

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039012**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.11.22**

**(21)** Номер заявки  
**201692468**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.06.16**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/13** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)

**(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ АТТЕНУИРОВАННЫЙ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ШТАММ ПОЛИОВИРУСА, СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО КОМПОЗИЦИЯ, ИНАКТИВИРОВАННАЯ ПОЛИОМИЕЛИТНАЯ ВАКЦИНА И КОМБИНИРОВАННАЯ ВАКЦИНА, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

**(31)** 62/013,379; 14176071.0

**(32)** 2014.06.17; 2014.07.08

**(33)** US; EP

**(43)** 2017.05.31

**(86)** PCT/EP2015/063489

**(87)** WO 2015/193324 2015.12.23

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД  
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Сандерс Барбара Петронелла,  
Кюстерс Жером Х.Х.В., Эдо-Матас  
Диана, Эйл Тако Жилль (NL), Льюис  
Джон Альфред (US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** CHAPIN M. ET AL.: "Cold-adapted genetic variants of polio viruses.", SCIENCE (NEW YORK, N.Y.) 28 SEP 1956, vol. 124, no. 3222, 28 September 1956 (1956-09-28), pages 586-587, XP002733375, ISSN: 0036-8075 the whole document

WO-A1-2008017870

WO-A1-2012090000

DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; May 2011 (2011-05), VERDIJK PAULINE ET AL: "Clinical development of a novel inactivated poliomyelitis vaccine based on attenuated Sabin poliovirus strains.", XP002733376, Database accession no. NLM21604984 abstract & VERDIJK PAULINE ET AL: "Clinical development of a novel inactivated poliomyelitis vaccine based on attenuated Sabin poliovirus strains.", EXPERT REVIEW OF VACCINES MAY 2011, vol. 10, no. 5, May 2011 (2011-05), pages 635-644, ISSN: 1744-8395

DOVE A. W. ET AL.: "Cold-adapted poliovirus mutants bypass a postentry replication block.", JOURNAL OF VIROLOGY JUN 1997, vol. 71, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 4728-4735, XP002733377, ISSN: 0022-538X page 4728

**(57)** Изобретение относится к рекомбинантным аттенуированным термочувствительным штаммам полиовируса, которые способны размножаться в культуре клеток при 30°C и которые фактически не способны размножаться в культуре клеток при 37°C. Изобретение также относится к композиции, содержащей такие штаммы, к инактивированной полиомиелитной вакцине, содержащей такую композицию, и комбинированной вакцине, содержащей такую полиомиелитную вакцину. Наконец, изобретение относится к способам получения препарата, содержащего штамм полиовируса, и инактивированной полиомиелитной вакцины.

**B1****039012****039012****B1**

### Область техники

Изобретение относится к области аттенуации вирусов и разработке новых аттенуированных штаммов полиовируса для применения в качестве вакцин.

### Предпосылки изобретения

Полиовирус (PV) принадлежит к роду энтеровирусов в пределах семейства Picornaviridae. Эти небольшие РНК-вирусы имеют геном в виде одноцепочечной положительной-смысловой РНК и являются безоболочечными. Их подразделяют на три серотипа: PV1, PV2 и PV3. Инфицирование PV обычно протекает бессимптомно, однако в 1-2% случаев приводит к паралитическому полиомиелиту, при котором индуцированное вирусом разрушение двигательных нейронов вызывает паралич, как правило, в конечностях, называемый острым вялым параличом (AFP). Из этих случаев AFP 5-10% являются летальными, поскольку вирус распространяется в области ствола головного мозга, что приводит к остановке дыхания и в конечном итоге к смерти. (Обзоры, касающиеся PV и патогенеза, см., например, Minor, 1999, Racioppo, 2006, Pfeiffer, 2010).

В настоящее время полиомиелит находится на грани ликвидации, при этом всего лишь 406 и 359 случаев было зафиксировано во всем мире в 2013 и 2014 годах, соответственно. В распоряжении имеются две вакцины, которые сделали возможной эту успешную борьбу против PV: инактивированная полиомиелитная вакцина (IPV) (Salk, 1953) и пероральная полиомиелитная вакцина (OPV) (Sabin, 1956). IPV состоит из трех инактивированных формалином (убитых) штаммов PV дикого типа (нейровирулентных) из каждого серотипа (как правило, Mahoney, MEF-1 и Saukett для PV1, PV2 и PV3, соответственно). OPV составлена из трех живых аттенуированных штаммов, называемых Sabin 1, Sabin 2 и Sabin 3. Штаммы Sabin названы в честь Альберта Сэйбина, который создал данные штаммы путем последовательных пассажей трех родительских вирусов дикого типа в клеточных культурах и даже в целых организмах (Sabin, 1973). Благодаря простоте введения и низкой стоимости OPV (John, 2009), она была объявлена Всемирной организацией здравоохранения (WHO) и Глобальной инициативой по ликвидации полиомиелита (Global Polio Eradication Initiative, GPEI) в качестве оптимальной вакцины для программы ликвидации в 1988 году (WHO, 1988). Однако применение OPV идет вразрез с ликвидацией и стратегией завершающей фазы борьбы, поскольку вакцинные штаммы OPV демонстрируют реверсию аттенуированного фенотипа к нейровирулентным и трансмиссивным полиовирусам (Henderson, Witte et al., 1964). Эти случаи ассоциированного с вакциной паралитического полиомиелита (VAPP) встречаются с частотой 1 случай на 500000 вакцин (John, 2004). Кроме того, это приводит к циркулирующим полиовирусам вакцинного происхождения (сVDPV), когда вакцинные вирусы с реверсией становятся трансмиссивными в пределах восприимчивой популяции. Поскольку OPV в настоящее время признается потенциальным источником полиомиелита из-за феномена VAPP и сVDPV, было высказано требование, что применение OPV следует исключить, если требуется достижение полной ликвидации полиомиелита. В действительности за последнее десятилетие регулирующие органы признали, что применение OPV должно быть прекращено для ликвидации полиомиелита (WHO, 2005). В случае IPV, иммуногены вакцины инактивированы формалином и, следовательно, при применении этой вакцины VAPP и сVDPV не наблюдаются. Однако в 20 раз более высокая стоимость этой вакцины делает ее невыгодной для применения в странах с низким и средним уровнем доходов (Heinsbroek and Ruitenberg, 2010, Zehrung, 2010). В связи с этим WHO и многочисленные сотрудничающие с ней организации инициировали множество проектов по разработке стратегий, чтобы сделать IPV более безопасной и экономичной (Zehrung, 2010, Hawken and Troy, 2012, Resik, Tejeda et al., 2013).

IPV действительно представляет собой более безопасную альтернативу OPV с учетом VAPP и сVDPV, однако вирусы дикого типа, которые составляют вакцину, могут представлять угрозу для населения планеты на этапе после ликвидации заболевания при случайной утечке этих вирусов из предприятия-изготовителя. Кроме того, после ликвидации полиовирусы дикого типа будут подлежать строгому регламентированию биоизоляции, что может дополнительно повышать стоимость товаров на основе этой уже дорогостоящей вакцины (WHO, 2006, Verdijk, Rots et al., 2011). В действительности WHO уже указывает на необходимость уничтожения любых штаммов PV дикого типа в лабораториях по всему земному шару. Эти действия, по-видимому, будут принудительно осуществляться более энергично по мере приближения ликвидации (WHO, 2009). Разработка IPV-вакцин на основе аттенуированных штаммов является более безопасной процедурой производства вакцин и снижает риски потенциальных эпидемий заболевания в случае промышленных аварий. С этой целью производство IPV на основе аттенуированных штаммов было предложено в качестве стратегии для безопасного и экономичного получения IPV на этапе после ликвидации заболевания. Множество аттенуированных штаммов было предложено в качестве основы для новой IPV-вакцины, в том числе большинство исследований уделяли особое внимание получению IPV из штаммов Sabin (Verdijk, Rots et al., 2011). IPV на основе Sabin недавно успешно прошла Фазу II клинических испытаний в качестве самостоятельно применяемой вакцины (Liao, Li et al., 2012) и Фазу II и III испытаний в комбинации с вакциной от дифтерии, столбняка и коклюша (DTaP) (Okada, Miyazaki et al., 2013). Более того, в Японии IPV на основе Sabin недавно была лицензирована в комбинации с DTaP (Mahmood, Pelkowski et al., 2013). Однако капсиды вирусов Sabin существенно отличаются от капсидов вирусов дикого типа традиционной IPV и после инактивации формалином вирусы

Sabin проявляют другие антигенные свойства, чем требуемые для выработки нейтрализующих антител (и, следовательно, защиты) против РV-инфекции. Действительно было обнаружено, что иммунный ответ на IPV с Sabin является модифицированным по сравнению с ответом, вырабатываемым против традиционной IPV, следовательно, необходимы другие дозировки вакцины (Westdijk, Brugmans et al., 2011).

Существует несколько рационально сконструированных аттенуированных штаммов РV, однако их потенциал в качестве штаммов для IPV-вакцин пока еще не был изучен в полной мере. Один набор таких аттенуированных штаммов-кандидатов основан на генетически стабилизированных штаммах Sabin, служащих улучшенными живыми вакцинными штаммами по сравнению с штаммами Sabin для разработки новой OPV, а также применения в качестве основы для новой IPV (например, Macadam et al., 2006; WO 2008/017870; WO 2012/090000). Эти штаммы способны к росту при физиологических температурах, однако они демонстрируют значительно сниженную инфекционность при этой температуре.

Для этапа после ликвидации заболевания остается необходимость в разработке IPV на основе безопасных аттенуированных штаммов полиовируса, у которых не происходит реверсия к нейровирулентным формам и которые индуцируют аналогичный иммунный ответ, что и традиционные IPV на основе штаммов дикого типа.

### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрен новый способ разработки рекомбинантных аттенуированных штаммов полиовируса, а также полученные новые рекомбинантные аттенуированные штаммы полиовируса, которые могут применяться в качестве основы для IPV. Аттенуированный осто́в можно подвергнуть перестройке, чтобы он содержал капсиды из штаммов дикого типа, используемых в современных IPV-вакцинах, что после инактивации приводит к профилю антигенности дикого типа при сохранении аттенуированного фенотипа во время получения вируса и увеличения масштаба для производства вакцины. Рекомбинантные аттенуированные полиовирусы являются генетически стабильными в условиях производства. Кроме того, из-за их неспособности реплицироваться при 37°C, весьма маловероятной является их реверсия в нейровирулентную форму при случайном проглатывании в случае (не)преднамеренной утечки из предприятия-изготовителя. Рекомбинантные аттенуированные штаммы полиовируса по настоящему изобретению могут быть инактивированы формалином для применения в IPV-вакцине.

Настоящее изобретение направлено на общие и предпочтительные варианты осуществления, определенные, соответственно, с помощью независимых и зависимых пунктов формулы изобретения, прилагаемой к данному документу, которые для краткости включены в данный документ с помощью ссылки. Другие предпочтительные варианты осуществления, признаки и преимущества различных аспектов настоящего изобретения станут очевидными из приведенного ниже подробного описания, рассматриваемого вместе с прилагаемыми графическими материалами.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, содержащий капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 1, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 2, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 3, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена композиция, содержащая штамм полиовируса и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель, где штамм полиовируса представляет собой рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, и где штамм полиовируса может необязательно содержать капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена композиция, содержащая первый, второй и третий рекомбинантные штаммы полиовируса, где каждый из первого, второго и третьего рекомбинантных штаммов полиовируса способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, и где первый, второй и третий рекомбинантные штаммы полиовируса, соответственно, содержат капсид из штамма Mahoney, MEF-1 и Saukett.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена композиция, содержащая первый, второй и третий рекомбинантные штаммы полиовируса, дополнительно содержащая фар-

мацевтически приемлемый носитель или наполнитель, где первый, второй и третий рекомбинантные штаммы полиовируса способны размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способны размножаться в культуре клеток при 37°C, и где первый, второй и третий рекомбинантные штаммы полиовируса содержат капсид из штамма Mahoney, MEF-1 и Saukett, соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена композиция IPV, где полиовирус в композиции инактивирован и где перед инактивацией полиовирус представляет собой рекомбинантный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, и где первый, второй и третий рекомбинантные штаммы полиовируса содержат капсид из штамма Mahoney, MEF-1 и Saukett, соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена композиция IPV, где композиция IPV содержит инактивированные первый, второй и третий рекомбинантные штаммы полиовируса, где перед инактивацией каждый из первого, второго и третьего рекомбинантных штаммов полиовируса способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, и где первый, второй и третий рекомбинантные штаммы полиовируса содержат капсид из штамма Mahoney, MEF-1 и Saukett, соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена композиция комбинированной вакцины, содержащая композицию IPV, описанную выше, и один или несколько антигенов из других патогенов, таких как возбудители дифтерии, столбняка, коклюша, *Neamophilus influenzae* типа b (Hib), вирус гепатита B (HBV) и т.д.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ вакцинации против полиовирусной инфекции и/или полиомиелита, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей композицию IPV, описанную выше, или композиции комбинированной вакцины, содержащей IPV, как описано выше.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, которая кодирует геном или комплементарную цепь генома полиовируса, где полиовирус представляет собой рекомбинантный аттенуированный термочувствительный полиовирус, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, и где рекомбинантный аттенуированный термочувствительный полиовирус содержит капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ получения препарата, содержащего полиовирус, где полиовирус представляет собой рекомбинантный аттенуированный термочувствительный полиовирус, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, и где полиовирус может необязательно содержать капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett, при этом способ включает

- a) инфицирование клетки в культуре клеток полиовирусом,
- b) культивирование клеток в культуре клеток (при температуре, которая допускает репликацию полиовируса, например, от приблизительно 20°C до приблизительно 33°C) для размножения полиовируса;
- и
- c) выделение штамма полиовируса из клеток или из культуры клеток с получением препарата, содержащего полиовирус.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ получения препарата, содержащего инактивированный полиовирус, где перед инактивацией полиовирус представляет собой рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, и где полиовирус может необязательно содержать капсид, выбранный из капсидов штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett, при этом способ включает:

- a) инфицирование клетки в культуре клеток полиовирусом;
- b) культивирование клеток в культуре клеток (при температуре, которая допускает репликацию полиовируса, например, от приблизительно 20°C до приблизительно 33°C) для размножения полиовируса;
- c) выделение штамма полиовируса из клеток или из культуры клеток с получением препарата, содержащего полиовирус; и
- d) инактивацию полиовируса.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ получения IPV, содержащей инактивированный полиовирус в составе, применимом в качестве фармацевтической композиции, где перед инактивацией полиовирус представляет собой рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, и где полиовирус может необязательно содержать капсид, выбранный из капсидов штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett, при этом способ включает:

- a) инфицирование клетки в культуре клеток полиовирусом;
- b) культивирование клеток в культуре клеток (при температуре, которая допускает репликацию по-

лиовируса, например, от приблизительно 20°C до приблизительно 33°C) для размножения полиовируса;

с) выделение штамма полиовируса из клеток или из культуры клеток с получением препарата, содержащего полиовирус;

d) инактивацию полиовируса и

e) составление инактивированного полиовируса в фармацевтическую композицию.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ получения рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, при этом способ включает стадии:

a) пассирования родительского (или исходного) штамма полиовируса при температуре  $\leq 30^\circ\text{C}$  в течение достаточного количества пассажей для получения вируса с нарушенным ростом при 37°C (например, в течение по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 пассажей);

b) выделения двух или более различных термочувствительных клонов из вирусной популяции, которая демонстрирует нарушенный рост при 37°C;

c) секвенирования геномов термочувствительных клонов;

d) идентификации мутаций в последовательностях геномов термочувствительных клонов путем сравнения последовательностей термочувствительных клонов с последовательностью родительского штамма полиовируса;

e) синтеза рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса путем комбинирования мутаций из двух или более различных термочувствительных клонов в геноме (например, родительского или другого) штамма полиовируса; и

f) "спасения" рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ получения рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса может необязательно содержать капсид, выбранный из другого штамма полиовируса, при этом способ включает стадии:

a) пассирования родительского штамма полиовируса при температуре  $\leq 30^\circ\text{C}$  в течение достаточного количества пассажей для получения вируса с нарушенным ростом при 37°C;

b) выделения двух или более термочувствительных клонов из вирусной популяции, которая демонстрирует нарушенный рост при 37°C;

c) секвенирования геномов термочувствительных клонов;

d) идентификации мутаций в последовательностях геномов термочувствительных клонов путем сравнения последовательностей термочувствительных клонов с последовательностью родительского штамма полиовируса;

e) синтеза рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса путем комбинирования мутаций из двух или более различных термочувствительных клонов в геноме (например, родительского или другого) штамма полиовируса;

f) "спасения" рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C; и

g) необязательно, замены последовательности, кодирующей капсид из "спасенного" рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, последовательностью, кодирующей капсид из другого штамма полиовируса.

В определенных вариантах осуществления последовательность, кодирующую капсид из "спасенного" аттенуированного штамма полиовируса, заменяют последовательностью, кодирующей капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

В определенных вариантах осуществления последовательность, кодирующую капсид из "спасенного" аттенуированного штамма полиовируса, заменяют последовательностью, кодирующей капсид из штамма Sabin типа 1, Sabin типа 2 или Sabin типа 3.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ получения рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса может необязательно содержать капсид, выбранный из капсидов штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett, при этом способ включает стадии:

h) пассирования родительского штамма полиовируса при температуре  $\leq 30^\circ\text{C}$  в течение достаточного количества пассажей для получения вируса с нарушенным ростом при 37°C;

i) выделения двух или более термочувствительных клонов из вирусной популяции, которая демонстрирует нарушенный рост при 37°C;

- ж) секвенирования геномов термочувствительных клонов;
- з) идентификации мутаций в последовательностях геномов термочувствительных клонов путем сравнения последовательностей термочувствительных клонов с последовательностью родительского штамма полиовируса;
- и) синтеза рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса путем комбинирования мутаций из двух или более различных термочувствительных клонов в геноме (например, родительского или другого) штамма полиовируса;
- к) "спасения" рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C; и
- л) замены последовательности, кодирующей капсид из "спасенного" рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, последовательностью, кодирующей капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который можно получать с помощью способов, описанных выше.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1. Схематическое представление способа аттенуации штамма полиовируса с помощью аттенуации вируса путем холодной адаптации (CAVA) с получением рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса (CAVA-PVBackbone). На типичном линейном графике показан рост при 37°C для родительского или исходного штамма полиовируса и трех различных термочувствительных клонов. Родительский вирус показан в виде закрашенных кружков, а 3 термочувствительных клон показаны в виде пустых ромбиков, пустых кружков и пустых квадратиков.

Фиг. 2. Кинетика репликации в суспензии клеток PER.C6 (sPER.C6) для панели из 4 различных штаммов PV типа 1 и типичного CAVA-PVBackbone. 2A: рост при 30°C. 2B: рост при 37°C. Данные для штаммов CAVA-PV, Brunhilde, Mahoney, Brunenders и Sabin 1 показаны в виде незакрашенных кружков, закрашенных ромбиков, пустых квадратиков, закрашенных треугольников и закрашенных квадратиков, соответственно.

