

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-3064**
 (22) Přihlášeno: **02.03.1998**
 (30) Právo přednosti: **28.02.1997 US 1997/807445**
15.01.1998 US 1998/7664
 (40) Zveřejněno: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)
 (47) Uděleno: **26.01.2009**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **04.03.2009**
(Věstník č. 9/2009)
 (86) PCT číslo: **PCT/US1998/003894**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/037911**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/193 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 93/06214; WO 90/01946.
 BRAY Michael a kol., Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes, listopad 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, číslo 88, stránky 10342 až 10346.

(73) Majitel patentu:

ACAMBIS INC., Cambridge, MA, US
 ST. LOUIS UNIVERSITY, St. Louis, MO, US

(72) Puvodce:

Chambers Thomas J., St. Louis, MO, US
 Monath Thomas P., Harvard, MA, US
 Guirakhoo Farshad, Melrose, MA, US

(74) Zastupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
 14000

(54) Název vynálezu:

**Chimérický živý, infekční, oslabený virus,
 léčivo pro prevenci nebo léčbu flavivirových
 infekcí s jeho obsahem a molekula nukleové
 kyseliny jej kódující**

(57) Anotace:

Chimérický, živý, infekční, oslabený virus, který zahrnuje virus žluté horečky, ve kterém je nukleotidová sekvence pro prM-E protein buď deletována, okleštěna, nebo zmutována, takže není exprimován funkční prM-E protein, a do genomu tohoto viru žluté horečky je integrována nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhého, odlišného flaviviru, takže prM-E protein tohoto druhého flaviviru exprimován je, přičemž jsou signální sekvence v C/prM a E/NS1 spojeních udržovány v konstrukci zmíněného chimérickém flaviviru, jeho použití pro přípravu léčiv pro prevenci nebo léčbu flavivirových infekcí u pacientů a molekula nukleové kyseliny jej kódující.

Chimérický živý, infekční, oslabený virus, léčivo pro prevenci nebo léčbu flavivirových infekcí s jeho obsahem a molekula nukleové kyseliny jej kódující

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se vztahuje k infekčním, oslabeným virům, které jsou použitelné jako vakcíny proti onemocněním způsobovaným flaviviry.

10

Dosavadní stav techniky

Několik členů patřících do čeledě flavivirů v současnosti jsou hrozbou nebo potenciálně mohou být ohrožením globálního obecného zdraví. Například Japonská encefalitida je závažným obecným zdravotním problémem, který představuje nebezpečí pro miliony jednotlivců na Dalekém Východě. Virus horečky Dengue, který je každoročně celosvětově odhadován jako příčina 100 milionů případů primární horečky Dengue a více než 450 000 případů hemoragické horečky Dengue, byl vyhodnocen jako jedna z nejvýznamnějších arthropodpřenosných lidských chorob. Další flaviviry pokračují ve způsobování endemických chorob u různých živočichů a mají potenciál vniknout i do nových oblastí, jakými jsou příčiny změn klimatu, vektor populací a výsledky narušení životního prostředí způsobované lidskou činností. Tyto flaviviry zahrnují například St. Louis encefalitický virus, který způsobuje sporadickou, ale vážnou akutní chorobu na středozápadě, jihovýchodě a západě Spojených států amerických; Západonilský virus, který způsobuje horečnatá onemocnění, příležitostně komplikovaná akutní encefalitidou a je významně rozšířen v Africe, na Středním Východě, v dřívějším Sovětském svazu a některých částech Evropy; Murray Valley encefalitický virus, který způsobuje endemické onemocnění nervového systému v Austrálii a Klíšťový encefalitický virus, který je rozšířen v bývalém Sovětském svazu a východní Evropě, kde jeho klíšťový nosič je běžný a je odpovědný za vážnou formu encefalitidy v těchto regionech.

30

Virus hepatitidy C (HCV) je dalším členem čeledě flavivirů, jehož organizace genomu a replikační strategie jsou podobné, ale nikoliv identické těm virům, které jsou zmíněny výše. HCV virus, který je přenášen hlavně mimo střevní expozici, je spojen s chronickou hepatitidou, která se může vyvinout do cirhóze jater a hepatocelulárního karcinomu a je vedoucí příčinou jaterních onemocnění, která vyžadují orthotopickou transplantaci ve Spojených státech amerických.

35

Čeď Flaviviridae je odlišná od alfavirů (např.: WEE, VEE, EEE, SFV atd.) a v současnosti zahrnuje tři rody: flaviviry, pestiviry a viry hepatitidy C. Zcela zralé viriony flavivirů obsahují tři strukturní proteiny, obálky (E), kapsidy (C) a membrány (M) a sedm nestrukturních proteinů (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5). Nezralé viriony nalézají v buněčném obsahu infikovaných buněk pre-membránový (prM) protein, který je prekurzorem membránového proteinu M.

40

Po navázání virionů na receptory hostitelské buňky, E protein prochází nevratnou konformační změnou pod vlivem kyselého pH endozomů, což způsobuje fúzi mezi dvojvrstevnou obálkou virionů a endocytickými váčky, a tudíž dochází k vypuštění virálního genomu do cytosolu hostitelské buňky. Viry klíšťové encefalitidy (TBE), které obsahují prM protein, jsou neschopné fúze, což znamená, že proteolytická úprava prM proteinu je nezbytná pro vytvoření virionů, které jsou schopné fúze a jsou to zcela infekční viriony (Guirakhoo *et al.*, J. Gen. Virol. 72 (pt. 2):333 až 338, 1991). Pozdějším použitím chloridu amonného ve virovém replikačním cyklu byly produkovány Murray Valley encefalitické viry (MVE), které obsahovaly prM protein, a které byly neschopné fúze. Za použití peptidů specifické sekvence a monoklonálních protilátek bylo demonstrováno, že prM protein interaguje s aminokyselinami 200 až 327 E proteinu. Tato interakce je nezbytná proto, aby ochránila E protein před nevratnými konformačními změnami způsobovanými

50

mi maturací virionů v kyselých měchýřcích exocytické cesty (Guirakhoo *et al.*, Virology 191:921 až 931, 1992).

- 5 Štěpení prM proteinu na M protein se objevuje krátce před vypuštěním virionů, provádí ho celulární proteáza podobná furinu (Stadler *et al.*, J. Virol. 71:8475 až 8481, 1997) a je nezbytné pro aktivaci hemoaglutinační aktivity, fusogení aktivity a infekčnosti virionů. M protein je vyštěpen ze svého prekursoru v souhlasné sekvenci R–X–R/K–R (X je variabilní) a je začleněn do virové lipidové obálky společně s E proteinem.
- 10 Štěpicí sekvence byly konzervativní ne pouze u flavivirů, ale také u proteinů ostatních nepříbuzných virů takový, jako jsou PE2 myších koronaviřů, PE2 alfavirů, HA chřipkových virů a p160 retrovirů. Štěpení prekurzorového proteinu je hlavní pro virovou infektivitu, ale ne pro vytvoření virové částice. Bylo prokázáno, že v případě TBE–dengue 4 chiméry, změna v štěpicím místě prM proteinu vede ke snížení neurovirulence této chiméry (Pletnev *et al.*, J. Virol. 67:4956 až 4963, 1993), což je v souladu s předchozím pozorováním, že dostatečná úprava prM proteinu je nezbytná pro plnou infekčnost (Guirakhoo *et al.*, 1991, výše, 1992, výše; Heinz *et al.*, Virology 198:109 až 117, 1994). Protilátky proti prM proteinu mohou zprostředkovat ochranou imunitu, zjevně z důvodu neutralizace vypuštěných virionů, které obsahují nějaký nenaštěpený prM protein. Proteolytické štěpicí místo v PE2 u VEE (4 aminokyseliny) bylo deletováno cílenou mutagenézou infekčního klonu (Smith *et al.*, ASTMH meeting, December 7–11, 1997). Deleční mutanty se replikovaly s velkou účinností a PE2 proteiny byly začleňovány do částic. Tento mutant byl odzkoušen na nehumánních primátech a vykazoval 100% serokonzervaci a ochraňoval všechny imunizované opice před smrtelnými změnami.
- 20

25

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález charakterizuje chimérické, živé, infekční, oslabené viry tak, že je každý tvořen takto:

30

- a) první virus žluté horečky (např.: kmen 17D), který představuje živou, oslabenou virovou vakcínu, v které je nukleotidová sekvence pro prM–E protein buď deletována, okleštěna, nebo zmutována tak, že funkční prM–E protein prvního flaviviru není exprimován, a
- 35 b) nukleotidová sekvence kódující virální obálku (prM–E proteinů) druhého, odlišného flaviviru, je integrována do genomu prvního flaviviru, takže prM–E protein druhého flaviviru je exprimován z pozmeněného genomu prvního flaviviru, přičemž jsou signální sekvence v C/prM a E/NS1 spojeních udržovány v konstrukci zmíněného chimérickém flaviviru.

40

Chimérický virus je tudíž tvořen geny a genovými produkty odpovědnými za intracelulární replikaci patřící prvnímu flaviviru a geny a genovými produkty obálky druhého flaviviru. Protože virální obálka obsahuje všechny antigenní determinanty odpovědné za indukci neutralizujících protilátek, výsledkem infekce chimérickým virem je, že tyto protilátky jsou produkovány pouze proti druhému flaviviru.

45

- Upřednostňovaným živým virem pro použití jako první flavivirus v chimérických virech podle předkládaného vynálezu je virus žluté horečky. Nejméně jedna vakcína již použila tento živý, oslabený virus; tato vakcína je známa jako YF17D a byla použita pro imunizaci lidí před více než 50 lety. Vakcína YF17D je popsána v řadě publikací, včetně publikací Smithburna *et al.* („Yellow Fever Vaccination“, World Health Org., p. 238, 1956) a Freestona (*in* Plotkin *et al.*, (Eds.), Vaccines, 2nd edition, W.B. Saunders, Philadelphia, 1995). Kromě toho byl virus žluté horečky studován na genetické úrovni (Rice *et al.*, Science 229:726 až 733, 1985) a informace vztahující se ke genotypu a fenotypu byly získány (Marchevsky *et al.*, Am. J. Trop. Med. Hyg. 52:75 až 80, 1995).
- 50

55

Upřednostňované viry pro použití jako druhý flavivirus v chimérických virech podle předkládaného vynálezu a tudíž zdroje imunizačního antigenu zahrnují virus japonské encefalitidy (JE), virus horečky Dengue (DEN, např.: jakýkoliv z Dengue typů 1 až 4), Murray Valley encefalitický virus (MVE), St. Louis encefalitický virus (SLE), Západonilský virus (WN), virus klíšťové encefalitidy (TBE) a viry hepatitidy C (HCV). Další flaviviry použitelné jako druhý flavivirus zahrnují Kunjin virus, středoevropský encefalitický virus, ruský jaro–letní encefalitický virus, Powassan virus, Kyasanur Forest Disease virus a virus omské hemoragické horečky. V upřednostňovaném chimérickém viru podle předkládaného vynálezu je sekvence kódující prM–E protein druhého flaviviru zaměněna za sekvenci kódující prM–E protein živého viru žluté horečky. V upřednostňovaném chimérickém viru je sekvence kódující prM–E protein odvozena od oslabeného virového kmene takového, jako je vakcínový kmen. Také jak je popsáno dále níže, prM část proteinu může obsahovat mutaci, která, zabraňuje štěpení, které umožňuje vytvoření zralého membránového proteinu.

V předkládaném vynálezu jsou také zahrnuty metody zabráňující nebo léčící flavivirovou infekci u savců takových, jako je člověk, podáváním chimérického flaviviru infekce savcům; použití chimérických flavivirů podle předkládaného vynálezu při přípravě medikamentů pro zabránění nebo léčbu flavivirové infekce; a způsoby přípravy chimérických flavivirů podle předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález zajišťuje několik výhod. Například, protože jsou chimérické viry živé a replikují se, mohou být chimérické viry podle předkládaného vynálezu použity k vytvoření dlouhotrvající ochranné imunity. Protože mají tyto viry replikační geny oslabeného viru (např.: virus žluté horečky 17D), je výsledný virus oslabený na takový stupeň, že skýtá bezpečí pro použití u lidí.

