрагированные из клеток, инфицированных химерами либо YF/JE(prM-E)-SA₁₄₋₁₄₋₂ либо YF/JE(prM-E)-Nakayama, подвергали ПЦР с ревертированием, используя специфичные для YF и JE праймеры, которые позволяют выделять весь структурный сегмент в виде двух ПЦР-продуктов длиной примерно 1000 нуклеотидов. Эти продукты затем анализировали путем рестриктазного расщепления по предполагаемым сайтам, имеющимся в составе последовательностей JE штаммов SA₁₄₋₁₄₋₂ и Nakayama и обеспечивающим дифференцирование этих вирусов. С использованием такого подхода была продемонстрирована химерная природа вирусной РНК, а для выделенных вирусов было подтверждено наличие соответствующих рестрикционных сайтов. Затем была верифицирована реальная граница C-prM, которая оказалась интактной на уровне данной последовательности - было применено секвенирование участка соединения в составе химеры YF/JE C-prM.

Присутствие оболочечного белка JE в этих двух химерах было проверено с помощью иммунопреципитации антисывороткой, специфичной в отношении JE, и в нейтрализационном тесте по проявлению бляшек с использованием антисывороток, специфичных в отношении YF и JE. Иммунопреципитация ³⁵S-меченых экстрактов клеток LLC-MK₂, инфицированных данными химерами, с использованием моноклонального антитела к белку E вируса JE, показала, что оболочечный белок E вируса JE может быть выделен в виде белка с молекулярной массой 55 кДа, в то время как та же антисыворотка не способна иммунопреципитировать какой-либо белок из состава клеток, инфицированных вирусом желтой лихорадки. Обе гипериммунные сыворотки к YF и JE проявили перекрестную реактивность по отношению к двум оболочечным белкам, однако при этом в ряде повторностей воспроизводится размерная дифференцированность двух белков: у вируса YF - 53 кДа, негликозилирован; у вируса JE 55 кДа, гликозилирован. Использование моноклональных антител к YF в условиях иммунопреципитации оказалось неэффективным: следовательно, специфичность зависела в данном анализе от моноклональных антител к JE. Нейтрализационный тест по снижению числа бляшек (PRNT) был осуществлен в отношении химерных вирусов и "чистых" вирусов YF и JE SA₁₄₋₁₄₋₂ с использованием гипериммунной асцитной жидкости (ATCC), специфичной в отношении YF и JE, и очищенного иммуноглобулина-G, специфичного в отношении YF (моноклональное антитело 2 E10). Для этих антисывороток были выявлены существенные

различия в их титре, необходимом для 50%-снижения числа бляшек при тестировании химер в сравнении с контрольными ("чистыми") вирусами по данному эксперименту (табл. 3). Таким образом, необходимые для нейтрализации эпитопы экспрессируются инфекционными химерными вирусами YF/JE.

Параметры роста в клеточной культуре

Способность химер к росту была исследована по количественным параметрам в линиях клеток, происходящих как от приматов, так и от комаров. На фиг.2 показаны кумулятивные кривые роста химер в клетках линии LLC-MK₂ после множественного заражения с низкой плотностью (0,5 бляшкообразующей единицы на клетку). В этом эксперименте для сравнения были использованы вирусы YF5.2IV (клонированный дериват) и JE SA₁₄₋₁₄₋₂ (неклонированный). Оба химерных вируса достигали максимального выхода на уровне, приблизительно на 1 логарифм выше, чем выход любого из родительских вирусов. В случае с химерой YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂ пик выхода вируса был отмечен на 12 часов позднее, чем тот же показатель у химеры YF/JE Nakayama (соответственно, 50 и 38 часов). Химера YF/JE Nakayama проявляла существенно больший цитопатический эффект в сравнении с химерой YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂ в той же клеточной линии. Сходный эксперимент был проведен с клетками C 6/36 при множественном заражении с низкой плотностью (0,5 бляшкообразующей единицы на 1 клетку). На фиг.2 также показана динамика роста вирусов в этой линии клеток беспозвоночного. Сходные уровни выхода вирусов были отмечены во все моменты тестирования в данном эксперименте, что дополнительно подтверждает заключение о том, что у химерных вирусов эффективность размножения несколько не нарушена.

Сравнение динамики роста RMS (YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂) и вакцины YF17D в клетках MRC-5

Эксперимент был проведен с целью оценки способности предполагаемой вакцины размножаться в клеточной линии, приемлемой для вакцин, предназначенных для человека. Коммерческая вакцина против желтой лихорадки YF17D (YF-Vax[®]) была получена от Connaught Laboratories, Swiftwater, PA. Клетки MRC-5 (диплоидные клетки эмбриональных легких человека) были приобретены в ATCC (171-CCL, Batch F-14308; 18-й пассаж); их выращивали в культуральной среде EMEM с добавлением 2 mM L-глутамин, солевого раствора Эрла, вносимого для доведения до 1,5 г/л по бикарбонату натрия, 0,1 mM заменимых аминокислот и 10% фетальной сыворотки телят.

Для сравнения кинетики роста RMS (Research Master Seed, YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂) и YF-Vax[®] клетки выращивали до 90%-ной конфлюэнтности и проводили их заражение RMS или YF-Vax[®] с плотностью (MOI) 0,1 б.о.е. С учетом того, что клетки MRC-5 обычно растут медленно, эти клетки выдерживали после инфицирования в течение 10 дней. Образцы замораживали на 7-10 дней и их инфекционность определяли в тесте на формирование бляшек с

использованием клеток Vero.

Вакцина YF-Vax[®] и химера YF/JE выросли в клетках MRC-5 до умеренных титров (фиг.3). Пиковый титр составил примерно $4,7 \log_{10}$ б.о.е. для YF-Vax[®] (он достигался на 2-й день), а для RMS был ненамного ниже - $4,5 \log_{10}$ б.о.е. на 6-й день.

Тестирование нейровирулентности у нормальных взрослых мышей

Свойства вирулентности химеры YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂ были проанализированы с использованием молодых взрослых мышей: применена интрацеребральная инокуляция. Группы по 10 мышей (самцы и самки линии ICR в возрасте 4 недель - по 5 особей каждого пола в каждой группе) были инокулированы 10 тысячами бляшкообразующими единицами химеры YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂, YF5.2IV или JE SA₁₄₋₁₄₋₂ и наблюдали ежедневно в течение 3 недель. Результаты этих экспериментов проиллюстрированы на фиг.4. Мыши, зараженные родительским штаммом YF5.2IV, погибали спустя примерно одну неделю после заражения. Смертность или признаки заболевания не были обнаружены у мышей, зараженных штаммом японского энцефалита JE SA₁₄₋₁₄₋₂ или химерой. Инокуляты, использовавшиеся в этих экспериментах, были оттитрованы в момент заражения, а подгруппы выживающих мышей тестировали на присутствие нейтрализующих антител, что было необходимо для подтверждения того, что заражение имело место. При сравнении тестированных особей отмечено, что титры антител против JE SA₁₄₋₁₄₋₂ были сходными с таковыми, которые были выявлены у животных, которые были заражены либо этим штаммом, либо химерным вирусом.

Результаты дополнительных экспериментов, связанных с изучением нейровирулентности химеры YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂ в отношении мышей, проиллюстрированы в табл. 4. В этих экспериментах все мыши, зараженные вирусом желтой лихорадки YF5.2IV, погибли в течение 7-8 дней. Напротив, ни одна из мышей, зараженных химерным вирусом YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂, не погибла в течение двух недель после заражения.

Результаты экспериментов, посвященных изучению нейровирулентности и патогенности химер YF/JE, проиллюстрированы в табл. 5. В этих экспериментах химерные вирусы использовались для заражения 3-недельных мышей при дозах, варьирующихся от 10 тысяч до 1 миллиона бляшкообразующих единиц при их внутрибрюшинном введении. Ни одна из мышей, зараженных химерами YF/JE Nakayama или YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂, не погибла в течение 3 недель после заражения: это указывает на то, что эти вирусы не способны вызывать заболевание после периферической инокуляции. У мышей, зараженных химерой YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂, формировались нейтрализующие антитела против вируса японского энцефалита JE (фиг. 7).

