



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **90098** (13) **C2**  
(51) **МПК (2009)**  
**C12N 15/86**  
**A61K 39/275**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПРОМОТОР ВІРУСУ ВІСПОВАКЦИНИ

1

(21) a200607039  
(22) 27.10.2004  
(24) 12.04.2010  
(86) РСТ/EP2004/012125, 27.10.2004  
(31) 04000943.3  
(32) 17.01.2004  
(33) EP  
(31) PA 2003 01730  
(32) 24.11.2003  
(33) DK  
(46) 12.04.2010, Бюл.№ 7, 2010 р.  
(72) ЛЕЙПЕР СОНЯ, DE/DE  
(73) БАВАРИАН НОРДІК А/С, DK  
(56) WO A 2004015118, 19.02.2004.  
WO A 0242480, 30.05.2002.  
MARS M ET AL: "Characterization of vaccinia virus early promoters and evaluation of their informational content." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY. 20 DEC 1987, vol. 198, no. 4, 20 December 1987 (1987-12-20), pages 619-631, XP009037526 ISSN: 0022-2836.  
CHAKRABARTI S ET AL: "COMPACT, SYNTHETIC, VACCINIA VIRUS EARLY/LATE PROMOTER FOR PROTEIN EXPRESSION" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 23, no. 6, December 1997 (1997-12), pages 1094-1097, XP001074084 ISSN: 0736-6205.  
(57) 1. Промотор, що складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що включає:  
(i) будь-яку нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 або 12,  
(ii) нуклеотидну послідовність довжиною щонайменше 15 нуклеотидів послідовності SEQ ID NO:2, 3, 4 або 6, і  
(iii) похідні послідовності SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 або 12, в яких не більше 10 нуклеотидів заміщені, делетовані і/або вбудовані відносно послідовності SEQ ID NO:8, 9, 10, 11 або 12, причому промотор є активним як промотор вірусу вісповакцини і/або активний у клітинах, інфікованих вірусом вісповакцини.  
2. Експресійна касета, що містить промотор за п. 1, а також кодуючу послідовність, де експресія кодуючої послідовності знаходиться під контролем вказаного промотору.

2

3. Експресійна касета за п. 2, в якій кодуюча послідовність кодує терапевтичні білки або пептиди, антигени, антигенні епітопи, антисмислову РНК або рибозими.  
4. ДНК, що містить промотор за п. 1 або експресійну касету за будь-яким з пп. 2 або 3, де ДНК є природним геномом модифікованого вірусу вісповакцини штаму Анкара.  
5. Вектор, що містить промотор за п. 1 або експресійну касету за будь-яким з пп. 2 або 3.  
6. Вектор за п. 5, вибраний з плазмідних векторів і вірусних векторів.  
7. Вектор за п. 6, де вірусний вектор являє собою вірус вісповакцини.  
8. Вектор за п. 7, де вірус вісповакцини являє собою модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара (MVA), переважно штам MVA-BN, депонований в Європейській колекції клітинних культур (ECACC) під номером V00083008, або його похідне, штам MVA 572, депонований в ECACC під номером VA94012707, або штам MVA 575, депонований в ECACC під номером V00120707.  
9. Вектор за п. 8, в якому промотор за п. 1 або експресійна касета за будь-яким з пп. 2 або 3 вбудовані у природний делеційний сайт геному MVA.  
10. Вектор за п. 8, в якому промотор за п. 1 або експресійна касета за будь-яким з пп. 2 або 3 вбудовані або у несуттєву частину вірусного геному або у міжгенну область вірусного геному.  
11. Вектор за будь-яким з пп. 5-10, що використовується як вакцина або лікарський засіб.  
12. Вакцина або фармацевтична композиція, що містить експресійну касету за будь-яким з пп. 2 або 3, ДНК за п. 4 або вектор за будь-яким з пп. 5-10.  
13. Вакцина або фармацевтична композиція за п. 12, яка містить щонайменше  $10^2$  TCID<sub>50</sub> (інфекційна доза для тканинної культури) вірусного вектора за будь-яким з пп. 7-10.  
14. Застосування експресійної касети за будь-яким з пп. 2 або 3, ДНК за п. 4 або вектора за будь-яким з пп. 5-10 для одержання вакцини або лікарського засобу.  
15. Застосування за п. 14, де вірусний вектор вводять у ефективній кількості при першій імунізації ("первинна вакцинація") і при другій імунізації ("ревакцинація").