Další vlastnosti a výhody předkládaného vynálezu budou jasné z následného detailního popisu, obrázků a nároků.

Předkládaný vynález zajišťuje chimérické flaviviry, které mohou být použity při vakcinačních metodách proti flavivirové infekci. Zkonstruování a analýza chimérických flavivirů podle předkládaného vynálezu takových, jako jsou chiméry viru žluté horečky a viru japonské encefalitidy (JE), viru horečky Dengue (DEN 1 až 4), Murray Valley encefalitického viru (MVE), St. Louis encefalitického viru (SLE), Západonilského viru (WN), viru klíšťové encefalitidy (TBE) a virů hepatitidy C (HCV), jsou popsány v následující textu.

Proteiny flavivirů jsou vytvářeny translaací z jednoho, dlouhého otevřeného čtecího rámce (kódovány jsou strukturní proteiny, kapsida (C), pre-membránový (prM) protein a obálka (E), zrovna tak, jako nestrukturní proteiny) a komplexem několika posttranslačních proteolytických štěpení. Chimérické flaviviry podle předkládaného vynálezu, jak již bylo diskutováno výše, zahrnují ty, u kterých byly pr–M a E proteiny jednoho flaviviru zaměněny za pr–M a E proteiny jiného flaviviru. Tudíž takto vytvořené chimérické flaviviry zahrnují generaci nových spojení mezi kapsidou a pre-membránovými proteiny; a obálkový M proteinem a nestrukturní oblastí (NS1) dvou odlišných flavivirů. Štěpení mezi každou z těchto sad proteinů (C a pr–M; a E a NS1) se vyskytuje během přirozené proteolytické úpravy flavivirových proteinů a vyžaduje přítomnost signální sekvence, která vytváří boční sekvence spojení štěpicích míst.

V chimérických flavivirech podle předkládaného vynálezu je upřednostňováno, aby signální sekvence virů tvořících chiméry byly skutečně udržovány, takže vlastní štěpení mezi C a pr–M proteiny a E a NS1 proteiny by mohlo účinně proběhnout. Tyto signální sekvence byly v udržovány v chimérách, které jsou popsány níže. Alternativně jakákoliv z řady známých signálních sekvencí může být zařazena, aby se připojila k C a prM proteinům nebo E a NS1 proteinům chimér (např.: von Heijne, Eur. J. Biochem. 133: 17 až 21, 1983; von Heijne, J. Mol. Biol. 184:99 až 105, 1985) nebo například použitím známých vedoucích sekvencí může ten, kdo je znalý stavu techniky, vytvořit doplňkové signální sekvence, které mohou být použity v chimérách podle předkládaného vynálezu. Obvykle například bude signální sekvence obsahovat jako svůj

poslední aminokyselinový zbytek aminokyseliny s malým, nenabitým postraním řetězcem, takovou, jako je alanin, glycin, serin, cystein, threonin nebo glutamin. Další požadavky kladené na signální sekvence jsou známy těm, kdo znají stav techniky (např.: von Heijne, 1983, výše; von Heijne, 1985, výše). Také signální sekvence dalších virů, které tvoří chiméry, mohou být udržovány nebo skutečně udržovány, takže vlastní štěpení probíhá. Konstrukce cDNA templátů pro vytvoření YE/JE chimérických virů – odvození celodélkových cDNA templátů pro chiméry podle předkládaného vynálezu popsané níže zahrnuje strategii podobnou té, kterou dřívější pracovníci použili k vytvoření YF17D z cDNA pro molekulárněgenetické analýzy replikace YF. Strategie je popsána např.: v Nestorowicz *et al.* (Virology 199:114–123, 1994).

V krátkosti, odvození YF/JE chiméry podle předkládaného vynálezu zahrnuje následující. Genomové sekvence YF jsou rozšířeny do dvou plazmidů (YF5'3'IV a YFM5.2), které kódují YF sekvence od nukleotidu 1 až do 2276 a od 8279 do 10 861 (YF5'3'IV) a od 1373 do 8704 (YFM5.2) (Rice *et al.*, The New Biologist 1:285–296, 1989). Celodélkové cDNA templáty jsou vytvářeny ligací vhodných restričních fragmentů odvozených od těchto plazmidů. Tato metoda byla nejspolehlivější pro zajištění stabilní exprese YF sekvencí a vytvoření RNA transkriptů, které mají vysoce specifickou infektivitu.

Naše strategie pro konstrukci chimér zahrnuje náhradu YF sekvencí mezi YF5'3'IV a YFM5.2 plazmidy odpovídajícími JE sekvencemi z oblasti startu prM proteinu (nukleotid 478, aminokyselina 128) přes E/NS1 štěpicí místo (nukleotid 2 452, aminokyselina 817). Kromě toho, aby mohla být klonována cDNA JE, bylo nezbytné provést několik kroků pro zavedení nebo eliminování restričních míst v obou YF a JE sekvencích, aby bylo umožněno *in vitro* ligace. Struktura templátu pro regenerování chimérických YF (C)/JE (prM–E) virů je ukázána na obrázku 4. Druhá chiméra kódující celou JE strukturní oblast (C prM–E) byl vytvořen za použití podobné strategie.

Molekulární klonování JE virové strukturní oblasti – klony genů skutečného JE strukturního proteinu byly vytvořeny z JE SA₁₄–14–2 kmene (JE živý, oslabený vakcinační kmen), protože biologické vlastnosti a molekulární charakterizace tohoto kmene jsou dobře zdokumentovány (Eckels *et al.*, Vaccine 6:513 až 518, 1988; JE SA₁₄–14–2 virus je dostupný v Centers for Disease Control, Fort Collins, Colorado a v Yale Arbovirus Research Unit, Yale University, New Haven, Connecticut, které jsou Světovou zdravotnickou organizací označeny za referenční centra pro arboviry ve Spojených státech amerických). JE SA₁₄–14–2 virus v transportní formě PDK–5 byl získán a transportován v LLC–MK₂ buňkách, aby bylo získáno dostatečné množství pro klonování cDNA. Strategie, která byla použita, zahrnovala klonování strukturní oblasti ve dvou částech, které se překrývají v *Nhe*I restričním místě (JE nukleotid 1 125), a které mohou být pak použity pro *in vitro* ligaci.

RNA byl extrahována z jednovrstevných infikovaných LLC MK₂ buněk a syntéza prvního řetězce z negativního vlákna cDNA byla provedena za použití reverzní transkriptázy s primerem pro negativní vlákno (JE nukleotidová sekvence 2 456 až 71), které obsahovalo naskládaná *Xba*I a *Nar*I restriční místa pro klonování zpočátku do pBluescript II KS(+) a následně do YFM5.2 (*Nar*I), respektive. Syntéza prvního řetězce cDNA byla následována PCR amplifikací JE sekvence od nukleotidů 1 108 do 2 471 za použití stejného primeru pro negativní vlákno a primeru pro pozitivní vlákno (JE nukleotidová sekvence 1108 až 1130), který obsahoval naskládaná *Xba*I a *Nsi*I restriční místa pro klonování do pBluescriptu a do YFM5.2 (*Nar*I), respektive JE sekvence byly určeny restričním štěpením za pomoci restričního enzymu a nukleotidovým sekvenováním. JE nukleotidová sekvence od nukleotidu 1 do nukleotidu 1130 byla odvozena pomocí PCR amplifikace negativního vlákna JE cDNA za použití primeru pro negativní vlákno, který odpovídal JE nukleotidům 1 116 až 1 130 a primeru pro pozitivní vlákno, který odpovídal JE nukleotidům 1 až 18, oba primery obsahují *Eco*RI restriční místo. PCR fragmenty byly klonovány do pBluescriptu a JE sekvence byly určeny nukleotidovým sekvenováním. Toto dohromady představuje klonování JE sekvence od nukleotidu 1 do nukleotidu 2 471 (aminokyseliny 1 až 792).

Konstrukce derivátů YF5'3'IV/JE a YFM5.2/JE – aby byl vložen C konec JE obálkového proteinu do YF E/NS1 štěpicího místa, bylo zavedeno unikátní restrikční místo *Nar I* do YFM5.2 plazmidu řízenou oligonukleotidovou mutagenezí signální sekvence v E/NS1 štěpicího místa (YF nukleotidy 2 447 až 2 452, aminokyseliny 816 až 817), aby se vytvořil YFM5.2 (*Nar I*). U transkriptů odvozených od templátů začleněných touto změnou byla kontrolována infektivita a výsledná specifická infektivita zda je podobná parentálním templátům (přibližně 100 plaky tvořících jednotek/250 nanogramů transkriptu). JE sekvence z nukleotidů 1108 až 2471 byla subklonována z několika nezávislých pBluescript/JE klonů, které byly vytvořeny PCR, do YFM5.2 (*Nar I*) za použití unikátních *Nsi I* a *Nar I* restrikčních míst. YF5'3'IV/JE klony obsahující YF5' netranslatovatelnou oblast (nukleotidy 1 až 118) sousedící s JE prM-E oblastí byly připraveny PCR amplifikací.

Aby byly odvozeny sekvence obsahující spojení YF kapsidu a JE prM, byl použit chimérický primer negativního vlákna zabírající tuto oblast spolu s primerem pozitivního vlákna, který odpovídá YF5'3'IV nukleotidům 6 625 až 6 639, aby vznikly PCR fragmenty, které byly pak použity jako PCR primery negativního vlákna v konjugaci s primerem pozitivního vlákna doplňujícím v pBluescriptu vektoru upstream sekvencí *EcoR I* restrikčního místa, aby se pak amplifikovala JE sekvence (kódovaná v opačné orientaci v pBluescript vektoru) od nukleotidu 477 (N konec prM proteinu) přes *Nhe I* restrikční místo do nukleotidu 1 125. Výsledné PCR fragmenty byly vneseny do YF5'3'IV plazmidu za použití *Not I* a *EcoR I* restrikčních míst. Tento konstrukt obsahuje SP6 promotor, který předchází YF5' netranslatovatelné oblasti, a je následován sekvencí: YF (C) JE (prM-E) a obsahuje *Nhe I* restrikční místo (JE nukleotid 1 125), které je nezbytné pro *in vitro* ligaci.

Vytvoření YFM5.2 a YF5'3'IV plazmidů, které obsahují restrikční místa pro *in vitro* ligaci – aby mohlo být použito *Nhe I* restrikční místo uvnitř sekvence JE obálky jako 5' koncové *in vitro* ligační místo, bylo nadbytečné *Nhe I* restrikční místo v YFM5.2 plazmidu (nukleotid 54S9) eliminováno. Toto bylo provedeno tichou mutací YF sekvence v nukleotidu 5 461 (T→C; alanin, aminokyselina 1 820). Toto místo bylo začleněno do YFM5.2 ligací vhodných restrikčních fragmentů a zavedeno do YFM5.2(*Nar I*)/JE výměnou za *Nsi I*/*Nar I* fragment kódující chimérickou YF/JE sekvenci.

Aby se vytvořilo unikátní 3' koncové restrikční místo pro *in vitro* ligaci, bylo vytvořeno *BspE I* restrikční místo downstream od *Aat II* restrikčního místa, které je normálně používané pro vytváření celodélkových templátů z YF5'3'IV a YFM5.2. (četná *Aat II* restrikční místa jsou přítomna v JE strukturní sekvenci, což zabraňuje použití tohoto místa pro *in vitro* ligaci). *BspE I* restrikční místo bylo vytvořeno tichou mutací YF nukleotidu 8 581 (A→C; serin, aminokyselina 2860) a bylo zavedeno do YFM5.2 výměnou vhodné restrikční fragmenty. Unikátní místo bylo začleněno do YFM5.2/JE výměnou za *Xba I*/*Sph I* fragment a do YF5'3'IV/JE(prM-E) plazmidů tříčástovou ligací vhodných restrikčních fragmentů z těchto parentálních plazmidů a z derivátu YFM5.2 (*BspE I*) delecí YF sekvence mezi *EcoR I* restrikčními místy nukleotidů 1 a 6912.

