



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.11.14

(21) Номер заявки

201890351

(22) Дата подачи заявки

2016.07.15

(51) Int. Cl. **C12N 15/863** (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ ORF-ВИРУСНЫЙ ВЕКТОР

(31) **10 2015 111 756.8**

(32) **2015.07.20**

(33) **DE**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/EP2016/066926**

(87) **WO 2017/013023 2017.01.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЭБЕРХАРД КАРЛС УНИВЕРЗИТЕТ
ТЮБИНГЕН МЕДИЦИНИШЕ
ФАКУЛЬТЕТ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Ржиха Ханс-Йоахим, Аманн Ральф
(DE)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) ZHANGYONG NING ET AL.: "Generation of recombinant Orf virus using an enhanced green fluorescent protein reporter gene as a selectable marker", BMC VETERINARY RESEARCH, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 7, no. 1, 22 December 2011 (2011-12-22), page 80, XP021119029, ISSN: 1746-6148, DOI: 10.1186/1746-6148-7-80 abstract; figures 1-5; tables 1, 2 page 2 - page 10

JOANNE L. TAN ET AL.: "Development of orf virus as a bifunctional recombinant vaccine: Surface display of antigen EG95 by fusion to membrane structural proteins", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 30, no. 2, 28 October 2011 (2011-10-28), pages 398-406, XP028348290, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.10.079 [retrieved on 2011-11-07] abstract; figures 2-8 page 399 - page 305

JORG ROHDE ET AL.: "New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5

Hemagglutinin Protects Mice against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus", PLOS ONE, vol. 8, no. 12, 20 December 2013 (2013-12-20), page e83802, XP055300959, DOI: 10.1371/journal.pone.0083802 abstract; figures 1-8; tables 1, 2 page 1618 - page 1629 page 1617 - page 1629

AMANN R. ET AL.: "A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein", JOURNAL OF VIROLOGY (ONLINE), AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 87, no. 3, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 1618-1630, XP002753921, ISSN: 1098-5514, DOI: 10.1128/JVI.02470-12 [retrieved on 2012-11-21] abstract; figures 1-6; table 1

T. FISCHER ET AL.: "Novel Recombinant Parapoxvirus Vectors Induce Protective Humoral and Cellular Immunity against Lethal Herpesvirus Challenge Infection in Mice", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77, no. 17, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 9312-9323, XP055005357, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.77.17.9312-9323.2003 abstract; figures 1-6; tables 1, 2

LI WEI ET AL.: "Comparative genomic sequence analysis of Chinese orf virus strain NA1/11 with other parapoxviruses", ARCHIVES OF VIROLOGY, SPRINGER WIEN, AT, vol. 160, no. 1, 11 November 2014 (2014-11-11), pages 253-266, XP035419843, ISSN: 0304-8608, DOI: 10.1007/S00705-014-2274-1 [retrieved on 2014-11-11] figure 3; table 1

M. BUTTNER ET AL.: "Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome", JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE. SERIES B - ZENTRALBLATT FUER VETERINAERMEDIZIN. REINE B., vol. 49, no. 1, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 7-16, XP055300947, DE ISSN: 0931-1793, DOI: 10.1046/j.1439-0450.2002.00539.x the whole document

(57) Изобретение относится к рекомбинантному Orf-вирусному вектору, клетке, содержащей рекомбинантный Orf-вирусный вектор, композиции, содержащей рекомбинантный Orf-вирусный вектор по изобретению и/или содержащей клетку по изобретению, применению рекомбинантного Orf-вирусного вектора по изобретению для получения чужеродного гена. Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей промотор Orf-вирусного вектора.

Изобретение относится к рекомбинантному Orf-вирусному вектору, клетке, содержащей рекомбинантный Orf-вирусный вектор, композиции, содержащей рекомбинантный Orf-вирусный вектор по изобретению и/или клетку по изобретению, применению рекомбинантного Orf-вирусного вектора по изобретению для экспрессии чужеродного гена и молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей промотор Orf-вирусного вектора.

Вирусные векторы используют в биотехнологии для встраивания генетического материала в клетки-мишени. Зачастую встраиваемый генетический материал кодирует чужеродные гены, служащие для получения рекомбинантного белка. По этой причине вирусные векторы представляют собой важную платформенную технологию, в частности, для получения рекомбинантных вакцин, все чаще используемых наряду с общепринятой профилактикой инфекционных заболеваний, а также для разработки новых, инновационных терапевтических концепций, таких как, например, терапевтическая опухолевая иммунизация.

Вirus Orf (ORFV) принадлежит к семейству поксвирусов и имеет различные характеристики, делающие его интересным для получения рекомбинантных вакцин и предпочтительным относительно других технологий. Он является прототипом рода парапоксвирусов и принадлежит к семейству Poxviridae. ORFV являются оболочечными, сложными дцДНК-вирусами, имеющими морфологию, напоминающую клубок шерсти, и имеют средний размер приблизительно 260×160 нм. Они имеют линейный ДНК-геном с высоким содержанием GC-пар и размер приблизительно от 130 до 150 т.п.н., центральная область которого ограничена с обеих сторон областями ITR ("инвертированных концевых повторов") и заканчивается шпилечной структурой, ковалентно соединяющей отдельные цепи ДНК друг с другом. В центральной области генома преимущественно находятся гены, в основном, необходимые для репликации и морфогенеза вируса и являющиеся высококонсервативными среди поксвирусов. И наоборот, в областях ITR есть так называемые неконсервативные гены вирулентности, в значительной степени определяющие диапазон хозяев, патогенность и иммуномодуляцию и, таким образом, характеризующие вирус.

У поксвирусов репликация вируса ограничена цитоплазмой и начинается со связывания вируса с поверхностью клетки-хозяина. После слияния в цитоплазму высвобождается так называемый вирусный кор, белковый кор, содержащий вирусный геном, раннюю вирусную мРНК и вирусные факторы транскрипции (TF). Затем начинается экспрессия ранних вирусных генов, при этом вирусная мРНК синтезируется под контролем поксвирус-специфичных ранних промоторов. После дезинтеграции структуры кора вирусная ДНК высвобождается в цитоплазму. В отличие от транскрипции "ранних" генов, происходящей исключительно под контролем вирусных TF, последующая транскрипция "промежуточных" и "поздних" генов зависит от поддержки клеточных TF. В результате, в отличие от экспрессии "промежуточных" и "поздних" генов для экспрессии ранних генов поксвирусов не требуется ни репликация вирусной ДНК, ни продукция вируса.