(13) **C2**

(11) **90098**

(19) **UA**

16. Спосіб введення кодувочної послідовності у клітину-мішень, що передбачає введення вектора за будь-яким з пп. 5-10, експресійної касети за будь-яким з пп. 2-3 або ДНК за п. 4 у клітину-мішень, де клітиною-мішенню не є клітина людини і/або організму тварини.

17. Спосіб одержання пептиду, білка і/або вірусу, що включає інфікування клітини-хазяїна вірусним вектором за будь-яким з пп. 6-10, культивування інфікованої клітини-хазяїна у відповідних умовах і виділення і/або збагачення пептиду і/або білка, і/або вірусу, продукovanого вказаною клітиною-хазяїном.

18. Спосіб одержання пептиду, білка і/або вірусу, що включає трансфекцію клітин експресійною касетою за будь-яким з пп. 2-3, ДНК за п. 4 або пла-

змідним вектором за п. 6, інфікування клітини вірусом вісповакцини, культивування інфікованої клітини-хазяїна у відповідних умовах і виділення і/або збагачення пептиду і/або білка, і/або вірусів, продукovaných вказаною клітиною-хазяїном, де стадію інфікування клітин вірусом вісповакцини можна здійснювати до або після стадії трансфекції клітин.

19. Клітина, що містить експресійну касету за будь-яким з пп. 2 або 3 або вірусний вектор за будь-яким з пп. 6-10.

20. Застосування промотору за п. 1 для експресії кодувочної послідовності.

21. Спосіб одержання вектора за будь-яким з пп. 5-10, що включає стадію вбудовування експресійної касети за будь-яким з пп. 2 або 3 у векторний геном.

Даний винахід відноситься до промоторів, зокрема, промоторів для експресії генів і/або кодувочих послідовностей у вірусах вісповакцини, таких як модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара (MVA). Крім того, даний винахід відноситься до експресійних касет, що містять вказаний промотор, до векторів, які містять вказані експресійні касети, а також до фармацевтичних композицій і вакцин.

Рекомбінантні поксвіруси широко використовуються для експресії чужорідних антигенів в інфікованих клітинах. Більш того, рекомбінантні поксвіруси постійно досліджують як надзвичайно перспективні вакцини для індукції імунної відповіді на чужорідний антиген, що експресується у відповідному поксвірусному векторі. Найбільш відомими є, з одного боку, авіпоксвіруси (віруси віспи птахів), і, з іншого боку, віруси вісповакцини, зокрема, модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара (MVA). MVA близький до вірусу вісповакцини, представника роду ортопоксвірусів сімейства поксвірусів (Poxviridae). MVA був одержаний внаслідок серії з 516 пасажів штаму Анкара вірусу вісповакцини (CVA) в ембріональних фібробластах курчати (див. огляд Mayr A., et al., *Infection* 3, 6-14 [1975]). Внаслідок досить тривалих пасажів в одержаному MVA вірусі, відбулася делеція близько 31 тисячі основ геномної послідовності, і, отже, він був описаний як високосприятливий хазяїн, обмежений клітинами птахів (Meyer H. et al., *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038 [1991]). На різних тваринних моделях, які одержували MVA, було показано, що він є практично авірулентним (Mayr A. & Danner K. [1978] *Dev. Biol. Stand.* 41:225-34). Крім того, даний штам MVA проходив клінічну перевірку як вакцина для імунізації проти віспи людини (Mayr et al., *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B* 167, 375-390 [1987]. Stickl i et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99, 2386-2392 [1974]).