Фиг. 3. Средняя кинетика репликации в клетках SPER.C6 для родительского PV Brunenders и типичного CAVA-PVBackbone. "Усы" представляют стандартное отклонение от среднего значения (N=3). На фиг. 3A показан рост при 30°C, а на фиг. 3B показан рост при 37°C. Родительский PV Brunenders показан в виде закрашенных треугольников, а CAVA-PVBackbone показан в виде незакрашенных кружков.

Фиг. 4. Кинетика репликации в клетках HEK293 для родительского PV Brunenders и типичного CAVA-PVBackbone. 4A: рост при 30°C, 4B: рост при 37°C и 4C: рост при 39,5°C. Родительский PV Brunenders показан в виде закрашенных треугольников, а CAVA-PVBackbone показан в виде незакрашенных кружков.

Фиг. 5. Кинетика репликации в клетках L20B для родительского PV Brunenders и типичного CAVA-PVBackbone. 5A: рост при 30°C, 5B: рост при 37°C, и 5C: рост при 39,5°C. Родительский PV Brunenders показан в виде закрашенных треугольников, а CAVA-PVBackbone показан в виде незакрашенных кружков.

Фиг. 6. Кинетика репликации в клетках HeLa для родительского PV Brunenders и типичного CAVA-PVBackbone. 6A: рост при 30°C, 6B: рост при 37°C, и 6C: рост при 39,5°C. Родительский PV Brunenders показан в виде закрашенных треугольников, а CAVA-PVBackbone показан в виде незакрашенных кружков.

Фиг. 7. Кинетика репликации в клетках Vero для родительского PV Brunenders и типичного CAVA-PVBackbone. 7A: рост при 30°C. 7B: рост при 37°C. Родительский PV Brunenders показан в виде закрашенных треугольников, а CAVA-PVBackbone показан в виде незакрашенных кружков.

Фиг. 8. Кинетика репликации в клетках SK-N-MC для родительского PV Brunenders и типичного CAVA-PVBackbone. 8A: рост при 30°C. 8B: рост при 37°C. Родительский PV Brunenders представлен в виде закрашенных треугольников, а CAVA-PVBackbone представлен в виде незакрашенных кружков.

Фиг. 9. Кинетика репликации в прикрепленных клетках PER.C6 (adPER.C6) для родительского PV Brunenders и типичного CAVA-PVBackbone. 9A: рост при 30°C. 9B: рост при 37°C. Родительский PV Brunenders представлен в виде закрашенных треугольников, а CAVA-PVBackbone представлен в виде незакрашенных кружков.

Фиг. 10. Кинетика репликации для CAVA-PVBackbone (закрашенные кружки) и после 8 (закрашенные кружки) пассажей (A) при предполагаемых условиях производства (A) при 30°C и (B) при 37°C в малом масштабе.

Фиг. 11. Кинетика репликации (11A, B) CAVA-PVMahoney, (11C, D) CAVA-PVMEF-1 и (E, F) CAVA-PVSaukett и после 5 пассажей на SPER.C6 (N=3) при предполагаемых условиях производства (11A, C, E) при 30°C и (11B, D, F) при 37°C в малом масштабе. Закрашенные ромбики представляют рост вирусов из исходного материала, тогда как пустые квадратики, кружки и треугольники представляют каждый из трех пассажей вирусов (N=1, 2 и 3, соответственно).

Фиг. 12. Схематический обзор различных вакцинных штаммов CAVA-PV после замены последовательности, кодирующей капсид исходного штамма CAVA-PVBackbone, последовательностями, кодирующими капсид штаммов Mahoney, MEF-1 и Saukett. После замены капсида полученные вакцинные штаммы названы CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett, соответственно.

Фиг. 13. Кинетика репликации CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett и родительского штамма Brunenders. 12A: рост при 30°C. 12B: рост при 37°C. "Усы" представляют стандартное отклонение от среднего значения (N=2 или 3). Родительский PV Brunenders показан в виде закрашенных треугольников, CAVA-PVMahoney показан в виде незакрашенных кружков, CAVA-PVMEF-1 показан в виде незакрашенных квадратов, а CAVA-PVSaukett показан в виде незакрашенных ромбов.

Фиг. 14. Титры вирус-нейтрализующих антител у крыс, иммунизированных инактивированным 14A: CAVA-PVMahoney, 14B: CAVA-PVMEF-1 или 14C: CAVA-PVSaukett.

Фиг. 15. Кинетика репликации для родительского PV Brunenders, CAVA-PVBackbone из примера 1 (с 31 мутацией из таблицы 1 по сравнению с родительским штаммом Brunenders) и дополнительного CAVA-PV из примера 10 (который соответствует родительскому штамму Brunenders с 14 мутациями из табл. 4). 15A: рост при 30°C. 15B: рост при 37°C. Данные для родительского PV Brunenders показаны в виде закрашенных треугольников, данные для CAVA-PVBackbone из примера 1 показаны в виде незакрашенных кружков, а данные для CAVA-PV из примера 10 показаны в виде закрашенных ромбов.

Фиг. 16. Кинетика репликации для родительского MEF-1 дикого типа, CAVA-PVBackbone из примера 1 (с 31 мутацией из таблицы 1 в исходной последовательности Brunenders) и дополнительного штамма CAVA-PV из примера 11 (который соответствует родительскому PV MEF-1 с 13 мутациями, указанными в табл. 4). 16A: рост при 30°C. 16B: рост при 37°C. Данные для MEF-1 показаны в виде закрашенных квадратов, данные для CAVA-PVBackbone из примера 1 показаны в виде незакрашенных кружков, а данные для MEF-1 с 13 CAVA-мутациями (CAVA-PV из примера 11) показаны в виде незакрашенных квадратов.

Фиг. 17. Кинетика репликации для родительского Sabin 3, CAVA-PVBackbone из примера 1 (с 31 мутацией из таблицы 1 в исходной последовательности Brunenders) и дополнительного штамма CAVA-PV из примера 11 (который соответствует родительскому PV Sabin 3 с 12 мутациями, указанными в табл. 4). 17A: рост при 30°C. 17B: рост при 37°C. Данные для Sabin 3 показаны в виде закрашенных квадратов, данные для CAVA-PVBackbone из примера 1 показаны в виде незакрашенных кружков, а данные для Sabin 3 с 12 CAVA-мутациями (CAVA-PV из примера 11) показаны в виде незакрашенных треугольников.

Фиг. 18. ЕМ-микрофотографии типичных клеток во время инфицирования (А) PBS (ложно инфицированные) при 37°C, (В) Mahoney при 37°C, (С) CAVA-PVMahoney при 37°C и (D) CAVA-PVMahoney при 30°C.

Фиг. 19. Инфекция CAVA-PVMahoney в динамике по времени в уровнях вирусной РНК, измеренных с помощью qPCR, выраженных как копии генома (Log10 GC на правой Y-оси, кружки), и инфекционных единиц, измеренных путем титрования (Log10 TCID50/мл на левой Y-оси, квадратики) во течение инфекции при (незакрашенный квадратик и кружок) 30°C и (закрашенный квадратик и кружок) 37°C.

Фиг. 20. Кинетика репликации родительского Brunenders, CAVA-PVBackbone из примера 1, CAVA-PVMahoney из примера 6 и двух промежуточных вирусов либо с 7 CAVA-мутациями в 5'UTR, либо с 17 CAVA-мутациями в неструктурных белках. 20A: рост при 30°C. 20B: рост при 37°C. Данные для родительского штамма Brunenders показаны в виде закрашенных кружков, данные для промежуточного вируса с 7 CAVA-мутациями в 5'UTR показаны в виде закрашенных треугольников, данные для промежуточного вируса с 17 CAVA-мутациями в неструктурных белках показаны в виде закрашенных квадратов, данные для CAVA-PVBackbone из примера 1 показаны в виде незакрашенных кружков, данные для CAVA-PVMahoney показаны в виде незакрашенных треугольников.

#### **Подробное описание изобретения**

В настоящем изобретении новый способ аттенуации вирусов путем холодовой адаптации (CAVA) применяли для получения рекомбинантных аттенуированных штаммов полиовируса, полиовируса с аттенуацией путем холодовой адаптации (CAVA-PV). CAVA-PV растет до высоких титров при низкой температуре (30°C), но фактически не растет при физиологической температуре (37°C). Из-за фактической неспособности реплицироваться при 37°C штаммы CAVA-PV сталкиваются с неподходящей температурой при нахождении внутри млекопитающего-хозяина, тем самым делая аттенуированный фенотип пригодным для применения в качестве основы для IPV-вакцины. Остов генома CAVA-PV пригоден для перестройки таким образом, чтобы он содержал последовательности, кодирующие капсиды других вирусов (например, три капсида дикого типа, применяемые в традиционной IPV), тем самым обеспечивается антигенный и, следовательно, предположительно такой же иммуногенный профиль, что и у традиционной вакцины, при сохранении аттенуированного фенотипа CAVA-PV. Кроме того, инактивированные формалином рекомбинантные аттенуированные штаммы полиовируса по настоящему изобретению могут быть использованы в качестве IPV, обеспечивая аналогичный иммунный ответ по сравнению с име-

ющимися на рынке традиционными IPV-вакцинами, в то же время риски VAPP и cVDPV устраняются.

Как определено в данном документе, "фактически не растет", "фактическая неспособность к репликации", "фактическое отсутствие репликации" и "фактически не способен к размножению" означает, что увеличение числа инфекционных единиц вируса по сравнению с теоретическим введением/инокуляцией (на основе рассчитанной MOI) составляет не более 10%, или предпочтительно не более 5%, или более предпочтительно не более 1%, или еще более предпочтительно отсутствует измеримое увеличение числа инфекционных единиц вируса. Анализ для измерения/титрования вирусных инфекционных единиц (анализ TCID<sub>50</sub>) имеет предел обнаружения 1,7 Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/мл. В определенных вариантах осуществления "фактически не растет", "фактическая неспособность к репликации", "фактическое отсутствие репликации" и "фактически не способен к размножению" определяется как отсутствие измеримого увеличения вирусной РНК (копий генома) по сравнению с теоретическим введением/инокуляцией (рассчитанные копии генома), измеряемыми с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR). В определенных вариантах осуществления "фактически не растет", "фактическая неспособность к репликации", "фактическое отсутствие репликации" и "фактически не способен к размножению" определяется как отсутствие визуальных признаков инфекции (цитопатический эффект), наблюдаемых с помощью световой микроскопии, или отсутствие визуальных признаков инфекции (мертвых или апоптотических клеток с индуцированными вирусом мембранными везикулами или вирусными решетчатыми структурами) с помощью электронной микроскопии (ЕМ).

Как определено в данном документе, "рекомбинантный" означает, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полиовирус, подверглась молекулярно-биологической манипуляции, заключающейся в комбинировании генетических компонентов из двух или более различных источников, например, разных клонов, разных штаммов или разных организмов. Рекомбинантные аттенуированные полиовирусы по настоящему изобретению можно создавать с помощью молекулярного клонирования ДНК или можно синтезировать химически (синтез ДНК de novo) с помощью методик, которые хорошо известны и являются обычной практикой для специалистов в данной области. Это даже можно осуществить путем предоставления информации о требуемой рекомбинантной последовательности контрактному производителю (например, Genscript, GeneArt, BaseClear), который затем может производить эти молекулы в соответствии с традиционными методиками. В любом стандартном руководстве по технологии ДНК представлены подробные протоколы, которые можно применять для получения рекомбинантных штаммов PV по настоящему изобретению. Коротко, примерные инструкции для конструирования таких рекомбинантных вирусов представлены ниже в примерах.

Как определено в данном документе, "аттенуированный" означает, что вирулентность полиовируса была снижена, так что полиовирус является менее патогенным по сравнению с родительским или исходным вирусом, но все еще является жизнеспособным. Например, аттенуированный полиовирус по настоящему изобретению является значительно менее нейровирулентным по сравнению со штаммами дикого типа и, следовательно, имеет значительно сниженную, если таковая имеется, способность вызывать паралич. В частности, предпочтительный аттенуированный штамм вируса по настоящему изобретению будет безопасным для применения в качестве вакцинного штамма не только при введении в инактивированной форме, но напрямую назначению, но даже при случайном инфицировании и/или утечке из предприятия-изготовителя. В определенных предпочтительных вариантах осуществления аттенуированный вирус по настоящему изобретению характеризуется (P)LD<sub>50</sub> более 1×10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> при интрацеребральном (i.e.) введении трансгенным по CD155 мышам.

Используемая в данном документе фраза "нуклеотид", "нуклеиновая кислота" или "молекула нуклеиновой кислоты" относится к ДНК, РНК, а также к любым известным аналогам оснований ДНК и РНК или к химерам, образованным из них. Таким образом, "нуклеотид", "нуклеиновая кислота" или "молекула нуклеиновой кислоты" относится к полимерной форме сложных фосфатных эфиров рибонуклеозидов (аденозин, гуанозин, уридин или цитидин; "молекулы РНК") или дезоксирибонуклеозидов (дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезокситимидин или дезоксицитидин; "молекулы ДНК") как в одноцепочечной форме, так и в двухцепочечной спирали. Возможны двухцепочечные спирали ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК. Термин молекула нуклеиновой кислоты и, в частности, молекула ДНК или РНК, относится только к первичной и вторичной структуре молекулы и не ограничивает ее какими либо конкретными третичными формами. Таким образом, этот термин включает двухцепочечную ДНК, обнаруживаемую в линейных или кольцевых молекулах ДНК (например, рестрикционные фрагменты или плазмиды), а также одноцепочечные положительные смысловые молекулы РНК генома полиовируса и его фрагментов. При обсуждении структуры конкретных двухцепочечных молекул ДНК или одноцепочечных молекул РНК последовательности могут быть описаны в данном документе в соответствии с обычным порядком приведения последовательности в направлении от 5' к 3' вдоль одноцепочечных положительных смысловых молекул РНК генома полиовируса или нетранскрибируемой цепи ДНК (т.е. цепи, имеющей последовательность, гомологичную мРНК).

Штамм полиовируса Brunenders применяли в качестве родительского штамма для получения CAVA-PVBackbone. Штамм Brunenders принадлежит к серотипу 1 и был изначально получен из клинического изолята, называемого штамм Brunhilde. Пассирование штамма Brunhilde на протяжении двена-

дцати последовательных пассажей в культуре ткани человеческого происхождения Др. John Enders в 1956 году дал штамм Brunenders. Было показано, что этот штамм является частично аттенуированным (Enders, 1952, Sanders, Liu et al., 2015). Типичная последовательность штамма Brunenders представлена как SEQ ID NO:1. Этот штамм Brunenders применяли в качестве родительского штамма для настоящего изобретения, но некоторая степень естественной изменчивости является обычной в вирусной популяции.

В данном документе также показано, что штамм CAVA-PV также может быть получен также с применением MEF-1 (PV типа 2, который относится к дикому типу и является нейровирулентным) или Sabin 3 (аттенуированный PV типа 3) в качестве родительских штаммов, что демонстрирует общую применимость настоящего изобретения для создания штаммов CAVA-PV, которые имеют фенотип значительного роста при 30°C и фактическое отсутствие роста при 37°C. Типичная последовательность штамма MEF-1 представлена как SEQ ID NO: 5 и Sabin 3 как SEQ ID NO: 8. Специалисту в данной области будет ясно, что мутации, индуцирующие термочувствительный фенотип, не являются серотип-специфическими и, следовательно, другие штаммы полиовируса, такие как, например, штаммы Mahoney или Saukett, также можно применять в качестве родительских штаммов для создания дополнительных штаммов CAVA-PV с фенотипом по настоящему изобретению в соответствии с идеями, представленными в данном документе.

Как определено в данном документе, "родительский штамм" или "исходный штамм" может представлять собой штамм дикого типа, циркулирующий в природе или выделенный из нее, известный стандартный лабораторный штамм или любой другой штамм полиовируса, который еще не был подвергнут способу CAVA по настоящему изобретению. Неограничивающими примерами родительских штаммов являются штаммы Brunenders, MEF-1, Mahoney, Saukett, Sabin 1, Sabin 2 или Sabin 3. Типичные примеры последовательностей предусмотрены для этих штаммов в данном документе следующим образом: Brunenders (SEQ ID NO: 1), MEF-1 (SEQ ID NO: 5), Mahoney (SEQ ID NO: 6), Saukett (SEQ ID NO: 7), Sabin 3 (SEQ ID NO: 8), Sabin 1 (SEQ ID NO: 9) и Sabin 2 (SEQ ID NO: 10).

В настоящем изобретении также предусмотрен способ получения рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, включающий стадии: а) пассирования (родительского) штамма полиовируса при температуре <32°C в течение достаточного количества пассажей для получения вируса с нарушенным ростом при 37°C; б) выделения двух или более (например, двух, трех, четырех, пяти или более) различных термочувствительных клонов, которые демонстрируют нарушенный рост при 37°C; в) секвенирования геномов термочувствительных клонов, д) идентификации мутаций в последовательностях геномов термочувствительных клонов путем сравнения последовательностей термочувствительных клонов с последовательностью родительского штамма полиовируса; е) синтеза рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса путем комбинирования мутаций из двух или более различных термочувствительных клонов в геноме родительского штамма полиовируса или в геноме другого штамма полиовируса и ф) "спасения" рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C. Пассирование на стадии а) предпочтительно выполняют путем инфицирования при низкой множественности заражения (MOI), например, при MOI от 0,0001 до 1, например, от 0,001 до 0,1, например, при приблизительно 0,01. Температура для пассирования на этапе а) составляет 32°C или менее, например, от приблизительно 20°C до 31°C, например, от приблизительно 24°C до 30°C, например, при приблизительно 30°C. Можно применять любую линию клеток, которая подходит для роста полиовируса при данной температуре, например, Vero, PER.C6, HEK293 и т.д. Специалисту в данной области будет понятно, что предусмотренное число пассажей не является принципиально важным и его можно легко определить с помощью скрининга в отношении фенотипа нарушенного роста при 37°C в клонах анализируемой вирусной популяции, так как мутации, которые будут способствовать холодоадаптированному фенотипу, могут накапливаться при любом пассаже. После ограниченного числа пассажей такой фенотип уже может наблюдаться, если же нет, дополнительное пассирование может повысить шанс обнаружения клонов с таким фенотипом. Поэтому в определенных вариантах осуществления число пассажей на этапе а) может составлять по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30 или больше. Используемое в данном документе выражение "нарушенный рост" при 37°C определяется как по меньшей мере 10-кратное, например, от 100- до 1000-кратного, снижение максимального титра по сравнению с вирусом дикого типа. Кроме того, клоны с нарушенным ростом также могут проявлять замедленный рост, т.е. для достижения максимального титра требуется больший срок инфекции по сравнению с вирусом дикого типа или родительским вирусом. В определенных вариантах осуществления кинетика роста термочувствительных клонов при более низкой температуре (например, 30°C) может быть ускоренной по сравнению с исходным (родительским) штаммом. В одном варианте осуществления для разработки CAVA-PV родительский штамм Brunenders последовательно пассировали на клетках PER.C6 более 30 раз при низкой температуре ( $\leq 30^\circ\text{C}$ ) и низкой MOI (например, 0,01). Полученную вирусную популяцию анализировали для выявления термочувствительных вирусных клонов в популяции с нарушенным ростом при фи-

физиологических температурах (37°C) и ростом дикого типа при низкой температуре (30°C). Три термочувствительных клона (которые демонстрировали нарушенный рост при 37°C, а также ускоренную кинетику роста при 30°C по сравнению с родительским штаммом Brunenders) обнаружили путем скрининга приблизительно 1000 клонов в вирусной популяции при 37°C.