Конструирование матриц кДНК, необходимых для создания химерных вирусов желтой лихорадки/лихорадки денге (YF/DEN)

Конструирование химерных вирусов желтой лихорадки/лихорадки денге (YF/DEN), описанное ниже, было осуществлено, в

принципе, таким же образом, что и конструирование химерных вирусов YF/JE, описанное выше. Другие флавивирусные химеры могут быть созданы с помощью аналогичной стратегии с использованием естественных или искусственно встроенных рестрикционных сайтов и, например, олигонуклеотидных праймеров, которые показаны в табл. 6.

Конструирование химерного вируса YF/DEN

Хотя некоторые молекулярные клоны вирусов лихорадки денге были сформированы ранее, сохраняется проблема обеспечения стабильности фрагментов вирусной кДНК, внесенных в состав плазмидных систем, а также эффективности размножения полученного вируса. Для эксперимента заявители выбрали клон DEN-2, сформированный Д-ром Питером Райтом (Dept. Microbiol, Monash Univ., Clayton, Австралия), потому что эта система является относительно эффективной с точки зрения регенерирования вируса, а также важно то, что она основана на двухплазмидной системе, сходной с той, которая используется в методологии заявителей. Полная последовательность этого клона DEN-2 является доступной и, соответственно, облегчает конструирование химерных матриц YF/DEN, поскольку при этом требуется осуществить лишь незначительные модификации клона YF. Необходимые для этого шаги являются следующими.

Аналогично двухплазмидной системе, использовавшейся в отношении вирусов YF5.2IV и YF/JE, система YF/DEN использует уникальный рестрикционный сайт в составе последовательности, кодирующей оболочечный белок E вируса DEN-2 в качестве точки разрыва для внесения структурного сегмента (prM-E) в состав двух плазмид, которые в данном тексте обозначены как YF5'3'IV/DEN (prM-E') и YFM5.2/DEN (E'-E) (см. фиг. 5). Два рестрикционных сайта, необходимые для лигирования *in vitro* химерной матрицы, маркируются рестриктазами AatII и SphI. Реципиентной плазмидой для 3'-сегмента последовательности гена белка-E DEN является плаزمида YFM5.2 (NarI[+]SphI[-]). Эта плазмиды включает рестрикционный сайт NarI в составе участка соединения E/NS1, который использовали для встраивания C-концевой части белка E вируса JE. Он был далее модифицирован путем элиминации дополнительного рестрикционного сайта SphI в составе последовательности, кодирующей белок NS5, - применен метод направленного несмыслового мутагенеза. Это позволяет встраивать последовательность DEN-2 от уникального сайта SphI до сайта NarI с помощью простейшего направленного клонирования. Подходящий фрагмент кДНК DEN-2 был сформирован с помощью ПЦР на материале производного от DEN-2 клона MON310, предоставленного Д-ром Райтом. Праймеры для ПЦР включали 5'-праймер, фланкирующий рестрикционный сайт SphI, и 3'-праймер, гомологичный нуклеотидам в составе DEN-2, расположенным сразу вверх от сигнального сайта в соединении E/NS1 и замещающим сигнальный сайт за счет замен, которые создают новый такой сайт, но при этом еще и вносят рестрикционный сайт NarI.

Полученный в результате ПЦР-фрагмент, состоящий из 1170 нуклеотидов, затем был встроен в состав плазмиды YFM5.2 (NarI[+]SphI[-]).

Сегмент 5' в составе клона DEN-2, включающий последовательности, которые кодируют ргМ и N-часть белка Е, был сконструирован в составе плазмиды YF5'3'IV с использованием химерного праймера для ПЦР. Химерный праймер, включающий 3'-конец антисмысловой последовательности белка С вируса YF и 5'-конец гена белка ргМ DEN-2, был использован наряду со смысловым праймером, фланкирующим промотор SP6 из состава плазмиды YF5'3'IV, с целью создания ПЦР-продукта, состоящего из 771 нуклеотида, характеризующегося 20-парным удлинением, представляющим последовательность ргМ вируса DEN-2. Этот ПЦР-продукт затем был использован для праймирования плазмиды DEN-2 наряду с 3'-праймером, представляющим нуклеотиды 1501-1522 последовательности DEN-2 и фланкирующим рестрикционный сайт SphI, с целью получения конечного ПЦР-продукта, состоящего из 1800 нуклеотидов, включающего последовательность вируса желтой лихорадки YF от рестрикционного сайта NotI через промотор SP6, 5'-нетранслируемый сегмент YF и последовательность, кодирующую белок С, смежную с последовательностью, кодирующей ргМ-E1522 DEN-2. ПЦР-продукт был лигирован в состав плазмиды YF5'3'IV с использованием рестрикционных сайтов NotI и SphI с получением плазмиды YF5'3'IV/DEN(ргМ-E).

Конструирование химерных матриц для других флавивирусов

Процедуры создания полноразмерных кДНК-матриц, кодирующих химерные вирусы YF/MVE, YF/SLE, YF/WN и YF/TBE, сходны с теми процедурами, которые были описаны выше для системы YF/DEN-2. Табл. 6 показывает особенности стратегии создания химерных вирусов, основанных на вакцинном штамме YF17D. Также показаны уникальные рестрикционные сайты, использовавшиеся для лигирования *in vitro*, и химерные праймеры для конструирования гибридных белков С/ргМ и Е/NS1. Источники кДНК для указанных гетерологичных вирусов легко доступны (MVE: Dalgarno et al., 1986, J. Mol. Biol, 187:309-323; SLE: Trent et al., 1987, Virology, 156:293-304; TBE: Mandl et al., 1988, Virology, 166: 197-205; вирус денге-1: Mason et al., 1987, Virology, 161:262-267; вирус денге-2: Deubel et al., 1986, Virology, 155:365-377; вирус денге-3: Hahn et al., 1988, Virology, 162:167-180; вирус денге-4: Zhao et al., 1986, Virology, 155:77-88).

Альтернативным подходом к конструированию дополнительных химерных вирусов является создание гибридного белка С/ргМ путем лигирования по "тупым концам" ПЦР-производных рестрикционных фрагментов, характеризующихся концами, которые встречаются в месте этой гибридизации, и 5'- и 3'-концами, которые фланкируют рестрикционные сайты, подходящие для встраивания в плазмиду YF5'3'IV или в какую-либо промежуточную плазмиду, такую как рBS-KS(+). Подходы к использованию химерного олигонуклеотида

либо лигированию по "тупым концам" должны варьироваться в зависимости от доступности уникальных рестрикционных сайтов в составе последовательности, кодирующей оболочечный белок в составе генома конкретного вируса.

5 Конструирование вирусов YF, кодирующих антигены HCV

Поскольку структурные белки E1 и E2 вируса HCV (гепатита С) негомологичны структурным белкам описанных выше флавивирусов, стратегия экспрессии этих белков включает встраивание в пределы того участка генома, который не является "жизненно необходимым", таким образом, чтобы все эти белки затем экспрессировались вместе с белками вируса желтой лихорадки в процессе размножения вируса в инфицированных клетках. Участком, являющимся мишенью для встраивания последовательностей, кодирующих эти белки, является последовательность, кодирующая N-концевую часть белка NS1, поскольку наличие полного белка NS1 не является строго обязательным для размножения вирусов. С учетом имеющейся проблемы со стабильностью генома YF в присутствии гетерологичной последовательности, превышающей нормальный размер вирусного генома (приблизительно 10 тысяч нуклеотидов), может быть использована описанная ниже "детекционная стратегия". Кроме того, делетирование гена NS1 может давать преимущества химерным флавивирусным системам "YF/флавивирус", описанным выше, благодаря тому, что частичная делеция этого белка может предотвращать выработку иммунитета к YF, основанного на антителах к белку NS1, что, таким образом, снимает проблемы вирусного иммунитета тогда, когда необходимо вводить данному пациенту более одной химерной вакцины или когда ранее была введена вакцина против желтой лихорадки или же ее введение понадобится в будущем.