У патентах США №5736368 і США №6051410 розкритий рекомбінантний штам вірусу вісповакцини Wyeth, який експресує антигени і білки ВІЛ. У патенті США №5747324 розкритий рекомбінантний штам вірусу вісповакцини NYCBH, який експресує гени лентивірусу. У патенті EP O 243029 розкритий

рекомбінантний штам вірусу вісповакцини Western Reserve, який експресує гени ретровірусу людини. У патенті WO 02/42480 розкриті, зокрема, безпечні і атенуйовані штами MVA. Рекомбінантний MVA розкритий, зокрема, у патентах WO 98/13500 і WO 03/048184.

Для експресії гетерологічних генів у поксвірусах фахівцям у даній галузі відомо лише декілька промоторів, таких як промотори 30K і 40K (див., наприклад, патент США №5747324), сильний синтетичний ранній/пізній промотор (див., наприклад, Sutter et al., *Vaccine* (1994) 12, 1032-40), промотор P7.5 (див., наприклад, Endo et al., *J. Gen. Virol.* (1991) 72, 699-703), а також промотор, одержаний з гена А-типу інклюзії (ATI) (Li et al., *J. Gen. Virol.* (1998) 79, 613). Всі ці промотори використовують у рекомбінантних вірусах вісповакцини для експресії гетерологічних генів і, як було показано, для експресії вказаних генів, що приводить до продукування білка, який кодується гетерологічними генами. Оскільки для експресії генів в експресійних системах вірусу вісповакцини доступно лише небагато промоторів, існує загальна необхідність в інших промоторах для вірусів вісповакцини. Крім того, всі відомі зараз промотори являють собою досить сильні пізні промотори, тобто промотори, які можна застосовувати для експресії генів після реплікації вектора вірусу вісповакцини. У деяких випадках бажано мати промотори, що роблять можливою експресію генів відразу ж після інфікування ними клітини, тобто, існує необхідність у ранніх промоторах вірусу вісповакцини.

Крім того, як вказано вище, внаслідок поліпшеної безпечності MVA є досить перспективним вірусом для експресії гетерологічних генів. Разом з тим, всі відомі зараз промотори для експресії гетерологічних генів в MVA були одержані з інших вірусів вісповакцини, або являють собою синтетичні промотори для експресії в інших вірусах вісповакцини. Отже, існує також необхідність у промоторах, оптимізованих для експресії в MVA.

Даний винахід відноситься до промоторів, одержаних з геному модифікованого (штаму Анка-

ра) вірусу коров'ячої віспи (MVA). MVA-промотори не відомі у даній галузі.

Зокрема, даний винахід відноситься до промоторів, які містять або складаються з нуклеотидної послідовності, вибраної з групи, що включає:

(i) будь-яку нуклеотидну послідовність з наведених нижче SEQ ID NO: 1-6:

5'TCTGCAATATTGTTATCGTAATTGGAAAAATAGTTCGAGTGAGTTGGATTAT  
GTGAGTATTGGATTGTATATTTATTTATATTTTGTAGTAAGAATAGAA  
TGCTAATGTCAAGTTTATTCGAATAGATGCTTATTAATAAACATATATAATAA  
ACA 3'(SEQ ID NO:1)

5'GATAAAATTTAAAGTGTAATATACTATTATTTATAGTTGTAATAAAAGGGA  
AATTTGATTGTATACCTTCGGTCTTTAAAGAACTGACTTGATAAAA 3' (SEQ  
ID NO: 2)

5'GCATTTTCATCTTCTCCAACTAATTCAAATGTTAAATAAATAAGGATAGTA  
TAAATAGTTATTAGTGATAAAATAGTAAATAATTATTAGAATAAGAGTGTAGTAT  
CATAGATAACTCTCTCTATAAAA 3' (SEQ ID NO: 3)