3 термочувствительных клона секвенировали и в трех различных клонах обнаружили в общей сложности 31 мутацию. Каждый клон имел 18 нуклеотидных мутаций, некоторые из которых были общими для различных клонов, а некоторые были уникальными для клона. Эти мутации выявили в 3 из 4 различных областей генома PV, в том числе в 5'UTR (нетранслируемая область), капсиде и неструктурных белках. Мутаций не было выявлено в 3'UTR. 5'UTR содержит структуру в виде "клеверного листа", которая необходима для связывания генома с белком VpG (2B) для образования инфекционного вириона и инкапсулирования РНК в капсид. Остальная часть 5'UTR представляет собой IRES (внутренний сайт связывания рибосомы), который необходим для трансляции вирусной РНК. Поскольку данная область не кодирует никаких белков (нетранслируемая), данный элемент выполняет свою функцию путем непосредственного связывания его взаимодействующей РНК/соответствующего белка, следовательно, вторичная структура этого домена является важной для его функционирования. Область капсида кодирует внешнюю поверхность вирусной частицы, и ее можно подразделять на четыре белка, которые составляют эту внешнюю часть вириона, известную как капсид. Эти четыре белка называются VP1, VP2, VP3 и VP4. Неструктурные белки подразделяются на белки 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D. Эти белки необходимы для репликации вируса, процессинга полипротеина, трансляции и взаимодействий с компонентами клетки-хозяина для успешного инфицирования. Например, протеаза 2A отключает трансляцию белка клетка-хозяина путем расщепления eIF4G (Stern and Liebig, 1994). 3'UTR также представляет собой нетранслируемую область, необходимую для инициации синтеза комплементарной цепи. Как и в случае 5'UTR структура данного элемента делает возможной его функционирование.

31 мутация, выявленная во всех трех клонах, включала 7 мутаций в IRES, 7 мутаций в капсиде и 17 мутаций в неструктурных белках. Первый CAVA-PV Backbone разработали путем комбинирования всех 31 мутации в исходной последовательности Brunenders дикого типа (и таким образом первый разработанный CAVA-PV представляет собой полиовирус типа 1). 31 мутацию, которые комбинировали с получением данного CAVA-PV Backbone см. в примере 1, табл. 1. Схематический обзор способа CAVA и то, как был создан CAVA-PV Backbone см. также на фиг. 1

Комбинация 31 мутации в одном вирусном геноме имела синергический эффект. CAVA-PV Backbone проявлял кумулятивную термочувствительность при сравнении с 3 индивидуальными клонами, при этом показывал фактическое отсутствие репликации при 37°C в клетках SPER.C6. В противоположность этому, в тех же клетках при 30°C для CAVA-PV Backbone показана аналогичная кинетика роста или даже ускоренный рост по сравнению с родительским штаммом Brunenders и другими штаммами PV1 (пример 2, фиг. 2 и 3). Ростовые характеристики CAVA-PV Backbone затем исследовали на различных других линиях клеток млекопитающих и неспособность CAVA-PV Backbone к репликации при физиологической температуре 37°C подтвердилась для всех типов клеток млекопитающих, которые подвергали тестированию (пример 3, фиг. 4-9).

Искусственная комбинация мутаций, обнаруженных у клонов, считается необходимой для получения фенотипа CAVA-PV (т. е. аналогичного роста при 30°C по сравнению с родительским штаммом Brunenders и неспособность к репликации при температуре 37°C). Отбор вируса с полной утратой репликации при 37°C не был возможен при последовательных пассажах Brunenders и MEF-1 в течение более 30 пассажей при низкой температуре. Фактически, только для 2-3 из приблизительно 1000 подвергнутых скринингу клонов, полученных во время пассирования Brunenders и MEF-1, показано нарушение роста при 37°C (фиг. 1), тогда как усиленный рост при 30°C по сравнению с родительским штаммом наблюдали в клонах после пассирования Brunenders и MEF-1. Следовательно, условия пассирования, применяемые в данном документе, предоставляли селективное преимущество для улучшенного роста при 30°C, но не поддерживали отбор вирусов с нарушенной репликацией при 37°C. Только после искусственной комбинации мутаций, обнаруженных в 3 индивидуальных клонах, в геноме Brunenders наблюдался фенотип CAVA. Интересно отметить, что для штаммов CAVA-PV не продемонстрировано лучшего роста по сравнению с родительским штаммом при 30°C (фиг. 3), который наблюдали в случае клонов. Следовательно, естественная комбинация этих CAVA-мутаций во время пассирования при 30°C (необходимых для фенотипа CAVA) была бы невыгодной по сравнению с исходными клонами и, следовательно, с малой вероятностью могла бы возникнуть самопроизвольно. Это подчеркивает обязательное требование к искусственной комбинации наблюдаемых мутаций для достижения фенотипа CAVA.

Таким образом, в определенных конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 из следующих положений по сравнению с геномом штамма Brunenders (SEQ ID NO: 1) : 133 (A), 142 (U), 146 (G), 163 (A), 579 (G), 597 (C)

и 609 (G) в 5'UTR; 805 (A), 1787 (C), 1905 (U), 2756 (U), 3236 (C), 3323 (C) и 3376 (A) в капсиде и 3476 (C), 3486 (G), 3852 (A), 4120 (U), 4253 (C), 4301 (U), 4428 (A), 4563 (A), 4811 (A), 5436 (G), 5705 (A), 6059 (C), 6210 (A), 6488 (C), 6848 (G), 7079 (U) и 7102 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкретных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 следующую мутацию по сравнению с геномом штамма Brunenders (SEQ ID NO:1): 133 (A в G), 142 (U в C), 146 (G в A), 163 (A в G), 579 (G в A), 597 (C в U) и 609 (G в A) в 5'UTR; 805 (A в C), 1787 (C в U), 1905 (U в C), 2756 (U в C), 3236 (C в U), 3323 (C в U) и 3376 (A в G) в капсиде и 3476 (C в U), 3486 (G в A), 3852 (A в U), 4120 (U в C), 4253 (C в U), 4301 (U в C), 4428 (A в G), 4563 (A в U), 4811 (A в G), 5436 (G в A), 5705 (A в G), 6059 (C в U), 6210 (A в G), 6488 (C в U), 6848 (G в A), 7079 (U в C) и 7102 (U в C) в неструктурных белках.

Кроме того, с помощью трансгенной по CD155 мышинной модели (Koike, Taya et al., 1991), применяемой для оценки нейровирулентности полиовируса *in vivo*, было показано, что CAVA-PV является высоко аттенуированным (пример 4, табл. 2). Фактически ни у одной мыши, инфицированной с помощью максимально возможной дозы CAVA-PV, не был отмечен паралич или какие-либо другие признаки заболевания. Это не относится к Sabin 1, известному аттенуированному штамму PV, который также был включен в тест. Штаммы, протестированные на мышинной модели нейровирулентности, в порядке убывания вирулентности располагались следующим образом: Mahoney, Brunhilde, Saukett, Brunenders, Sabin 1-3 и CAVA-PV. Определили, что CAVA-PV были по меньшей мере в 100 раз более аттенуированными, чем Brunenders, который является частично аттенуированным штаммом, и по меньшей мере настолько же аттенуированными, как штаммы Sabin, которые представляют собой хорошо известные аттенуированные штаммы, которые широко применяются во многих странах для пероральной вакцинации против полиомиелита.

Более того, путем перестройки остова CAVA-PV таким образом, чтобы он содержал капсиды из различных штаммов полиовируса, CAVA-PV становится пригодным для применения в качестве аттенуированного вакцинного штамма для разработки IPV с антигенным профилем применяемых в настоящее время IPV-вакцин дикого типа, но с аттенуированным фенотипом CAVA-PV. Например, CAVA-PV пригоден для применения в качестве аттенуированного остова для получения аттенуированных полиовирусов, содержащих капсиды вирулентных штаммов PV дикого типа (типов 1, 2 и 3, например, штамма Mahoney типа 1, штамма MEF-1 типа 2 и штамма Saukett типа 3). Это можно, например, осуществлять путем замены последовательности капсида из штамма CAVA-PV последовательностью необходимого капсида с использованием традиционной молекулярной биологии (см., например, WO 2012/090000 для примеров перестройки капсидов остовов аттенуированных штаммов PV в капсиды штаммов дикого типа; однако в упомянутом случае полученные штаммы все еще были фактически способны к репликации при 37°C в отличие от штаммов CAVA-PV по настоящему изобретению). Таким образом, CAVA-PV можно применять для получения рекомбинантных аттенуированных полиовирусов для IPV. Предпочтительно, CAVA-PV конструируют таким образом, чтобы он содержал последовательности тех же капсидов, что и в штаммы IPV дикого типа, которые были использованы для успешной иммунизации населения всего мира с 1952 года. Это позволит обойти измененный антигенный (и, следовательно, предполагаемый иммуногенный) профиль других аттенуированных штаммов для IPV, как наблюдалось в случае штаммов Sabin после инактивации формалином. В особенно предпочтительных вариантах осуществления, следовательно, CAVA-PV применяется в качестве остова, и последовательность, кодирующую капсид, заменяют на последовательность, кодирующую капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett. Это приводит к рекомбинантным штаммам полиовируса, которые способны размножаться в культуре клеток при 30°C и которые фактически не способны размножаться в культуре клеток при 37°C, содержащим капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett, соответственно. В альтернативных предпочтительных вариантах осуществления мутации, которые вызывают фенотип CAVA-PV (например, по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 мутаций, показанных в табл. 4 в отношении исходной последовательности штамма Brunenders), конструируют в соответствующие положения родительских штаммов Mahoney, MEF-1 или Saukett, что будет приводить, соответственно, к штаммам Mahoney, MEF-1 или Saukett (которые, таким образом, имеют оригинальные капсиды таких штаммов), которые способны размножаться в культуре клеток при 30°C и которые фактически не способны размножаться в культуре клеток при 37°C. В настоящем изобретении также предусмотрены такие способы и штаммы полиовируса, получаемые с их помощью. Такие штаммы можно также использовать для замены капсидов, например, штамм MEF-1, который уже был подвергнут мутации, чтобы содержать мутации, ведущие к фенотипу CAVA-PV (рост при 30°C, фактическое отсутствие роста при 37°C, фиг. 11), можно применять как основу для замены капсида MEF-1 на капсид Mahoney или Saukett путем дополнительной генной инженерии.

Как описано в примере 6 ниже, последовательности, кодирующие капсиды из Mahoney, MEF-1 и Saukett, помещали в исходную последовательность генома CAVA-PV путем замены последовательности, кодирующей капсид CAVA-PV, который соответствует капсиду родительского штамма Brunenders (нук-

леотиды 747-3389 из SEQ ID NO:1). Полученные вакцинные штаммы представляют собой CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett, которые содержат капсиды Mahoney, MEF-1 и Saukett, соответственно. Как описано в примере 7, кинетику роста всех CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett в суспензии клеток PER.C6 (sPER.C6), подходящей производственной линии клеток, сравнивали с ростом родительского штамма Brunenders. Для всех штаммов CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett показана кинетика роста, которая была аналогичной кинетике родительского штамма Brunenders при 30°C. В противоположность этому, при 37°C для штаммов CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett фактически не показана репликация. Такую же кинетику роста наблюдали для первого CAVA-PVBackbone без замены капсида, что демонстрирует, что термочувствительность вирусов связана с мутациями, расположенными вне области капсида.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 следующих положениях по сравнению с геномом штамма Brunenders (SEQ ID NO: 1): 133 (A), 142 (U), 146 (G), 163 (A), 579 (G), 597 (C) и 609 (G) в 5'UTR и 3476 (C), 3486 (G), 3852 (A), 4120 (U), 4253 (C), 4301 (U), 4428 (A), 4563 (A), 4811 (A), 5436 (G), 5705 (A), 6059 (C), 6210 (A), 6488 (C), 6848 (G), 7079 (U) и 7102 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкретных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма PV содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 следующих мутаций по сравнению с геномом штамма Brunenders (SEQ ID NO:1): 133 (A в G), 142 (U в C), 146 (G в A), 163 (A в G), 579 (G в A), 597 (C в U) и 609 (G в A) в 5'UTR и 3476 (C в U), 3486 (G в A), 3852 (A в U), 4120 (U в C), 4253 (C в U), 4301 (U в C), 4428 (A в G), 4563 (A в U), 4811 (A в G), 5436 (G в A), 5705 (A в G), 6059 (C в U), 6210 (A в G), 6488 (C в U), 6848 (G в A), 7079 (U в C) и 7102 (U в C) в неструктурных белках. В определенных вариантах осуществления капсид таких штаммов по сравнению с капсидом Brunenders был заменен капсидом из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett. Аминокислотные последовательности типичных капсидов представлены в данном документе как Mahoney (SEQ ID NO:2), MEF-1 (SEQ ID NO:3) и Saukett (SEQ ID NO:4), и, конечно же, специалист в данной области осознает, что некоторая степень естественной изменчивости является обычной в вирусной популяции.

Специалистам в данной области также будет очевидно, что мутации, выявленные в данном документе для CAVA-PV, можно экстраполировать на другие штаммы полиовируса, поскольку относительно высокая степень гомологии наблюдается между геномами множества различных типов штаммов PV. Таким образом, положения, соответствующие мутациям в CAVA-PV, можно выявить в различных штаммах полиовируса путем выравнивания геномных последовательностей различных штаммов. Фактически, было сделано выравнивание, содержащее примеры всех трех серотипов полиовируса (Toyoda, Kohara et al., 1984). Таким образом, аттенуированный фенотип CAVA-PV можно передать другим штаммам для получения аттенуированного фенотипа CAVA-PV в новых и других исходных последовательностях. Например, определили, что из 31 мутации в CAVA-PV 11 являются уникальными в CAVA-PV и нуклеотиды родительского Brunenders в этих положениях являются консервативными во всех других штаммах PV, используемых для выравнивания (например, нуклеотид 142 представляет собой C (цитидин) в CAVA-PV, но в родительском штамме Brunenders и штаммах Brunhilde, Mahoney, Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, MEF-1 и Saukett нуклеотид в этом положении представляет собой U (уридин)). Кроме того, в CAVA-PV имеется 6 других мутаций, для которых нуклеотиды в родительском Brunenders в этих положениях являются консервативными во всех штаммах PV1, используемых для выравнивания (Brunenders, Brunhilde, Mahoney и Sabin 1). Имеется также 1 мутация, которая является общей для CAVA-PV и Sabin 1, но нуклеотид в этом положении является консервативным во всех других штаммах. В дополнение, в CAVA-PV имеется 6 мутаций в положениях, которые не являются консервативными в других штаммах, используемых для выравнивания.

Исходя из анализа всех мутаций CAVA-PV выявили 14 мутаций, которые, вероятнее всего, будут обеспечивать значительный вклад в термочувствительный (и, следовательно, аттенуированный) фенотип CAVA-PV. Эти 14 мутаций показаны в табл. 4 (см. также пример 10 ниже). Мутации отбирали, исходя из следующих критериев: а) консервативность среди других штаммов PV; б) экспериментальное подтверждение на основе реверсии в клонах после пассирования при 37°C; в) новые мутации в клонах по сравнению с предшествующими популяциями промежуточных пассажей, которые еще были способны к росту при 37°C; и d) мутации, которые вызывают аминокислотные замены, или находящиеся в важнейших структурах РНК (т. е. IRES). Эти 14 мутаций конструировали в исходных последовательностях разных штаммов полиовируса. Таким образом, CAVA-PV по настоящему изобретению может содержать 14 мутаций из табл. 4. CAVA-PV по настоящему изобретению также может содержать 14 мутаций из табл. 4 и необязательно одну или несколько из других 17 мутаций в первом выявленном CAVA-PVBackbone. CAVA-PV по настоящему изобретению может также содержать 14 мутаций из табл. 4 и необязательно

дополнительные другие мутации в геноме по сравнению со штаммом дикого типа. CAVA-PV по настоящему изобретению также может содержать 14 мутаций из табл. 4 и необязательно также может содержать капсид из штамма Mahoney MEF-1 или Saukett. Также будет понятно, что специалист в данной области техники с применением изложенных в данном документе идей сможет получить дополнительные штаммы CAVA-PV, которые имеют только подгруппу из 14 мутаций из табл. 4 (например, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 из них, либо в исходной последовательности штамма Brunenders, либо в соответствующих положениях в исходных последовательностях других штаммов PV), и тестировать такие штаммы в отношении фенотипа CAVA-PV и таким способом потенциально получить дополнительные штаммы CAVA-PV.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 следующих положениях по сравнению с геномом штамма Brunenders (SEQ ID NO:1): 133 (A), 142 (U), 163 (A), 597 (C) и 609 (G) в 5'UTR и 3486 (G), 3852 (A), 4120 (U), 4428 (A), 4563 (A), 5436 (G), 6210 (A), 6848 (G) и 7102 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкретных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма PV содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 следующих мутаций по сравнению с геномом штамма Brunenders (SEQ ID NO: 1): 133 (A в G), 142 (U в C), 163 (A в G), 597 (C в U) и 609 (G в A) в 5'UTR и 3486 (G в A), 3852 (A в U), 4120 (U в C), 4428 (A в G), 4563 (A в U), 5436 (G в A), 6210 (A в G), 6848 (G в A) и 7102 (U в C) в неструктурных белках. В определенных предпочтительных вариантах осуществления капсид таких штаммов был заменен капсидом из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

Рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса по настоящему изобретению также можно получить из штамма полиовируса, иного чем штамм Brunenders (например, штамма Brunhilde, Mahoney, Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, MEF-1 или Saukett, или штаммов, полученных из любого из них, или других штаммов), путем переноса мутаций из CAVA-PV в гомологичные нуклеотиды в геноме другого штамма полиовируса. Кроме того, рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса по настоящему изобретению может быть получен из штамма полиовируса, иного чем штамм Brunenders, и необязательно содержать капсид из другого штамма полиовируса. Поскольку для штаммов PV показана некоторая степень изменчивости длины их геномов, точное положение нуклеотида с мутацией может варьировать при выравнивании последовательностей различных PV. Следовательно, CAVA-мутации несколько отличаются по номеру нуклеотида при экстраполяции из исходной последовательности Brunenders в штамм MEF-1 или другие штаммы полиовируса, в зависимости от того, как выравниваются последовательности. Соответствующие положения нуклеотидов с CAVA-мутациями для штаммов Mahoney (PV1), MEF-1 (PV2), Saukett (PV3), Sabin 1 (PV1), Sabin 2 (PV2) и Sabin 3 (PV3) в сравнении с нумерацией для штамма Brunenders представлены в данном документе (табл. 4).