Výměna JE Nakayama cDNA s YF/JE chimérickými plazmidy – z důvodu nejistoty ohledně kapacity JE SA₁₄-14-2 strukturní oblasti, která byla vytvořena PCR amplifikací, aby fungovala správně v kontextu chimérického viru, byla použita cDNA z klonu JE Nakayama kmene, který byl široce charakterizován během expresních experimentů a pro jeho kapacitu navodit ochrannou imunitu (Melda *et al.*, Virology 158:348 až 360, 1987; JE Nakayama kmen je dostupný v Centers for Disease Control, Fort Collins, Colorado a v Vale Arbovirus Research Unit, Vale University, New Haven, Connecticut). Nakayama cDNA byla vnesena do YF/JE chimérických plazmidů za použití vhodných restrikčních míst (*Hind III* až *Pvu II* a *Bpm I* až *Mun I*), aby byla zaměněna celá prM-E oblast v dvou plazmidových systémech kromě jedné aminokyseliny, serinu, v pozici 49, která byla ponechána intaktní, aby mohla být použita pro *Nhe I* restrikční místo k *in vitro* ligaci. Celá JE oblast v Nakayama klonu byla sekvenována, aby bylo ověřeno, že záměna cDNA opravdu proběhla (tabulka 2).

Vytvoření celodélkových cDNA templátů, RNA transfekce a vytvoření infekčního viru – postupy pro vytvoření celodélkových cDNA templátů jsou hlavně popsány v Rice *et al.* (The New Biologist 1:285–296, 1989) (obrázek 1). V případě chimérických templátů jsou plazmidy YF5'3'IV/JE(prM-E) a YFM5.2/JE štěpeny restrikčními endonukleázami *Nhe I*/*Bsp I* a *in vitro* ligace byla provedena za použití 50 nanogramů purifikovaných fragmentů a za přítomnosti T4 DNA ligázy. Produkty ligace byly linearizovány enzymem *Xho I*, aby byla umožněna ubíhající transkripce. SP6 transkripty byly syntetizovány za použití 50 nanogramů purifikovaného templátu, kvantifikován začleněním ³H-UTP a celistvost RNA byla určena nedenaturující elektroforézou v agarózovém gelu. Výtěžky byly v rozmezí od 5 do 10 mikrogramů RNA na reakci při použití této procedury, jichž většina byla představována celodélkovými transkripty. Transfekce RNA transkripty v přítomnosti kationtových liposomů bylo prováděno tak, jak je popsáno v Rice *et al.* (výše) pro YFI7D. V počátečních experimentech byly pro transfekci a kvantifikaci viru použity LLC-MK₂ buňky, protože u nich byla určena tolerantnost pro replikaci a vytváření plaků parentálních kmenů YF a JE. Tabulka 1 ilustruje obvyklé výsledky transfekčních experimentů za použití Lipofectinu (GIBCO/BRL) jako transfekčního nosiče. Vero buněčné linie byly také běžně použity pro přípravu infekčních virových zásobních roztoků, charakterizaci značených proteinů a neutralizační testy.

Nukleotidové sekvenování chimérických cDNA templátů – plazmidy obsahující chimérickou YF/JE cDNA byly podrobeny sekvenční analýze části JE klonů, aby byla identifikována správné sekvence SA₁₄-14-2 a Nakayama obálkového proteinu. Odlišnosti nukleotidových sekvencí mezi těmito konstrukty v porovnání s publikovanými sekvencemi (McAda *et al.*, výše) jsou ukázány v tabulce 2.

Strukturní a biologická charakterizace chimérických YF/JE virů – genomová struktura chimérických YF/JE virů získaných z transfekčních experimentů byla ověřena analýzou založenou na RT/PCR virální RNA izolované z monovrstevných infikovaných buněk. Tyto experimenty byly provedeny tak, aby byla eliminována možnost, že virové zásobní roztoky budou kontaminovány během transfekčních procedur. Při těchto experimentech byl použit prvoprůchozí virus, který zahájil infekční cyklus, aby byla eliminována tvorba jakýchkoliv artefaktů přítomností reziduální transfectované virální RNA. Celkové RNA extrakty z buněk infikovaných buď YF/JE (prM-E)-SA₁₄-14-2 nebo YF/JE (prM-E)-Nakayama chimérami byly podrobeny RT/PCR za použití YF a JE-specifických primerů, které umožnily vytvoření celé strukturní oblasti, jako dva PCR produkty o přibližné velikosti 1 kilobáze. Tyto produkty byly poté analyzovány štěpením restrikčními enzymy za použití předpověděných restrikčních míst uvnitř sekvencí JE SA₁₄-14-2 a Nakayama, které umožňují diferenciaci těchto virů. Použitím tohoto přístupu byla virální RNA určena, že je chimérickou a u vytvořených virů byla ověřena přítomnost vhodných restrikčních míst. Aktuální vazba C-prM byla pak ověřena, že je intaktní na úrovni sekvence cyklickou sekvenční analýzou před chimérické spojení YF/JE C-prM.

Přítomnost JE obálkového proteinu ve dvou chimérách byla ověřena imunoprecipitací obou za použití JE-specifického antiséra a plakovým redukčním neutralizačním testem za použití YF a JE-specifického antiséra. Imunoprecipitace extraktů z infikovaných LLC-MK₂ buněk, které byly označeny ³⁵S, s chimérami za použití monoklonální protilátky k JE E proteinu ukázala, že JE obálkový protein by mohl být vytvořen 55 kD proteinem, kde stejné antisérum selhává při imunoprecipitaci proteinu z YF-infikovaných buněk. Obě JE a YF hyperimunní séra vykazovala křížovou reaktivitu ke dvěma obálkovým proteinům, ale rozdílnost ve velikosti mezi proteiny (YF = 53 kD, neglykosylovaný; JE = 55 kD, glykosylovaný) mohla být reprodukovatelně pozorována. Použití YF monoklonálních protilátek nebylo za uspokojivých imunoprecipitačních podmínek, tudíž specifita této analýzy byla závislá na JE monoklonálních protilátkách. Plakový redukční neutralizační test (PRNT) byl proveden na chimérických virech a na YF a JE SA₁₄-14-2 virech za použití YF a JE-specifických hyperimunních ascitických kapalin (ATCC) a YF-specifických purifikovaných IgG (monoklonální protilátka 2E10). Významné odlišnosti v 50% plakovém redukčním titru těchto antisér byly pozorovány pro chiméry, když byly porovnány s kont-

rolními viry použitými v těchto experimentech (tabulka 3). Tedy epitopy nezbytné pro neutralizaci jsou exprimovány v infekčních chimérických YF/JE virech.

Růstové vlastnosti v buněčné kultuře – růstová kapacita chimér byla zkoušena kvantitativně v buněčných liniích, obě v liniích původem pocházejících od primátů a komárů. Obrázek 2 ilustruje kumulativní růstové křivky chimér v LLC-MK₂ buňkách po nízké mnohonásobné infekci (0,5 plak tvořících jednotek/buňku). V tomto experimentu byly použity viry YF5.2iv (klonovaný derivát) a JE SA₁₄-14-2 (neklonovaný) pro srovnání. Oba chimérické viry dosáhly maximálního virového výtěžku přibližně o řád vyššího než parentální virus. V případě YF/JE SA₁₄-14-2 chiméry se pík virové produkce objevilo 12 hodin později než v případě YF/JE Nakayama chiméry (50 hodin proti 38 hodinám). YF/JE Nakayama chiméra vykazala významně vyšší cytopatické vlivy než YF/JE SA₁₄-14-2 chiméra na této buněčné linii. Podobný experiment byl proveden v C6/36 buňkách po nízké mnohonásobné infekci (0,5 plak tvořících jednotek/buňku). Obrázek 2 také ilustruje růstovou kinetiku virů v této intervertebrální buněčné linii. Podobné virové výtěžky byly získány ve všech bodech použitých pro izolování viru v tomto experimentu, dále prokazující představu, že chimérických virů není poškozena replikační účinnost.

Porovnání růstové kinetiky RMS (YF/JE SA₁₄-14-2) s YF 17D vakcínou v MRC-5 buňkách experiment byl proveden, aby byla určena schopnost vakcinového kandidáta rozmnožit se v buněčné linii akceptovatelně pro lidskou vakcínu. Komerční vakcína žluté horečky 17D (YF-Vax[®]) byla získána z Connaught Laboratories, Swiftwater, PA. MRC 5 (diploidní lidské embryonální plicní buňky) byly zakoupeny od ATCC (171-CCL, vsádka#: F 14308, pasáž 18) a rostly v EMEM, 2 mM L-Gln, Earle's BSS, které bylo upraveno tak, aby obsahovalo 1,5 g/l uhličitanu sodného, 0,1 mM neesenciálních aminokyselin a 10% FBS.

Aby mohla být porovnána růstová kinetika RMS (Research Master Seed, YF/JE SA₁₄-14-2) s YF-Vax[®], rostly buňky do 90% splývání a infikovány byly s RMS nebo YF-Vax[®] při MOI okolo 0,1 pfu. Protože MRC-5 buňky obvykle rostou pomalu, byly tyto buňky inkubovány po dobu 10 dnů po inokulaci. Vzorky byly zmrazovány každodenně po dobu 7 až 10 dnů a infektitivita byla určena testem plaků ve Vero buňkách.

YF-Vax[®] a YF/JE chiméry rostly do slušných titrů v MRC-5 buňkách (obrázek 3). Pík titru byl ~4,7 log₁₀ pfu pro YF-Vax[®] dosažený druhý den a byl nepatrně nižší než 4,5 log₁₀ pfu pro RMS po 6 dnech.

Testování neurovirulence v normálních dospělých myších – virulenční vlastnosti YF/JE SA₁₄-14-2 chiméra byly analyzovány v mladých dospělých myších intracerebrální inokulací. Skupiny po 10 myších (4 týdny starí samci a samice ICR myši, každých 5 na jednu skupinu) byly inokulovány 10 000 plak tvořícími jednotkami YF/JE SA₁₄-14-2 chiméry, YF5.2iv nebo JE SA₁₄-14-2 a pozorovány každý den po dobu 3 týdnů. Výsledky těchto experimentů jsou zobrazeny na obrázku 4. Myši přijímaly parentální YF5.2iv odevzdané přibližně jeden týden po inokulaci. Žádná mortalita nebo onemocnění nebyly pozorovány mezi myši přijímajícími buď JE SA₁₄-14-2 parentální virus, nebo chiméru. Inokula, která byla použita pro experimenty, byla titrována v době injekce a podskupina myši, které přežily, byla testována na přítomnost neutralizačních protilátek, aby se potvrdilo, že došlo k infekci. Mezi těmito testovanými myši byly titry proti viru JE SA₁₄-14-2 podobné pro zvířata, která přijala buď tento kmen, nebo chiméru.

Výsledky dalších experimentů zjišťujících neurovirulenci YF/JE SA₁₄-14-2 chiméry v myších jsou zobrazeny v tabulce 4. V těchto experimentech všechny myši inokulované YF5.2iv zemřely v rozmezí 7 až 8 dnů. Naopak žádná myš inokulovaná YF/JE SA₁₄-14-2 nezemřela během dvou týdnů postinokulačního pozorování.

Výsledky experimentů, které určovaly neuroinvasivitu a patogenezi YF/JE chimér jsou zobrazeny v tabulce 5. V těchto experimentech byly chimérické viry inokulovány do 3 týdny starých myši v dávkách pohybujících se v rozmezí mezi 10 000 a 1 milionem plak tvořících jednotek přes

intraperitoneální cestu. Žádná z myši inokulovaných buď YF/JE Nakayama, nebo YF/JE SA₁₄-14-2 nezemřela během tří týdnů postinokulačního pozorování, což naznačuje, že virus byl neschopný způsobit onemocnění po periferní inokulaci. Myši inokulované YF/JE SA₁₄-14-2 virem vyvinuly neutralizující protilátky proti JE viru (obrázek 7).