ORFV отличается очень узким диапазоном природных хозяев, включающим овец и коз. Инфекция проникает через повреждения кожи, делающие возможным проникновение вируса. Впоследствии репликация дермотропного вируса ограничена регенеративными кератиноцитами, инициируя контактный дерматит или Ecthyma contagiosum. Эта, как правило, слабопрогрессирующая, самоограничивающаяся инфекция манифестирует как локально ограниченное повреждение кожи или слизистой оболочки, при этом пустулы, вызываемые массивной инфильтрацией полиморфных ядерных гранулоцитов, в основном, возникают во рту и на вымени. Повреждения заживают через приблизительно 4-6 недель без формирования рубцов. Длительная иммунная защита не развивается, несмотря на сильный иммунный ответ, таким образом, что возможно повторное инфицирование даже спустя несколько недель, хотя клинические симптомы и продукция вируса значительно снижены. В случае ORFV не наблюдают системное распространение или виремию даже после экспериментальной внутривенной инъекции высоких доз инфицирующих вирусов.

ORFV считают зоонозным патогеном, и в редких случаях он также может передаваться людям через поврежденную кожу. После инфицирования можно наблюдать локально ограниченные отеки, главным образом, ограниченные пальцами и кистями рук, и изредка отеки лимфоузлов и лихорадку. Как правило, прогрессирование является безвредным, не сопровождается осложнениями и полностью проходит в течение от трех до восьми недель без клинических последствий. У пациентов с иммунной недостаточностью также наблюдают более тяжелое прогрессирование, которое, однако, полностью проходит после лечения противовирусными средствами, такими как цидофовир или имиквимод.

ORFV представляет интерес в связи с получением рекомбинантных вакцин. По сравнению с ортопоксвирусами, ORFV отличается очень ограниченным тропизмом в отношении природных хозяев, включающим овец и коз. В результате, у людей можно почти исключать ингибирующий "предиммунитет" против вектора, вызываемый природной инфекцией, как можно наблюдать в случае большинства распространенных вирусных векторов на основе вируса осповакцины и аденовирусов. Кроме того, исключительно слабый и кратковременный иммунитет против вектора ORFV делает возможной очень эффективную бустерную и/или повторную вакцинацию или иммунизацию с использованием вакцин на основе ORFV, направленных против дополнительных патогенов.

Введение ORFV пермиссивным, а также непермиссивным, хозяевам приводит к сильной реакции,

стимулирующей иммунитет, отличающейся выраженной индукцией механизмов врожденного иммунитета и высвобождением интерферонов, цитокинов и хемокинов. Вскоре после иммунизации дендритные клетки накапливаются в месте инъекции, а затем посредством активации Т- и В-клеток индуцируют специфический адаптивный иммунный ответ. В отличие от вакцин из инактивированных вирусов и живых векторов, главным образом, индуцирующих гуморальный иммунный ответ, значительным преимуществом является сбалансированная индукция клеточного и гуморального иммунного ответа после иммунизации с использованием рекомбинантного ORFV. В то же время, это делает использование адъювантов излишним, что может вызывать непреднамеренные побочные эффекты и воспалительные реакции. Другими преимуществами, кроме того, являются возможность стандартизированного получения рекомбинантных вакцин в устойчивых линиях клеток без использования антибиотиков и отказ от использования куриных яиц в производстве (повышение количества случаев непереносимости белка и антибиотиков).

Аттенуированная вакцина ORFV, одобренная для использования в ветеринарии, имеет обозначение D1701 в соответствии с идентичным штаммом ORFV. Эту вакцину, в инактивированной форме известную под торговым названием байпамун (Bayer) или зилексис (Pfizer), исходно получали посредством выделения вируса дикого типа из овцы и последующей адаптации в результате множественных пассажей в культуре клеток почки быка. Затем его адаптировали с использованием клеток Vero (клетки почки африканской зеленой марышки), что приводило к получению вектора ORFV D1701-V. D1701-V дополнительно аттенуировали, и у овцы с иммуносупрессией он приводил лишь к бессимптомным инфекциям.

В настоящее время в качестве участка инсерции в рекомбинантных векторах ORFV используют locus VEGF. Согласно современному уровню знаний, это приводит к предполагаемому преимуществу, состоящему в том, что посредством элиминации гена *vegf-e*, находящегося под контролем поксвируспецифичных "ранних" промоторов и рассматриваемого в качестве фактора вирулентности, происходит дальнейшая аттенуация вектора. В то же время, получено несколько рекомбинантных вакцин на основе ORFV, и их исследовали с использованием модели на животных. В настоящее время рекомбинантные вакцины ORFV используют против различных инфекционных заболеваний, таких как, например, болезнь Ауески, бешенство, болезнь Борна, грипп или классическая чума свиней.

О хорошей стимуляции иммунитета и профилактически применимом эффекте рекомбинантных вирусов Orf может свидетельствовать количество вакцин против различных вирусных инфекционных заболеваний, разработанных за последние годы. Обзор использования рекомбинантных поксвирусов, включая ORFV, для получения рекомбинантных белков можно найти в Rziha et al. (2000), Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes, Journal of Biotechnology Vol. 83, pages 137-145, and Buttner and Rziha (2002), Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome, J. Vet. Med. B. Vol. 49, pages 7-16.

Ограниченное использование существующих рекомбинантных векторов ORFV можно объяснить, в частности, длительными процедурами селекции. В частности, до сих пор невозможно получение поливалентных вакцин. Кроме того, известные рекомбинантные векторы ORFV не обладают точно контролируемой экспрессией чужеродных генов.

В связи с этим задачей, лежащей в основе настоящего изобретения, является получение нового рекомбинантного вектора ORFV, посредством которого можно уменьшать недостатки известных векторов ORFV и векторных систем или избегать их.