Таким образом, в качестве дополнительного неограничивающего примера в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 следующих положениях по сравнению с геномом штамма MEF-1 (SEQ ID NO:5): 134 (A), 143 (U), 164 (A), 598 (C) и 610 (G) в 5'UTR и 3481 (A), 3847 (A), 4115 (U), 4423 (A), 4558 (A), 5431 (G), 6205 (A), 6843 (G) и 7097 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме MEF-1 указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкретных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 следующих мутаций по сравнению с геномом штамма MEF-1 (SEQ ID NO: 5): 134 (A в G), 143 (U в C), 164 (A в G), 598 (C в U) и 610 (G в A) в 5'UTR и 3481 (A в A), 3847 (A в U), 4115 (U в C), 4423 (A в G), 4558 (A в U), 5431 (G в A), 6205 (A в G), 6843 (G в A) и 7097 (U в C) в неструктурных белках. В определенных вариантах осуществления капсид таких штаммов можно заменить капсидом из штамма Mahoney или из штамма Saukett.

В дополнительных неограничивающих примерах в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 следующих положениях по сравнению с геномом штамма Mahoney (SEQ ID NO: 6): 131 (A), 140 (U), 161 (A), 593 (C) и 605 (G) в 5'UTR и 3482 (G), 3848 (A), 4116 (U), 4424 (A), 4559 (A), 5432 (G), 6206 (A), 6844 (G) и 7098 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме Mahoney указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкрет-

ных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 следующих мутаций по сравнению с геномом штамма Mahoney (SEQ ID NO: 6): 131 (А в G), 140 (U в C), 161 (А в G), 593 (С в U) и 605 (G в А) в 5'UTR и 3482 (G в А), 3848 (А в U), 4116 (U в C), 4424 (А в G), 4559 (А в U), 5432 (G в А), 6206 (А в G), 6844 (G в А) и 7098 (U в C) в неструктурных белках. В определенных вариантах осуществления капсид таких штаммов можно заменить капсидом из штамма MEF-1 или из штамма Saukett.

В других дополнительных неограничивающих примерах в настоящем изобретении предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 следующих положениях по сравнению с геномом штамма Saukett (SEQ ID NO: 7): 133 (А), 142 (U), 163 (А), 596 (С) и 608 (G) в 5'UTR и 3472 (А), 3839 (А), 4107 (U), 4415 (А), 4550 (А), 5423 (G), 6197 (А), 6835 (G) и 7089 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме Saukett указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкретных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 следующих мутаций по сравнению с геномом Saukett (SEQ ID NO: 7): 133 (А в G), 142 (U в C), 163 (А в G), 596 (С в U) и 608 (G в А) в 5'UTR и 3472 (А в А), 3839 (А в U), 4107 (U в C), 4415 (А в G), 4550 (А в U), 5423 (G в А), 6197 (А в G), 6835 (G в А) и 7089 (U в C) в неструктурных белках. В определенных вариантах осуществления капсид таких штаммов можно заменить капсидом из штамма MEF-1 или Mahoney.

В других дополнительных неограничивающих примерах в настоящем изобретении предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 следующих положениях по сравнению с геномом штамма Sabin 3 (SEQ ID NO: 8): 133 (А), 142 (U), 163 (G), 596 (С) и 608 (G) в 5'UTR и 3473 (А), 3839 (А), 4107 (U), 4415 (А), 4550 (А), 5423 (G), 6197 (А), 6835 (G) и 7089 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме Sabin 3 указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкретных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 следующих мутаций по сравнению с геномом Sabin 3 (SEQ ID NO: 8): 133 (А в G), 142 (U в C), 163 (G в G), 596 (С в U) и 608 (G в А) в 5'UTR и 3473 (А в А), 3839 (А в U), 4107 (U в C), 4415 (А в G), 4550 (А в U), 5423 (G в А), 6197 (А в G), 6835 (G в А) и 7089 (U в C) в неструктурных белках. В определенных вариантах осуществления капсид таких штаммов можно заменить капсидом из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

В дополнительных неограничивающих примерах в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 следующих положениях по сравнению с геномом штамма Sabin 1 (SEQ ID NO: 9): 131 (А), 140 (U), 161 (А), 593 (С) и 605 (G) в 5'UTR и 3482 (G), 3848 (А), 4116 (С), 4424 (А), 4559 (А в U), 5432 (G), 6206 (А), 6844 (G) и 7098 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме Sabin 1 указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкретных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 следующих мутаций по сравнению с геномом Sabin 1 (SEQ ID NO: 9): 131 (А в G), 140 (U в C), 161 (А в G), 593 (С в U) и 605 (G в А) в 5'UTR и 3482 (G в А), 3848 (А в U), 4116 (С в C), 4424 (А в G), 4559 (А в U), 5432 (G в А), 6206 (А в G), 6844 (G в А) и 7098 (U в C) в неструктурных белках. В определенных вариантах осуществления капсид таких штаммов можно заменить капсидом из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

В дополнительных неограничивающих примерах в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 следующих положениях по сравнению с геномом штамма Sabin 2 (SEQ ID NO: 10): 131 (А), 140 (U), 161 (А), 594 (С) и 606 (G) в 5'UTR и 3481 (G), 3847 (А), 4115 (U), 4423 (А), 4558 (А), 5431 (G), 6205 (А), 6844 (G) и 7098 (U) в неструктурных белках (нуклеотид в родительском штамме Sabin 2 указан в скобках после его положения и, таким образом, он подвергается мутации в другой нуклеотид в данном варианте осуществления). В определенных конкретных вариантах его осуществления геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 следующих мутаций по сравнению с геномом Sabin 2 (SEQ ID NO:

10): 131 (А в G), 140 (U в C), 161 (А в G), 594 (С в U) и 606 (G в А) в 5'UTR и 3481 (G в А), 3847 (А в U), 4115 (U в C), 4424 (А в G), 4559 (А в U), 5432 (G в А), 6206 (А в G), 6844 (G в А) и 7098 (U в C) в неструктурных белках. В определенных вариантах осуществления капсид таких штаммов можно заменить капсидом из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

В настоящем изобретении также предусмотрен рекомбинантный аттенуированный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, где геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса содержит следующие нуклеотиды по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 следующих положениях по сравнению с геномом исходного штамма полиовируса (где исходный штамм полиовируса представляет собой, например, штамм Brunenders/MEF-1/Mahoney/Saukett/Sabin 3/Sabin 2/Sabin 1, соответственно, с соответствующими последовательностями генома, такими как, например, SEQ ID NO: 1/5/6/7/8/9/10): G в положении 133/134/131/133/133/131/131, C в положении 142/143/140/142/142/140/140, G в положении 163/164/161/163/163/161/161, U в положении 597/598/593/596/596/593/594 и А в положении 609/610/605/608/608/605/606 в 5'UTR и А в положении 3486/3481/3482/3473/3473/3482/3481, U в положении 3852/3847/3848/3839/3839/3848/3847, C в положении 4120/4115/4116/4107/4107/4116/4115, G в положении 4428/4423/4424/4415/4415/4424/4423, U в положении 4563/4558/4559/4550/4550/4559/4558, А в положении 5436/5431/5432/5423/5423/5423/5431, G в положении 6210/6205/6206/6197/5197/6206/6205, А в положении 6848/6843/6844/6835/6835/6844/6843 и C в положении 7102/7097/7098/7089/7089/7098/7097 в неструктурных белках или в соответствующих положениях в других исходных штаммах PV, исходя из выравнивания с последовательностями этих четырех штаммов. В определенных вариантах осуществления капсид таких штаммов содержит последовательность капсида из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett.

Таким образом, в настоящем изобретении также предусмотрены дополнительные способы для создания штаммов CAVA-PV путем введения мутаций (например, с помощью традиционной генной инженерии или с помощью синтеза de novo полных геномов полиовируса) в геном полиовируса дикого типа (например, штаммов Brunenders, Mahoney, MEF-1, Saukett или других PV), так что геном содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13 или 14 следующих нуклеотидов в следующих положениях: G в положении 133, C в положении 142, G в положении 163, U в положении 597 и А в положении 609 в 5'UTR и А в положении 3486, U в положении 3852, C в положении 4120, G в положении 4428, U в положении 4563, А в положении 5436, G в положении 6210, А в положении 6848 и C в положении 7102 в неструктурных белках со ссылкой на штамм Brunenders (SEQ ID NO: 1), или в соответствующих положениях в других штаммах PV, например, как представлено в табл. 4.

Рекомбинантные аттенуированные штаммы CAVA-PV по настоящему изобретению, как правило, являются также генетически стабильными при предполагаемых условиях производства и вследствие их неспособности к репликации при физиологических условиях 37°C весьма маловероятной является их реверсия в нейровирулентную форму при случайном инфицировании и/или утечке из предприятия-изготовителя. Последовательное пассирование штаммов CAVA-PV при 37°C всегда приводит к невозможности количественной оценки вируса после первого пассажа, что указывает на невозможность реверсии при такой температуре даже после более чем 10 слепых пассажей для восстановления способности к репликации при 37°C. Это обуславливает преимущество CAVA-PV над другими аттенуированными штаммами, которые способны к репликации при физиологической температуре. Таким образом, CAVA-PV обеспечивает разработку IPV-вакцин с более безопасными процедурами производства вакцины при потенциально более слабыми барьерами биоизоляции вследствие сниженного риска потенциальных всплесков заболевания в случае промышленных аварий. Таким образом, присущая CAVA-PV безопасность в качестве основы IPV может помочь контролировать затраты на производство IPV, а также может обеспечивать возможность производства в странах, где производство с применением PV дикого типа ограничено или представляет высокий риск. Кроме того, штаммы CAVA-PV можно выращивать в суспензионных культурах клеток PER.C6 при высокой плотности, что обеспечивает высокие выходы, и, следовательно, применение этой производственной линии клеток также может способствовать значительному снижению затрат на производство IPV по сравнению с другими линиями клеток. См., например, патент США № 8546123 и Sanders, Edo-Matas et al. (2012).

Штаммы CAVA-PV можно размножать с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области. Например, CAVA-PV можно размножать путем культивирования в подходящей линии клеток (например, PER.C6 или клетках Vero, клетках HEK293, HeLa, L20B и т.д.) и при подходящих температурах (например, 20-33°C, 26-33°C, 28-32°C или предпочтительно при приблизительно 30°C). Пригодные среды для культивирования таких линий клеток широко известны и доступны от различных производителей. Предпочтительно, применяют бессывороточные среды, а в определенных вариантах осуществления клетки культивируют в суспензии. Сбор вируса обычно выполняют при достижении максимального титра, он зависит от применяемой MOI и температуры инкубации. В общем случае при MOI 1 максимальный титр будет достигнут через 12-48 ч после заражения (hpi), например, через 18-30 hpi, например, через приблизительно 24 hpi при 30°C.

Способы сбора и очистки полиовируса или вирусных компонентов, а также производства вакцин из них применяются в данной области техники в течение многих десятилетий, и, таким образом, они хорошо известны и были подробно описаны, см., например, WO 2007/007344; патент США № 4525349 и (van Wezel, van Steenis et al., 1978, Montagnon, Fanget et al., 1984), все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В большинстве случаев, каждый штамм полиовируса культивируют в отдельном процессе, и если, например, получают трехвалентную вакцину, содержащую три типа полиовируса, вирусы (инактивированные в случае IPV) смешивают и составляют для приготовления индивидуальных дозировок. В определенных вариантах осуществления, например, доза окончательной вакцины, к примеру, может содержать различные количества каждого CAVA-PV. В определенных вариантах осуществления такие действия можно производить со CAVA-штаммами типа 1 (CAVA-PVMahoney), типа 2 (CAVA-PVMEF-1) и типа 3 (CAVA-PVSaukett). В определенных вариантах осуществления доза окончательной вакцины (например, 0,5 мл), к примеру, может содержать 10-80, например 40, D-антигенных единиц (DU) типа 1, 2-20, например 8 DU типа 2, и 8-64, например 32 DU типа 3, как определено путем сравнения с эталонными препаратами.

Инактивацию CAVA-PV можно выполнить в соответствии со способами, которые хорошо известны специалистам в данной области, например, формалином или  $\beta$ -пропиолактоном (BPL), см., например, (Jiang, Pye et al., 1986). В определенных вариантах осуществления инактивацию выполняют формалином, например, следующим способом: очищенную вирусную суспензию фильтруют через мембрану 0,22  $\mu$ m, нагревают до 37°C при постоянном перемешивании магнитной мешалкой в течение 24 ч, после чего добавляют раствор формалина до достижения концентрации 1 к 4000. Поддерживая вирусную суспензию при 37°C, перемешивание магнитной мешалкой продолжают в течение первых четырех дней. На шестой день вирусную суспензию фильтруют через мембрану 0,22 мкм, и инактивацию продолжают в суспензии при 37°C до двенадцатого дня. Инактивированную вирусную суспензию гомогенизируют и могут хранить, например, при 4°C. После этой стадии можно готовить концентрированные и/или конечные партии для введения, например, путем смешивания необходимых препаратов.

В определенных вариантах осуществления очищенный CAVA-PV или вирусный компонент составляют в виде фармацевтической композиции. Это можно осуществлять в соответствии с различными способами и с применением различных буферов, все в соответствии с традиционными способами, хорошо известными специалисту в данной области, после рассмотрения настоящего раскрытия. В целом, это предусматривает введение вирусных частиц в фармацевтически приемлемой композиции, содержащей полиовирус и по меньшей мере фармацевтически приемлемый наполнитель. Такая композиция может быть получена в условиях, известных специалисту в данной области, и в определенных вариантах осуществления она пригодна для введения человеку. В определенных вариантах осуществления композиция может содержать забуференную среду для культивирования, которая может необязательно представлять собой среду M-199, которую применяют в качестве буфера для составления в некоторых зарегистрированных традиционных IPV. Кроме того, можно применять фосфатно-солевой буфер, и конечные дозированные формы могут содержать, например, 0,5% 2-феноксиэтанола и максимум 0,02% формальдегида на дозу в качестве антимикробных консервантов.

Фармацевтически приемлемые носители или наполнители и разбавители хорошо известны из уровня техники и широко используются в целом ряде терапевтических продуктов. Предпочтительно, применяются носители, которые хорошо подходят для вакцин. В определенных вариантах осуществления вакцины дополнительно содержат адъювант, например, квасцы. Адъюванты, как известно из уровня техники, дополнительно повышают иммунный ответ в отношении применяемой антигенной детерминанты.

Для введения человеку в настоящем изобретении могут быть использованы фармацевтические композиции, содержащие CAVA-PV и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В настоящем контексте выражение "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или наполнитель в используемых дозировках и концентрациях не вызовет каких-либо нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны из уровня техники.

Очищенный инактивированный CAVA-PV или его иммуногенные части предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора. Стерильные растворы можно получать, например, путем стерильной фильтрации или с помощью других способов, известных из уровня техники. Затем растворы лиофилизируют или расфасовывают в контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. Значение pH раствора обычно находится в диапазоне pH 3,0-9,5, например, pH 5,0-7,5. Полиовирус или его иммуногенные части, как правило, находятся в растворе с подходящим фармацевтически приемлемым буфером, и раствор полиовируса может также содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления вакцину можно составлять в виде инъекционного препарата. Эти составы, содержащие эффективные количества полиовируса или его иммуногенных частей, представляют собой либо стерильные жидкие растворы, жидкие суспензии, либо лиофилизированные

варианты, и они необязательно содержат стабилизаторы или наполнители.

Вакцина с CAVA-PV, получаемая в соответствии с настоящим изобретением, может быть моновалентной, содержащей один тип полиовируса (тип 1, 2 или 3), или бивалентной (содержащей два типа полиовируса, например, типы 1 и 2, 1 и 3 или 2 и 3), или трехвалентной (содержащей три типа полиовируса, например, типы 1, 2 и 3).

Кроме того, в дополнение к применению в качестве самостоятельно применяемой IPV, IPV на основе CAVA-PV, получаемые в соответствии со способами по настоящему изобретению, можно комбинировать с другими вакцинами обычным способом, например, в форме комбинированной вакцины, которая может необязательно включать дополнительные вакцинные компоненты, например, против одного или нескольких из дифтерии, столбняка, коклюша, *Neamophilus influenzae* типа b (Hib), вируса гепатита В (HBV) и т. д., как это обычно делается для традиционной IPV (см., например, "Vaccines." 5-е изд. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Раздел 2, относительно различных компонентов и комбинированных вакцин; например, в Главе 25 описаны IPV-вакцины [Plotkin, pp. 605-630]. Таким образом, вакцина с CAVA-PV, получаемая в соответствии с настоящим изобретением, пригодна для применения в расширенной программе иммунизации (EPI) и может комбинироваться с вакцинами в этой программе. Подобно традиционной IPV вакцина с CAVA-PV в соответствии с настоящим изобретением может быть вводиться в виде однократной дозы или, предпочтительно, по схеме "прайм-буст", при которой несколько доз вакцины вводят с соответствующими интервалами времени. Например, согласно рекомендациям WHO для стран с высоким уровнем охвата вакцинацией (>90%), график может включать первичную серию из трех доз, начиная с 2-месячного возраста (например, в 2, 3 и 4 месяца). В дополнение к этому, если первичная серия начинается раньше (например, с 6-, 10- и 14-недельным графиком), может вводиться бустер-доза после интервала по меньшей мере 6 месяцев, т. е. четырехдозовый график. Кроме того, вакцину с CAVA-PV в соответствии с настоящим изобретением можно также использовать в комбинации с OPV, как было предложено WHO для применения традиционной IPV. Например, WHO рекомендует, чтобы все страны, в настоящее время применяющие только OPV, добавляли в график по меньшей мере 1 дозу IPV. В эндемичных по полиомиелиту странах и в странах с высоким риском ввоза и последующего распространения WHO также рекомендует дозу OPV при рождении (также называемую 'нулевой дозой') с последующей первичной серией из 3 доз OPV и по меньшей мере 1 дозой IPV. В конечном счете, оптимальный режим дозирования может определяться в соответствии со стандартной медицинской практикой и, как правило, будет следовать тем же режимам, которые приняты для доступных IPV.

Специалистам в данной области также будет очевидно, что терапевтически эффективное количество вакцины с CAVA-PV, получаемую в соответствии с настоящим изобретением, будет зависеть от графика введения, стандартной дозы вводимого рекомбинантного вируса, от того, вводится ли рекомбинантный аттенуированный полиовирус в комбинации с другими терапевтическими средствами, и от статуса и состояния здоровья пациента.

Настоящее изобретение также включает в себя набор для введения композиции, содержащей вакцину с CAVA-PV, получаемую в соответствии с настоящим изобретением, и фармацевтически приемлемый носитель. Набор содержит рекомбинантный аттенуированный полиовирус, раскрываемый в данном документе. Набор может необязательно дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, аппликатор, такой как шприц, и инструкционный материал для их применения. Инструкции могут содержать любую применимую информацию, в которой содержатся инструкции по введению рекомбинантного аттенуированного полиовируса или по размножению вируса.