5'GATCTATAAAGGTAGACCTAATCGTCTCGGATGACCATATATTTATTTTCAGTTT  
TATTATACGCATAAATAGTAAAAATATGTTAGGTTTACAAAA 3' (SEQ ID NO: 4)

5'GGTAAACTTTAAGACATGTGTGTTATACTAAGATGGTTGGCTTATCCATAGTA  
GCTTGTGGAATTTATAAAGTTATGATAGTAAAGTAGTACCCAAATGTAAAGATG  
AAAAAGTAAATTAATTAACGCCGTCGGTATTCGTTTCATCCATTCAGTT 3'(SEQ  
ID NO: 5)

5'ATTCTCGGTAGCACATCAATGATGTTACCACTTTCTTAGCATGCTTAAGTTG  
ACTAAATATTCATACTAATTTTATTAATGATACAAAAACGAAATAAAATGTCATA

TTATACACTGGTTAAGCCCTTATAGGCTCTAACCATTTTCAAG 3' (SEQ ID NO:  
6)

(ii) субпослідовності будь-якої послідовності SEQ ID NO. 1-6

(iii) послідовності з однією або декількома нуклеотидними замінами, делеціями і/або вставками у послідовностях, визначених в (i) або (ii).

Послідовності SEQ ID NO: 1-6 являють собою природну частину генома MVA і розташовані у напрямі 3'-5' від рамок зчитування A42R, J6R, F6R, I2R, C7L і B9R, відповідно.

Промотори за даним винаходом є переважно активними як промотори вірусу вісповакцини або ж активними як промотори в інфікованих вірусом вісповакцини клітинах. Використовуваний вірус вісповакцини переважно являє собою MVA, зокрема, один зі штамів MVA, як зазначено нижче. "Активний як промотор вірус вісповакцини" означає, що промотор здатний направляти експресію гена, до якого він функціонально приєднується у вірусі вісповакцини після інфікування клітин вказаним вірусом. Клітини являють собою, переважно, клітини, які забезпечують пізню і/або ранню експресію вірусу вісповакцини. "Промотор, активний у клітинах, інфікованих вірусом вісповакцини" включає також ситуацію, коли промотор не є частиною генома вірусу вісповакцини, а наприклад, є частиною плазміді або вірусного генома, що не належить вірусу вісповакцини; у такій ситуації промотор за даним винаходом буде активний у тому випадку, якщо клітина, що містить промотор, також містить геном вірусу вісповакцини, наприклад, якщо

клітина інфікована вірусом вісповакцини. У цих обставинах РНК-полімераза вірусу впізнає промотор за даним винаходом, і активується експресія гена/кодуючої послідовності, який(а) приєднаний(а) до промотору.

Відповідно до даного винаходу також можливо використовувати будь-який промотор, визначений як послідовність SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:6. Промотор, який звичайно використовують для направлення експресії гена/кодуючої послідовності, може складатися з будь-якої послідовності SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:6, або звичайно використовуваним промотором може бути велика структура, яка містить будь-яку послідовність SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:6. Також у межах даного винаходу, знаходиться застосування похідного даних промоторів, яке може являти собою субпослідовність будь-якої послідовності SEQ ID NO:1-6. Термін "субпослідовність будь-якої послідовності SEQ ID NO:1-6" відноситься до більш коротких фрагментів будь-якої послідовності SEQ ID NO:1-6, які також активні як промотор, зокрема, як промотор вірусу вісповакцини, або в інфікованих вірусом вісповакцини клітинах. Знову, вірус вісповакцини переважно являє собою MVA, такий як один з вказаних нижче штамів. Характерна субпослідовність будь-якої послідовності SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:6 має довжину щонайменше 15 нуклеотидів, більш переважно, щонайменше 20 нуклеотидів, ще більш переважно, щонайменше 25 нуклеотидів, найбільш переважно, щонайменше 30 нуклеотидів будь-якої послідовності SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:6.