40 Данная стратегия включает формирование серии внутрирамочных делеций в пределах последовательности, кодирующей белок NS1, находящейся в составе плазмиды YFM5.2, в сочетании с конструированием стоп-кодона по окончании кодирующей рамки белка Е, а также серии из двух IRES (т.н. "внутренние сайты присоединения к рибосоме"). Один из сайтов IRES расположен сразу вниз от стоп-кодона и обеспечивает экспрессию открытой рамки на участке между кодирующими последовательностями Е и NS1. Второй сайт IRES инициирует трансляцию укороченного белка NS1, что обеспечивает экспрессию оставшегося полипредшественника неструктурных белков. Эти производные варианты тестируют на восстановление инфекционного вируса, а конструкцию с самой большой делецией используют для встраивания чужеродных последовательностей (например, генов белков HCV) по их первому сайту IRES. Такая частная конструкция также может служить основой для определения того, будет ли делеция гена NS1 подавлять вектор-специфичный иммунитет в контексте химерных конструкций "YF/флавивирус", экспрессирующих ргМ-E, таким способом, который был описан выше.

Встраивание нуклеотидов, кодирующих

белки вируса HCV E1, E2 и (или) E1+E2, ограничено размером делеции, по которой вирус-реципиент "толерантен" к утрате белка NS1. С учетом этого с целью усиления стабильности модифицируемого клона YF могут быть использованы укороченные антигены вируса HCV. Белки HCV конструируют таким образом, чтобы

сигнальная последовательность располагалась сразу вслед за сайтом IRES, а стоп-кодон - непосредственно на С-конце. Такая конструкция будет направлять белки HCV в эндоплазматический ретикулум с последующей секрецией из клетки. Схематически стратегия получения таких конструкций показана на фиг.6. Для такого конструирования могут быть использованы плазмиды, кодирующие белки HCV генотипа I, например плазмиды с HCV, полученные от Д-ра Чарльза Раиса из Вашингтонского университета (Grakoui et al., 1993, J. Virol, 67: 1385-1395), который экспрессировал этот сегмент вируса в процессирующих системах и в полноразмерном клоне HCV, способном к репликации.

Делеционные мутанты по расщеплению ргМ, как предполагаемые ослабленные вакцинные флавивиролы

Дополнительные химерные вирусы, включенные в настоящее изобретение, несут мутации, которые предотвращают расщепление (процессинг) предшественника ргМ, такие как мутации, затрагивающие сайт расщепления ргМ. Например, сайт расщепления ргМ у представляющих интерес инфекционных флавивирусных клонов, таких как вирусов денге, TBE, SLE и другие, может быть мутирован с применением метода направленного (сайт-специфического) мутагенеза. Любая из или все аминокислоты в составе сайта расщепления, которые были названы выше, могут быть делетированы или замещены. Фрагмент нуклеиновой кислоты, включающий мутированные гены ргМ-Е, может быть затем встроен в вектор вируса желтой лихорадки с использованием описанных выше методов. Делетирование в гене ргМ может быть проведено наряду с или без сопровождающих ослабляющих мутаций, таких как, например, мутаций в гене белка Е, перед встраиванием в состав генома вируса желтой лихорадки. Эти мутанты обладают преимуществами по сравнению с монозамещенными мутантами в качестве предполагаемых вакцин, потому что они обеспечивают практически полную невозможность реверсии делетированных последовательностей и восстановления вирулентности.

Следующие химерные флавивиролы по настоящему изобретению были внесены в Американскую Коллекцию типовых культур (ATCC), находящуюся в Роквилле (штат Мэриленд, США) в соответствии с Будапештским договором с датой включения 6 января 1998 года: химерный вирус "желтой лихорадки 17D/денге типа 2" (YF/DEN-2; депозитарный ATCC VR-2593) и химерный вирус "желтой лихорадки 17D/японского энцефалита" SA₁₄-14-2 (YF/JE A1.3; депозитарный ATCC VR-2594).

Другие варианты

Другие варианты также охватываются

приведенной ниже формулой изобретения. Например, гены других имеющих медицинское значение флавивирусов, кодирующие белок ргМ-Е, могут быть встроены в вакцинный вирус желтой лихорадки с целью получения вакцин против других важных с медицинской точки зрения флавивирусов (см., например, Monath et al., 1995, "Flaviviruses", In "Virology", ed. by Fields, Raven-Lippincott, New York, Vol. 1, 961-1034).

Примерами других флавивирусов, гены из геномов которых могут быть встроены в химерные векторы по настоящему изобретению, являются вирусы лихорадки Куньяня, центрально-европейского энцефалита, весенне-летнего клещевого энцефалита, повассанской лихорадки, киасанурской лесной болезни и омской геморрагической лихорадки. Кроме того, гены даже более филогенетически отдаленных вирусов могут быть встроены в вакцинный вирус желтой лихорадки в процессе конструирования новых вакцин.

Получение и использование вакцин

Вакцины по настоящему изобретению вводят в количестве и с использованием тех способов, которые могут быть легко определены специалистами в данной области техники. Вакцины могут быть приготовлены и введены, например, таким же образом, как и вакцина против желтой лихорадки 17D, например, в виде осветленной суспензии инфицированной ткани куриного эмбриона или в виде жидкости, выделяемой из клеточных культур, инфицированных химерным вирусом желтой лихорадки. Таким образом, живой ослабленный вакцинный вирус используется при приготовлении лекарственного препарата в виде стерильного водного раствора, содержащего от 100 до 1 миллиона инфекционных единиц (например, бляшкообразующих единиц или инфекционных доз для тканевых культур) в дозах от 0,1 до 1,0 мл, предназначенного для, например, внутримышечного, подкожного или внутривенного введения. Кроме того, поскольку флавивиролы могут быть способны к заражению человека через слизистые оболочки, например, через слизистые рта (Gresikova et al., 1988, "Tick-borne encephalitis". In "Arboviruses: Ecology & Epidemiology", ed. by Monath, CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. IV, 177-203), то вакцинный вирус может быть введен по пути через слизистые, с целью достижения защитного иммунного ответа. Вакцина может быть введена в качестве первичного профилактического средства взрослым или детям при наличии риска заражения флавивирусной инфекцией. Также вакцины могут быть использованы в качестве вторичных средств для лечения зараженных флавивиролами пациентов путем стимулирования иммунного ответа на флавивирусную инфекцию.

Может быть желательным использовать векторную систему вакцины против желтой лихорадки, предназначенной для иммунизации реципиента против одного из вирусов (например, вируса японского энцефалита) и для последующей реиммунизации того же объекта против второго или третьего вируса с применением различающихся химерных конструкций.