Различные публикации, которые могут включать в себя патенты, опубликованные заявки, технические статьи и научные статьи, процитированы в данном описании в скобках, а полные библиографические данные каждой из них могут быть найдены в конце описания. Каждая из этих процитированных публикаций включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Другие варианты осуществления, признаки и преимущества настоящего изобретения дополнительно проиллюстрированы со ссылкой на следующие примеры.

### Примеры

Без дополнительного описания полагают, что обычный специалист в данной области может с применением предшествующего описания и следующих иллюстративных примеров выполнить и использовать настоящее изобретение и осуществлять на практике заявленные способы. Следующие рабочие примеры, следовательно, конкретно указывают на определенные варианты осуществления настоящего изобретения и не должны быть истолкованы как ограничивающие каким-либо образом остальную часть настоящего раскрытия.

**Пример 1.** Способ аттенуации вируса путем холодовой адаптации (CAVA) и получение CAVA-полиовируса (CAVA-PV).

В случае данного примера родительский штамм Brunenders последовательно пассировали 34 раза в клетках PER.C6 при низкой температуре (<30°C) и при низкой MOI (0,01) в среде Permexis™ (бессывороточная среда с определенным химическим составом, например, доступна от Lonza, кат. № BE02-039Q), дополненной 4 mM L-глутамин. Полученную вирусную популяцию анализировали для выявления термочувствительных вирусных клонов в популяции с нарушенным ростом при физиологических

температурах (37°C) и ростом дикого типа при низкой температуре (30°C). При скрининге приблизительно 1000 клонов обнаружили 3 клона (названные G12P5, F9P4 и G11P3), для которые показана термочувствительность с нарушенным ростом при 37°C. Нарушенный рост определяли как 100-1000-кратное снижение максимального титра по сравнению с родительским вирусом. Эти 3 клона все еще были способны к репликации при физиологической температуре, но при пониженных титрах. Кинетика роста этих 3 клонов при низкой температуре (30°C) была ускоренной по сравнению с исходным родительским штаммом. Термочувствительные клоны секвенировали и в трех различных клонах обнаружили в общей сложности 31 мутацию. Каждый клон имел 18 нуклеотидных мутаций, некоторые из которых были общими для различных клонов, а некоторые были уникальными для каждого клона.

Для создания нового рекомбинантного штамма полиовируса, названного в данном документе полиовирусом с аттенуацией вируса путем холодовой адаптации (CAVA-PV), все 31 мутацию, выявленные в 3 клонах, комбинировали в одном геноме с применением последовательности родительского Brunenders в качестве остова. Последовательность родительского Brunenders представлена в данном документе как SEQ ID NO:1. Синтезировали последовательность CAVA-PV и CAVA-PVBackbone подвергали "спасению". Коротко, последовательность для рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса CAVA-PVBackbone получали искусственным путем в форме кДНК-плазмиды, в которой последовательность вирусного генома расположена непосредственно ниже промотора фага T7, который необходим для выработки вирусной РНК. Для "спасения" кДНК-плазмиду, содержащую последовательность генома CAVA-PVBackbone, применяли в качестве матрицы для *in vitro* транскрипции, опосредованной полимеразой T7, с получением вирусной РНК, которую в дальнейшем применяли для трансфекции клеток и "спасения" вируса. Данная процедура "спасения" часто применяется в данной области техники, см., например, (van der Werf, Bradley et al., 1986). В табл. 1 показана 31 мутация, которые комбинировали с получением CAVA-PVBackbone. На фиг. 1 представлен схематический обзор способа CAVA и того, как получали первый CAVA-PV.

Пример 2. Кинетика роста CAVA-PVBackbone в клетках SPER.C6 по сравнению с другими штаммами PV типа 1.

Кинетику роста CAVA-PVBackbone в суспензии клеток PER.C6 (SPER.C6), производственной линии клеток, сравнивали с ростом других штаммов PV типа 1 (PV1) при 30 и 37°C. Другими штаммами PV1 были Brunhilde, Brunenders, Mahoney и Sabin 1. Brunhilde является родительским штаммом для Brunenders, который, в свою очередь, является родительским штаммом для CAVA-PVBackbone.

Mahoney представляет собой нейровирулентный штамм PV дикого типа, который обычно применяют в качестве вакцинного штамма для компонента типа 1 в IPV Солка. Sabin 1 представляет собой аттенуированный штамм, применяемый в качестве вакцинного штамма для живой аттенуированной пероральной полиомиелитной вакцины (OPV). Суспензия клеток PER.C6 в момент инфицирования характеризовалась плотностью клеток  $10 \times 10^6$  клеток/мл в среде Permexcis, дополненной 4 mM L-глутамина. Клетки инфицировали при MOI 2, инфицирование выполняли однократно (N=1). Сбор вируса титровали с применением анализа TCID<sub>50</sub> при 30°C для определения инфекционной дозы, при которой для 50% образцов показано инфицирование (CPE), что представляет собой 50% инфекционную дозу культуры тканей (TCID<sub>50</sub>) на мл. Линейные графики кинетики репликации в клетках SPER.C6 показаны на фиг. 2. Для CAVA-PVBackbone показана кинетика роста дикого типа или даже ускоренный рост по сравнению с другими штаммами PV1 при 30°C. В противоположность этому, при 37°C CAVA-PVBackbone неожиданно фактически не наблюдается репликации, что указывает на синергический кумулятивный эффект от комбинирования мутаций из 3 различных термочувствительных клонов. Все другие штаммы PV1 реплицировались нормально и для них наблюдалось сходное ростовое поведение в клетках SPER.C6 при 37°C.

Кинетику роста CAVA-PV и Brunenders в клетках SPER.C6 дополнительно оценивали в трех независимых экспериментах и средний титр при 30°C и 37°C нанесли на график в зависимости от времени. Средний титр изображен на графике на фиг. 3 с усами, представляющими стандартное отклонение от среднего значения. Кривые роста демонстрируют сходную кинетику для обоих вирусов при 30°C, но при 37°C CAVA-PVBackbone не реплицируется; только введенный вирус измеряется во время этого анализа. Для родительского штамма Brunenders не показано нарушение роста при 37°C. Средний максимальный титр CAVA-PVBackbone при 30°C составил  $9,82 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{мл}$ , что аналогично титрам, достигнутым штаммами дикого типа на клетках SPER.C6 (Sanders, Edo-Matas et al., 2012).

Пример 3. Кинетика роста CAVA-PVBackbone в различных линиях клеток по сравнению с исходным вирусом Brunenders.

Успешное инфицирование представляет собой сложное взаимодействие между вирусом и клеткой-хозяином, следовательно, на термочувствительность могут воздействовать факторы клетки-хозяина. Таким образом, панель различных линий клеток млекопитающих исследовали в отношении вирусного роста для подтверждения неспособности CAVA-PVBackbone к репликации в физиологических условиях.

На фиг. 4, 5 и 6 показана кинетика репликации CAVA-PVBackbone и Brunenders в клетках HEK293, L20B и HeLa, соответственно. Для каждой линии клеток  $1 \times 10^6$  клеток инфицировали при трех различных температурах (30°C, 37°C и 39,5°C) из расчета MOI 2 в среде DMEM +1% BCS. Вирусные титры

количественно оценивали с помощью анализа бляшкообразования на клетках HelaR19 при 30°C, что приводило к числу бляшкообразующих единиц (PFU) в вирусном сборе. Результаты подтверждают, что CAVA-PVBackbone не реплицируется при 37°C или 39,5°C во всех трех линиях клеток. Однако при 30°C кинетика роста CAVA-PVBackbone аналогична таковой у родительского штамма PV Brunenders. Для вируса Brunenders не наблюдалось нарушения репликации в любой линии клеток при любой температуре, но титры были несколько ниже при 39,5°C по сравнению с более низкими температурами.

На фиг. 7, 8 и 9 показана кинетика репликации CAVA-PVBackbone и Brunenders в клетках Vero, SK-N-MC и прикрепленных клетках PER.C6 (adPER.C6), соответственно. Эти инфицирования выполняли либо при 30°C, либо при 37°C из расчета MOI 2 в среде MEM +5% FBS (клетки Vero и SK-N-MC) или DMEM+10%FBS + 4, 9 mM MgCl<sub>2</sub> (adPER.C6). Сборы вирусов титровали с применением анализа TCID<sub>50</sub> при 30°C. Результаты для Vero и adPER.C6 совпадают с тем, что наблюдалось ранее: для CAVA-PVBackbone наблюдалась репликация только при 30°C, сравнимая с таковой у штамма Brunenders. В свою очередь, при 37°C наблюдается отсутствие репликации.

В линии клеток SK-N-MC (Фиг. 8) CAVA-PVBackbone не был способен к репликации при обеих температурах. Эта линия клеток представляет собой линию нервных клеток человека, полученную из нейроэпителиомы, и она применялась в качестве *in vitro* модели нейровирулентности (Jahan, Wimmer et al., 2011). Хотя это не является валидированным прогностическим *in vitro* анализом нейроаттенуации штамма вируса, ингибированный вирусный рост CAVA-PVBackbone в данной линии клеток как при 30°C, так и при 37°C может указывать на неспособность к репликации в линиях нервных клеток и прогнозирует нейроаттенуацию.

Пример 4. Тестирование нейровирулентности в трансгенных по CD155 мышах.

Чтобы определить, приводит ли *in vitro* термочувствительный фенотип к нейроаттенуации, применяли *in vivo* модель на трансгенных по CD155 мышах (Koike, Taya et al., 1991). Трансгенные по CD155 мыши являются генетически модифицированными для экспрессии полиовирусного рецептора (PVR или CD155), что приводит к восприимчивости мышей к инфекции PV. Мышей CD155 инфицировали CAVA-PV и другими wybranymi штаммами PV. Мышей инфицировали интрацеребрально (i.c.), внутримышечно (i.m.) или внутривбрюшинно (i.p.) различными дозами для определения (паралитической или) летальной дозы 50 ((P)LD<sub>50</sub>), что соответствует числу инфекционных единиц (выраженных в TCID<sub>50</sub>), необходимых, чтобы вызвать паралич или гибель 50% мышей в данной тестируемой группе. Чем ниже (P)LD<sub>50</sub>, тем более нейровирулентным является вирус. В табл. 2 показаны результаты теста на *in vivo* нейровирулентность. Для CAVA-PV (активные CAVA-PVBackbone, CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett) максимальное количество вируса, введенное мышам, не приводило ни к каким признакам паралича у любой из инъецированных мышей, следовательно, данная (P)LD<sub>50</sub> превышает (>) максимальную дозу, которая могла быть введена. В качестве показателя нейровирулентности также определяли (P)LD<sub>50</sub> других вирусов PV. Brunenders и Brunhilde являются родительскими штаммами для CAVA-PV, тогда как вирусы Mahoney, MEF-1, Saukett и Sabin являются вакцинными штаммами IPV и OPV, соответственно. Mahoney является наиболее вирулентным вирусом, с которым следуют штаммы Brunhilde, Saukett, Brunenders, MEF-1 и Sabin. Это совпадает с данными по нейровирулентности для этих штаммов из литературы. Штаммы CAVA-PV являются менее нейровирулентными, чем любой из штаммов дикого типа. CAVA-PV являются по меньшей мере в 1 миллион раз более аттенуированными, чем Mahoney при интрацеребральном пути введения (наиболее чувствительный путь, применяемый в данном документе для измерения способности вируса разрушать нервные клетки и вызывать паралич). CAVA-PV являются по меньшей мере в 100 раз более аттенуированными, чем Brunenders, который является частично аттенуированным штаммом. Чтобы выяснить, являются ли штаммы CAVA более аттенуированными, чем Sabin, необходимо применить более чувствительную модель для определения нейровирулентности, поскольку данная модель не является достаточно чувствительной, чтобы обнаруживать различия для штаммов Sabin и CAVA. Однако штаммы Sabin вызывали паралич у некоторых мышей, которым вводили самые высокие дозы, тогда как штаммы CAVA не вызывали.

Значения (P)LD<sub>50</sub> для двух известных аттенуированных вирусов (RIPO и Sabin 1) по сообщениям составляли >108 и 5×10<sup>7</sup> PFU, соответственно, на той же модели нейровирулентности (Bouchard, Lam et al., 1995, Jahan, Wimmer et al., 2011). Однако эти значения не были определены в одном эксперименте, поэтому следует проявлять осторожность при прямом сравнении этих значений (P)LD<sub>50</sub>. Штамм RIPO представляет собой аттенуированный онколитический штамм полиовируса, лицензированный для применения в клинических испытаниях для лечения злокачественной глиомы (Jahan, Wimmer et al., 2011). Штаммы CAVA-PV ведут себя таким же образом, как эти аттенуированные штаммы. Фактически, ни у одной мыши, инфицированной самой высокой из возможных доз штамма CAVA-PV, не наблюдалось никаких признаков заболевания, тогда как это не является обязательным для других аттенуированных вирусов (например, Sabin 1, который является компонентом типа 1 для OPV, лицензированной живой аттенуированной вакцины, вводимой миллионам детей в год). Таким образом, на данной модели нейровирулентности показано, что CAVA-PV является высоко аттенуированным.

Пример 5. Генетическая стабильность CAVA-PV в производственных условиях.

Штамм CAVA-PVBackbone пассировали в малом масштабе при предполагаемых условиях производства (клетки SPER.C6 при плотности клеток  $10 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в среде Permethcis, при MOI 1, при 30°C) и собирали через 24 hpi. Пассирование выполняли 8 раз, что представляет собой 5 пассажей после теоретической коммерческой производственной партии. После этих пассажей секвенировали геном целиком. Ни одна из 31 мутации, которые были введены в вирус, не подвергались реверсии. Геном целиком после пассирования был идентичен исходному материалу за исключением одного нуклеотида, при этом наблюдали смешанную популяцию для нуклеотида 5206 в гене 3A, что вызывало аминокислотную замену. Из-за большой частоты ошибок у РНК-полимеразы полиовирусов мы предполагаем, что данная мутация является случайной и не вызывает какой-либо реверсии термочувствительного (и аттенуированного) фенотипа. Впоследствии мы подтвердили термочувствительный фенотип путем проведения анализа кинетики репликации, и наблюдали, что после 8 пассажей для CAVA-PV наблюдались аналогичные кривые роста по сравнению с исходным материалом CAVA-PV как при 30°C, так и при 37°C (фиг. 10). Таким образом, термочувствительный фенотип CAVA-PVBackbone, *in vitro* признак нейроаттенуации, является стабильным после многократных пассажей в условиях производства. Это сделает CAVA-PV пригодным для применения в производственном процессе получения партий для коммерческого применения.

Такие же тестирования генетической стабильности выполняли с применением предполагаемых вакцинных штаммов, а именно, CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett. В данном случае вирусы пассировали трижды ( $n=3$ ) в малом масштабе при предполагаемых условиях производства (клетки SPER.C6 при плотности клеток  $10 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в среде Permethcis, при MOI 1, при 30°C и собирали через 24 hpi). Число пассажей составило 5, что представляет собой два пассажа после теоретической коммерческой партии. На фиг. 11 изображен *in vitro* фенотип всех пассажей вируса по сравнению с исходным материалом. Все вирусы сохранили свой термочувствительный фенотип, а также свою *in vivo* аттенуацию, при этом значения PLD50 все еще составляли  $>108$  для трех серотипов после продолжительного пассирования.

Секвенирование пассированных вирусов, изображенных на фиг. 11, показало, что возникло лишь несколько мутаций и, как описано выше, эти мутации не повлияли на аттенуацию *in vivo* и *in vitro*.

Пример 6. Введение антигенного профиля традиционной IPV в CAVA-PV.

Для создания IPV на основе CAVA-PV, которая может проявлять такой же иммунный профиль, что и традиционная IPV, последовательности, кодирующие капсиды некоторых иллюстративных вирусов, помещали в исходную последовательность генома CAVA-PV путем замены последовательности, кодирующей оригинальный капсид CAVA-PVBackbone. Данная замена капсида приводит к удалению 7 из 31 мутации, преднамеренно сконструированных в CAVA-PV. Вначале замены капсидов разрабатывают *in silico*, а затем получают ДНК путем химического синтеза новых геномов. После синтеза плазмидной ДНК (выполнено на заказ в Genscript) ее применяли для создания вирусной РНК с помощью *in vitro* транскрипции и последующего "спасения" различных новых рекомбинантных CAVA-PV путем трансфекции. Полученные вакцинные штаммы назвали CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett, которые содержали капсиды Mahoney, MEF-1 и Saukett, соответственно. Типичные аминокислотные последовательности капсидов представлены в данном документе для штамма PV типа 1 Mahoney (SEQ ID NO:2), штамма PV типа 2 MEF-1 (SEQ ID NO:3) и штамма PV типа 3 Saukett (SEQ ID NO:4). На фиг. 12 показан схематический обзор этих различных вакцинных штаммов CAVA-PV.

Пример 7. Кинетика роста CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett в клетках SPER.C6 по сравнению с родительским штаммом Brunenders.

Кинетику роста CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett в суспензии клеток PER.C6 (SPER.C6), производственной линии клеток, сравнивали с ростом PV1 Brunenders при 30 и 37°C. В момент инфицирования суспензия клеток PER.C6 имела плотность клеток  $10 \times 10^6$  клеток/мл в среде Permethcis, дополненной 4 mM L-глутамин. Клетки инфицировали из расчета MOI 1, инфицирования выполняли дважды в случае CAVA-PVSaukett и Brunenders ( $N=2$ ) и трижды в случае CAVA-PVMahoney и CAVA-PVMEF-1 ( $N=3$ ). Сборы вирусов титровали с применением анализа TCID50 при 30°C. Линейные графики для кинетики репликации в клетках SPER.C6 показаны на фиг. 13. Для CAVA-PV наблюдали кинетику роста дикого типа по сравнению с родительским штаммом Brunenders при 30°C, при этом усы обозначают стандартное отклонение от среднего. В противоположность этому, при 37°C для CAVA-PV не фактически не показано репликации, что наблюдалось также в случае CAVA-PVBackbone, это указывает на то, что термочувствительность вирусов связана с мутациями вне области капсида. Штамм Brunenders реплицировался нормально, и аналогичное ростовое поведение наблюдалось в клетках SPER.C6 при 37°C.

Средний максимальный титр CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett при 30°C составил 9,94, 9,91 и 9,74 Log<sub>10</sub> TCID50/мл, соответственно, что аналогично титрам, достигаемым штаммами дикого типа на клетках SPER.C6 (Sanders, Edo-Matas et al., 2012).

Пример 8. *In vitro* антигенное содержание CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett в клетках SPER.C6 по сравнению со штаммами Mahoney, MEF-1 и Saukett традиционных IPV.

Дозирование IPV основано на D-антигенных единицах (DU), которые количественно оценивают с помощью ELISA в отношении *in vitro* D-антигена (Beale, 1961), выполняемого как описано в фармакопейной статье 0214 Европейской фармакопеи. Для IPV дикого типа одна доза вакцины должна содержать 40, 8 и 32 DU для инактивированных вирусов Mahoney, MEF-1 и Saukett, соответственно, что соответствует дозе, которая будет индуцировать защитный иммунный ответ у реципиентов вакцины (Grassly, 2014). Содержание D-антигена и, следовательно, опосредованно, иммуногенную эффективность активных вирусов CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett количественно оценивали с помощью анализа ELISA в отношении D-антигена и сравнивали с штаммами традиционных IPV, Mahoney, MEF-1 и Saukett. Инфицировали клетки PER.C6 в суспензии при плотности клеток  $10 \times 10^6$  клеток/мл из расчета MOI 1. Температура при инфицировании составляла 30°C для штаммов CAVA-PV и 35°C для штаммов дикого типа, поскольку это является температурой производства для традиционной IPV.