Переважною субпослідовністю SEQ ID NO:1 є SEQ ID NO:7. Переважною субпослідовністю SEQ ID NO:2 є SEQ ID NO:8. Переважними субпослідовностями і/або похідними вказаних субпослідовностей SEQ ID NO:3 є SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:10. Переважними субпослідовностями SEQ ID NO:4 є SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:12. Послідовності SEQ ID NO:6-12 представлені у розділі "Приклади".

Похідне промотору, що містить або складається з нуклеотидної послідовності будь-якої SEQ ID NO:1-6 або їх субпослідовностей, зокрема, похідне нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:7 - SEQ ID NO:12, також може бути послідовністю з однією або декількома нуклеотидними замінами, делеціями і/або вставками у будь-якій послідовності SEQ ID NO:1-6 або в їх субпослідовностях, особливо, у нуклеотидних послідовностях з числа SEQ ID NO:7 - SEQ ID NO:12. Похідні за даним винаходом також активні як промотор, зокрема, як промотор вірусу вісповакцини, або в інфікованих вірусом вісповакцини клітинах, більш переважно як промотор MVA або в інфікованих MVA клітинах. Послідовність з однією або декількома нуклеотидними замінами, являє собою послідовність, в якій один або декілька нуклеотидів будь-якої послідовності SEQ ID NO:1-6 або їх субпослідовностей, таких як будь-яка субпослідовність SEQ ID NO:7-12, замінені іншими нуклеотидами. Послідовність з однією або декількома нуклеотидними вставками являє собою послідовність, в якій один або декілька нуклеотидів вбудовані в одну або декілька областей будь-якої SEQ ID NO:1-6 або їх субпослідовностей, зокрема, нуклеотидних послідовностей SEQ ID NO:7 -

SEQ ID NO:12. Послідовність з однією або декількома нуклеотидними делеціями являє собою послідовність, в якій делетований один або декілька нуклеотидів будь-якої послідовності SEQ ID NO:1-6 або їх субпослідовностей, зокрема, нуклеотидних послідовностей SEQ ID NO:7 - SEQ ID NO:12. У похідних за даним винаходом делеції, заміни або вставки можуть бути об'єднані в одній послідовності.

Прикладом похідної субпослідовності за даним винаходом є SEQ ID NO:10, яка являє собою субпослідовність SEQ ID NO:3 з однією додатковою нуклеотидною заміною у порівнянні з відповідною нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO:3.

Переважаю, похідне щонайменше на 40%, більш переважно, щонайменше на 60%, ще більш переважно, щонайменше на 80%, найбільш переважно, щонайменше на 90% гомологічне будь-якій послідовності SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:6 або їх субпослідовностям, зокрема, будь-якій послідовності SEQ ID NO:7 - SEQ ID NO:12. Відповідно до найбільш переважного варіанту здійснення даного винаходу у будь-якій послідовності SEQ ID NO:7 - SEQ ID NO:12 замінено, видалено і/або вбудовано, не більше 10 нуклеотидів, ще більш переважно, не більше 5 нуклеотидів.