Эту задачу решают с помощью рекомбинантного Orf-вирусного (ORFV) вектора, содержащего следующее: (1) по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую и экспрессирующую чужеродный ген, и (2) по меньшей мере один промотор, контролирующий экспрессию нуклеотидной последовательности, отличающегося тем, что нуклеотидную последовательность встраивают в по меньшей мере один из локусов инсерции (IL) 1, 2 и 3, локализованных в геноме ORFV в следующих областях:

	IL 1	IL 2	IL 3
Рестрикционный фрагмент	<i>HindIII</i> -фрагмент C, <i>KpnI</i> -фрагмент G, <i>BamHI</i> -фрагмент C/G, <i>EcoRI</i> -фрагмент B	<i>HindIII</i> -фрагмент B, <i>KpnI</i> -фрагмент A, <i>BamHI</i> -фрагмент A/E	<i>HindIII</i> -фрагмент G/D, <i>KpnI</i> -фрагмент B, <i>BamHI</i> -фрагмент A, <i>EcoRI</i> -фрагмент D
<i>и/или</i>			
Ген/ORF	006, 007 (дУТФаза), 008 (G1L-Ank), 009 (G2L)	102, 103	114, 115, 116, 117 (GIF)
<i>и/или</i>			
Положение нуклеотида	Нуклеотиды 500±100-2400±600	Нуклеотиды 5210±100-7730±100	Нуклеотиды 15660±100-17850±100

В рамках изобретения термин "вирус Orf" (ORFV) относится ко всем вирусам и штаммам вирусов, входящим в вид *Parapoxvirus ovnis*, в частности к штамму D1701.

В рамках изобретения термин "рекомбинантный вектор ORFV" относится к вектору на основе генома ORFV, сконфигурированному для транспорта и/или экспрессии чужеродного гена в биологических клетках.

В рамках изобретения термин "чужеродный ген" относится к гену или открытой рамке считывания (ORF), происходящим не из генома ORFV.

В рамках изобретения термин "промотор" относится к участку нуклеиновой кислоты, делающему возможной регулируемую экспрессию чужеродного гена в векторе ORFV по изобретению. Предпочтительно, он относится к промотору ORF, т.е. промотору, существующему в геноме ORFV дикого типа, или промотору, полученному из него, или искусственному промотору, такому как промотор поксвируса, промотор CMV и т.д.

В рекомбинантном векторе ORFV положение локусов инсерции IL 1, 2 и 3 в геноме ORFV можно определять по изобретению несколькими способами: с помощью рестрикционных фрагментов, генов ORFV или открытых рамок считывания (ORF) или положений нуклеотидов в геноме ORFV.

Общепринятое описание локализации IL 1, 2 и 3 осуществляют с помощью карт рестрикции и рестрикционных фрагментов, в которых локализуются области инсерции. Карта рестрикции ORFV для штамма D1701 в виде примера представлена в Cottone et al. (1998), Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701, Virus Research, Vol. 56, pages 53-67. Содержание этой публикации является частью описания настоящего изобретения. В рамках изобретения, например, в отношении IL 1, обозначения HindIII-фрагмент C, KpnI-фрагмент G, BamHI-фрагмент C/G, EcoRI-фрагмент B означают, что этот локус инсерции располагается от HindIII-фрагмента C до EcoRI-фрагмента B. IL 2 располагается от HindIII-фрагмента I-J до EcoRI-фрагмента A/E. IL 3 располагается от HindIII-фрагмента G/D до EcoRI-фрагмента D.

Обозначения 006, 007 (дУТФаза), 008 (G1Li-Ank), 009 (G2L) в случае IL 1 означают, что локус инсерции располагается от гена или ORF 006 до гена или ORF 009. Обозначения в скобках относятся к кодируемым продуктам или кодируемым ферментативным активностям в той степени, в которой они известны в настоящее время.

В рамках изобретения IL 1 локализуется в области, начинающейся с нуклеотида 400-600 (500 ± 100) и заканчивающейся нуклеотидом 1800-3000 (2400 ± 600).

Указанное для IL 1 применимо к IL 2 и IL 3 в соответствии с приведенной выше таблицей.

Указанные положения нуклеотидов (nt) установлены авторами настоящего изобретения при многократном определении в различных штаммах ORFV. При исследовании штамма D1701 или его вариантов определяли следующие положения, являющиеся особенно предпочтительными:

IL 1: Нуклеотиды 496-2750, нуклеотиды 496-1912, нуклеотиды 511-2750.

IL 2: Нуклеотиды 52112-7736.

IL 3: Нуклеотиды 15656-17849.

Авторы настоящего изобретения установили, что чужеродные гены можно стабильно встраивать в геном ORFV в указанные недавно обнаруженные локусы инсерции. Это являлось неожиданным. До сих пор считалось, что области локусов инсерции в геноме необходимы для репликации вируса и не подходят для экспрессии чужеродных генов.

Важным преимуществом вектора ORFV по изобретению оказалось то, что посредством выбора локуса инсерции можно контролировать экспрессию генов. Например, экспрессия чужеродных генов в IL 2 снижена по сравнению с экспрессией в используемом в настоящее время локусе VEGF под действием фактора 2. Кроме того, посредством выбора промотора можно направленно влиять на силу и время экспрессии чужеродного гена.

Таким образом, полностью решается задача, лежащая в основе настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантного вектора ORFV по изобретению ORFV представляет собой штамм D1701.

Эта мера имеет преимущество, состоящее в том, что используют вектор, являющийся аттенуированным и вызывающим лишь бессимптомные инфекции у хозяина. В изобретение входят все варианты D1701, включая D1701-B и D1701-V.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления рекомбинантного вектора ORFV по изобретению промотор является промотором ORFV, более предпочтительно - ранним промотором ORFV, предпочтительно содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 1 (P1), SEQ ID NO: 2 (P2), SEQ ID NO: 3 (VEGF), SEQ ID NO: 4 (оптимизированный "ранний" промотор), SEQ ID NO: 5 (промотор 7,5 кДа) и SEQ ID NO: 6 (консенсусная последовательность "раннего" промотора).