В табл. 3 показаны значения D-антигена, полученные для данных вирусов, выраженные на миллилитр инфекционного сбора (DU/мл) и на инфекционную единицу (DU/TCID<sub>50</sub>). Поскольку D-антигенность на миллилитр (DU/мл) зависит от концентрации вируса, присутствующего в образце (титр или TCID<sub>50</sub>/мл), рассчитывали удельное антигенное содержание на инфекционную единицу штаммов CAVA-PV в сравнении со штаммами дикого типа. Это соответствует объективному сравнению штаммов. Удельное антигенное содержание было аналогичным для штаммов CAVA-PV в сравнении с их аналогами дикого типа, что указывает на то, что аналогичный иммуногенный профиль можно ожидать у CAVA-PV и их аналогов дикого типа. Поскольку вирусы содержат одинаковые последовательности капсидов, ожидается, что их антигенность будет аналогичной, это подтверждается полученными результатами относительно D-антигена.

Пример 9. *In vivo* иммуногенность инактивированных и очищенных CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett у крыс.

Вакцинные штаммы CAVA: CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett очищали и инактивировали. Очистку проводили с помощью двух последовательных стадий хроматографии с применением просветленного неочищенного собранного материала после инфицирования при предполагаемых условиях производства (2×250 мл во вращающемся флаконе, содержащем клетки SPER.C6 при плотности клеток  $10 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в среде Permethcis из расчета MOI 1, при 30°C). Катионообменную хроматографию (CEX) проводили с применением катионных мембран Sartobind S, после чего элюированный материал в дальнейшем применяли на стадии эксклюзионной хроматографии для дополнительной очистки (полировки) и замены буфера. Элюат SEC кондиционировали с помощью M199 и глицина перед инактивацией. Инактивацию проводили путем добавления 0,009% формалина (или 3,3 мМ формальдегида) и инкубировали в течение 13 дней при 37°C. Фильтрацию проводили на 6-й и 13-й день инактивации. Инактивированный балк применяли для тестирования *in vivo* иммуногенности на крысах. Четыре группы самок крыс линии Вистар (n=10) иммунизировали в разведении 1:1 (полная доза для человека), 1:2, 1:4 и 1:16 каждым из инактивированных вакцинных штаммов CAVA. Полная доза для человека составляет 40, 8 или 32 D-антигенные единицы типа 1, 2 и 3, соответственно, что представляет собой дозировку традиционной IPV. Крыс оставляли на 21 день, после чего у них брали кровь и сыворотку крови использовали для анализа нейтрализации вируса с применением вирусов Sabin в качестве вирусов для контрольного заражения и клеток Hep2C. На фиг. 14 изображены титры нейтрализующих антител, выработанные у крыс после иммунизации одним из инактивированных CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 или CAVA-PVSaukett. Показано, что все три вакцинных штамма являются иммуногенными, так как они индуцировали выработку высоких титров нейтрализующих антител дозозависимым образом при разбавлении полной дозы вакцины.

Пример 10. Создание дополнительного штамма CAVA-PV.

31 мутацию, которые были получены из трех независимых клонов (см. пример 1, табл. 1), проанализировали на их консервативность среди панели штаммов PV. Выявили 14 мутаций, которые, по-видимому, играют значительную роль в обеспечении термочувствительного фенотипа, наблюдаемого у CAVA-PV. Они изображены в табл. 4. В этой таблице одна звездочка показывает мутации, которые являются уникальными в CAVA-PV, и где нуклеотиды в этих положениях являются консервативными во всех других штаммах PV, применяемых для выравнивания, которые представляли собой Brunenders, а также Brunhilde, Mahoney, Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, MEF-1 и Saukett. Две звездочки в данной таблице показывают мутации, которые являются уникальными в CAVA-PV, и где нуклеотиды в этих положениях являются консервативными во всех других штаммах PV типа 1, применяемых для выравнивания: Brunenders, Brunhilde, Mahoney и Sabin 1. Мутация нуклеотида в положении 4120 в CAVA-PV является общей с Sabin 1, но нуклеотид является консервативным в данном положении во всех других штаммах PV, применяемых для выравнивания.

Мы ввели эти 14 мутаций, описанных в табл. 4, в последовательность родительского Brunenders для определения эффектов в отношении термочувствительности. Вирус получали, как описано в примере 1. Коротко, синтезировали плазмиду с рекомбинантной кДНК, содержащую геном Brunenders с 14 мутациями. Полученную плазмиду подвергали *in vitro* транскрипции и последующей трансфекции РНК. Ана-

лиз кинетики репликации выполняли в клетках PER.C6 путем инфицирования клеток при 30°C или 37°C из расчета MOI 1 и плотности клеток 10×10<sup>6</sup> клеток на мл в среде Permexcis, дополненной 4 mM L-глутамина. Образцы отбирали через 0, 2, 8, 24 и 48 часов после инфицирования и подвергали титрованию.

На фиг. 15 показаны кривые роста нового штамма CAVA-PV с 14 мутациями, описанного в данном примере, и штамма CAVA-PVBackbone из примера 1 (с 31 мутацией) по сравнению с их аналогом дикого типа (родительский штамм Brunenders). Для родительского штамма Brunenders наблюдали кривые роста, ожидаемые для штаммов дикого типа, как при 37°C, так и при 30°C, при этом плато титра достигалось в пределах 10 и 24 ч после заражения, соответственно. После введения 14 мутаций новый штамм CAVA-PV проявлял ростовой фенотип, аналогичный штамму CAVA-PVBackbone из примера 1, который имеет более чем в два раза большее количество (т.е. 31) мутаций по сравнению с родительским штаммом. Репликации не наблюдалось при 37°C, тогда как при 30°C репликация была сравнима с диким типом.

Эти результаты показывают, что потеря приспособленности к физиологической температуре может индуцироваться уже этими 14 мутациями. Кроме того, в дополнение к различным вариантам осуществления, описанным выше, в данном примере предоставлен еще один вариант осуществления штамма CAVA-PV в соответствии с настоящим изобретением, т.е. рекомбинантный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться при 37°C.

Пример 11. Создание штамма CAVA-PV из различных родительских штаммов различных серотипов.

Во всех предыдущих примерах описано применение штамма Brunenders (частично аттенуированного штамма PV типа 1) в качестве исходного или родительского штамма для создания различных штаммов CAVA-PV. В данном примере два очень разнородных родительских штамма, а именно, нейровирулентный типа 2 штамм MEF-1 дикого типа и нейроаттенуированный типа 3 штамм Sabin 3, применяли в качестве исходного (родительского) штамма. MEF-1 традиционно применяют в качестве иммуногена типа 2 для традиционных IPV-препаратов, тогда как Sabin 3 представляет собой компонент OPV-препаратов.

Тринадцать из 14 мутаций, описанных в табл. 4 со ссылкой на штамм Brunenders, вставили в соответствующие нуклеотидные положения в штамме MEF-1 (SEQ ID NO: 5; поскольку штамм MEF-1 уже содержал А в положении 3481, это положение не подвергали мутации, отсюда 13 мутаций вместо 14) для определения эффектов в отношении термочувствительности. То же выполняли с применением геномной последовательности Sabin 3 (SEQ ID NO: 8, поскольку штамм Sabin 3 уже содержал Г и А в положениях 163 и 3473, соответственно, эти нуклеотиды не подвергали мутации, отсюда 12 вместо 14 мутаций, см. табл. 4 для подробного описания CAVA-мутаций в штамме).

Вирусы MEF-1 и Sabin 3 получали, как описано в примере 1. Коротко, сначала синтезировали плазмиды с рекомбинантной кДНК, содержащие геномы MEF-1 и Sabin 3 с 13 и 12 мутациями. Полученные плазмиды подвергали *in vitro* транскрипции и последующей трансфекции РНК. Анализ кинетики репликации выполняли в клетках PER.C6 путем инфицирования клеток при 30°C или 37°C из расчета MOI 1 и плотности клеток 10×10<sup>6</sup> клеток на мл в среде Permexcis, дополненной 4 mM L-глутамина. Образцы отбирали через 0, 2, 8, 24 и 48 часов после инфицирования и подвергали титрованию.

На фиг. 16 показаны кривые роста нового штамма на основе MEF-1 с 13 мутациями, описанного в данном примере, и штамма CAVA-PVBackbone из примера 1 (т. е. штамма на основе Brunenders с 31 мутацией) в сравнении со штаммом MEF-1 дикого типа. Для родительского штамма MEF-1 наблюдали кривые роста, ожидаемые для штаммов дикого типа, как при 37°C, так и при 30°C, при этом плато титра достигалось в пределах 10 и 24 часов после инфицирования, соответственно. После введения 13 мутаций у нового штамма на основе MEF-1 развился ростовой фенотип, аналогичный штамму CAVA-PVBackbone из примера 1, который был основан на исходной последовательности штамма Brunenders и имел более чем в два раза большее количество мутаций по сравнению с родительским штаммом. Репликации не наблюдалось при 37°C, тогда как при 30°C репликация была сравнима с диким типом.

На фиг. 17 показаны кривые роста нового штамма на основе Sabin 3 с 12 мутациями, описанного в данном примере, в сравнении с CAVA-PVBackbone из примера 1 (т. е. штаммом Brunenders с 31 мутацией), в сравнении с аттенуированным штаммом Sabin 3. Для штамма Sabin 3 из OPV показаны кривые роста, сравнимые с ростом PV дикого типа как при 37°C, так и при 30°C, при этом плато титра достигалось в течение 10 и 24 часов после заражения, соответственно. После введения 12 мутаций у нового штамма на основе Sabin 3 проявился ростовой фенотип, аналогичный штамму CAVA-PVBackbone из примера 1, который основан на исходной последовательности штамма Brunenders. Репликации не наблюдалось при 37°C, тогда как при 30°C репликация была сравнима с диким типом.

Эти данные показывают, что новые штаммы MEF-1 и Sabin 3 с 13 и 12 мутациями, соответственно, также имеют фенотип CAVA-PV, и, таким образом, имеется еще один вариант осуществления штамма CAVA-PV в соответствии с настоящим изобретением, т.е. рекомбинантный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться при 37°C. Следовательно, в общей сложности 14 мутаций (из которых 1 и 2 уже присутствовали в ро-

дительских штаммах новых MEF-1 и Sabin 3) достаточно для придания ростового фенотипа CAVA-PV штамму полиовируса дикого типа. В этом примере продемонстрирован еще один альтернативный способ создания дополнительных штаммов CAVA-PV и показано, что такие штаммы можно получить из различных родительских штаммов полиовируса. Следует отметить, что эти данные показывают, что родительский штамм не обязательно должен быть штаммом PV типа 1, или штаммом дикого типа, или частично аттенуированным штаммом, поскольку родительский штамм в данном примере был нейровирулентным штаммом PV типа 2 и штаммом PV дикого типа, а также аттенуированным штаммом типа 3. Новый штамм из данного примера имеет последовательность капсида MEF-1 дикого типа, и его, таким образом, можно применять непосредственно для создания безопасной и эффективной IPV против PV типа 2. Его также можно применять в качестве отправной точки для замены этого капсида на другие капсиды дикого типа, такие как капсид Mahoney или Saukett. Специалисту в данной области также будет понятно, что этот пример делает вероятным то, что введение 14 мутаций (или их подгруппы) из табл. 4 в соответствующие положения в геноме штаммов Mahoney, Saukett, Sabin 1 и Sabin 2 будет приводить к дополнительным штаммам CAVA-PV, которые можно будет применять в качестве безопасных и эффективных вакцинных штаммов для получения IPV.

Пример 12. Количественная оценка инфекции CAVA-PV с помощью ЕМ.

Количественная оценка вирусной инфекции путем титрования (TCID<sub>50</sub>) при 37°C штаммов CAVA-PV не приводит к наблюдаемым цитопатическим эффектам (CPE), следовательно, титрование должно выполняться при 30°C. Это подтверждается кривыми кинетики репликации штаммов CAVA-PV, на которых показано отсутствие повышения числа инфекционных единиц в ходе инфекции при 37°C (фиг. 2-11, 13, 15-17). Это указывает на то, что вирусы не способны к репликации при данной температуре. Однако для дополнительного понимания блокировки репликации при 37°C мы провели электронно-микроскопическое (ЕМ) исследование в качестве альтернативного способа характеристики инфекции PV. На фиг. 18 изображены результаты ЕМ после инфицирования клеток SPER.C6 при плотности клеток 10×10<sup>6</sup> клеток/мл из расчета MOI 1 при 30 и 37°C с применением Mahoney, CAVA-PVMahoney или PBS (ложно инфицированные).

Образцы для ЕМ фиксировали в 1,5% глутаральдегиде в 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,4) и окрашивали 1% тетраоксидом осмия. Затем образцы промывали в 0,14 М какодилатном буфере и осаждали в 3% агар, после чего осадки постепенно обезвоживали в серии концентраций этанола. Затем образцы пропитывали в течение одного часа смесью 1:1 пропиленоксида и эпоксидной смолы LX-112 (Ladd Research) и дополнительный час в 100% эпоксидной смоле LX-112, после чего образцы полимеризовали в течение 48 ч при 60°C. Изготавливали срезы клеток толщиной 50 нм, их помещали на покрытые углеродом сетки с формваровой пленкой-подложкой и контрастно окрашивали 7% уранилацетатом и цитратом свинца. Для визуализации применяли просвечивающий электронный микроскоп Tecnai 12 BioTwin (компания FEI), работающий при 120 кВ.

Данные ЕМ на фиг. 18 изображают типичные клетки от каждого инфицирования. Клетки, инфицированные CAVA-PVMahoney при 30°C, были похожи на клетки, инфицированные штаммами Mahoney дикого типа, большинство клеток были уже погибшими и лизированными или апоптотическими. Апоптотические клетки сократились в размерах и имели очень темный цвет. Эти апоптотические клетки содержали перегруппировки мембран ER, а также индуцированное вирусом образование везикул. При очень высоких концентрациях полиовируса в клетке могут образовываться высоко структурированные вирусные решетчатые структуры, которые были видны в образцах с Mahoney и CAVA-PVMahoney (при 30°C).

Однако при 37°C в клетках, инфицированные CAVA-PVMahoney, не наблюдалось каких-либо этих признаков, связанных с инфекцией PV.

Фактически, эти клетки выглядели здоровыми без признаков инфекции в любой из клеток в образцах. Клетки, инфицированные CAVA-PVMahoney, которые инкубировали при 37°C, были похожи на образцы, ложно инфицированные с помощью PBS. Измеренный титр CAVA-PVMahoney в этом образце, инкубированном при 37°C, составил 4,32 TCID<sub>50</sub>/мл, что меньше теоретического введения (7,0 TCID<sub>50</sub>/мл рассчитанной MOI на основе добавленного объема вводимого вируса с известным титром), однако он подтверждает, что вирус CAVA-PVMahoney действительно был добавлен для инфицирования, при этом не вызывая никаких признаков инфекции.

Пример 13. Количественная оценка инфекции CAVA-PV с помощью qPCR.

Образцы проб, применяемых для ЕМ (пример 12), подвергали количественной ПЦР для определения уровней вирусной РНК в ходе инфекции. Вирусную РНК выделяли из инфекционных сборов с применением набора для выделения вирусной РНК от QIAamp, после чего применяли набор PowerSYBR Green RNA-to-Ct 1 step для RT-qPCR с применением праймеров, связывающихся с геном полимеразы 3D. На фиг. 19 изображены уровни вирусной РНК, наблюдаемые при титровании инфекционных сборов, уровни вирусной РНК снижаются, когда инфекцию CAVA-1 Mahoney поддерживают при 37°C, однако не в том случае, если температура инфекции составляла 30°C, где наблюдалось повышение вирусной РНК. Следовательно, можно сделать вывод, что имеются нарушения в репликации РНК, и, по-видимому,

она полностью блокируется при 37°C. Блокирование репликации CAVA-PV, таким образом, имеет место на уровне репликации РНК или ранее в инфекционном цикле.

Пример 14. Создание PV, которые не проявляют CAVA-фенотип.

Для более глубокого понимания того, какие мутации участвуют в CAVA-фенотипе, сконструировали новые промежуточные вирусы либо с 7 CAVA-мутациями в 5'UTR, либо с 17 мутациями в неструктурных белках в исходной последовательности родительского штамма Brunenders (SED ID NO: 1, см. табл. 4 относительно CAVA-мутаций в двух этих областях). Штаммы CAVA-PV из примера 6 уже продемонстрировали, что CAVA-мутацию в капсиде можно удалить, не оказывая эффектов на CAVA-фенотип, следовательно в данном случае исследовали только мутации в областях 5'UTR и неструктурных белков. Промежуточные вирусы тестировали в отношении кинетики репликации при 30 и 37°C по сравнению с родительским штаммом Brunenders, CAVA-PVBackbone из примера 1 и CAVA-PVMahoney из примера 6.

Промежуточные вирусы получали, как описано в примере 1. Коротко, сначала синтезировали плазмиды с рекомбинантной кДНК, содержащие геномы Brunenders либо с 7 CAVA-мутациями в 5'UTR, либо с 17 CAVA-мутациями в неструктурных белках. Полученные плазмиды подвергали *in vitro* транскрипции и последующей трансфекции РНК. Анализ кинетики репликации выполняли в клетках PER.C6 путем инфицирования клеток при 30°C или 37°C из расчета MOI 1 и плотности клеток 10×10<sup>6</sup> клеток на мл в среде Permexcis, дополненной 4 мМ L-глутамин. Образцы отбирали через 0, 2, 8, 24 и 48 ч после инфицирования и подвергали титрованию.

На фиг. 20 показаны кривые роста новых штаммов на основе родительских штаммов Brunenders с мутациями, описываемых в данном примере, а также штамма CAVA-PVBackbone из примера 1 (т.е. штамма Brunenders с 31 мутацией) в сравнении со штаммом Brunenders дикого типа. Для промежуточных штаммов показаны нарушенные кривые роста при 37°C, где репликация была затруднена по сравнению с родительскими штаммами Brunenders, но не прекращена по сравнению с CAVA-PVBackbone. В данном случае промежуточные вирусы росли с более низкой скоростью по сравнению с родительским штаммом Brunenders, а также до более низких максимальных титров. При 30°C для промежуточных вирусов показаны идентичные кривые роста по сравнению с родительским штаммом Brunenders, а также со штаммами CAVA-PVBackbone и CAVA-PVMahoney из примера 1 и 6, соответственно. Плато титра достигалось в пределах 24 часов после заражения. После введения мутаций в 5'UTR или неструктурные белки новые штаммы не имели фенотип, идентичный штаммам CAVA-PVBackbone и CAVA-PVMahoney, поэтому можно заключить, что CAVA-фенотип может индуцироваться только в случае комбинации в одном родительском геноме мутаций из обеих областей (5'UTR и неструктурные белки).