Существенное преимущество химерной системы вируса желтой лихорадки состоит в том, что вектор не приводит к выработке сильного иммунитета к самому себе. Также предварительный иммунитет к желтой лихорадке не является препятствием для использования химерной вакцины в качестве вектора для экспрессии гетерологичных генов. Эти преимущества обуславливаются удалением части гена белка E вируса желтой лихорадки, который кодирует нейтрализующие (защитные) антигены к желтой лихорадке, и замещением его другим гетерологичным геном, который не обеспечивает перекрестного защитного эффекта против желтой лихорадки. Хотя неструктурные белки вируса YF17D могут играть роль в защите, например, за счет формирования антител к NS1, который вовлечен в опосредованный комплемент-зависимыми антителами лизис инфицированных клеток (Schlesinger et al., 1985, J. Immunol, 135: 2805-2809), или за счет индукции ответа на белок NS3 или на другие вирусные белки, то практически исключено, чтобы эти иммунные ответы предотвращали бы способность живой вирусной вакцины стимулировать выработку нейтрализующих антител. Это заключение подтверждается теми фактами, что: 1) пациенты, которые были ранее инфицированы вирусом японского энцефалита, реагируют на вакцинацию штаммом YF17D сходным образом с теми пациентами, у которых предварительного заражения вирусом JE не было, и 2) пациенты, которые ранее получали вакцину YF17D, реагируют на повторную вакцинацию повышением титров нейтрализующих антител (Sweet et al., 1962, Amer. J. Trop. Med. Hyg. , 11:562-569). Таким образом, химерный вектор может быть использован в популяциях, являющихся иммунными к желтой лихорадке благодаря первичному естественному иммунитету или вакцинации, а также может быть использован повторно, или для иммунизации одновременно или последовательно наряду с некоторыми другими отличающимися конструкциями, включая химеры вируса желтой лихорадки со встроенными вирусами, например, японского энцефалита, энцефалита Сент-Луиса или лихорадки западного Нила.

Для практической вакцинации могут быть использованы адъюванты, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Адъюванты, которые могут быть использованы для усиления иммуногенности химерных вакцин, включают, например, липосомные препараты, синтетические адъюванты, такие как сапонины (например, QS21), мурамил-дипептид, монофосфорный липид-A или полифосфазин. Хотя эти адъюванты обычно используются для усиления иммунных ответов на инактивированные (убитые) вакцины, они также могут быть использованы и для живых вакцин. В случае применения химерных вакцин через слизистые, например, через слизистые рта, применимыми адъювантами могут быть специальные адъюванты для слизистых оболочек, такие как теплоустойчивый токсин E.coli (LT) или мутантные производные LT. Кроме того, гены, кодирующие цитокины, обладающие

активностью адъювантов, могут быть встроены в векторы вируса желтой лихорадки. Таким образом, гены, кодирующие цитокины, такие как GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов), IL-2, IL-12, IL-13 или IL-5 (интерлейкины), могут быть встроены вместе с гетерологичными флавивирусными генами с целью получения вакцины, которая бы обусловила усиление иммунных ответов, или с целью модулирования иммунитета, более специфически направленного в отношении клеточных, гуморальных или слизистых ответов. В дополнение к применению вакцин, как понятно специалисту в данной области техники, векторы по настоящему изобретению могут быть использованы в методах генотерапии с целью внесения "терапевтических генных продуктов" в клетки пациента. В этих методах гены, кодирующие "терапевтические генные продукты", встраиваются в состав векторов, например, вместо гена, кодирующего белок рМ-E.

Дополнительное преимущество векторной системы вируса желтой лихорадки состоит в том, что репликаты флавивируса находятся в цитоплазме клеток, поэтому стратегия размножения вируса не связана интеграцией вирусного генома в геном клетки-хозяина (Chambers et al., 1990, "Flavivirus genome organization, expression and replication", Ann. Rev. Microbiol, 44:649-688), что является важным фактором безопасности.

Все цитированные ссылки включены в данный текст в своей полноте.

Формула изобретения:

1. Химерный живой инфекционный аттенуированный вирус, включающий вирус желтой лихорадки, у которого нуклеотидная последовательность, кодирующая премембранный и оболочечный белки, либо deletирована, либо укорочена, либо мутирована таким образом, чтобы функциональные премембранный и оболочечный белки вируса желтой лихорадки не экспрессировались; интегрированную в геном упомянутого вируса желтой лихорадки нуклеотидную последовательность, кодирующую премембранный и оболочечный белки второго, отличающегося, флавивируса, таким образом, чтобы премембранный и оболочечный белки упомянутого второго флавивируса экспрессировались, и сигнальные последовательности в точках соединения C/prM и E/NS1 сохраняются в конструкции упомянутого химерного флавивируса.

2. Химерный вирус по п.1, где упомянутым вторым флавивирусом является вирус японского энцефалита (JE).

3. Химерный вирус по п.1, где упомянутым вторым флавивирусом является вирус лихорадки денге, выбираемый из группы, включающий вирусы денге типов 1-4.

4. Химерный вирус по п.1, где упомянутый второй вирус выбирается из группы, включающей вирус энцефалита долины Мюррей, вирус энцефалита Сент-Луиса, вирус лихорадки западного Нила, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки Куныния, вирус центрально-европейского энцефалита, вирус весенне-летнего клещевого энцефалита, вирус повассанской лихорадки, вирус киасанурской лесной болезни и вирус омской

геморрагической лихорадки.

5. Химерный вирус по п.1, где нуклеотидная последовательность, кодирующая премолекулный и оболочечный белки упомянутого второго, отличающегося, флавивируса, замещает нуклеотидную последовательность, кодирующую предшественника мембранного и оболочечного белков упомянутого вируса желтой лихорадки.

6. Химерный вирус по п.1, где упомянутая нуклеотидная последовательность, кодирующая упомянутые премолекулный и оболочечный белки упомянутого второго, отличающегося, флавивируса, несет мутацию, которая предотвращает расщепление премолекулного белка при образовании зрелого мембранного белка.

7. Химерный живой инфекционный аттенуированный вирус для использования для приготовления лекарственного средства, предназначенного для профилактики или лечения флавивирусной инфекции у пациента, где вирус включает вирус желтой лихорадки, у которого нуклеотидная последовательность, кодирующая премолекулный и оболочечный белки, либо делегирована, либо укорочена, либо мутирована таким образом, чтобы функциональные премолекулный и оболочечный белки вируса желтой лихорадки не экспрессировались; интегрированную в геном упомянутого вируса желтой лихорадки нуклеотидную последовательность, кодирующую премолекулный и оболочечный белки второго, отличающегося, флавивируса, таким образом, чтобы премолекулный и оболочечный белки упомянутого второго флавивируса экспрессировались, и сигнальные последовательности в точках соединения C/prM и E/NS1 сохраняются в конструкции упомянутого химерного флавивируса.

8. Вирус по п.7, где упомянутым вторым флавивирусом является вирус японского энцефалита (JE).

9. Вирус по п.7, где упомянутым вторым флавивирусом является вирус лихорадки денге, выбираемый из группы, включающий вирусы денге типов 1-4.

10. Вирус по п. 7, где упомянутый второй вирус выбирается из группы, включающей вирус энцефалита долины Мюррей, вирус энцефалита Сент-Луиса, вирус лихорадки западного Нила, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки Куньяня, вирус центрально-европейского энцефалита, вирус весенне-летнего клещевого энцефалита, вирус повассанской лихорадки, вирус киасанурской лесной болезни и вирус омской геморрагической лихорадки.

11. Вирус по п.7, где нуклеотидная последовательность, кодирующая премолекулный и оболочечный белки упомянутого второго, отличающегося, флавивируса, замещает нуклеотидную последовательность, кодирующую предшественника мембранного и оболочечного белков упомянутого вируса желтой лихорадки.

12. Вирус по п.7, где упомянутая нуклеотидная последовательность,

кодирующая упомянутые премолекулный и оболочечный белки упомянутого второго, отличающегося, флавивируса, несет мутацию, которая предотвращает расщепление премолекулного белка при образовании зрелого мембранного белка.

13. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный живой инфекционный аттенуированный вирус, включающий вирус желтой лихорадки, у которого нуклеотидная последовательность, кодирующая премолекулный и оболочечный белки, либо делегирована, либо укорочена, либо мутирована таким образом, чтобы функциональные премолекулный и оболочечный белки вируса желтой лихорадки не экспрессировались; интегрированную в геном упомянутого вируса желтой лихорадки нуклеотидную последовательность, кодирующую премолекулный и оболочечный белки второго, отличающегося, флавивируса, таким образом, чтобы премолекулный и оболочечный белки упомянутого второго флавивируса экспрессировались, и сигнальные последовательности в точках соединения C/prM и E/NS1 сохраняются в конструкции упомянутого химерного флавивируса.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13, где упомянутым вторым флавивирусом является вирус японского энцефалита (JE).

15. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13, где упомянутым вторым флавивирусом является вирус лихорадки денге, выбираемый из группы, включающей вирусы денге типов 1-4.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13, где упомянутый второй вирус выбирается из группы, включающей вирус энцефалита долины Мюррей, вирус энцефалита Сент-Луиса, вирус лихорадки западного Нила, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки Куньяня, вирус центрально-европейского энцефалита, вирус весенне-летнего клещевого энцефалита, вирус повассанской лихорадки, вирус киасанурской лесной болезни и вирус омской геморрагической лихорадки.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13, где нуклеотидная последовательность, кодирующая премолекулный и оболочечный белки упомянутого второго, отличающегося, флавивируса, замещает нуклеотидную последовательность, кодирующую предшественника мембранного и оболочечного белков упомянутого вируса желтой лихорадки.

18. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13, где упомянутая нуклеотидная последовательность, кодирующая упомянутые премолекулный и оболочечный белки упомянутого второго, отличающегося, флавивируса, несет мутацию, которая предотвращает расщепление премолекулного белка при образовании зрелого мембранного белка.

Приоритет по пунктам и признакам:

28.02.1997 по пп.1-5, 7-10, 11, 13-17;

15.01.1998 по пп.4, 10 и 16: в качестве второго вируса представлен вирус клещевого энцефалита;

15.01.1998 по пп.6, 12 и 18.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) БАЗОВАЯ ИНФОРМАЦИЯ

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ: OraVax, Inc., et al.

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Химерные флавиовирусные вакцины

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 16

(iv) АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

(A) АДРЕСАТ: Clark & Elbing LLP

(B) УЛИЦА: 176 Federal str.

(C) ГОРОД: Boston

(D) ШТАТ: Massachusetts

(E) СТРАНА: Соединённые Штаты Америки

(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС: 02110

(v) ФОРМА, ПРИГОДНАЯ ДЛЯ КОМПЬЮТЕРА

(A) ТИП СВЯЗИ: дискета

(B) КОМПЬЮТЕР: IBM-совместимый

(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: DOS

(D) ПРОГРАММА: FastSEQ for Windows Version 2.0

(vi) ТЕКУЩИЕ ПАРАМЕТРЫ ЗАЯВКИ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ:

(B) ДАТА ПОДАЧИ: 2 марта 1998 г.

(C) КЛАССИФИКАЦИЯ:

(vii) ДАННЫЕ ПРИОРИТЕТА ЗАЯВКИ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ: 08/807445

(B) ДАТА ПОДАЧИ: 28 февраля 1997 г.

(viii) ДАННЫЕ ПРИОРИТЕТА ЗАЯВКИ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ: неизвестен

(B) ДАТА ПОДАЧИ: 15 января 1998 г.

(ix) ИНФОРМАЦИЯ О ПАТЕНТНОМ ПОВЕРЕННОМ:

(A) ИМЯ: CLARK Paul T.

(B) НОМЕР РЕГИСТРАЦИИ: 30162

(C) РЕЕСТРОВЫЙ НОМЕР: 06132/033W02

RU
2
2
0
9
0
8
2
C
2

RU
2
2
0
9
0
8
2
C
2

(x) ТЕЛЕКОММУНИКАЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(A) ТЕЛЕФОН: (1-617) 428-0200

(B) ФАКС: (1-617) 428-7045

(C) ТЕЛЕКС:

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 1

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 21 пара нуклеотидов

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 1

CACTGGGAGA GCTTGAAGGT C

21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 2

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 25 пар нуклеотидов

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 2

AAAGCCAGTT GCAGCCGCGG TTAA

25

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 3

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА: 21 пара нуклеотидов

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 3

AAGGTAGACT GGTGGGCTCC C

21

RU
2
2
0
9
0
8
2
C
2

RU
2
2
0
9
0
8
2
C
2

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 4

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 26 пар нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 4

GATCCTCAGT ACCAACCGCG GTTTAA

26

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 5

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 21 пара нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 5

AAGGTAGATT GGTGTGCATT G

21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 6

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 26 пар нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 6

AACCCCTCAGT ACCACCCGCG GTTTAA

26

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 7

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 21 пара нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота

RU
2
2
0
9
0
8
2
C
2

RU
2
2
0
9
0
8
2
C
2

- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 7

AAGGTGAATT GAAGTGCTCT A

21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 8

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 25 пар нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 8

ACCCCCAGCA CCACCCGCGG TTAA

25

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 9

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 21 пара нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 9

AAAAGGAACA GTTGTTCTCT A

21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 10

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 25 пар нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 10

RU 2209082 C2

RU 2209082 C2

ACCCGAAGTG TCAACCGCGG TTAA

25

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 11

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 21 пара нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 11

AACGTGAATA GTTGGATAGT C

21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 12

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 25 пар нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 12

ACCGTTGGTC GCACCCGCGG TTAA

25

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 13

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 21 пара нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 13

AATTCGAAA GGTGGAAGGT C

21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 14

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

RU 2209082 C2

RU 2209082 C2

- (A) ДЛИНА: 26 пар нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 14

GACCGGTGTT TACAGCCGCG GTTAA

26

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 15

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 21 пара нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 15

TACTGCGAAC GACGTTGCCA C

21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID NO 16

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА: 25 пар нуклеотидов
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ЧИСЛО НИТЕЙ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: κДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO 16

ACTGGGAACC TCACCCGCGG TTAA

25

Таблица 1

Характеристика химер YF/JE

Клон	Выход (мкг)	Инфекционность "бляшки"/100 нг клетки LLC-MK ₂	PBS-буфер	РНКаза	ДНККаза
			log-титр Vero	log-титр Vero	log-титр Vero
YF5.2IV	5,5	15	7,2	0	7
YF/JE-S	7,6	50	6,2	0	6,2
YF/JE-N	7	60	5	0	5,4

Таблица 2

Сравнение последовательностей штаммов JE и химер YF/JE

Вирус	E	E	E	E	E	E	E	E
	107	138	176	177	227	243	244	279
JE SA14-14-2	F	K	V	T	S	K	G	M
YF/JE SA14-14-2	F	K	V	A	S	E	G	M
YF/JE Nakayama	L	E	I	T	P	E	E	K
JE Nakayama	L	E	I	T	P	E	E	K
JE SA14-14-2	L	E	I	T	S	E	G	K

Таблица 3

Нейтрализационные титры по снижению числа бляшек

для химер YF/JE

Вирус	неиммунная	асцитная	асцитная	неиммунный	IgG YF
	асцитная	жидкость YF	жидкость JE	IgG	
	жидкость				
YF5.2IV	< 1,3	3,7	< 1,3	< 2,2	> 4,3
JE SA14-14-2	< 1,3	< 1,3	3,4	< 2,2	< 2,2
YF/JE SA14-14-2	< 1,3	< 1,3	3,1	< 2,2	< 1,9
YF/JE Nakayama	< 1,3	< 1,3	3,4	< 2,2	< 2,2

Таблица 4

Нейровирулентность химеры YF/JE SA14-14-2 в отношении

3-недельных самцов мышей линии ICR

Вирус	log дозы (интрацеребральной)	Смертность, %
YF5.2IV	4	100 (7/7)
YF/JE SA14-14-2	4	0 (0/7)
YF/JE SA14-14-2	5	0 (0/7)
YF/JE SA14-14-2	6	0 (0/8)

Таблица 5

Нейроинвазивность химеры YF/JE в отношении

Вирус	3-недельных самцов мышей линии ICR	
	log дозы (внутрибрюшинно)	Смертность, %
YF/JE Nakayama	4	0 (0/5)
YF/JE Nakayama	5	0 (0/4)
YF/JE Nakayama	6	0 (0/4)
YF/JE SA14-14-2	4	0 (0/5)
YF/JE SA14-14-2	5	0 (0/4)
YF/JE SA14-14-2	6	0 (0/4)