Эта мера имеет преимущество, состоящее в том, что используют промоторы, делающие возможным высокий уровень экспрессии чужеродного гена и направленный контроль экспрессии. Недавно авторами настоящего изобретения разработаны промоторы P1 и P2. Остальные промоторы получены из вируса осповакцины и описаны в Davidson and Moss (1989), Structure of Vaccinia virus late promoters, J. Mol. Biol., Vol. 210, pages 771 to 784, и Yang et al. (2011), Genome-wide analysis of the 5' and 3' ends of Vaccinia Virus

early mRNAs delineates regulatory sequences of annotated and anomalous transcripts, J. Virology, Vol. 85, Nr. 12, S. 5897-5909, Broyles (2003), Vaccinia virus transcription, J. gene. Virol., Vol. 84, Nr. 9, S. 2293-2303. В соответствии с данными, полученными авторами настоящего изобретения, P2 вызывает значительное снижение силы экспрессии по сравнению с P1. Это было неожиданным, т.к. промотор P1 на 100% соответствует консенсусной последовательности из вируса осповакцины, но не P2. Низкая экспрессия "оптимального" промотора вируса осповакцины (ортопоксвируса) в ORFV (парапоксвирусе) противоречит этому и является неожиданной. Также неожиданным являлось то, что промотор P2 вызывает сильную экспрессию.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления рекомбинантного вектора ORFV по изобретению промотор локализуется в положении нуклеотидов 28 ± 10 - 13 ± 210 выше нуклеотидной последовательности, кодирующей чужеродный ген.

Эта мера имеет преимущество, состоящее в том, что промотор локализуется в положении, делающем возможной высокую силу экспрессии и контролируемую экспрессию чужеродного гена.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления рекомбинантного вектора ORFV по изобретению по меньшей мере в один из IL 1, 2 или 3 встраивают несколько, предпочтительно - 2, 3, 4 или более, нуклеотидных последовательностей, кодирующих и экспрессирующих чужеродный ген.

Эта мера имеет преимущество, состоящее в том, что с помощью одного рекомбинантного вектора ORFV по изобретению можно экспрессировать множество чужеродных генов. Этот вариант осуществления особенно подходит для получения поливалентных вакцин, в то же время направленных против ряда антигенных структур. В каждом локусе инсерции можно экспрессировать множество чужеродных генов, предпочтительно - 2, 3, 4 или более.

В конфигурации, являющейся предпочтительной в рамках изобретения, рекомбинантный вектор ORFV содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую и экспрессирующую чужеродный ген, находящийся под контролем, предпочтительно, раннего промотора ORFV и встраиваемый в локус инсерции, который в геноме ORFV локализуется в гене *vegf E*.

Эта мера имеет преимущество, состоящее в том, что используют локус инсерции, уже описанный и хорошо охарактеризованный на современном уровне техники. Локус *vegf* можно использовать для направленного контроля экспрессии генов. При использовании локуса *vegf* можно повышать экспрессию чужеродного гена по сравнению с любым из новых локусов экспрессии, например, IL 2.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения чужеродный ген в рекомбинантном векторе ORFV выбран из группы следующих антигенов: вирусного антигена, предпочтительно антигена вируса бешенства, включая гликопротеин (RabG); антигена вируса гриппа А, включая нуклеопротеин (NP), гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA); опухолевый антиген, предпочтительно вирусный опухолевый антиген, включая HPV-селективный вирусный опухолевый антиген; опухоли-ассоциированный антиген, включая вирусный опухоли-ассоциированный антиген, включая HPV-селективный вирусный опухоли-ассоциированный антиген; паразитарный антиген, предпочтительно плазмодийный антиген; цитокин.

Эта мера имеет преимущество, состоящее в том, что особенно важные антигены, в частности, для получения вакцин, экспрессируются с помощью рекомбинантного вируса ORFV по изобретению.

Другой объект настоящего изобретения относится к биологической клетке, предпочтительно - клетке млекопитающего, более предпочтительно - клетке Vero, содержащей ORFV вектор по изобретению.

Другой объект настоящего изобретения относится к композиции, предпочтительно - фармацевтической композиции, содержащей вектор ORFV по изобретению и/или клетку по изобретению. Фармацевтическая композиция, предпочтительно, может являться вакциной, более предпочтительно - поливалентной вакциной.

Характеристики, преимущества, признаки и дальнейшая разработка вектора ORFV по изобретению соответствующим образом применимы к клетке по изобретению и композиции по изобретению.

Другой объект настоящего изобретения относится к применению рекомбинантного вектора ORFV по изобретению для экспрессии по меньшей мере одного чужеродного гена, более предпочтительно - для экспрессии по меньшей мере одной вакцины, содержащей один продукт чужеродного гена (моновалентная вакцина), более предпочтительно - вакцины, содержащей по меньшей мере два продукта чужеродных генов (поливалентная вакцина).

В этом контексте термин "по меньшей мере" означает включение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и т.д. чужеродных генов.

Характеристики, преимущества, признаки и дальнейшая разработка рекомбинантного вектора ORFV по изобретению соответствующим образом применимы к применению изобретения.

Другой объект настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей промотор ORFV, предпочтительно - ранний промотор ORFV, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 (P1) и SEQ ID NO: 2 (P2).

Молекула нуклеиновой кислоты по изобретению кодирует новые промоторы ORFV, особенно подходящие для экспрессии чужеродных генов в рекомбинантном векторе ORFV. Промоторы вызывают очень сильную раннюю экспрессию генов.

Следует понимать, что описанные выше признаки и признаки, описываемые далее, можно использовать не только в комбинации, указанной в каждом случае, но также и в других комбинациях или в отдельности без отклонения от объема изобретения.

Изобретение далее описано посредством вариантов осуществления, приводящих к дополнительным признакам, преимуществам и характеристикам изобретения. Варианты осуществления являются исключительно иллюстративными и не ограничивают объем изобретения. Приведена ссылка на включенные фигуры, на которых представлено следующее.

На фиг. 1 представлена карта рестрикционных фрагментов HindIII ДНК-генома ORFV D1701-V. Заштрихованными прямоугольниками указаны положения инсерции IL1, IL2, IL3 и vegf. ITRL означает инвертированные концевые повторы на концах генома.