Таблица 1. CAVA-PV, содержащий в общей сложности 31 мутацию, в том числе 7 мутаций в 5'UTR, 7 мутаций в капсиде и 17 мутаций в неструктурных белках. Положения нуклеотидов, описанные в табл. 1, приведены со ссылкой на геном штамма Brunenders, для других PV точная нумерация нуклеотидов может несколько отличаться.

7 мутаций в 5'UTR, 7 мутаций в капсиде, 17 мутаций в неструктурных белках

| Местоположение | № нуклеотида | Нуклеотидная замена | № нуклеотида | Местоположение | Нуклеотидная замена | Аминокислотная замена |
|----------------|--------------|---------------------|--------------|----------------|---------------------|-----------------------|
| 5'UTR          | 133          | A → G               | 805          | VP4            | A → C               | Y → S                 |
| 5'UTR          | 142          | U → C               | 1787         | VP3            | C → U               | молчащая              |
| 5'UTR          | 146          | G → A               | 1905         | VP3            | U → C               | молчащая              |
| 5'UTR          | 163          | A → G               | 2756         | VP1            | U → C               | молчащая              |
| 5'UTR          | 579          | G → A               | 3236         | VP1            | C → U               | молчащая              |
| 5'UTR          | 597          | C → U               | 3323         | VP1            | C → U               | молчащая              |
| 5'UTR          | 609          | G → A               | 3376         | VP1            | A → G               | E → G                 |

| № нуклеотида | Местоположение | Нуклеотидная замена | Аминокислотная замена |
|--------------|----------------|---------------------|-----------------------|
| 3476         | 2A             | C → U               | молчащая              |
| 3486         | 2A             | G → A               | V → I                 |
| 3852         | 2B             | A → U               | I → F                 |
| 4120         | 2B             | U → C               | I → T                 |
| 4253         | 2C             | C → U               | молчащая              |
| 4301         | 2C             | U → C               | молчащая              |
| 4428         | 2C             | A → G               | I → V                 |
| 4563         | 2C             | A → U               | I → L                 |
| 4811         | 2C             | A → G               | молчащая              |
| 5436         | 3A             | G → A               | V → M                 |
| 5705         | 3BC            | A → G               | молчащая              |
| 6059         | 3D             | C → U               | молчащая              |
| 6210         | 3D             | A → G               | M → V                 |
| 6488         | 3D             | C → U               | молчащая              |
| 6848         | 3D             | G → A               | M → I                 |
| 7079         | 3D             | U → C               | молчащая              |
| 7102         | 3D             | U → C               | V → A                 |

Таблица 2. Мышиная модель для оценки нейровирулентности in vivo на трансгенных по CD155 мышах

| Вирус           | Путь введения | (P) LD50 (TCID50)    |
|-----------------|---------------|----------------------|
| CAVA-PVBackbone | i.c.          | >9×10 <sup>7</sup>   |
|                 | i.m.          | >10 <sup>8</sup>     |
|                 | i.p.          | >10 <sup>8</sup>     |
| CAVA-PVMahoney  | i.c.          | >2,4×10 <sup>8</sup> |
| CAVA-PVMEF-1    | i.c.          | >2,4×10 <sup>8</sup> |
| CAVA-PVSaukett  | i.c.          | >1,7×10 <sup>8</sup> |
| Brunenders      | i.c.          | 1,5×10 <sup>6</sup>  |
|                 | i.m.          | 3,2×10 <sup>6</sup>  |
|                 | i.p.          | 1,7×10 <sup>7</sup>  |
| Brunhilde       | i.c.          | 4,2×10 <sup>2</sup>  |
|                 | i.m.          | 2,4×10 <sup>4</sup>  |
|                 | i.p.          | 6,9×10 <sup>6</sup>  |
| Mahoney         | i.c.          | 10 <sup>2</sup>      |
|                 | i.m.          | 1,6×10 <sup>4</sup>  |
|                 | i.p.          | 5×10 <sup>5</sup>    |
| MEF-1           | i.c.          | 3,2×10 <sup>4</sup>  |
|                 | i.m.          | >10 <sup>8</sup>     |
|                 | i.p.          | >10 <sup>8</sup>     |
| Saukett         | i.c.          | 7,0×10 <sup>2</sup>  |
|                 | i.m.          | 1,0×10 <sup>6</sup>  |
|                 | i.p.          | 2,3×10 <sup>6</sup>  |
| Sabin 1         | i.c.          | >2×10 <sup>7</sup>   |
| Sabin 2         | i.c.          | >10 <sup>8</sup>     |
| Sabin 3         | i.c.          | >10 <sup>8</sup>     |

Таблица 3. Антигенное содержание для CAVA-PVMahoney, CAVA-PVMEF-1 и CAVA-PVSaukett

| Полиовирус |                | DU/мл | Титр<br>(TCID50/мл) | DU/TCID50             |
|------------|----------------|-------|---------------------|-----------------------|
| Тип I      | CAVA-1-Mahoney | 2652  | 9,56                | 7,3×10 <sup>-07</sup> |
|            | Mahoney        | 3288  | 10,09               | 2,7×10 <sup>-07</sup> |
| Тип II     | CAVA-2 MEF-1   | 705   | 9,91                | 8,7×10 <sup>-08</sup> |
|            | MEF-1          | 501   | 10                  | 5,0×10 <sup>-08</sup> |
| Тип III    | CAVA-3 Saukett | 866   | 9,56                | 2,4×10 <sup>-07</sup> |
|            | Saukett        | 1334  | 9,56                | 3,7×10 <sup>-07</sup> |

Таблица 4. 14 мутаций, определяющих термочувствительность некоторых штаммов CAVA-PV (например, примеры 10 и 11). \*: мутации, которые являются уникальными в CAVA-PV, и нуклеотиды в родительском Brunenders в этих положениях являются консервативными во всех других штаммах PV, применяемых для выравнивания. \*\*: мутации, которые являются уникальными в CAVA-PV, и нуклеотиды в родительском Brunenders в этих положениях являются консервативными во всех других штаммах PV1, применяемых для выравнивания. Типичные последовательности генома исходных штаммов представлены как SEQ ID NO: 1 (Brunenders), SEQ ID NO: 5 (MEF-1), SEQ ID NO: 6 (Mahoney), SEQ ID NO: 7 (Saukett), SEQ ID NO: 8 (Sabin 3), SEQ ID NO: 9 (Sabin 1) и SEQ ID NO: 10 (Sabin 2). Все описываемые нуклеотидные замены являются идентичными для всех штаммов и соответствующих положений за исключением мутации в последовательности, кодирующей белок 2A, которая уже является аденином в штаммах MEF-1, Saukett и Sabin 3 в положениях 3481 и 3473, соответственно, помеченных как "a" в таблице. Мутация в домене II IRES уже является гуанином в Sabin 3 в положении 163, помеченном как "b" в таблице. Мутация в положении 4120 в белке 2B в Sabin 1 уже представляла собой "C" в данном положении.

## 5 мутаций в 5'UTR

| Положение нуклеотида в геноме соответствующего PV |            |       |         |         |         |         |         |                     |
|---------------------------------------------------|------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------------------|
| Местоположение                                    | Brunenders | MEF-1 | Mahoney | Saukett | Sabin 1 | Sabin 2 | Sabin 3 | Нуклеотидная замена |
| Домен II IRES                                     | 133        | 134   | 131     | 133     | 131     | 131     | 133     | A → G*              |
| Домен II IRES                                     | 142        | 143   | 140     | 142     | 140     | 140     | 142     | U → C*              |
| Домен II IRES                                     | 163        | 164   | 161     | 163     | 161     | 161     | 163b    | A → G**             |
| Домен VI IRES                                     | 587        | 589   | 593     | 596     | 593     | 594     | 596     | C → U*              |
| Домен VI IRES                                     | 609        | 610   | 605     | 608     | 605     | 606     | 608     | G → A*              |
| 9 мутаций в неструктурных белках                  |            |       |         |         |         |         |         |                     |
| Положение нуклеотида в геноме соответствующего PV |            |       |         |         |         |         |         |                     |
| Местоположение                                    | Brunenders | MEF-1 | Mahoney | Saukett | Sabin 1 | Sabin 2 | Sabin 3 | Нуклеотидная замена |
| 2A                                                | 3486       | 3481a | 3482    | 3473a   | 3482    | 3481    | 3473a   | G → A**a            |
| 2B                                                | 3852       | 3847  | 3848    | 3839    | 3848    | 3847    | 3839    | A → U*              |
| 2B                                                | 4120       | 4115  | 4116    | 4107    | 4116c   | 4115    | 4107    | U → C               |
| 2C                                                | 4428       | 4423  | 4424    | 4415    | 4424    | 4423    | 4415    | A → G*              |
| 2C                                                | 4563       | 4558  | 4559    | 4550    | 4559    | 4558    | 4550    | A → U*              |
| 3A                                                | 5436       | 5431  | 5432    | 5423    | 5432    | 5431    | 5423    | G → A*              |
| 3D                                                | 6210       | 6205  | 6206    | 6197    | 6206    | 6205    | 6197    | A → G*              |
| 3D                                                | 6848       | 6843  | 6844    | 6835    | 6844    | 6843    | 6835    | G → A*              |
| 3D                                                | 7102       | 7097  | 7098    | 7089    | 7098    | 7097    | 7089    | U → C*              |

## Библиография

## Патентные документы США:

Патент США № 8546123 (1 октября 2013 года). "Production of poliovirus at high titers for vaccine production". Lewis.

Патент США № 4525349 (25 июня 1985 года). "Process for the large-scale production of a vaccine against poliomyelitis and the resulting vaccine". Montagnon and Fanget.

## Зарубежные патентные документы:

WO 2007/007344 (18 января 2007 года). "Inactivated Poliomyelitis Vaccine Derived From Sabin Strain Of Polio Virus". Jain, Chawla, and Kumraj.

## Другие ссылочные документы:

Beale, A. J. (1961). "The D-antigen content in poliovaccine as a measure of potency." Lancet 2(7213): 1166-1168.

Bouchard, M. J., D. H. Lam and V. R. Racaniello (1995). "Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine." J Virol 69(8): 4972-4978.

Enders, J. F.; Weller, T.H.; Robbins, F.C. (1952). "Alteration in pathogenicity for monkeys of Brunhilde strain of poliomyelitis virus following cultivation in human tissues." Fed Proc 11: 467.

Grassly, N. C. (2014). "Immunogenicity and Effectiveness of Routine Immunization With 1 or 2 Doses of Inactivated Poliovirus Vaccine: Systematic Review and Meta-analysis." J Infect Dis.

Hawken, J. and S. B. Troy (2012). "Adjuvants and inactivated polio vaccine: a systematic review." Vaccine 30(49): 6971-6979.

Heinsbroek, E. and E. J. Ruitenberg (2010). "The global introduction of inactivated polio vaccine can circumvent the oral polio vaccine paradox." Vaccine 28(22): 3778-3783.

Henderson, D. A., J. J. Witte, L. Morris and A. D. Langmuir (1964). "Paralytic Disease Associated with Oral Polio Vaccines." Jama 190: 41-48.

Jahan, N., E. Wimmer and S. Mueller (2011). "A host-specific, temperature-sensitive translation defect determines

the attenuation phenotype of a human rhinovirus/poliovirus chimera, PV1(RIPO)." J Virol 85(14): 7225-7235.

Jiang, S. D., D. Pye and J. C. Cox (1986). "Inactivation of poliovirus with beta-propiolactone." J Biol Stand 14(2): 103-109.

John, J. (2009). "Role of injectable and oral polio vaccines in polio eradication." Expert Rev Vaccines 8(1): 5-8.

John, T. J. (2004). "A developing country perspective on vaccine-associated paralytic poliomyelitis." Bull World Health Organ 82(1): 53-57; обсуждение 57-58.

Koike, S., C. Taya, T. Kurata, S. Abe, I. Ise, H. Yonekawa and A. Nomoto (1991). "Transgenic mice susceptible to poliovirus." Proc Natl Acad Sci U S A 88(3): 951-955.

Liao, G., R. Li, C. Li, M. Sun, Y. Li, J. Chu, S. Jiang and Q. Li (2012). "Safety and immunogenicity of inactivated poliovirus vaccine made from Sabin strains: a phase II, randomized, positive-controlled trial." J Infect Dis 205(2): 237-243.

Mahmood, K., S. Pelkowski, D. Atherly, R. Sitrin and J. J. Donnelly (2013). "Hexavalent IPV-based combination vaccines for public-sector markets of low-resource countries: A product review." Hum Vaccin Immunother 9(9).

Minor, P. D. (1999). "Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis." Expert Rev Mol Med 1999: 1-17.

Montagnon, B. J., B. Fanget and J. C. Vincent-Falquet (1984). "Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier." Rev Infect Dis 6 Suppl 2: S341-344.

Okada, K., C. Miyazaki, Y. Kino, T. Ozaki, M. Hirose and K. Ueda (2013). "Phase II and III Clinical Studies of Diphtheria-Tetanus-Acellular Pertussis Vaccine Containing Inactivated Polio Vaccine Derived from Sabin Strains (DTaP-sIPV)." J Infect Dis 208(2): 275-283.

Pfeiffer, J. K. (2010). "Innate host barriers to viral trafficking and population diversity: lessons learned from poliovirus." Adv Virus Res 77: 85-118.

Racaniello, V. R. (2006). "One hundred years of poliovirus pathogenesis." Virology 344(1): 9-16.

Resik, S., A. Tejada, R. W. Sutter, M. Diaz, L. Sarmiento, N. Alemani, G. Garcia, M. Fonseca, L. H. Hung, A. L. Kahn, A. Burton, J. M. Landaverde and R. B. Aylward (2013). "Priming after a fractional dose of inactivated poliovirus vaccine." N Engl J Med 368(5): 416-424.

Sabin, A. B. (1956). "Present status of attenuated live-virus poliomyelitis vaccine." J Am Med Assoc 162(18): 1589-1596.

Sabin, A. B. B., L.R. (1973). "History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains." Journal of Biological Standardization 1: 115-118.

Salk, J. E. (1953). "Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress." J Am Med Assoc 151(13): 1081-1098.

Sanders, B. P., D. Edo-Matas, J. H. Custers, M. H. Koldijk, V. Klaren, M. Turk, A. Luitjens, W. A. Bakker, F. Uytdehaag, J. Goudsmit, J. A. Lewis and H. Schuitemaker (2012). "PER.C6((R)) cells as a serum-free suspension cell platform for the production of high titer poliovirus: a potential low cost of goods option for world supply of inactivated poliovirus vaccine." Vaccine 31(5): 850-856.

Sanders, B. P., Y. Liu, A. Brandjes, V. van Hoek, I. de Los Rios Oakes, J. Lewis, E. Wimmer, J. H. Custers, H. Schuitemaker, J. Cello and D. Edo-Matas (2015). "Brunenders: A partially attenuated historic poliovirus Type I vaccine strain." J Gen Virol.

Skern, T. and H. D. Liebig (1994). "Picornains 2A and 3C." Methods Enzymol 244: 583-595.

Toyoda, H., M. Kohara, Y. Kataoka, T. Suganuma, T. Omata, N. Imura and A. Nomoto (1984). "Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic

relationship, gene function and antigenic determinants." J Mol Biol 174(4): 561-585.

van der Werf, S., J. Bradley, E. Wimmer, F. W. Studier and J. J. Dunn (1986). "Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A 83(8): 2330-2334.

van Wezel, A. L., G. van Steenis, C. A. Hannik and H. Cohen (1978). "New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines." Dev Biol Stand 41: 159-168.

Verdijk, P., N. Y. Rots and W. A. Bakker (2011). "Clinical development of a novel inactivated poliomyelitis vaccine based on attenuated Sabin poliovirus strains." Expert Rev Vaccines 10(5): 635-644.

Westdijk, J., D. Brugmans, J. Martin, A. van't Oever, W. A. Bakker, L. Levels and G. Kersten (2011). "Characterization and standardization of Sabin based inactivated polio vaccine: proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccines." Vaccine 29(18): 3390-3397.

WHO (1988). Polio eradication by the year 2000. Rep. Resolution 41.28. W. H. Assembly. Geneva, WHO.

WHO (2005). Cessation of routine oral polio vaccine use after global polio eradication. Framework for National Policy Makers in OPV-Using Countries. Geneva, WHO.

WHO (2006). "Inactivated poliovirus vaccine following oral poliovirus vaccine cessation." Wkly Epidemiol Rec 81(15): 137-144.

WHO (2009). WHO global action plan to minimize poliovirus facility-associated risk after eradication of wild polioviruses and cessation of routine OPV use. Geneva, WHO.

Zehrun, D. (2010). Improving the affordability of inactivated poliovirus vaccines (IPV) for use in low- and middle-income countries. An economic analysis of strategies to reduce the cost of routine IPV immunization PATH.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и который фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, содержащий капсид из штамма Mahoney, MEF-1 или Saukett, причем геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса включает мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 из следующих положений по сравнению с геномом штамма Brunenders (SEQ ID NO:1): A133, U142, A163, C597, G609 в 5'-концевой нетранслируемой области; и G3486, A3852, U4120, A4428, A4563, G5436, A6210, G6848, U7102 в генах неструктурных белков.

2. Рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 1, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, причем геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса включает мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 из следующих положений по сравнению с геномом штамма Mahoney (SEQ ID NO: 6): A131G, U140C, A161G, C593U, G605A в 5'-концевой нетранслируемой области и G3482A, A3848U, U4116C, A4424G, A4559U, G5432A, A6206G, G6844A, U7098C в генах неструктурных белков.

3. Рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 2, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, причем геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса включает мутации по меньшей мере в 10, 11, 12 или 13 из следующих положений по сравнению с геномом штамма MEF-1 (SEQ ID NO: 5): A134G, U143C, A164G, C598U, G610A в 5'-концевой нетранслируемой области и A3847U, U4115C, A4423G, A4558U, G5431A, A6205G, G6843A, U7097C в генах неструктурных белков.

4. Рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 3, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, причем геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса включает мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 из следующих положений по сравнению с геномом штамма Saukett (SEQ ID NO: 7): A133G, U142C, A163G, C596U, G608A в 5'-концевой нетранслируемой области и G3473A, A3839U, U4107C, A4415G, A4550U, G5423A, A6197G, G6835A, U7089C в генах неструктурных белков.

5. Рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 1, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, причем геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса включает мутации по меньшей мере в 10, 11, 12 или 13 из следующих положений по сравнению с геномом штамма Sabin 1 (SEQ ID NO: 9): A131G, U140C, A161G, C593U, G605A в 5'-концевой нетранслируемой области и G3482A, A3848U, A4424G, A4559U, G5432A, A6206G, G6844A, U7098C в генах неструктурных белков.

6. Рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 2, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, причем геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса включает мутации по меньшей мере в 10, 11, 12, 13 или 14 из следующих положений по сравнению с геномом штамма Sabin 2 (SEQ ID NO: 10): A131G, U140C, A161G в генах неструктурных белков.