Документи вже відомого рівня техніки дозволяють фахівцям у даній галузі прогнозувати, які похідні або субпослідовності будь-якої SEQ ID NO:1-12 будуть володіти біологічною активністю, являючись активними як промотор вірусу коров'ячої віспи, зокрема, як активний промотор MVA. У зв'язку з цим можна зробити посилання на Chakraborti et al., *Biotechniques* (1997) 23, 1094-1097, and Davison and Moss. *J. Mol. Biol.* (1989) 210, 771-784. Крім того, фахівець у даній галузі легко оцінить, чи буде фрагмент активним як промотор вірусу коров'ячої віспи, зокрема, як промотор MVA. Зокрема, похідне послідовності можна клонувати у плазмідну конструкцію у напрямі 3'-5' від репортерного гена. Така конструкція може бути трансфорована у клітинну лінію або в еукаріотичну клітину, таку як клітини CEF або BHK, які інфіковані MVA. Визначають експресію репортерного гена і порівнюють з експресією репортерного гена, що знаходиться під контролем промотору будь-якої SEQ ID NO:1-6. Похідне за даним винаходом, являє собою похідне з промоторною активністю у вказаній тест-системі, яка складає щонайменше 10%, переважно, щонайменше 30%, більш переважно, щонайменше 50%, ще більш переважно, щонайменше 70%, найбільш переважно, щонайменше 90% активності промоторної послідовності будь-якої SEQ ID NO:1-6. Також у межах даного винаходу знаходяться похідні будь-якої послідовності SEQ ID NO:1-12 з більшою промоторною активністю.

Промотори за даним винаходом особливо придатні для експресії кодуючих послідовностей в MVA.

Промотор, що базується на SEQ ID NO:1 володіє дуже високою активністю, особливо як пізній промотор, хоча його також можна використовувати і як ранній промотор. Такі ж міркування застосовні відносно відповідних субпослідовностей, таких як

послідовність SEQ ID NO:7, яка, однак, особливо придатна як пізній промотор.

Промотор, що базується на SEQ ID NO:2, також володіє досить сильною активністю, особливо як пізній промотор. Також його можна використовувати як ранній промотор. Такі ж міркування застосовні відносно відповідних субпослідовностей, таких як послідовність SEQ ID NO:8, яка, однак, особливо придатна як пізній промотор.

Промотор, що базується на SEQ ID NO:3, особливо придатний як ранній промотор і з усіх перевірених промоторів володіє найбільшою активністю раннього промотору. Однак, його також можна використовувати як пізній промотор. Такі ж міркування застосовні відносно відповідних субпослідовностей, таких як послідовності SEQ ID NO:9 і 10, відповідно. З цих субпослідовностей SEQ ID NO:9 особливо придатна як ранній промотор, а SEQ ID NO:10 особливо придатна як пізній промотор.

Промотор, що базується на SEQ ID NO:4 є особливо придатним, якщо він призначений для ранньої і пізньої експресії приєднаної кодуючої послідовності, оскільки цей промотор володіє досить високою активністю у ранньому, а також у пізньому стані. Такі ж міркування застосовні відносно відповідних субпослідовностей, таких як послідовності SEQ ID NO:11 і 12, відповідно. З цих субпослідовностей SEQ ID NO:11 особливо придатна як ранній промотор, а SEQ ID NO:12 особливо придатна як пізній промотор.

Промотори, що базуються на SEQ ID NO:5 і 6 є особливо ефективними, якщо вони призначені для експресії приєднаних кодуючих послідовностей у відносно невеликих кількостях. Це іноді бажано, якщо приєднувана кодуюча послідовність гена кодує продукт токсичного гена і/або якщо промотори призначені для індукції імунної відповіді з високим рівнем авідності.