На фиг. 2 изображена схема трансферная плаزمиды pD1-GFP-D2Cherry. На схеме вектора представлен ген AcGFP (заштриховано линиями) под контролем искусственного раннего промотора P1 (черная стрелка, сверху) и ген mCherry (крестовая штриховка) под контролем искусственного раннего промотора P2 (черная стрелка, справа). После обоих генов с флуоресцентной меткой находятся поксвирус-специфичные ранние мотивы терминации транскрипции T5NT (указаны черным). Гены отделены друг от друга спейсером (Sp). Несколько участков множественного клонирования (MCS 1-6) делают возможным замену флуоресцентного маркерного гена желаемыми чужеродными генами. Гены включают фланкирующие области, которые в 5'-3'-направлении гомологичны области генома ORFV ORF117/118, в 3'-5'-направлении гомологичны области генома ORFV ORF114 и делают возможным направленное встраивание в локус IL 3 генома D1701-V посредством гомологичной рекомбинации.

На фиг. 3 представлен анализ экспрессии различных флуоресцентных продуктов рекомбинации. (A, а) Флуоресцентное микроскопическое изображение 6-луночного планшета с клетками Vero, инфицированными D1701-V-D2Cherry. Для селекции продуктов рекомбинации выбирали Cherry-флуоресцентные бляшки и выращивали вирус из бляшек. После очистки четырех бляшек гомогенность D1701-V-D2Cherry проверяли с помощью ПЦР-анализов. (A, b) Определение экспрессии Cherry с помощью проточной цитометрии. На фигуре представлен пример экспрессии в инфицированных D1701-V-D2Cherry клетках Vero (MOI=1,0) при проточной цитометрии. Через 48 ч приблизительно 45% всех живых отдельных клеток экспрессировали Cherry. Неинфицированные клетки Vero служили в качестве отрицательного контроля. (B) Флуоресцентная экспрессия рекомбинантного D1701-V-GFP-D2Cherry в клетках Vero, инфицированных D1701-V-GFP-D2Cherry (MOI=0,5). В верхнем ряду представлено флуоресцентное изображение, полученное через 48 ч после инфицирования (20-кратное увеличение). В нижнем ряду представлена флуоресцентная экспрессия через 24 ч (63-кратное увеличение). Флуоресцентная микроскопия делает возможной визуализацию экспрессии AcGFP-(GFP), mCherry (mCherry) и их обоих в одной клетке (наложение). Кроме того, клетки визуализировали с помощью микроскопии в проходящем свете (проходящий свет). (C) Флуоресцентная экспрессия рекомбинантного D1701-V-D1GFP-D2Cherry. Клетки Vero инфицировали D1701-V-D1GFP-P2Cherry (MOI=1,0) и определяли экспрессию с помощью проточного цитометра. Через 24 ч приблизительно 25% всех живых отдельных клеток экспрессировали и mCherry, и GFP. Неинфицированные клетки Vero использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 4 представлено определение интенсивностей флуоресценции различных продуктов рекомбинации. (A) Клетки Vero инфицировали экспрессирующими GFP продуктами рекомбинации (MOI приблизительно 1,5) и через 24 ч среднюю интенсивность флуоресценции определяли с помощью проточного цитометра. Неинфицированные клетки Vero служили в качестве отрицательного контроля. M1 означает область, в которой можно определять 99,39% всех неинфицированных клеток (первая передняя кривая). И наоборот, в области M2 можно обнаружить GFP-положительные клетки. Популяция GFP-положительных клеток после инфицирования была сравнима с GFP-экспрессирующими продуктами рекомбинации (38,2-40,0%). Было очевидно, что интенсивность GFP в D1701-V-D1GFP-инфицированных клетках (непрерывная линия) была наименьшей, в D1701-V-D2GFP-инфицированных клетках (----) была наиболее высокой. (B) Клетки Vero инфицировали mCherry-экспрессирующими продуктами рекомбинации (MOI приблизительно 3,0) и через 24 ч измеряли среднюю интенсивность флуоресценции посредством проточной цитометрии. Неинфицированные клетки Vero служили в качестве отрицательного контроля. M1 означает область, в которой можно определять 99,47% всех неинфицированных клеток (первая передняя кривая). И наоборот, в области M2 обнаруживали Cherry-положительные клетки. Популяция mCherry-положительных клеток после инфицирования была сравнима с GFP-экспрессирующими продуктами рекомбинации (62,5-63,3%). Интенсивность mCherry в D1701-V-Cherry-инфицированных клетках (-----) была значительно ниже, чем в D1701-V-D2Cherry- (синяя линия) или D1701-V2Cherry-инфицированных клетках (красная линия). (C+D) На графиках представлена процентная доля интенсивности флуоресценции различных флуоресцентных продуктов рекомбинации относительно D1701-V-GFP (C) или D1701-V-Cherry (D). Данные представляют собой средние значения по меньшей мере для 3 независимых экспериментов.

Варианты осуществления

1. Геном ORFV.

Геном ORFV состоит из линейной двухцепочечной ДНК и имеет длину приблизительно 138 т.п.н.,

содержание GC-пар приблизительно 64% и содержит 130-132 генов. Конструкция генома ORFV схожа с конструкцией геномов других поксвирусов. Он состоит из центральной области с необходимыми генами, имеющими высокую степень консервативности среди Poxviridae. В геноме ORFV есть 88 генов, консервативных для всех Chordopoxvirinae. В концевых областях локализуются вирусные гены, не являющиеся необходимыми для роста *in vitro*, однако, важных для патогенности и тропизма вируса.

По сравнению с другими вирусами Orf в вирусе D1701, адаптированном для репликации в культуре клеток, наблюдают значительное увеличение инвертированных концевых повторов (ITR). Эти изменения не только вызывают утрату, но также и дубликацию нескольких генов, включая ген *veg-f-e*. Адаптация D1701-B, амплифицируемого в клетках быка ВК-КЛ3А, к росту в клетках Vero приводила к получению трех дополнительных локусов инсерции IL 1, IL 2 и IL 3 в геноме вируса, теперь обозначаемых как D1701-V. Они приведены на фиг. 1.

2. Промоторы поксвирусов.