Konstrukce cDNA templátů pro vytvoření žlutá horečka/dengue (YF/DEN) chimérických virů odvození chimérických žlutá horečka/dengue (YF/DEN) virů je popsáno v následujícím textu, a které je v principu prováděno stejně, jako konstrukce YF/JE chiméry, jak je popsáno výše. Další flavivirové chiméry mohou být vytvořeny podobnou strategií za použití přirozených nebo vytvořených restrikčních míst a například oligonukleotidových primerů, jak je ukázáno v tabulce 6.

Konstrukce YF/DEN chimérického viru – ačkoliv bylo vyvinuto několik molekulárních klonů dengue virů, byly zjištěny problémy se stabilitou virálních cDNA plazmidových systémů a s účinností replikace vytvořených virů. Pro použití byl vybrán klon DEN-2 vyvinutý Dr. Peterem Wrightem, Dept. of Microbiology, Monash University, Clayton, Austrálie, protože tento systém je relativně účinný pro regeneraci viru a tvoří dvou-plazmidový systém, který je podobný naší vlastní metodologii. Kompletní sekvence tohoto DEN-2 klonu je přístupná a usnadňuje konstrukci chimérických YF/DEN templátů, protože pouze několik modifikací YF klonu bylo nezbytných. Významné kroky jsou naznačeny v následujícím textu.

Podobně jako dvou-plazmidový systém pro YF5.2iv a YF/JE viry používá YF/DEN systém unikátní restrikční místo uvnitř DEN-2 obálkového proteinu (E), jako zlomové místo pro rozšíření strukturní oblasti (prM-E) uvnitř dvou plazmidů, tímto způsobem odvolávající se jako YF5'3'IV/DEN (prM-E') a YFM5.2/DEN (E'-E) (obrázek 5). Dvě restrikční místa pro *in vitro* ligaci chimérického templátu jsou *Aat* II a *Sph* I. Recipientní plazmid pro 3' koncovou část DEN E proteinové sekvence je YFM5.2(*Nar* I[+]*Sph* I[-]). Tento plazmid obsahuje *Nar* I restrikční místo v E/NS1 spojení, které bylo použito pro začlenění karboxylového konce JE E proteinu. Dále bylo modifikováno eliminací *Sph* I restrikčního místa, které bylo navíc, v oblasti NS5 proteinu tichou v tomto místě řízenou mutagenezí. To dovolilo začlenění DEN-2 sekvence z unikátní *Sph* I místa do *Nar* I místa jednoduchým přímým klonováním. Vhodný fragment DEN-2 cDNA byl získán pomocí PCR z DEN-2 klonu MON310, který byl poskytnut Dr. Wrightem. PCR primery zahrnovaly 5' koncový primer ohraničující *Sph* I restrikční místo a 3' koncový primer homologní k DEN-2 nukleotidům okamžitě upstream od signalázového místa v E/NS1 spojení a nahrazující signalázové místo substitucí, takže vytváří nové místo, ale zároveň zavádí *Nar* I restrikční místo. Výsledný 1 170 párů bází dlouhý PCR fragment byl poté zaveden do YFM5.2(*Nar* I[+]*Sph* I[-]).

5' koncová část DEN-2 klonu zahrnující prM a aminokoncová část E proteinu byla vytvořena a zavedena do YF5'3'IV plazmidu za použití chimérického PCR primeru. Chimérický primer zahrnující 3' konec negativního vlákna YF C proteinu a 5' konec DEN-2 prM proteinu byl použit s primerem pozitivního vlákna, který ohraničuje SP6 promotor YF5'3'IV plazmidu, tak, aby došlo k vytvoření 771 párů bází velký PCR produkt s 20 bázevým prodloužením představujícím DEN-2 prM sekvencí. Tento PCR produkt byl pak použit pro přípravu DEN-2 plazmidu pro konjugaci s 3' koncovým primerem, který představuje DEN-2 sekvenci 1501 až 1522 a ohraničuje *Sph* I, aby došlo k vytvoření 1 800 párů bází velkého konečného PCR produktu, který zahrnuje YF sekvenci od *Not* I restrikčního místa přes SP6 promotor, YF5' netranslatovatelnou oblast a YF C protein sousedící s DEN-2 prM E1522 sekvencí. PCR produkt byl ligován do YF5'3'IV za použití *Not* I a *Sph* I restrikčních míst, aby výsledkem ligace byl YF5'3'IV/DEN(prM-E) plazmid.

Konstrukce chimérických templátů dalších flavivirů – procedury pro vytváření celodélkových cDNA templátů kódujících chimérické YF/MVE, YF/SLE, YF/WN, YF/TBE viry jsou podobné těm, které byly popsány výše pro YF/DEN-2 systém. Tabulka 6 zobrazuje rysy strategie pro vytváření chimérických virů na základě YF17D. Unikátní restrikční místa použitá pro *in vitro*

ligaci a chimérické primery pro vytváření C/prM a E/NS1 spojení jsou také dobře známy. Zdroje cDNA pro tyto heterologní flaviviry jsou lehce přístupné (MVE: Dalgarno *et al.*, J. Mol. Biol. 187:309 až 323, 1986; SLE: Trent *et al.*, Virology 156:293 až 304, 1987; TBE: Mandl *et al.*, Virology 166:197 až 205, 1988; Dengue 1: Mason *et al.*, Virology 161:262 až 267, 1987; Dengue 2: Deubel *et al.*, Virology 155:365 až 377, 1986; Dengue 3: Hahn *et al.*, Virology 162:167 až 180, 1988; Dengue 4: Zhao *et al.*, Virology 155:77 až 88, 1986).

Alternativní přístup k vytváření dalších chimérických virů je vytvořit C/prM spojení ligací tupých konců restrikčních fragmentů, které bylo připraveny PCR, a které mají konce, které se setkávají v tomto spojení a 5' a 3' konce, které ohraničují vhodná restrikční místa pro zavedení do YF5'3'IV nebo do intermediátového plazmidu takového, jako je pBS-KS(+). Volba použití chimérické oligonukleotidy nebo ligací tupých konců může být různá, závisí na vhodnosti unikátních restrikčních míst uvnitř obálkového proteinu kódujícího oblast uvažovaného viru. Konstrukce virů kódujících HCV antigeny – protože strukturní proteiny E1 a E2 HCV nejsou homologní k strukturním proteinům flavivirů, které byly popsány výše, strategie pro expresi těchto proteinů obsahuje inzerci uvnitř vedlejší oblasti genomu, takže všechny tyto proteiny jsou pak spoluexprimovány s proteiny žluté horečky během replikaci viru v infikovaných buňkách. Oblast vybraná pro inzerci proteinů je N koncové části NS1 proteinu, protože celý NS1 protein není nezbytný pro virální replikaci. Z důvodu potenciálních problémů se stabilitou YF genomu v přítomnosti heterologní sekvence převyšující normální velikost genomu (přibližně 10 000 nukleotidů), může být použita detekční strategie popsaná níže. Kromě toho delece v NS1 může být výhodná v chimérickém YF/Flavivirus systému popsaném výše, protože částečná delece tohoto proteinu může odstranit imunitu k YF asociovanému s protilátkami proti NS1 a tedy vyhnout se problémům s vektorovou imunitou, jestliže více než jedna chimérická vakcína byla nezbytně podána recipientovi nebo jestliže YF vakcína byla dříve podána nebo by byla potřeba v budoucnosti.

Strategie zahrnuje vytvoření série delecí v rámci uvnitř NS1 kódující oblasti YFM5.2 plazmidu v konjugaci s vytvořením translačního terminačního kodonu na konci E a sérii dvou IRES (vnitřní ribozomální vstupní místo). Jedno IRES je ihned downstream od terminačního kodonu a dovoluje expresi z otevřeného čtecího rámce uvnitř oblasti mezi E a NS1. Druhé IRES iniciuje translaci z okleštěných NS1 proteinů, zajišťující expresi zbytku YF nestrukturních polyproteinů. Tyto deriváty byly testovány na schopnost vytvořit infekční virus a konstrukt s největší delecí byl použit pro inzerci cizorodých sekvencí (např.: HCV proteiny) v oblasti prvního IRES. Tento jednotlivý konstrukt může také sloužit jako základ pro určování zda bude delece v NS1 působit vektorovou specifickou imunitu v kontextu YF/Flavivirus chimérických virů exprimujících prM-E; jak bylo popsáno výše.

Inzerce nukleotidů kódujících E1, E2 a/nebo E1 plus E2 HCV proteiny je limitována velikostí tolerované delecí v NS1 proteinu. Z toho důvodu okleštěné HCV proteiny mohou být použity k zesílení stability uvnitř modifikovaného YF klonu. HCV proteiny jsou vytvářeny s N koncovou signální sekvencí ihned následovanou IRES a s terminačním kodonem na C konci. Tato konstrukce bude řídit HCV proteiny směrem do endoplasmatického retikula z důvodu sekrece ven z buněk. Strategie této konstrukce je schématicky ukázána na obrázku 6. Plazmid kódující HCV proteiny genotypu I může být použit pro tyto konstrukce, například HCV plazmidy získané od Dr. Charlese Riccho z Washington University (Grakoui *et al.*, J. Virology 67:1385 až 1395, 1993), který expimoval tuto virovou oblast v upravených systémech a uvnitř replikačně-komplementárních celodélkových HCV klonů.

prM štěpené delecí mutanty jako kandidáti oslabené vakcíny pro flaviviry – další chimérické viry zahrnuté v předkládaném vynálezu obsahují mutace, které zabraňují štěpení prM takové, jako mutace v prM štěpicím místě. Například prM štěpicí místa ve flavivirových infekčních kloněch, které jsou předmětem zájmu takové, jako jsou dengue, TBE, SLE a další mohou být mutována místní přímou mutagenezí. Jakákoliv nebo všechny aminokyseliny v štěpicím místě, tak jako výše popsané, mohou být deletovány nebo substituovány. Fragment nukleové kyseliny obsahující mutované prM-E geny může být pak vnesen do vektoru viru žluté horečky metodami,

5 které byly popsány výše. prM delece může být použita s nebo bez ostatních zeslabujících mutací, například mutací v E proteinu, aby byla pak vnesena do viru žluté horečky. Tyto mutanty mají výhody oproti jednou substituovaným mutantům coby kandidátům na vakcínu, protože je téměř nemožné vrátit zpět deletovanou sekvenci a obnovit tak virulenci.

5

Následující chimérické flaviviry podle předkládaného vynálezu byly umístěny do American Type Culture Collection (ATCC) v Rockville, Maryland, U.S.A v souladu s Budapešťskou smlouvou a bylo jim uděleno datum umístění 6. ledna 1998: chimérický žlutá horečka 17D/dengue typ 2 virus (YF/DEN-2; ATCC přístupové číslo ATCC VR-2593) a chimérický žlutá horečka
10 17D/japonská encefalitida SA₁₄-14-2 virus (YF/JE A1.3; ATCC přístupové číslo ATCC VR-2594).