Термін "ранній промотор" відноситься до промоторів, які активні у вірусі вісповакцини або ж у клітинах, інфікованих вірусом вісповакцини, перед реплікацією вірусної ДНК. Фахівцям у даній галузі відомі способи перевірки, чи є той або інший промотор раннім промотором. Зокрема, цікавлячий промотор можна вбудувати у напрямі 3'-5' від репортерного гена. Конструкцію, що містить промотор і репортерний ген, вводять у клітини, інфіковані вірусом вісповакцини. Для визначення його активності як раннього промотору, клітини інкубують разом з речовиною, яка інгібує реплікацію ДНК, такою як AraC. Реплікація ДНК необхідна як попередня умова для активності пізнього промотору. Таким чином, будь-яка промоторна активність, що вимірюється у цій системі дослідження, повинна бути обумовлена елементами, активними як ранній промотор. Отже, термін "пізній промотор" відноситься до будь-якого промотору, який виявляє свою активність після реплікації ДНК. Пізню активність також можна виміряти способами, відомими фахівцям у даній галузі. Для простоти термін "пізній промотор", як він використовується у даній заявці, відноситься до активності промотору, яка визначається за відсутності додання речовини, яка блокує реплікацію ДНК.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення, даний винахід відноситься до експресійної касети, що містить промотор за даним винаходом і кодуючу послідовність, де експресія кодуючої послідовності знаходиться під контролем вказаного промотору. Експресійна касета переважно не є природною експресійною касетою генома вірусу вісповакцини. Таким чином, якщо промотор за даним винаходом являє собою природний промотор генома вірусу вісповакцини, то послідовність, до якої вказаний промотор приєднаний, переважно, відрізняється від послідовності, до якої звичайно приєднаний промотор у геномі вірусу вісповакцини. Іншими словами, якщо промотор за даним винаходом ідентичний природному промотору, то кодуюча послідовність, експресія якої знаходиться під контролем промотору, і/або послідовність, розташовані між промотором і кодуючою послідовністю, відрізняються від відповідних послідовностей, до яких звичайно приєднаний вказаний промотор. Термін "відрізняється" у контексті даного опису відноситься до послідовностей, які відрізняються, щонайменше, за одним нуклеотидом у вказаній послідовності. Переважно, послідовність являє собою кодуючу послідовність, яка відрізняється, щонайменше, за одним нуклеотидом. Відповідно до інших варіантів, гомологія між кодуючою послідовністю в експресійній касеті і послідовністю, до якої звичайно приєднаний промотор, складає менше 90%, менше 80%, менше 70%, менше 60%, менше 50%, менше 40%, або навіть менше 20%. Найбільш переважно, коли кодуюча послідовність, яка знаходиться під контролем промотору за даним винаходом, кодує пептид/білок, який відрізняється щонайменше за однією амінокислотою від природного білка, що кодується вказаною кодуючою послідовністю. Як приклад, експресійна касета не є експресійною касетою, що містить природний промотор C7L вірусу вісповакцини, що направляє експресію природного C7L-гена, наприклад, експресійна касета не є експресійною касетою, описаною у WO2004/015118, що містить промотор C7L і кодуючу послідовність C7L.

З іншого боку, якщо послідовність, яка повинна експресуватися, є природною послідовністю вірусу вісповакцини, то промотор, який використовується для експресії вказаної послідовності, відрізняється від промотору, який направляє експресію цієї кодуючої послідовності у природній ситуації. Відповідно до цього варіанту, нуклеотидна послідовність промотору відрізняється щонайменше одним нуклеотидом від природної послідовності промотору вірусу вісповакцини. Відповідно до ще одного варіанту, гомологія між промотором за даним винаходом, який контролює експресію послідовності вірусу вісповакцини і природним промотором, приєднаним до послідовності вірусу вісповакцини, складає менше 90%, менше 80%, менше 70%, менше 60%, менше 50% або навіть менше 40%.

Переважно, кодуюча послідовність може кодувати щонайменше один антигенний епітоп або антиген, терапевтичні пептиди або білки, антисмислову РНК або рибозими. Якщо кодуюча послідовність кодує антигенний епітоп або антиген, то експресійну касету можна використовувати для

експресії вказаного антигену після введення вказаної експресійної касети у клітини організму, наприклад, у клітини тварини, у тому числі, у клітини людини. Презентація вказаного антигену/епітопу може викликати імунну відповідь організму, що може приводити до вакцинації організму проти агента, з якого одержаний даний антиген/епітоп. Більш конкретно, епітоп/антиген може бути частиною великої амінокислотної послідовності, такої як поліпептид, пептид або білок. Переважно, кодуюча послідовність кодує щонайменше один антигенний епітоп або антиген, терапевтичні пептиди або білки, антисмислову РНК або рибозими, які не кодуються у геномі вірусу вісповакцини.