Поксвирусы содержат "ранние", "промежуточные" и "поздние" промоторы. Эти разные промоторы содержат несколько характерных признаков последовательности, дополнительно описываемых далее на примере VACV. "Ранний" промотор VACV состоит из критической области длиной 16 или 15 нуклеотидов, соответственно, разделенных инициаторной областью длиной 7 нуклеотидов и спейсерной областью длиной 11 нуклеотидов. Эта критическая область достаточно богата аденином, в то время как спейсерная область достаточно богата тиминном. Инициация транскрипции почти всегда, за редким исключением, начинается с пурина. Замены нуклеотидов в критической области могут иметь значительный отрицательный эффект в отношении активности промотора, возможна даже полная утрата активности. При анализе замен в раннем промоторе VACV 7,5 кДа получали оптимизированную критическую область, кроме того, удалось получить консенсусную последовательность "раннего" промотора поксвируса, представленную в табл. 1. "Промежуточные" промоторы состоят из АТ-богатой коровой последовательности, имеющей длину приблизительно 14 нуклеотидов, затем спейсерной области из 10-11 нуклеотидов, а затем короткой инициаторной области. Структура "поздних" промоторов состоит из вышележащей АТ-богатой области из приблизительно 20 нуклеотидов, отделенной от точки начала транскрипции спейсерной областью из приблизительно 6 нуклеотидов, включающей высококонсервативную последовательность-1 ТАААТ+4.

Таблица 1. Используемые промоторы

	Критическая область																SE Q ID NO	% идентичности по отношению к оптимизированн ому "раннему" промотору	Спейсерная область Богата тиминном, -12--2	Область инициации Главным образом, начинается с пурина, -1-6
	-28	-27	-26	-25	-24	-23	-22	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13				
Оптимизированный "ранний" промотор	A	A	A	A	A	T	T	G	A	A	A	A	A	C/T	T	A	3			
Промотор 7,5 кДа	A	A	A	A	G	T	A	G	A	A	A	A	T		T	A	4	75		
Консенсусная последовательность "раннего" промотора	A	A	A	A	A	A	T	G	A	A	A	A	A	A	A/T	A	5	87,5		
VEGF	C	A	A	A	A	T	G	T	A	A	A	T	T	A	T	A	6	62,5		
P1	A	A	A	A	A	T	T	G	A	A	A	A	A	T	T	A	1	100		
P2	A	A	A	A	A	T	T	G	A	A	A	T	T	C	T	A	2	87,5		

P1 и P2 - недавно разработанные авторами настоящего изобретения.

3. Получение рекомбинантного вектора ORFV.

Авторы настоящего изобретения искали новую стратегию для получения рекомбинантного поливалентного вектора ORFV. При адаптации ORFV к культуре клеток Vero возникало несколько делеций в вирусном геноме. Определяли, подходят ли области делеций для встраивания чужеродных генов (Фиг. 1А).

По этой причине, вместе с другими плазмидами конструировали трансферную плазмиду pDel2, включающую гомологичные секции области IL 3 (фиг. 2). Клонирование чужеродных генов в плазмиду делали возможным с использованием нескольких MCS (участков множественного клонирования). Кроме того, плазмиду конструировали таким образом, что она делает возможным одновременное встраивание

множества чужеродных генов, каждый из которых находится под контролем искусственных ранних промоторов ORFV и связан с поксвирус-специфичными ранними мотивами терминации транскрипции T5NT (фиг. 2).

Конструировали нуклеотидные последовательности новых искусственных ранних промоторов ORFV P1 и P2.

В первом эксперименте было необходимо изучить, подходит ли локус IL 2 для стабильного встраивания чужеродных генов. С этой целью флуоресцентный маркерный ген mCherry клонировали под контролем промотора P2 в трансферную плазмиду pDel2. Затем с помощью плазмиды трансфицировали клетки Vero, инфицированные D1701-VrV, и новые рекомбинантные вирусы визуально выбирали после идентификации светящихся красным клеток посредством флуоресцентной микроскопии и культивировали гомогенные рекомбинантные D1701-V-D2-Cherry, полученные посредством нескольких очисток блешек (фиг. 3A, a).

Правильное встраивание гена mCherry в локус IL 3 D1701-VrV подтверждали посредством специфических ПЦР-анализов и саузерн-блоттинга, правильную экспрессию можно определять посредством анализа флуоресценции и вестерн-блоттинга, а также проточной цитометрии (фиг. 3A, b).

В этом контексте сильную экспрессию можно определять вскоре после инфицирования. Посредством множественных пассажей продукта рекомбинации *in vitro* можно демонстрировать, что встраивание чужеродного гена в геном ORFV является стабильным.

Это также можно продемонстрировать с помощью полученного продукта рекомбинации D1701-V-GFP-D2-Cherry, в котором ген AcGFP встраивают в ген *vegf-e* и ген mCherry встраивают в локус IL 3 таким образом, что два гена флуоресцентных маркеров одновременно рано экспрессируются в разных локусах инсерции (фиг. 3B).

Кроме того, необходимо изучить, можно ли одновременно стабильно встраивать второй чужеродный ген в локус IL 3. С этой целью, в дополнение к P2-контролируемому гену mCherry в трансферную плазмиду pDel2 клонировали ген AcGFP под контролем промотора P1. Селекцию и очистку продукта гомологичной рекомбинации D1701-V-D1-GFP-D2-Cherry осуществляли аналогично описанной выше селекции D1701-V-P2-Cherry.

И снова, правильное встраивание обоих чужеродных генов в локус IL 2 демонстрировали посредством ПЦР и саузерн-блоттинга. Детекцию экспрессии осуществляли посредством флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии (фиг. 3C).

Силу промоторов P1 и P2 сравнивали друг с другом и с промотором P_{veg} посредством анализов экспрессии. Можно показать, что промотор P2 индуцировал наиболее сильную экспрессию генов, и промотор P1 индуцировал наиболее слабую экспрессию генов (фиг. 4A+4C). Это было неожиданным, т.к. P1 на 100% соответствует консенсусной последовательности из вируса осповакцины, но не P2.

Также можно показать, что встраивание второго регулируемого чужеродного гена под контролем отдельного промотора не имеет эффекта в отношении силы экспрессии первого чужеродного гена. Не имело значения, встраивали ли второй ген в тот же или в другой локус инсерции. После инсерции P2-контролируемого гена mCherry в локус VEGF влияние области инсерции можно анализировать в сравнении с продуктом рекомбинации, содержащим P2-регулируемый ген mCherry, встроенный в локус IL 3. Также можно показать, что экспрессия генов в локусе VEGF приблизительно в два раза превышала экспрессию в локусе IL 2 (фиг. 4B+4D).