15

Tabulka 1 charakterizace YF/JE chimér

klon	výtěžek (μg)	infektivita	PBS	RNAse	DNAse
		plaky/100 ng	log titr	log titr	log titr
		LLC-MK ₂	VERO	VERO	VERO
YF5.21 v	5,5	15	7,2	0	7
YF/JE-S	7,6	50	6,2	0	6,2
YF/JE-A	7	60	5	0	5,4

20

Tabulka 2 – porovnání sekvencí JE kmenů a YF/JE chimér

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

Tabulka 3 – plakové redukční neutralizační titry na YF/JE chimérách

virus	neimunní ascitická kapalina	YF ascitická kapalina	JE ascitická kapalina	neimunní IgG	YF IgG
YF5.2iv	<1,3	3,7	<1,3	<2,2	>4,3
JE SA ₁₄ - 14-2	<1,3	<1,3	3,4	<2,2	<2,2
YF/JE SA ₁₄ - 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

5

Tabulka 4 – neurovirulence YF/JE SA₁₄-14-2 chiméry, 3 týdny staré samčí ICR myši

	log dávky I.C.	% úmrtnosti
YF5.2iv	4	100 (7/7)
YF/JE SA ₁₄ -14-2	4	0 (0/7)
YF/JE SA ₁₄ -14-2	5	0 (0/7)
YF/JE SA ₁₄ -14-2	6	0 (0/8)

10

Tabulka 5 – neuroinvasivnost YF/JE chimér, 3 týdny staré samčí ICR myši

	log dávky (intraperitoneální)	% úmrtnosti
YF/JE Nakayama	4	0 (0/5)
YF/JE Nakayama	5	0 (0/4)
YF/JE Nakayama	6	0 (0/4)
YF/JE SA ₁₄ -14-2	4	0 (0/5)
YF/JE SA ₁₄ -14-2	5	0 (0/4)
YF/JE SA ₁₄ -14-2	6	0 (0/4)

15

Tabulka 6 – vytvoření Y/Flavivirus chimér

virus	chimerické C/prM spojení ¹	chimerické E/NS1 spojení ²	5' ligace	3' ligace	místa ⁵ elimino- váno nebo (změněno)
YF/WN	X-cactgggagagcttgaagtc (SEQ ID NO: 1)	aaagccagttgcagccggtttaa (SEQ ID NO: 2)	<i>Aat</i> II	<i>Nsi</i> I	
YF/DEN-1	X-aaggtagactggtgggtccc (SEQ ID NO: 3)	gactctcagtagccaaaccggtttaa (SEQ ID NO: 4)	<i>Aat</i> II	<i>Sph</i> I	<i>Sph</i> I v DEN
YF/DEN-2	X-aaggtagattggtgtcattg (SEQ ID NO: 5)	aaccctcagtagccaccggtttaa (SEQ ID NO: 6)	<i>Aat</i> II	<i>Sph</i> I	
YF/DEN-3	X-aaggtgaattgaagtctcta (SEQ ID NO: 7)	accccccagcaccaccggtttaa (SEQ ID NO: 8)	<i>Aat</i> II	<i>Sph</i> I	<i>Xho</i> I v DEN (<i>Sph</i> I v DEN)
YF/DEN-4	X-aaaaggaacagttgttcta (SEQ ID NO: 9)	acccgaagtgtcaaccggtttaa (SEQ ID NO: 10)	<i>Aat</i> II	<i>Nsi</i> I	
YF/SLE	X-aacgtgaatagttgtagtc (SEQ ID NO: 11)	accgttgtgtcaccggtttaa (SEQ ID NO: 12)	<i>Aat</i> I	<i>Sph</i> I	<i>Aat</i> I v SLE
YF/MVE	X-aattcgaaagtggaagtc (SEQ ID NO: 13)	gaccggtgtttacagccggtttaa (SEQ ID NO: 14)	<i>Aat</i> II	<i>Age</i> I	(<i>Age</i> I v YF)
YF/TBE	X-tactgcgaacgacgtgccac (SEQ ID NO: 15)	actgggaacctcaccggtttaa (SEQ ID NO: 16)	<i>Aat</i> II	<i>Age</i> I	(<i>Age</i> I v YF)

^{1,2}: sloupec znázorňuje oligonukleotidy použité pro vytvoření chimérických YF/Flavivirus primerů, které odpovídají C/prM nebo E/NS1 spojení. (v textu). X = karboxylový konec kódující sekvence YF kapsidy. Podtržená oblast odpovídá cílené heterologní sekvenci ihned upstream od *Nar* I restrikčního místa (opačná sekvence – ccgccc). Toto místo dovoluje začlenění PCR produktů do YFM5.2 (*Nar* I) plazmidu, který je nezbytný pro vytvoření celodélkových cDNA templátů. Další nukleotidy jsou specifické pro heterologní virus. Oligonukleotidové primery jsou zapsány v orientaci od 5' konce k 3' konci.

^{3,4}: Unikátní restrikční místa použitá pro vytvoření restrikčních fragmentů, které mohou být izolovány a ligovány *in vitro*, aby mohlo dojít k produkci celodélkových chimérických cDNA templátů jsou zde zapsána. Protože některé sekvence neobsahují vhodná místa, je v některých případech nezbytné vhodná místa vytvořit (poznámka 5).

⁵: V závorkách jsou místa pro restrikční enzymy, která musí být vytvořena buď v YF páteři nebo v heterologním virus, aby umožnila účinnou *in vitro* ligaci. Restrikční místa, která nejsou v závorkách musí být eliminována. Všechny tyto modifikace jsou prováděny tichou mutagenezí cDNA pro určitý klon. Prázdná místa označují, že nebyly potřeba žádné modifikace.

Ostatní části jsou uvedeny v následujících patentových nárocích. Například geny prM–E proteinu dalších flavivirů, které jsou důležité z medicínského hlediska, mohou být vneseny do vakcíny s páteří viru žluté horečky, aby mohlo dojít k produkci vakcín proti dalším medicínsky zajíma-

vým flavivirům (Monath *et al.*, „Flaviviruses“, ve Virology, Fields (ed.), Raven Lippincott, New York, 1995, Volume I, 961–1 034).

5 Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 je schématickým představením kroků genetické manipulace, které byly provedeny, aby byl zkonstruován chimérický virus podle předkládaného vynálezu virus žluté horečky/virus japonské encefalitidy (YF/JE).

10

Obrázek 2 zobrazuje sadu růstových křivek pro chimérické viry YF/JE podle předkládaného vynálezu v buněčné kultuře akceptovatelné pro přípravu lidské vakcíny.

15

Na obrázku 3 je graf ukazující porovnání růstu mezi RMS (Research Master Seed, YF/JE SA₁₄-14-2) a YF-Vax v MRC-5 buňkách.

Na obrázku 4 je ukázána struktura templátu pro regenerování chimérických YF (C)/JE (prM-R) virů.

20

Na obrázku 5 jsou schématicky uvedeny dva plazmidové systémy, které jsou nutné pro vytvoření chimérického YF/DEN-2 viru. Strategie je hlavně popsána pro YF/JE chimérický virus.

25

Na obrázku 6 je schématicky zobrazena struktura modifikovaných YF klonů vytvořených, aby byly deletovány části NS1 proteinu a/nebo exprimovány cizí proteiny pod kontrolou vnitřního ribozomálního vstupního místa (IRES). Obrázek ukazuje pouze E/NS1 oblast virálního genomu. Translační stop kodon je zaveden na karboxylový konec obálkového (E) proteinu. Downstream translace je zahajována uvnitř intergenového otevřeného čtecího rámce (ORF) pomocí IRES-1, což je cizí protein, který řídí expresi (např.: HCV proteiny E1 a/nebo E2). Druhý protein IRES (IRES-2) kontroluje iniciaci translace YF nestrukturní oblasti, v které jsou nahromaděné a ohraničené NS1 proteiny (např.: NS1del-1, NS1del-2 nebo NS1del-3) exprimovány. Rozměr NS1 delece je inverzně úměrný tomu, jak se IRES 1 připojuje na ORF.

30

Na obrázku 7 je graf, který ukazuje neutralizační odpověď protilátky u myši, které byly imunizovány YF/JE SA₁₄-14-2 chimérickou vakcínou.

35

Příklady provedení vynálezu

40

Příklady dalších flavivirů, z jejichž vynášených genů mohou být získány chimérické vektory podle předkládaného vynálezu, zahrnují např.: Kunjin virus, středoevropský encefalitický virus, ruský jaro–letní encefalitický virus, Powassan virus, Kyasanur Forest Disease virus a virus omské hemoragické horečky. Kromě toho mohou být vnášeny do vakcíny viru žluté horečky dokonce geny z mnohem vzdáleněji příbuzných virů za účelem vytvoření nových vakcín.

45

Výroba vakcíny a její použití - vakcíny podle předkládaného vynálezu jsou podávány v množstvích a za použití způsobů, které mohou být ihned určeny osobou, která má zkušenosti se stavem techniky. Vakcíny mohou být podávány vytvářeny například stejným způsobem, jako vakcína žluté horečky 17D např.: jako vyčištěná suspenze tkáně infikovaného kuřecího embrya nebo kapalina získaná z buněčných kultur infikovaných chimérickým virem žluté horečky. Tudiž živý, oslabený chimérický virus je vytvořen jako sterilní vodný roztok, který obsahuje mezi 100 a 1 000 000 infekčních jednotek (např.: plak tvořících jednotek nebo infekčních dávek tkáňové kultury) v dávce o objemu od 0,1 do 1,0 ml, aby byl podáván například intramuskulárně, podkožní nebo intradermální cestou. Navíc, protože flaviviry mohou být schopné infikovat lidského hostitele přes sliznice taková, jako je orální cesta (Gresikova *et al.*, „Tick-borne Encephalitis“, v The Arboviruses, Ecology and Epidemiology, Monath (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida,

55

1988, Volume IV, 177 až 203), může být virová vakcína podávána přes sliznice, aby bylo dosaženo ochranné imunitní odpovědi. Vakcína může být podávána jako primární profylaktické činidlo dospělým nebo dětem v případě nebezpečí flavivirové infekce. Vakcíny mohou také být použity jako sekundární činidla pro léčbu pacientů, kteří byly infikováni flaviviry, aby stimulovaly imunitní odpověď proti flavivirům.

Může být žádoucí použít vakcíny vektorového systému žluté horečky pro imunizaci hostitele proti jednomu viru (například proti viru japonské encefalitidy) a později přeočkovat stejného jedince proti druhému nebo třetímu viru za použití odlišného chimérického konstruktů. Hlavní výhodou chimérického systému žluté horečky je, že vektor nebude sám vyvolávat silnou imunitní odpověď. Ani nebude dřívější imunita proti viru žluté horečky znemožňovat použití chimérické vakcíny, jako vektoru pro heterologní genovou expresi. Tyto výhody jsou z důvodu odstranění části E genu vakcíny žluté horečky, která kóduje neutralizující (ochranné) antigeny žluté horečky, a zaměnění za jiné heterologní geny, které neumožňují křížové ochranu proti žluté horečce. Ačkoliv nestrukturní proteiny viru YF17D mohou hrát roli v ochraně například vyvoláváním tvorby protilátek proti NS1, které jsou obsaženy v komplementárně dependentní protilátce zprostředkovávající lyzi infikovaných buněk (Schlesinger *et al.*, J. Immunology 135:2 805–2 809), nebo zahrnutím cytotoxické odpovědi T buněk na NS3 nebo jiné virální proteiny, je nepravděpodobné, že tyto odpovědi budou rušit schopnost živé virové vakcíny stimulovat neutralizační protilátky. Toto je podpořeno fakty, že (1) jedinci, kteří byly dříve infikováni JE virem, odpovídali na vakcinaci YF17D podobně, jako osoby, které nebyly dříve JE virem infikovány, a (2) jedinci, kteří dříve obdrželi YF17D vakcínu odpovídali na přeočkování vzrůstajícími titry neutralizačních protilátek (Sweet *et al.*, AM. J. Trop. Med. Hyg. 11:562–569, 1962). Tudíž chimérický vektor může být použit v populacích, které jsou imunní vůči žluté horečce bez ohledu na předchozí přirozenou infekci nebo vakcinaci, a může být použit opakovaně nebo pro simultánní imunizaci nebo následnou imunizaci řadou odlišných konstruktů, které zahrnují chiméry žluté horečky s inzerty z například japonské encefalitidy, St. Louis encefalitického viru nebo Západonilského viru.