Таблица 6

Вирус	Конструирование химер "YF/флавивирус"				Элиминируемые или создаваемые рестрикционные сайты ⁵
	Химерное соединение C/prM ¹	Химерное соединение E/NS1 ²	Лигирование по 5'-концу ³	Лигирование по 3'-концу ⁴	
YF/WN	X-cactgggagagcctgaaggtc (SEQ ID NO:1)	<u>aaagccagttccagcccggttaa</u> (SEQ ID NO:2)	<i>AatII</i>	<i>NsiI</i>	
YF/DEN-1	X-aaggtagactgggtggctccc (SEQ ID NO:3)	<u>gaicctcagttaccaaccgcggttaa</u> (SEQ ID NO:4)	<i>AatII</i>	<i>SphI</i>	<i>SphI</i> in DEN
YF/DEN-2	X-aaggtagattgggtgcatg (SEQ ID NO:5)	<u>aaccctcagttaccaccgcggttaa</u> (SEQ ID NO:6)	<i>AatII</i>	<i>SphI</i>	
YF/DEN-3	X-aaggtgaatgaagtgtctca (SEQ ID NO:7)	<u>acccctcagttaccaccgcggttaa</u> (SEQ ID NO:8)	<i>AatII</i>	<i>SphI</i>	<i>XhoI</i> in DEN (<i>SphI</i> in DEN)
YF/DEN-4	X-aaaaggaacagttgtctca (SEQ ID NO:9)	<u>acccgaagtctcaaccgcggttaa</u> (SEQ ID NO:10)	<i>AatII</i>	<i>NsiI</i>	
YF/SLE	X-aacgtgaatagttggatagtc (SEQ ID NO:11)	<u>acccttggtccagcccgcggttaa</u> (SEQ ID NO:12)	<i>AatII</i>	<i>SphI</i>	<i>AatII</i> in SLE
YF/MVE	X-aamtcgaaaggtggaaggtc (SEQ ID NO:13)	<u>gaccgtgttttaaccgcggttaa</u> (SEQ ID NO:14)	<i>AatII</i>	<i>AgeI</i>	(<i>AgeI</i> in YF)
YF/TBE	X-tactcgcaacgactgtgccac (SEQ ID NO:15)	<u>atggggaacctcaccgcggttaa</u> (SEQ ID NO:16)	<i>AatII</i>	<i>AgeI</i>	(<i>AgeI</i> in YF)

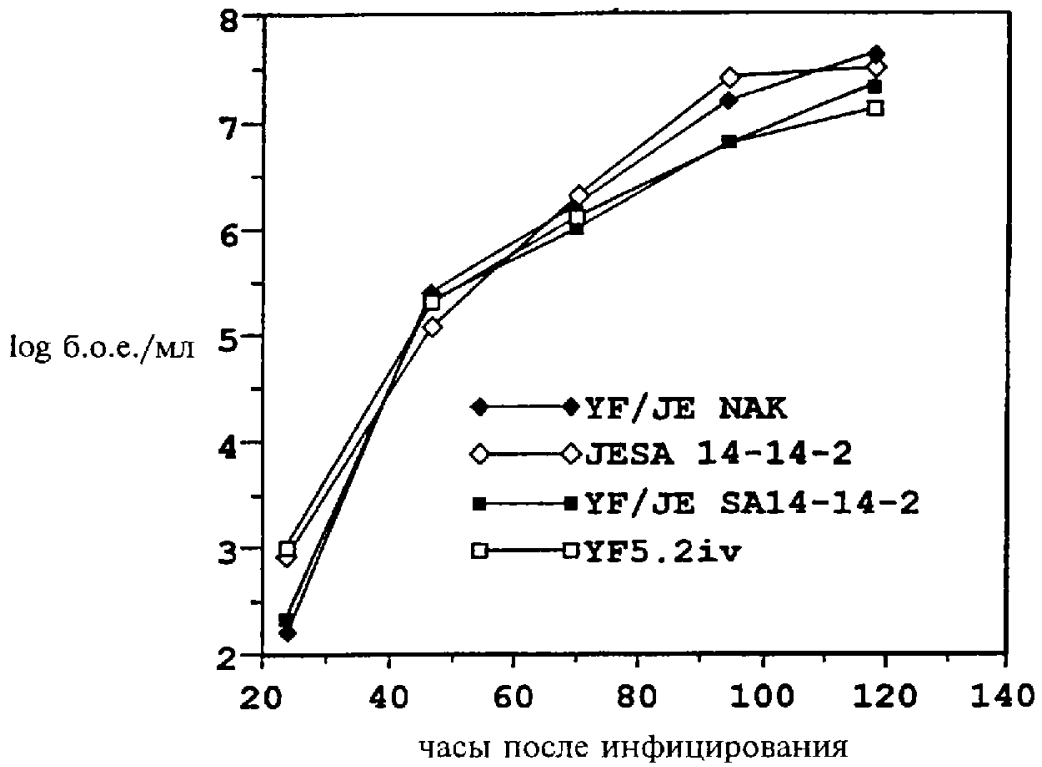
^{1,2}: данная колонка показывает олигонуклеотиды, использованные при создании химерных затравок для "YF/флавивируса", соответствующие сайтам соединения кодирующих рамок белков C/prM или E/NS1 (см. текст). X - карбоксильный конец кодирующей последовательности капсида YF. Подчеркнутый сегмент соответствует являющейся мишенью гетерологической последовательности, расположенной сразу ниже рестрикционного сайта *NarI* (его антисмысловая последовательность - CCGCGG). Этот

сайт обеспечивает встраивание ПЦР-продуктов в состав плазмиды YFM5.2 (NarI), необходимой для формирования полноразмерных кДНК-матриц. Другие нуклеотиды специфичны в отношении гетерологичного вируса. Направление последовательностей олигонуклеотидных праймеров соответствует 5'→3'.

^{3,4}: перечислены уникальные рестрикционные сайты, использовавшиеся для получения рестрикционных фрагментов, которые могут быть выделены и лигированы *in vitro* с получением полноразмерных химерных кДНК-матриц. Поскольку некоторые последовательности не включают собственных сайтов, то в ряде случаев становится необходимым искусственное формирование таких подходящих сайтов (см. примечание 5).

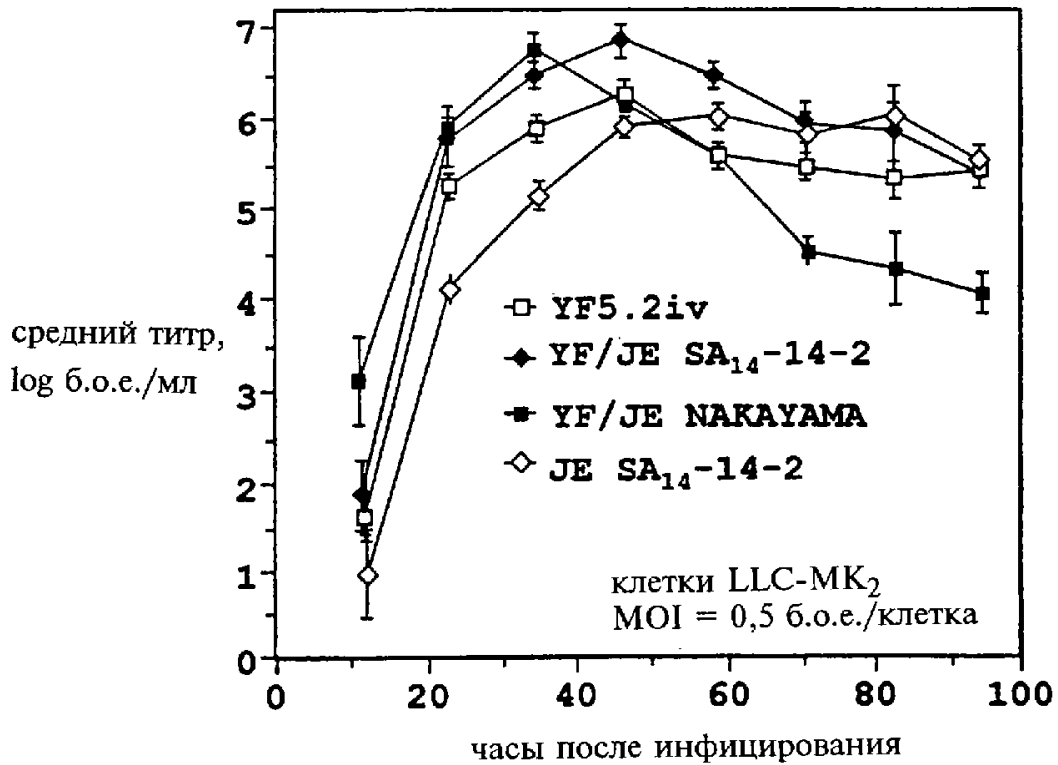
⁵: в скобках обозначены рестрикционные сайты, которые должны быть созданы либо непосредственно в базовой последовательности YF, либо в последовательности гетерологичного вируса, с целью обеспечения лигирования *in vitro*. Сайты, не взятые в скобки, обозначают сайты, которые должны быть уничтожены. Все такие модификации выполняются с применением метода направленного мутагенеза кДНК соответствующего клона. Отсутствие записей в трех строках означает, что никакие модификации этих клонов кДНК не требуются.