В целом, можно показать, что Orf-вирусный вектор D1701-V очень хорошо подходит для получения поливалентных продуктов рекомбинации. Несколько чужеродных генов можно стабильно встраивать в вирусный геном, например, с помощью недавно обнаруженных локусов инсерции IL 1, 2 и 3 или известного локуса инсерции VEGF. Сила экспрессии чужеродного гена зависит от промотора, но также от локуса инсерции. Наиболее сильной экспрессия генов достигали после встраивания P2-контролируемого чужеродного гена в локус VEGF.

Авторы настоящего изобретения получали различные дополнительные векторы, которые можно отличать по виду и группе различных чужеродных маркерных генов, областям инсерции и промоторам (табл. 2).

Таблица 2. Обзор недавно полученных флуоресцентных векторов ORFV

Продукт рекомбинации	Локус			Экспрессия чужеродного гена
	VEGF	IL 3		
D1701-V-Cherry	P _{vegf} : mCherry	-	-	+++
D1701-V-Cherry-D1GFP	P _{vegf} : mCherry	P1:AcGFP	-	+++/+
D1701-V-Cherry-D2GFP	P _{vegf} : mCherry	-	P2: AcGFP	+++ /++++
D1701-V12-Cherry	P2: mCherry	-	-	++++
D1701-V12-Cherry-D2GFP	P2: mCherry	-	P2: AcGFP	++++ /++++
D1701-V-GFP	P _{vegf} : AcGFP	-	-	+++
D1701-V-GFP-D2Cherry	P _{vegf} : AcGFP	-	P2: mCherry	+++ /++++
D1701-V-GFP-D2CD4	P _{vegf} : AcGFP	-	P2: hCD4	+++ /++++
D1701-V-D1GFP	P _{vegf} : LacZ	P1 AcGFP	-	+++ /+
D1701-V-D1GFP-D2Cherry	P _{vegf} : LacZ	P1 AcGFP	P2: mCherry	+++ /++++
D1701-V-D2GFP	P _{vegf} : LacZ	-	P2: AcGFP	+++ /++++
D1701-V-D2Cherry	P _{vegf} : LacZ	-	P2: mCherry	+++ /++++
D1701-V-D2Orange	P _{vegf} : LacZ	-	P2: mOrange	+++ /++++
D1701-V-CD4-D2Cherry	P _{vegf} : hCD4	-	P2: mCherry	+++ /++++

В таблице представлен обзор флуоресцентных рекомбинантных векторов ORFV, полученных при работе над настоящим изобретением. Область инсерции (локус) и промоторы, используемые для контроля экспрессии чужеродного гена (P_{vegf}, P1, P2), приведены в таблице для каждого из продуктов рекомбинации. Кроме того, указана сила экспрессии чужеродного гена (от очень сильной=++++ до слабой=+).

Настоящее изобретение делает возможным множество вариантов разработки новых рекомбинантных вакцин на основе ORFV. Можно получать продукты рекомбинации, одновременно экспрессирующие множество антигенов. Это может быть значительным преимуществом при получении универсальной вакцины из комбинированных вакцин или терапевтических опухолевых вакцин, направленных против множества опухолевых антигенов. Кроме того, на иммунный ответ можно влиять посредством одновременной направленной инсерции антигена и цитокинов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вектор на основе вируса Orf (ORFV) для экспрессии чужеродного гена, причем ORFV принадлежит к штамму D1701, содержащий следующее: (1) по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую и экспрессирующую чужеродный ген, и (2) по меньшей мере один поксвирусный или происходящий из поксвируса промотор, контролирующий экспрессию нуклеотидной последовательности, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность локализована по меньшей мере в одном из локусов инсерции (IL) 2 и 3, локализованных в геноме ORFV в следующих областях:

	IL 2	IL 3
Рестрикционный фрагмент	<i>HindIII</i> -фрагмент <i>KpnI</i> -фрагмент B, <i>BamHI</i> - фрагмент A, <i>EcoRI</i> - фрагмент A/E	<i>HindIII</i> -фрагмент G/D, <i>KpnI</i> -фрагмент B, <i>BamHI</i> - фрагмент A, <i>EcoRI</i> - фрагмент D
или		
Ген/ORF	102, 103	114, 115, 116, 117 (GIF)
или		
Положение нуклеотида	Нуклеотиды 5210±100- 7730±100	Нуклеотиды 15660±100- 17850±100

2. Рекомбинантный вектор ORFV по п.1, отличающийся тем, что промотор ORFV является ранним промотором ORF, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 1 (P1), SEQ ID NO: 2 (P2), SEQ ID NO: 3 (оптимизированный "ранний"), SEQ ID NO: 4 (промотор 7,5 кДа), SEQ ID NO: 5 (консенсусная последовательность "раннего") и SEQ ID NO: 6 (консенсусная последовательность "раннего" VEGF).

3. Рекомбинантный вектор ORFV по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что промотор лока-

лизован в положении нуклеотидов 28 ± 10 - 13 ± 10 выше нуклеотидной последовательности, кодирующей чужеродный ген.

4. Рекомбинантный вектор ORFV по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что по меньшей мере в один из IL 2 или 3 встраивают 2, 3, 4 или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих и экспрессирующих чужеродный ген.

5. Рекомбинантный вектор ORFV по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что он содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую и экспрессирующую чужеродный ген, находящийся под контролем раннего промотора ORFV и встраиваемую в локус инсерции, локализующийся в геноме ORFV в гене *vegF* E.

6. Рекомбинантный вектор ORFV по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что продукт, кодируемый чужеродным геном, выбран из группы следующих антигенов: вирусный антиген; опухолевый антиген; опухолеассоциированный антиген, включая вирусный опухолеассоциированный антиген, включая HPV-селективный вирусный опухолеассоциированный антиген; паразитарный антиген; цитокин.