Pro vakcinační aplikace mohou být použity pomocné látky, které jsou známy těm, kteří se zajímají o stav techniky. Pomocné látky, které mohou být použity, aby zesílily imunogenicitu chimérických vakcín, zahrnují například lipozomální formulace, syntetické pomocné látky takové, jako jsou saponiny (např.: QS21), muramyl dipeptid, monofosforyl lipid A nebo polyfosfazin. Ačkoliv tyto pomocné látky jsou obvykle používány pro zesílení imunitních odpovědí u inaktivovaných vakcín, mohou být také použity v případě živých vakcín. V případě chimérické vakcíny dopravované přes sliznice, například orálně, jsou použitelné pomocné látky takové, jako je tepelně-labilní toxin z *E. coli* (LT) nebo mutantní deriváty LT. Kromě toho geny kódující cytokiny, které mají aktivitu pomocných látek, mohou být vneseny do vektorů žluté horečky. Tudíž geny kódující cytokiny takové, jako jsou GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-13 nebo IL-5, mohou být vneseny společně s heterologními flavivirovými geny, aby docházelo k produkci vakcíny, která ve výsledku zesiluje imunitní odpověď nebo zmírňuje imunitu zaměřenou více specificky směrem k buněčným, humorálním nebo sliznicovým odpovědím. Kromě toho jako aplikace vakcíny tak, jak jim bude ten, kdo zná stav techniky ihned rozumět, mohou být vektory podle předkládaného vynálezu použity v metodách genové terapie, aby byly zavedeny do buněk pacienta produkty terapeutických genů. V těchto metodách jsou geny kódující terapeutické genové produkty zavedeny do vektorů, například v místě genu kódujícího prM-E protein.

Další výhodou vektorového systému žluté horečky je, že se flaviviry replikují v cytoplazmě buněk, takže virová replikační strategie nezahrnuje integraci virového genomu do genomu hostitelských buněk (Chambers *et al.* (1990) „Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication“, v Annual Review of Microbiology 44:649–688), což zajišťuje důležitou míru bezpečnosti.

Všechny odkazy zde citované jsou začleněny jako reference v jejich úplnosti.

Seznam sekvencí

- (1) obecné informace
- 5 (i) přihlašovatel: OraVax, Inc., et al.
(ii) název vynálezu: CHIMERIC FLAVIVIRUS VACCINES
(iii) počet sekvencí: 16
(iv) korespondenční adresa:
- 10 (a) adresa: Clark & Elbing LLP
(b) ulice: 176 Federal Street
(c) město: Boston
(d) stát: MA
- 15 (e) země: USA
(f) směrovací číslo: 02110
- (v) forma čitelná počítačem:
- 20 (a) typ média: disketa
(b) počítač: kompatibilní s IBM
(c) operační systém: DOS
(d) software: FastSEQ pro Windows verze 2.0
- 25 (vi) v současnosti přihlašovaná data:
- (a) aplikační číslo:
(b) datum vyplnění: 2. březen 1998
(c) klasifikace:
- 30 (vii) dříve přihlášená data:
- (a) aplikační číslo: 08/807,445
(b) datum vyplnění: 28. únor 1997
- 35 (viii) dříve přihlášená data:
- (a) aplikační číslo: neznámé
(b) datum vyplnění: 15. leden 1998
- 40 (ix) právní zástupce/agent informace:
- (a) jméno: Clark, Paul T
(b) registrační číslo: 30, 162
- 45 (c) odkaz/soudní číslo: 06132/033W02

(x) telekomunikační informace:

- (a) telefon: 617-428-0200
 5 (b) telefax: 617-428-7045
 (c) telex:

(2) informace o SEQ ID NO: 1:

10 (i) charakteristika sekvence:

- (a) délka: 21 párů bází
 (b) typ: nukleová kyselina
 (c) řetězec: jednoduchý
 15 (d) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

20 CACTGGGAGA GCTTGAAGGT C

(2) informace o SEQ ID NO: 2:

25 (i) charakteristika sekvence:

- (a) délka: 25 párů bází
 (b) typ: nukleová kyselina
 (c) řetězec: jednoduchý
 30 (d) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

35 AAAGCCAGTT GCAGCCGCGG TTAA

(2) informace o SEQ ID NO: 3:

40 (i) charakteristika sekvence:

- (a) délka: 21 párů bází
 (b) typ: nukleová kyselina
 (c) řetězec: jednoduchý
 45 (d) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

50 AAGGT AGACT GGTGGGCTCC C

(2) informace o SEQ ID NO: 4:

(i) charakteristika sekvence:

- 5 (a) délka: 26 párů bází
 (b) typ: nukleová kyselina
 (c) řetězec: jednoduchý
 (d) topologie: lineární

10 (ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

GATCCTCAGT ACCAACCGCG GTTTAA

15

(2) informace o SEQ ID NO: 5:

(i) charakteristika sekvence:

- 20 (a) délka: 21 párů bází
 (b) typ: nukleová kyselina
 (c) řetězec: jednoduchý
 (d) topologie: lineární

25 (ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

AAGGTAGATT GGTGTGCATT G

30

(2) informace o SEQ ID NO: 6:

(i) charakteristika sekvence:

- 35 (a) délka: 26 párů bází
 (b) typ: nukleová kyselina
 (c) řetězec: jednoduchý
 (d) topologie: lineární

40 (ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

AACCCTCAGT ACCACCCGCG GTTTAA

45

(2) informace o SEQ ID NO: 7:

(i) charakteristika sekvence:

- 50 (a) délka: 21 párů bází
 (b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

5

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

AAGGTGAATT GAAGTGCTCT A

10

(2) informace o SEQ ID NO: 8:

(i) charakteristika sekvence:

(a) délka: 25 párů bází

15

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

20

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

ACCCCCAGCA CCACCCGCGG TTAA

25

(2) informace o SEQ ID NO: 9:

(i) charakteristika sekvence:

(a) délka: 21 párů bází

30

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

35

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

AAAAGGAACA GTTGTCTCT A

40

(2) informace o SEQ ID NO: 10:

(i) charakteristika sekvence:

(a) délka: 25 párů bází

45

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

50

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

ACCCGAAGTG TCAACCGCGG TTAA

5

(2) informace o SEQ ID NO: 11:

(i) charakteristika sekvence:

10

(a) délka: 21 párů bází

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

15

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

AACGTGAATA GTTGGATAGT C

20

(2) informace o SEQ ID NO: 12:

(i) charakteristika sekvence:

25

(a) délka: 25 párů bází

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

30

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

ACCGTTGGTC GCACCGCGG TTAA

35

(2) informace o SEQ ID NO: 13:

(i) charakteristika sekvence:

40

(a) délka: 21 párů bází

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

45

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

AATTTCGAAA GGTGGAAGGT C

50

(2) informace o SEQ ID NO: 14:

(i) charakteristika sekvence:

5

(a) délka: 26 párů bází

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

10

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

15 GACCGGTGTT TACAGCCGCG GTTTAA

(2) informace o SEQ ID NO: 15:

(i) charakteristika sekvence:

20

(a) délka: 21 párů bází

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

25

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 15:

30 TACTGCGAAC GACGTTGCCA C

(2) informace o SEQ ID NO: 16:

(i) charakteristika sekvence:

35

(a) délka: 25 párů bází

(b) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jednoduchý

(d) topologie: lineární

40

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 16:

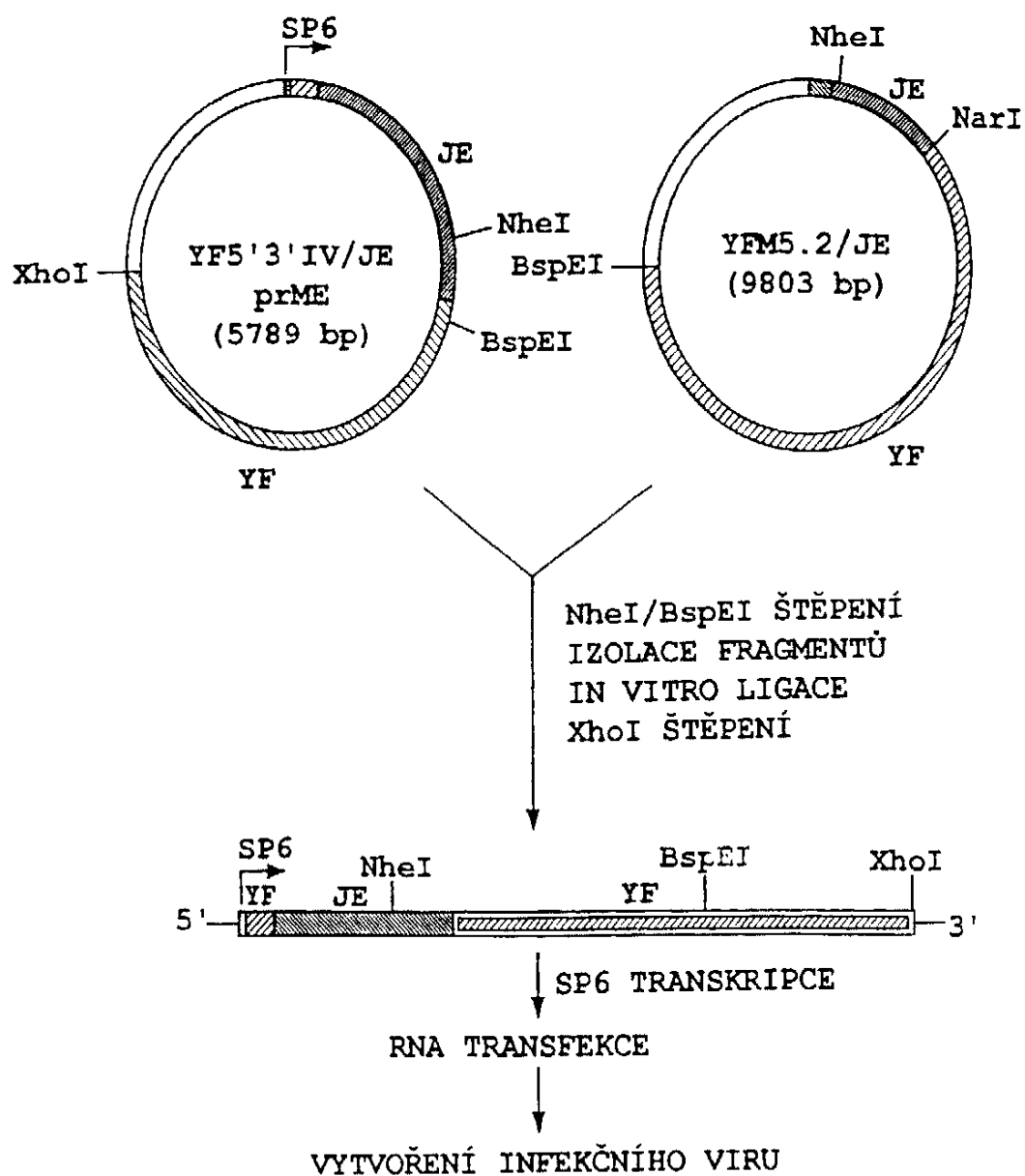
45 ACTGGGAACC TCACCCGCGG TTAA

PATENTOVÉ NÁROKY

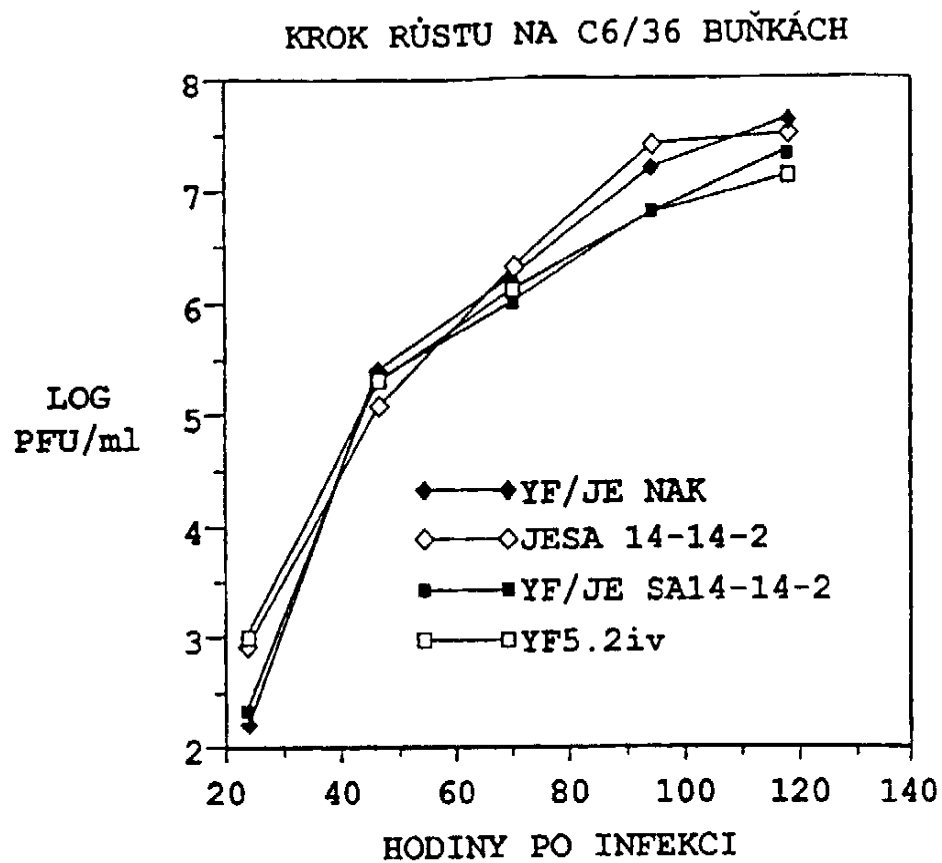
- 5 1. Chimérický živý, infekční, oslabený virus, který zahrnuje virus žluté horečky, ve kterém je nukleotidová sekvence kódující prM-E protein buď deletována, okleštěna, nebo zmutována, takže není exprimován funkční prM-E protein viru žluté horečky, a do genomu tohoto viru žluté horečky je integrována nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhého, odlišného flaviviru, takže prM-E protein tohoto druhého flaviviru exprimován je, přičemž jsou signální sekven-
10 ce v C/prM a E/NS1 spojeních udržovány v konstrukci zmíněného chimérického flaviviru.
2. Chimérický virus podle nároku 1, kde druhým flavivirem je virus japonské encefalitidy (JE).
3. Chimérický virus podle nároku 1, kde druhým flavivirem je virus dengue vybraný ze skupi-
15 ny zahrnující typy virů dengue 1 až 4.
4. Chimérický virus podle nároku 1, kde druhý virus je vybrán ze skupiny zahrnující Murray Valley encefalitický virus, St. Louis encefalitický virus, Západonilský virus, virus klíšťové encefalitidy, viry hepatitidy C, Kunjin virus, středoevropský encefalitický virus, ruský jaroletní encefalitický virus, Powassan virus, Kyasanur Forest Disease virus a virus omské hemoragické horeč-
20 ky.
5. Chimérický virus podle nároku 1, kde nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhé-
25 ho, odlišného flaviviru, nahrazuje nukleotidovou sekvenci kódující prM-E protein viru žluté horečky.
6. Chimérický virus podle nároku 1, kde nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhé-
30 ho, odlišného flaviviru, obsahuje mutaci, která zabraňuje štěpení prM, aby mohlo dojít k produkci M proteinu.
7. Použití chimérického živého, infekčního oslabeného viru pro přípravu léčiva pro prevenci
35 nebo léčbu flavivirových infekcí u pacientů, přičemž chimérický, živý, infekční oslabený virus zahrnuje virus žluté horečky, ve kterém je nukleotidová sekvence kódující prM-E protein buď deletována, okleštěna, nebo zmutována, takže není exprimován funkční prM-E protein viru žluté horečky, a do genomu tohoto viru žluté horečky je integrována nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhého, odlišného flaviviru, takže prM-E protein tohoto druhého flaviviru expri-
40 mován je, přičemž jsou signální sekvence v C/prM a E/NS1 spojeních udržovány v konstrukci zmíněného chimérického flaviviru.
8. Použití podle nároku 7, kde druhým flavivirem je virus japonské encefalitidy (JE).
9. Použití podle nároku 7, kde druhým flavivirem je virus dengue vybraný ze skupiny zahrnující
45 typy virů dengue 1 až 4.
10. Použití podle nároku 7, kde druhý flavivirus je vybrán ze skupiny zahrnující Murray Valley encefalitický virus, St. Louis encefalitický virus, Západonilský virus, virus klíšťové encefalitidy, viry hepatitidy C, Kunjin virus, středoevropský encefalitický virus, ruský jaro-
50 letní encefalitický virus, Powassan virus, Kyasanur Forest Disease virus a virus omské hemoragické horečky.
11. Použití podle nároku 7, kde nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhého, odliš-
55 ného flaviviru, nahrazuje nukleotidovou sekvenci kódující prM-E protein viru žluté horečky.
12. Použití podle nároku 7, kde nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhého, odliš-
ného flaviviru, obsahuje mutaci, která zabraňuje štěpení prM, aby mohlo dojít k produkci M pro-
teinu.

13. Molekula nukleové kyseliny kódující chimérický živý, infekční oslabený virus, přičemž virus zahrnuje virus žluté horečky, ve kterém je nukleotidová sekvence kódující prM-E protein buď deletována, okleštěna, nebo zmutována, takže není exprimován funkční prM-E protein viru žluté horečky, a do genomu tohoto viru žluté horečky je integrována nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhého, odlišného flaviviru, takže prM-E protein tohoto druhého flaviviru exprimován je, přičemž jsou signální sekvence v C/prM a E/NS1 spojeních udržovány v konstrukci zmíněného chimérického flaviviru.
14. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 13, kde druhým flavivirem je virus japonské encefalitidy (JE).
15. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 13, kde druhým flavivirem je virus dengue vybraný ze skupiny zahrnující typy virů dengue 1 až 4.
16. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 13, kde druhý flavivirus je vybrán ze skupiny zahrnující Murray Valley encefalitický virus, St. Louis encefalitický virus, Západonilský virus, virus klíšťové encefalitidy, viry hepatitidy C, Kunjin virus, střeoevropský encefalitický virus, ruský jaro-letní encefalitický virus, Powassan virus, Kyasanur Forest Disease virus a virus omské hemoragické horečky.
17. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 13, kde nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhého, odlišného flaviviru, nahrazuje nukleotidovou sekvenci kódující prM-E protein virus žluté horečky.
18. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 13, kde nukleotidová sekvence kódující prM-E protein druhého, odlišného flaviviru, obsahuje mutaci, která zabraňuje štěpení prM, aby mohlo dojít k produkci M proteinu.