Рост в клетках С6/36



ФИГ. 2А

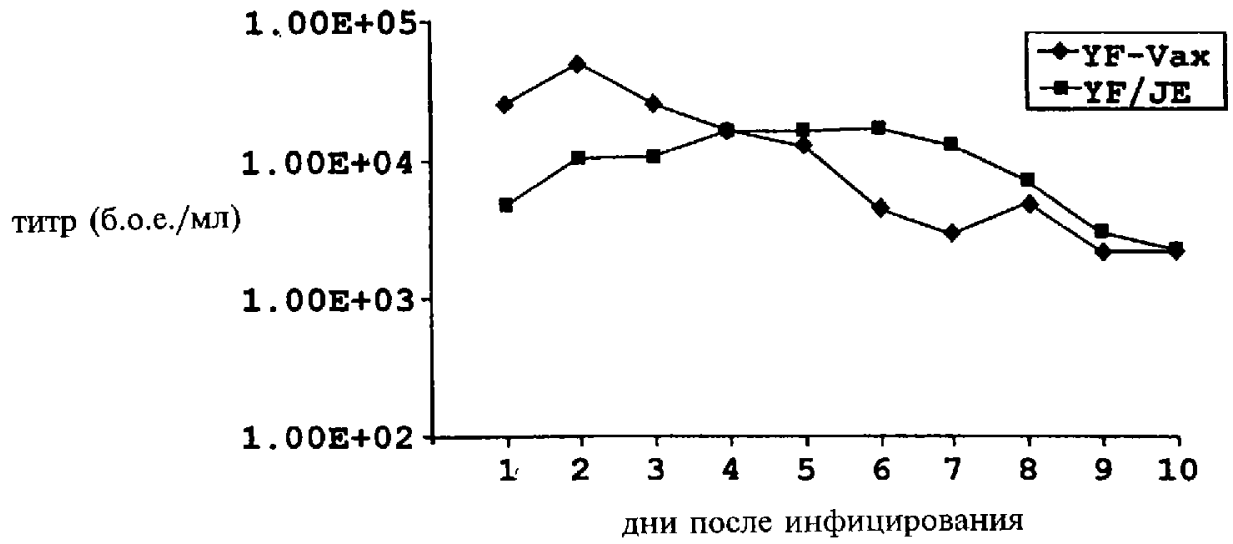
Кривая роста



ФИГ. 2В

RU 2209082 C2

RU 2209082 C2



Сравнение роста RMS и YF-Vax в клетках MRC-5

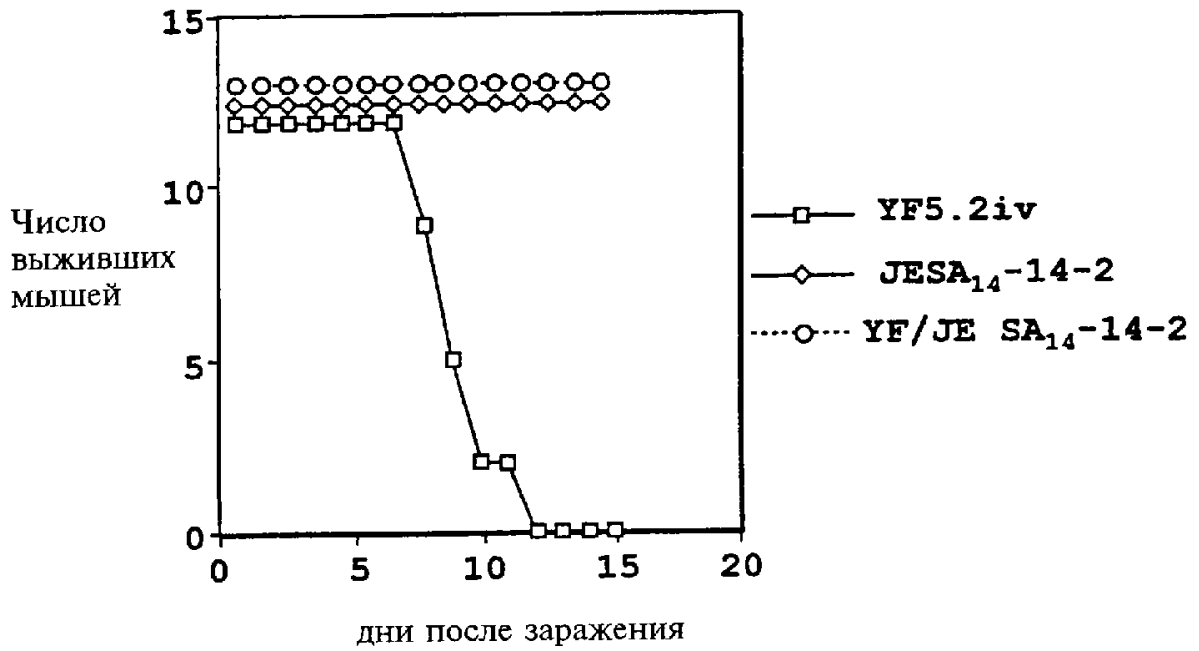
ФИГ. 3

RU 2209082 C2

RU 2209082 C2

Анализ нейровирулентности у мышей

мыши: 4-недельные самцы/самки линии ICR
 доза вируса: 10^4 б.о.е., интрацеребральное введение