7. Рекомбинантный вектор ORFV по п.6, отличающийся тем, что вирусный антиген выбран из антигена вируса бешенства, включая гликопротеин (RabG), и антигена вируса гриппа А, включая нуклеопротеин (NP), гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA); опухолевый антиген выбран из вирусного опухолевого антигена, включая HPV-селективный вирусный опухолевый антиген; паразитарный антиген представляет собой плазмодийный антиген.

8. Клетка для экспрессии чужеродного гена, содержащая рекомбинантный вектор ORFV по любому из пп.1-7.

9. Клетка по п.8, представляющая собой клетку млекопитающего.

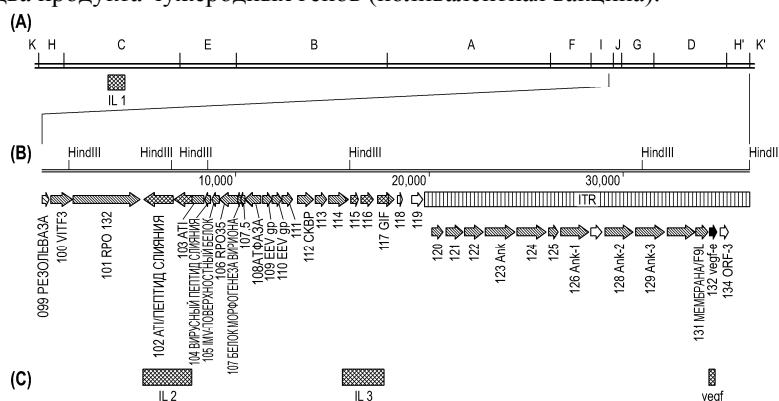
10. Клетка по п.9, представляющая собой клетку Vero.

11. Вакцина для профилактики или лечения вирусного, опухолевого и/или паразитарного заболевания, содержащая рекомбинантный вектор ORFV по любому из пп.1-7 или клетку по любому из пп.8-10.

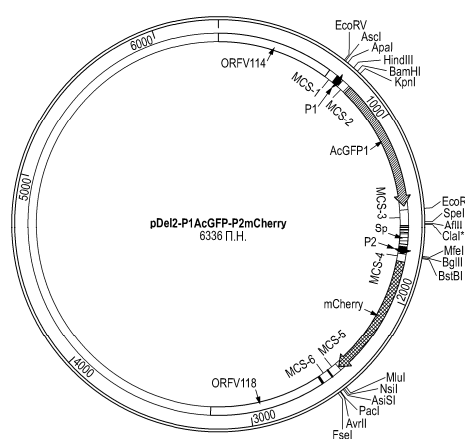
12. Вакцина по п.11, отличающаяся тем, что она является поливалентной вакциной.

13. Применение рекомбинантного вектора ORFV по любому из пп.1-7 для экспрессии по меньшей мере одного чужеродного гена.

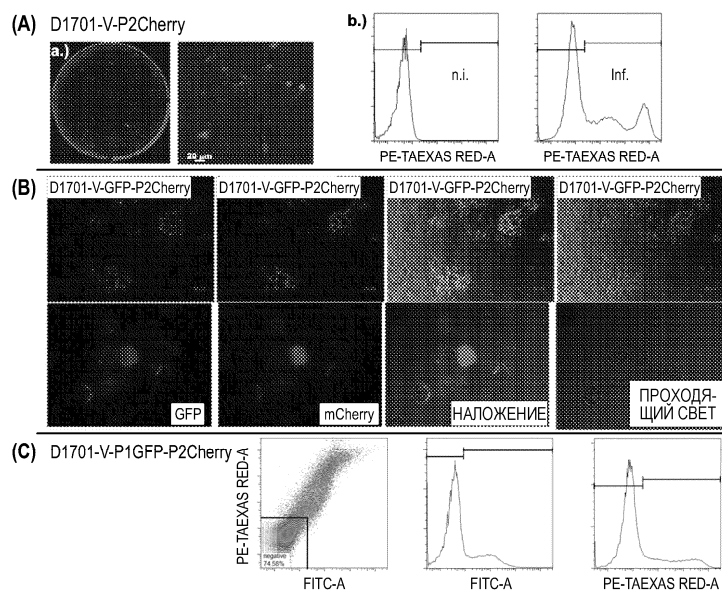
14. Применение рекомбинантного вектора ORFV по любому из пп.1-7 для получения вакцины, содержащей по меньшей мере один продукт чужеродного гена (моновалентная вакцина), или содержащей по меньшей мере два продукта чужеродных генов (поливалентная вакцина).



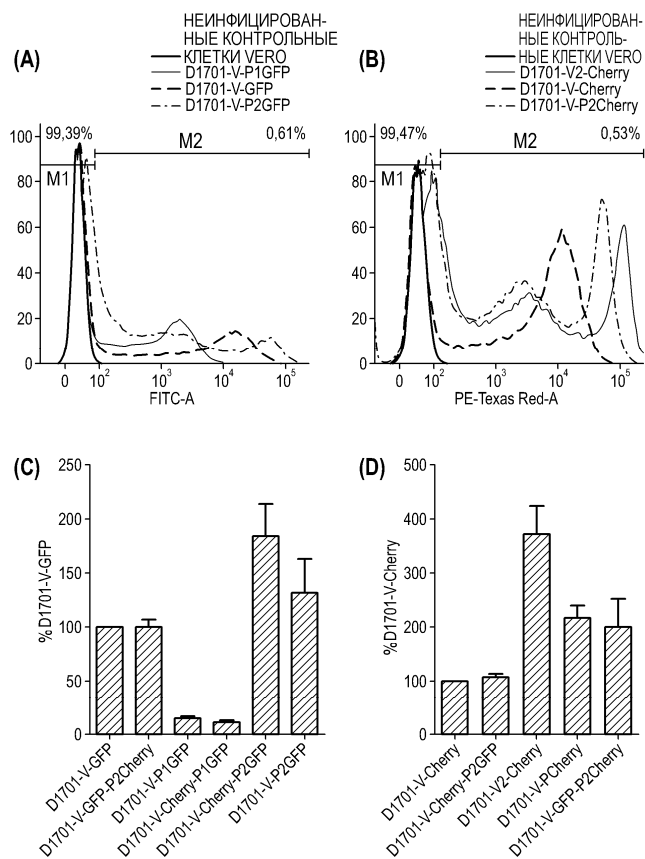
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2