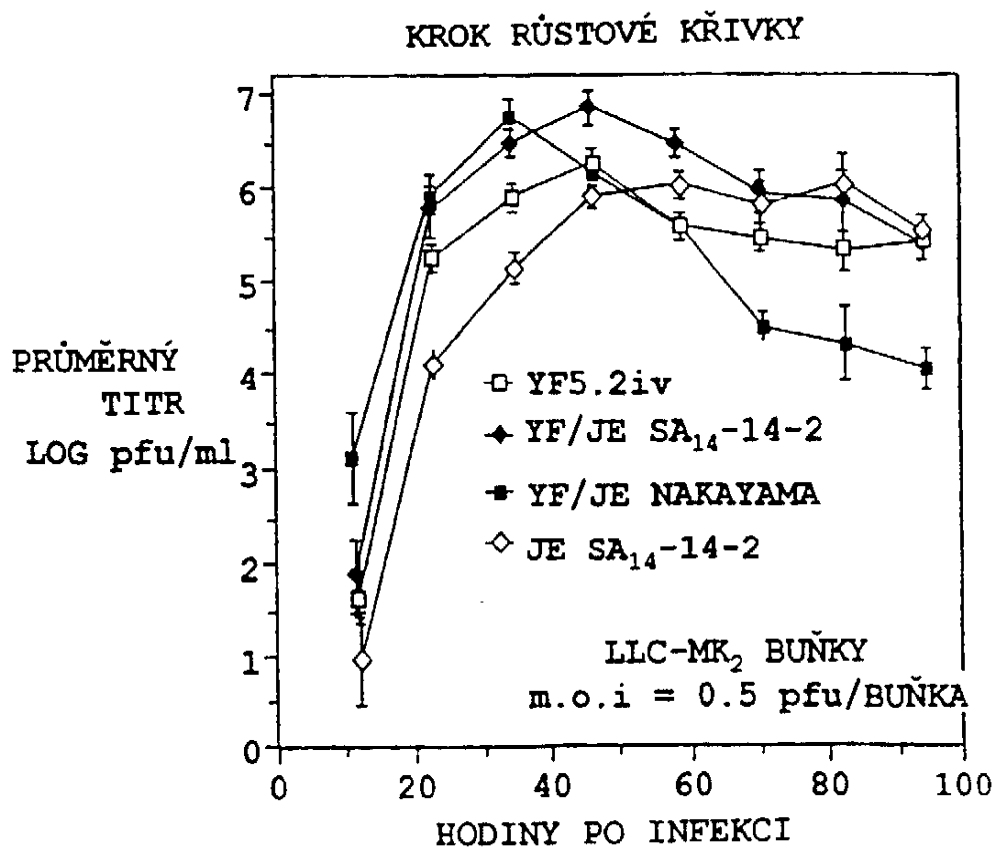
7 výkresů



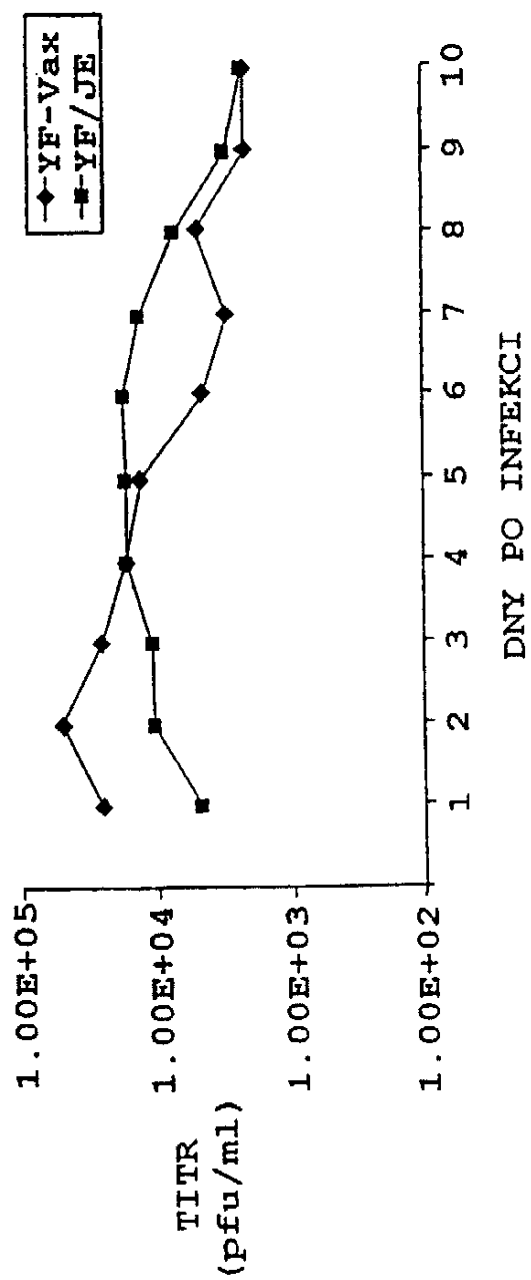
Obr. 1



Obr. 2A



Obr. 2B

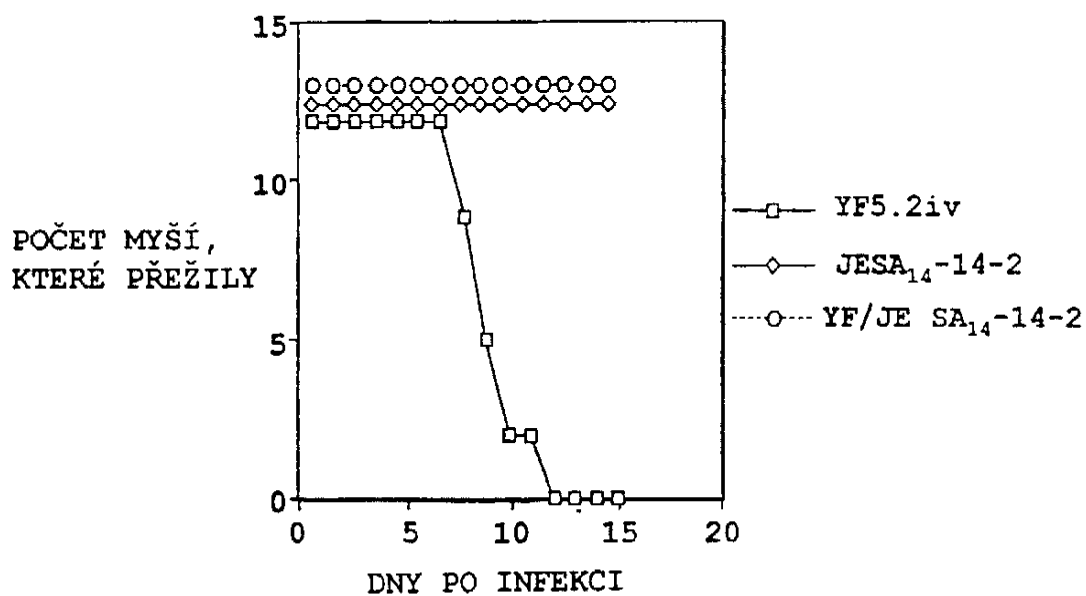


POROVNÁNÍ RŮSTU MEZI RMS A YF-Vax V MRC-5 BUŇKÁCH

Obr. 3

ANALÝZA MYŠÍ NEUROVIRULENCE

MYŠI: 4 TÝDNY STAŘÍ ICR SAMCI/SAMICE
DÁVKA VIRU: 10^4 pfu INTRACEREBRÁLNĚ



VIRUS	PŘEŽILO	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

Obr. 4

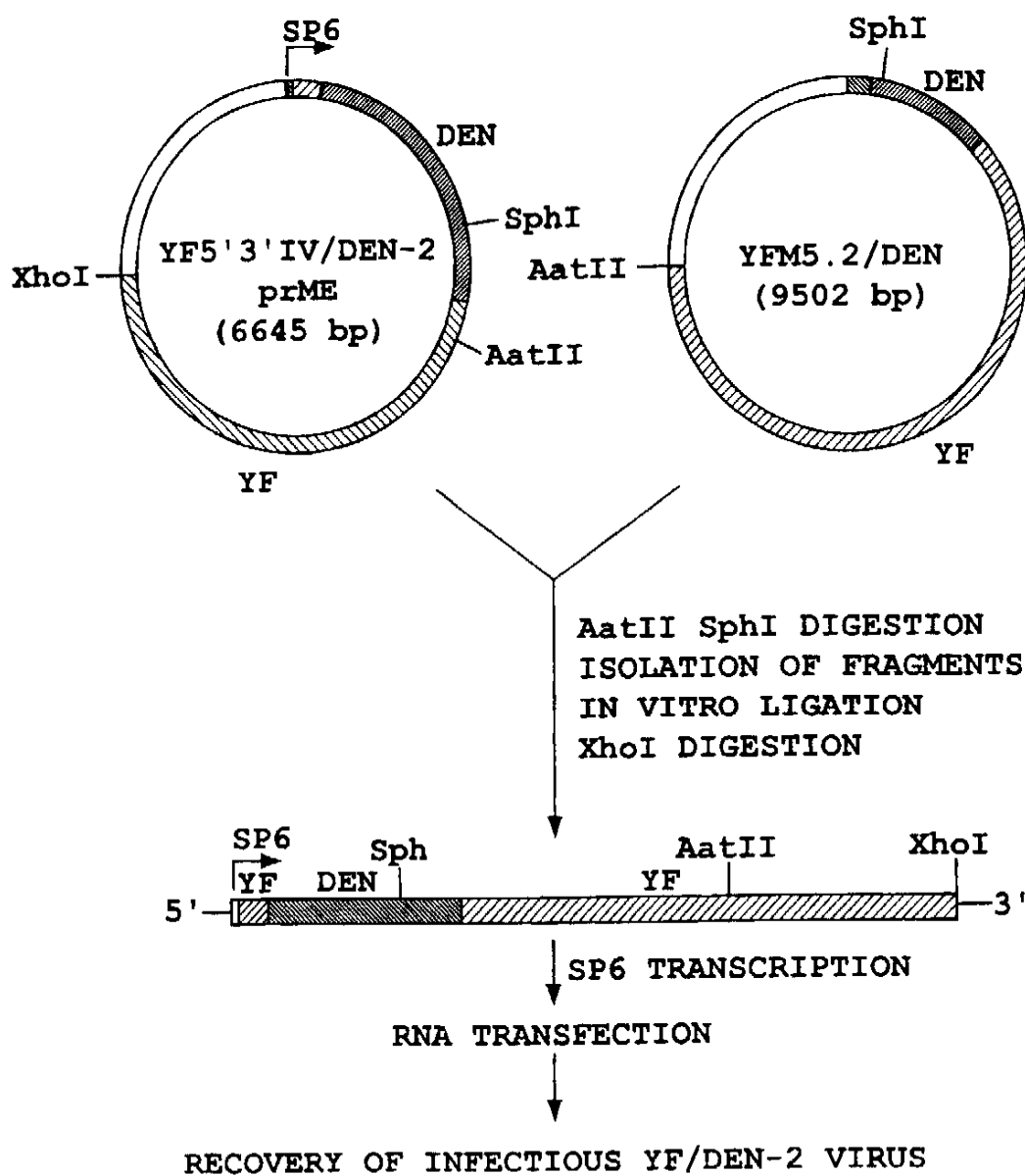
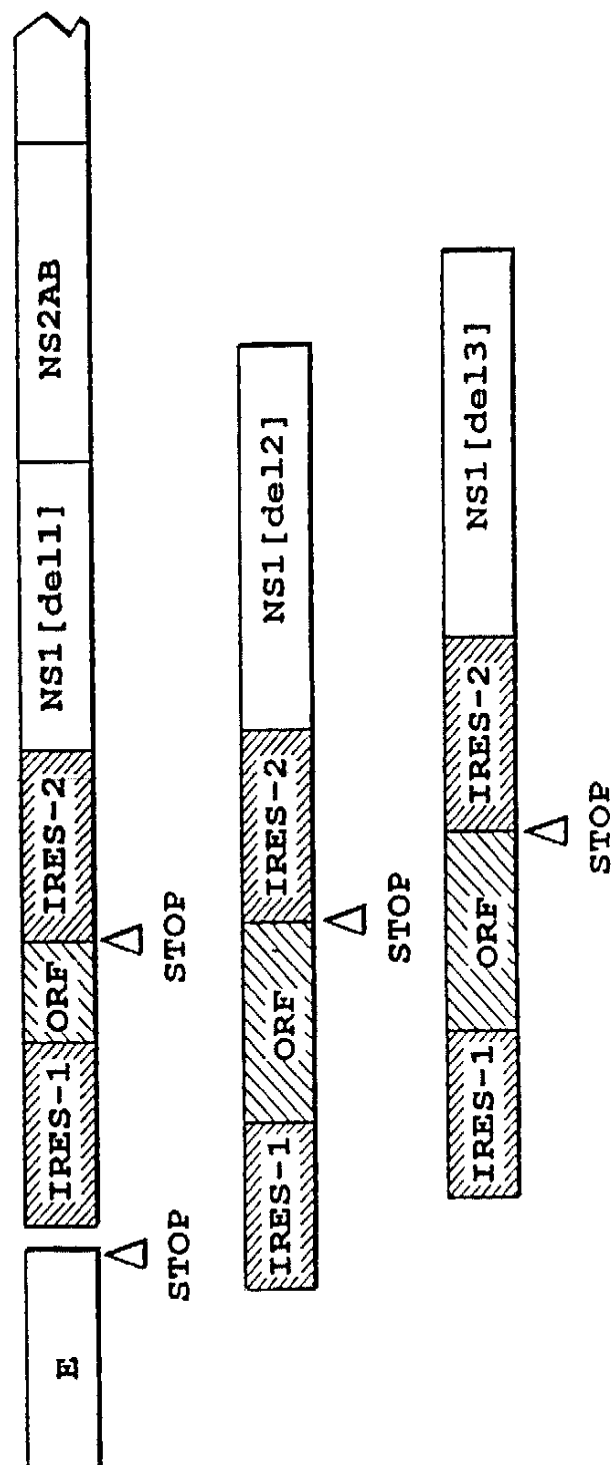


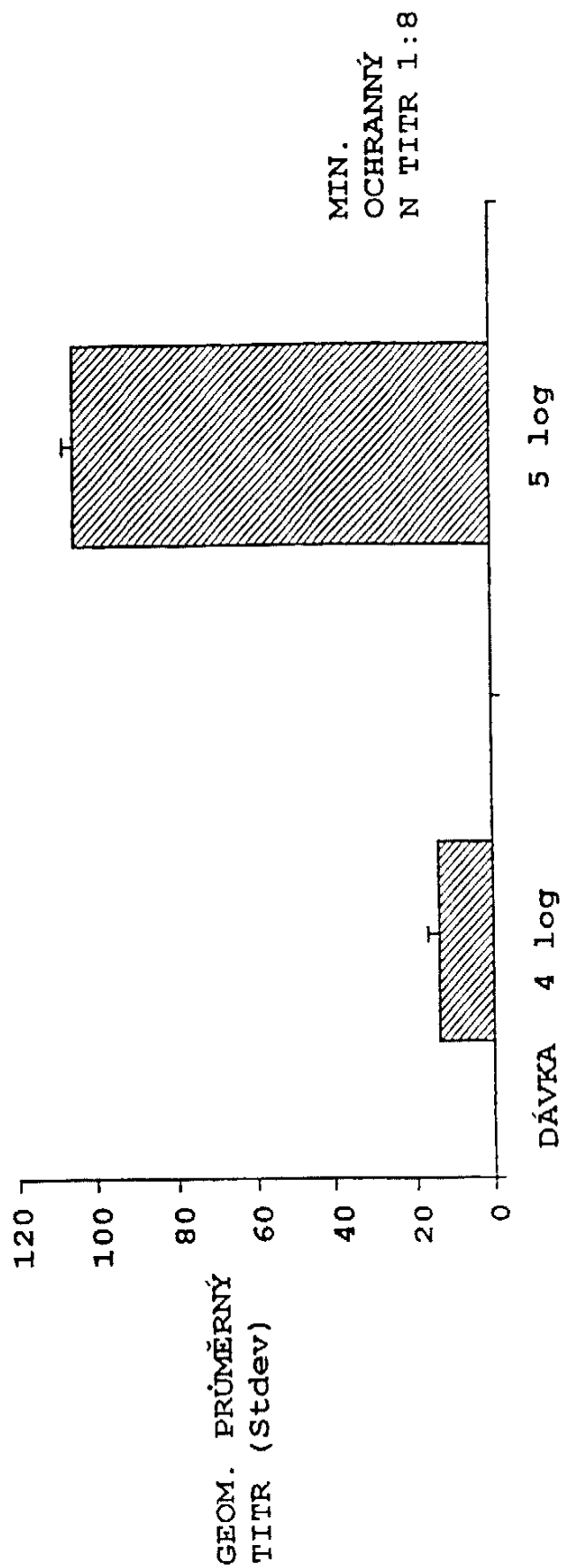
FIG. 5

STRUKTURA MODIFIKOVANÝCH YF KLONŮ EXPRIMUJÍCÍCH
E/NS1 INTERGENOVÉ OTEVŘENÉ ČTECÍ RÁMCE



Obr. 6

ODPOVĚĎ NEUTRALIZUJÍCÍCH PROTILÁTEK
 NA YF/JE SA₁₄-14-2 CHIMERICKOU VAKCÍNU
 (3 TÝDNY IMUNIZOVANÉ MYŠI, VZORKY PRO TEST ODEBRÁNY PO 6 TÝDNECH)



Obr. 7