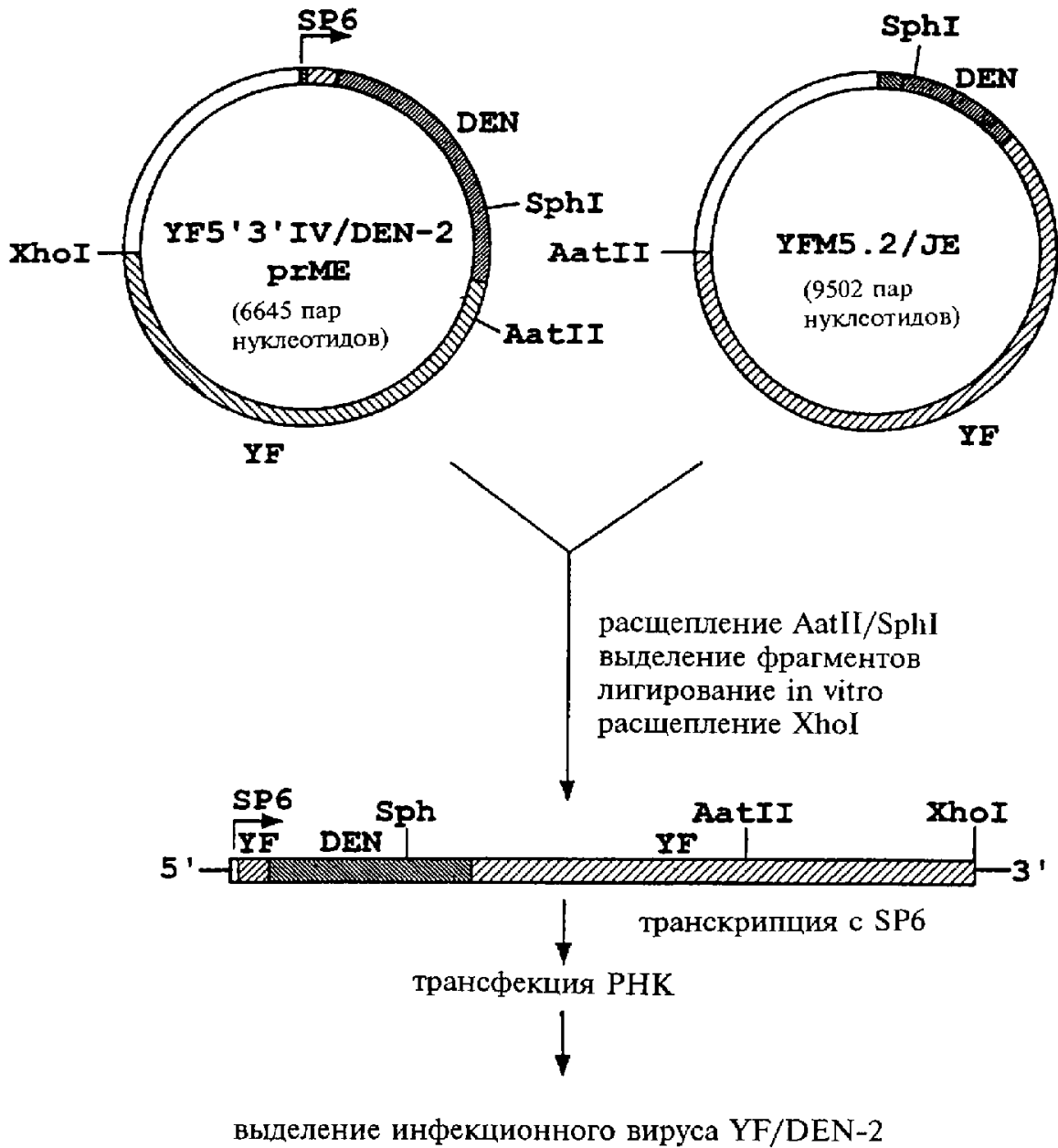


Вирус	Выживаемость	P
YF5.2iv	0/12 (0%)	-
JESA ₁₄ -14-2	12/12 (100%)	<0.001
YF/JE SA ₁₄ -14-2	13/13 (100%)	<0.001

ФИГ. 4

RU 2209082 C2

RU 2209082 C2

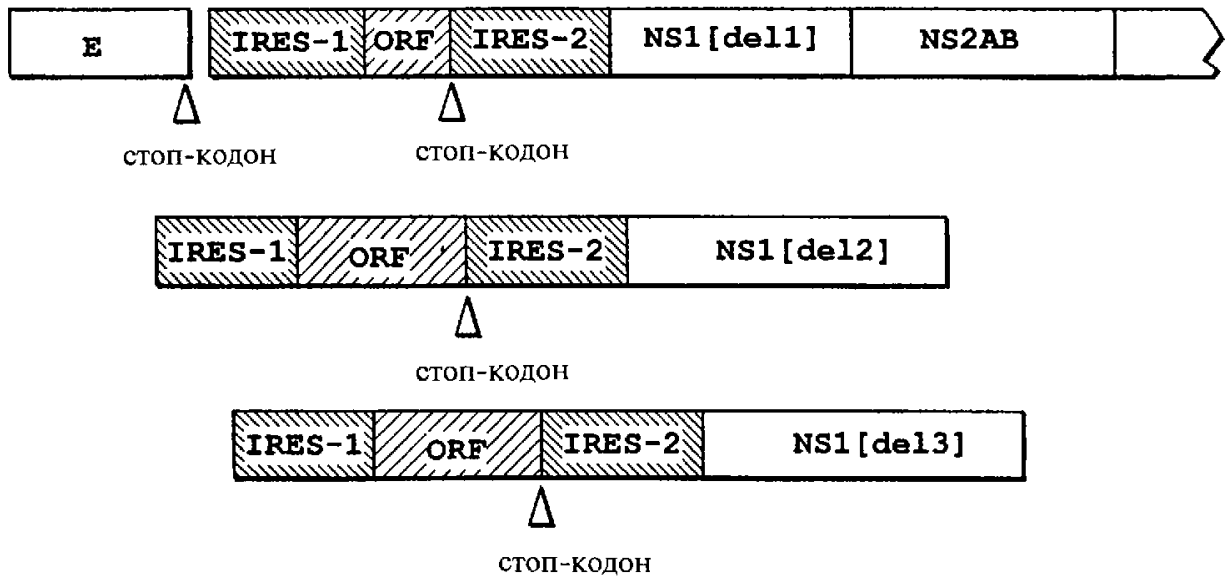


ФИГ. 5

RU 2209082 C2

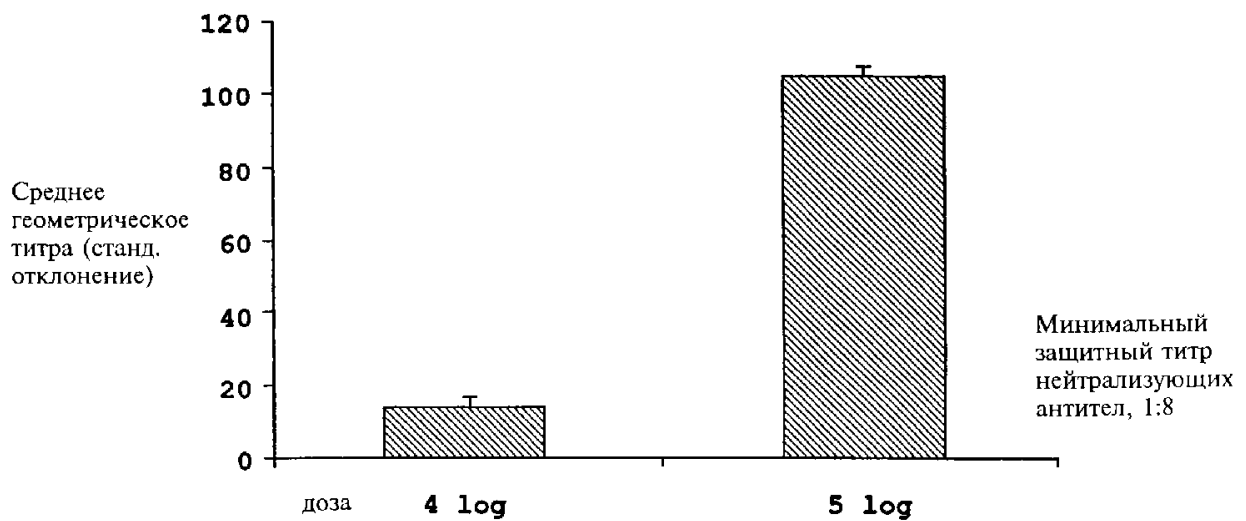
RU 2209082 C2

Структура модифицированных клонов YF,
экспрессирующих межгенные кодирующие рамки E/NS1



ФИГ. 6

Реакция нейтрализации антител
на химерную вакцину YF/JE SA14-14-2
(иммунизация 3-недельных мышей;
взятие проб для тестирования на 6-й неделе)



ФИГ. 7