7. Рекомбинантный аттенуированный термочувствительный штамм полиовируса типа 3, который способен размножаться в культуре клеток при 30°C и фактически не способен размножаться в культуре клеток при 37°C, причем геном рекомбинантного аттенуированного штамма полиовируса включает мутации по меньшей мере в 10, 11 или 12 из следующих положений по сравнению с геномом штамма Sabin 3 (SEQ ID NO: 8): A133G, U142C, C596U, G608A в 5'-концевой нетранслируемой области и A3839U, U4107C, A4415G, A4550U, G5423A, A6197G, G6835A, U7089C в генах неструктурных белков.

8. Композиция для получения полиомиелитной вакцины, содержащая штамм полиовируса по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

9. Инактивированная полиомиелитная вакцина (IPV), содержащая композицию по п.8, в которой полиовирусы являются инактивированными.

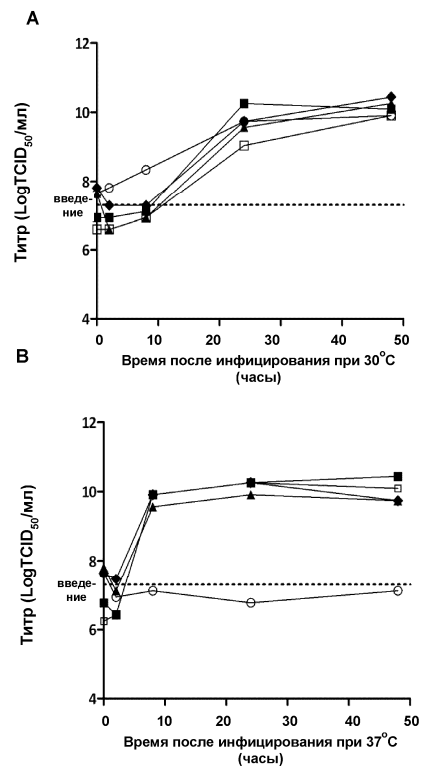
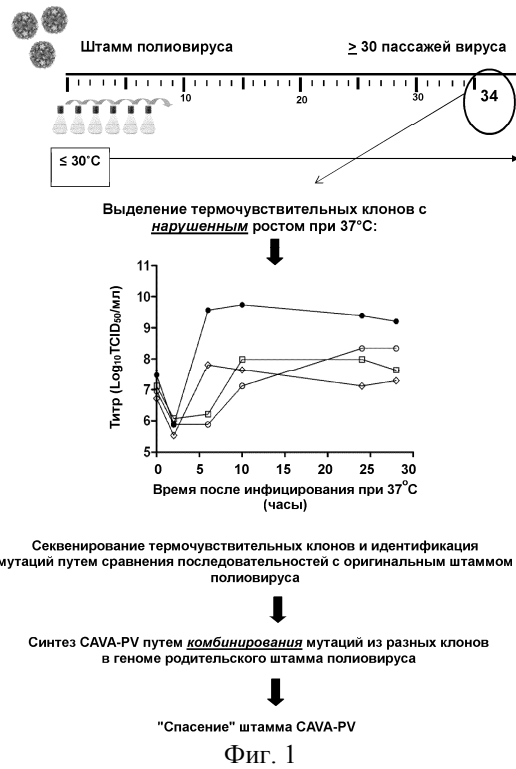
10. Комбинированная вакцина, содержащая вакцину по п.9 и один или более антигенов из возбудителей дифтерии, столбняка, коклюша, *Neomophilus influenzae* типа b (Hib) или вируса гепатита В (HBV).

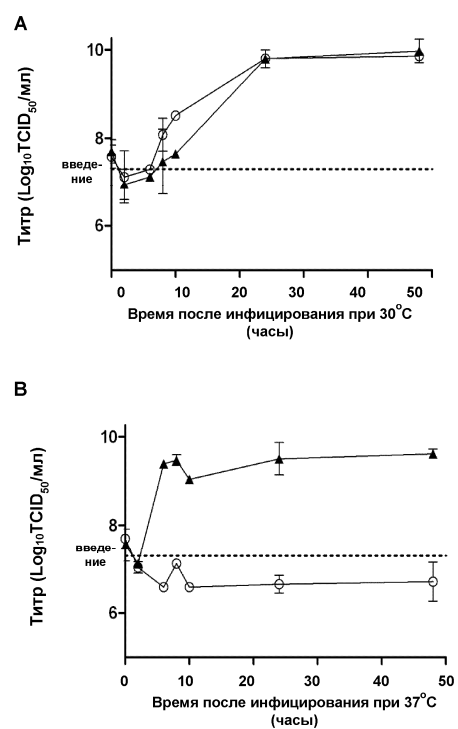
11. Способ получения препарата, содержащего штамм полиовируса по любому из пп.1-7, включающий:

- а) инфицирование клетки в культуре клеток штаммом полиовируса по любому из пп.1-7,
- б) культивирование клеток в культуре клеток для размножения полиовируса и
- с) выделение полиовируса из клеток или культуры клеток с получением препарата, содержащего полиовирус.

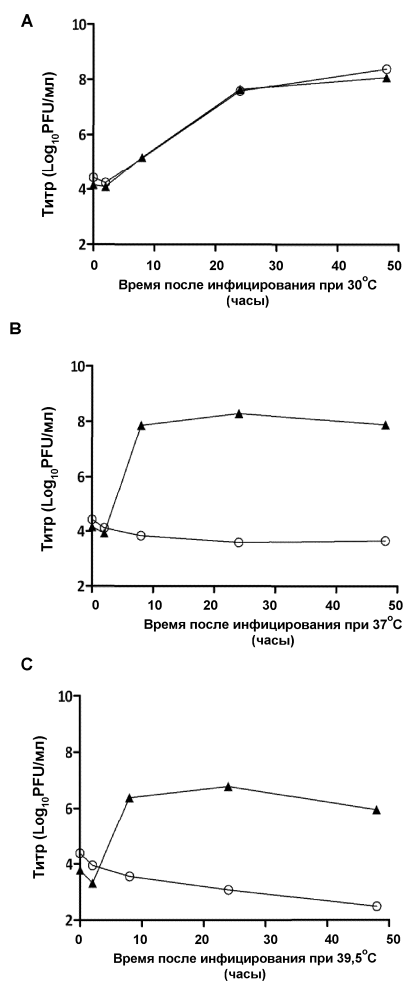
12. Способ по п.11, дополнительно включающий инактивацию полиовируса.

13. Способ получения инактивированной полиомиелитной вакцины (IPV), включающий составление инактивированного способом по п.12 штамма полиовируса в фармацевтическую композицию.

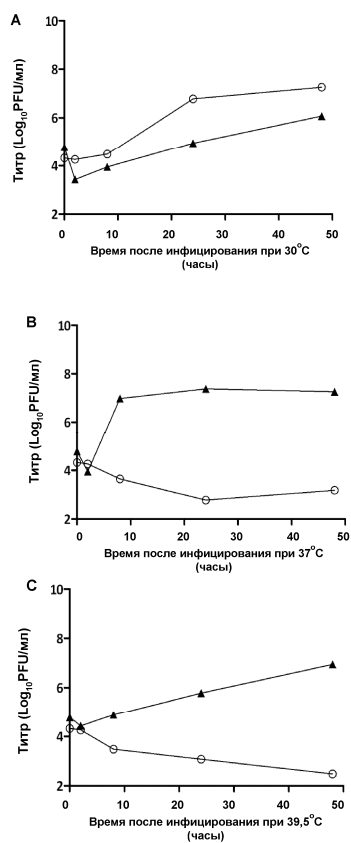




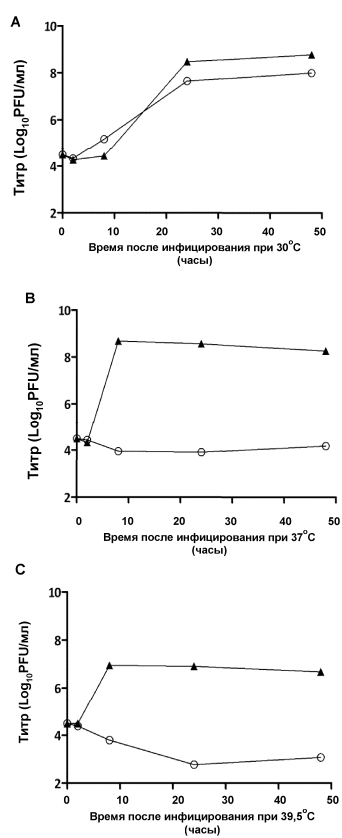
Фиг. 3



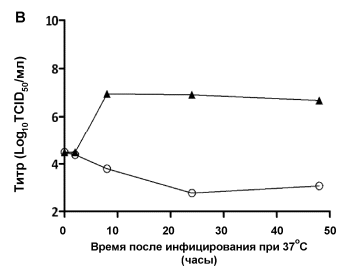
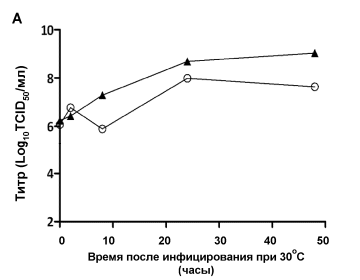
Фиг. 4



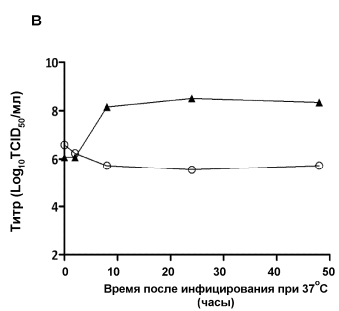
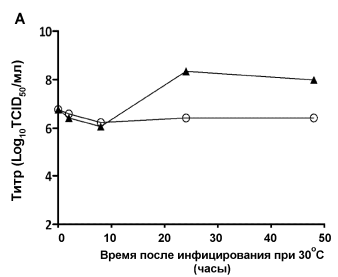
Фиг. 5



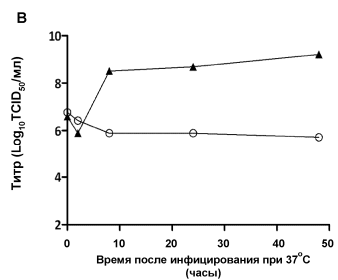
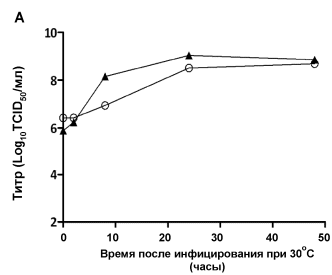
Фиг 6



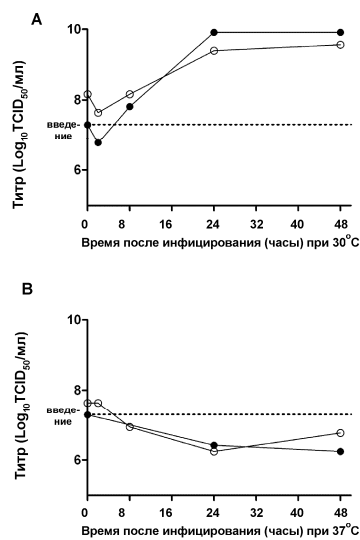
Фиг. 7



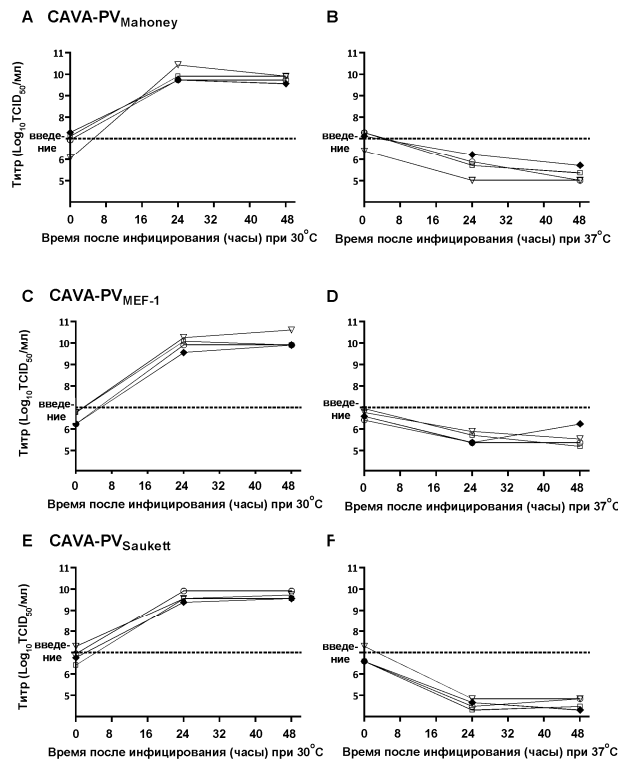
Фиг. 8



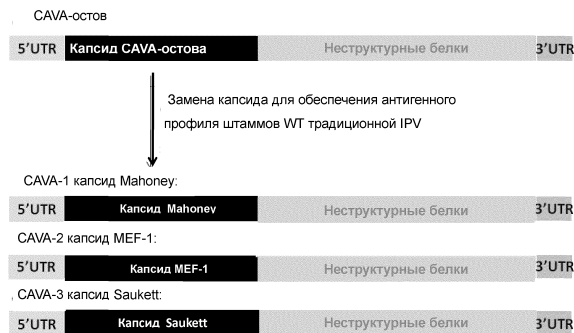
Фиг. 9



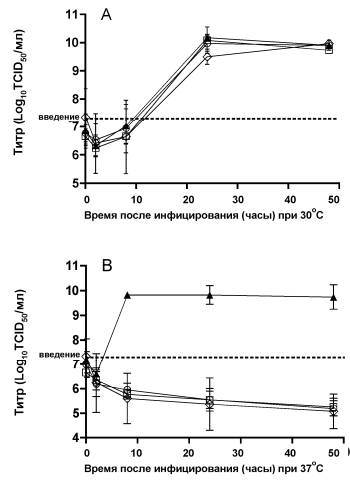
Фиг. 10



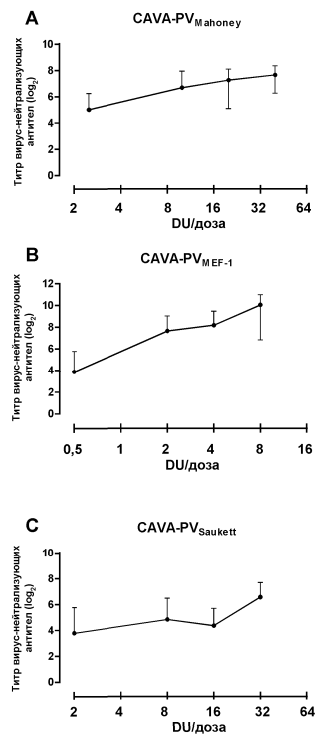
Фиг. 11



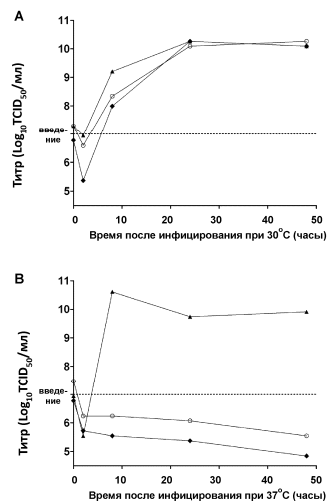
Фиг. 12



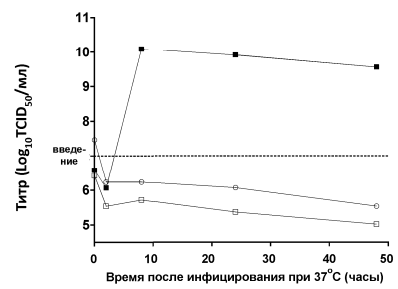
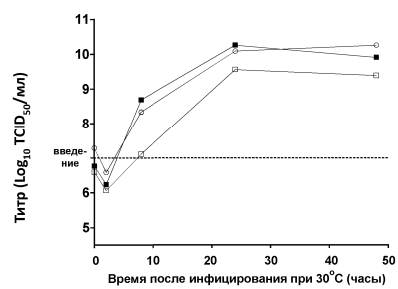
Фиг. 13



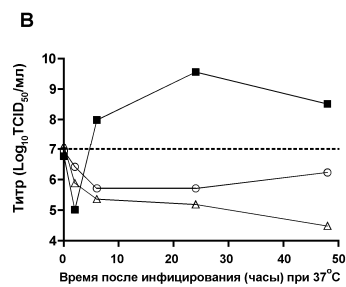
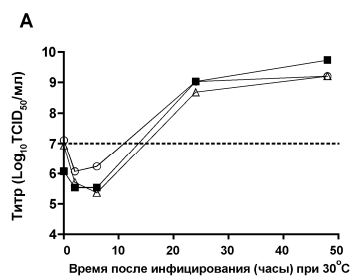
Фиг. 14



Фиг. 15

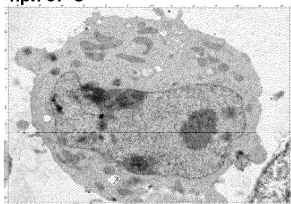


Фиг. 16

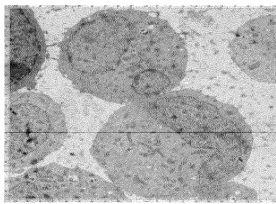


Фиг. 17

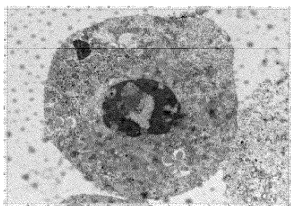
**A) PBS/ложное инфицирование при 37°C**



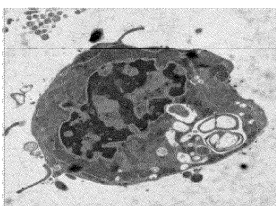
**C) CAVA-PV<sub>Mahoney</sub> при 37°C**



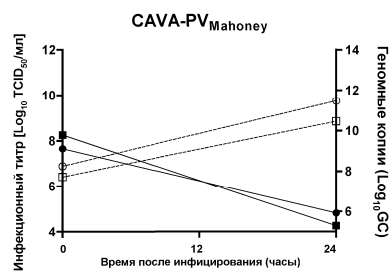
**В) Mahoney при 37°C**



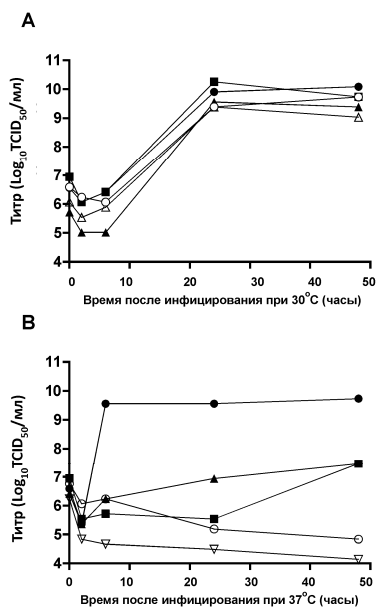
**D) CAVA-PV<sub>Mahoney</sub> при 30°C**



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