Прикладами таких поліепітопів, пептидів або білків можуть бути поліепітопи, пептиди і білки, одержані: (i) з вірусів, зокрема, з вірусів, які відрізняються від вірусів вісповакцини, таких як ВІЛ, HTLV, герпесвірус, вірус Денге, поліовірус, вірус кори, вірус свинки, вірус краснухи, вірус гепатиту і так далі, (ii) з бактерій, (iii) з грибів, (iv) з поліпептидів/білків злоякісних пухлин, таких як антигени злоякісних пухлин.

Крім того, кодуюча послідовність може кодувати терапевтичну сполуку, таку як інтерлейкіни, інтерферони, рибозими або ферменти.

У загальних рисах, даний винахід відноситься до будь-якої послідовності нуклеїнових кислот, що містить промотор за даним винаходом і/або експресійну касету за даним винаходом. Нуклеїнова кислота може являти собою РНК, наприклад, якщо промотор є частиною ретровірусного генома. Більш переважно, нуклеїнова кислота являє собою ДНК. Така ДНК може бути ДНК будь-якого типу, наприклад, лінійною, кільцевою, одноланцюжковою або двохланцюжковою ДНК.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення даного винаходу, промотор і/або експресійна касета за даним винаходом може бути частиною вектора. Термін "вектор" відноситься до будь-якого вектора, відомого фахівцям у даній галузі. Вектор може бути плазмідним вектором, таким як pBR322 або вектором серії pUC. Більш переважно, вектор являє собою вірусний вектор. У контексті даного винаходу, термін "вірусний вектор" або "вектор на основі вірусу" відноситься до інфекційного вірусу, що містить вірусний геном. У цьому випадку ДНК за даним винаходом є частиною вірусного генома відповідного вірусного вектора. Рекombінантний вірусний геном є упакованим, і одержані рекombінантні вектори можна використовувати для інфікування клітин і клітинних ліній, зокрема, для інфікування тварин, включаючи людину. Звичайні вектори на основі вірусів, які можуть використовуватися за даним винаходом, являють собою аденовірусні вектори, ретровірусні вектори або вектори на основі аденоасоційованого вірусу 2 (AAV2). Найбільш переважними є поксвірусні вектори. Поксвірус може бути, переважно, поксвірусом канарок, поксвірусом домашньої птиці або вірусом вісповакцини.

Більш переважним є модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара (MVA) (Sutter G. et al., [1994], Vaccine 12:1032-40; Antoine G. et al., [1998], Virology 244:365-396). Термін "MVA", що викорис-

товується у даній заявці, відноситься до будь-якого штаму MVA, відомого у даній галузі. Прикладом штаму MVA є депонований штам VR-1508, депонований в American Type Culture collection (ATCC), Manassa, VA 20108, США. Іншими прикладами вірусних штамів MVA, що використовуються за даним винаходом, є штами MVA 572 і 575, депоновані в European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Salisbury (UK) з депозитними номерами ECACC V94012707 і EXACC V00120707, відповідно і MVA-BN з депозитним номером ECACC V00083008.

Найбільш переважним MVA-штамом є штам MVA-BN або його похідне. Характерні ознаки MVA-BN, опис біологічних аналізів, що дозволяють встановити, чи є MVA-штам штамом MVA-BN або його похідним, а також способи одержання MVA-BN або його похідного, розкриті у WO 02/42480. Зміст цієї заявки наведений у даній заявці як посилання. Зокрема, посилання зроблене для визначення властивостей вірусу вісповакцини за даним винаходом, як описано у WO 02/42480, таких як властивості MVA, а також властивості і визначення похідних MVA-BN. Крім того, у вказаному посиланні розкрито, яким чином MVA та інші віруси вісповакцини можуть розмножуватися. Коротко, еукаріотичні клітини інфікують вірусом. Ці еукаріотичні клітини являють собою клітини, які сприйнятливі до інфікування відповідним поксвірусом, а також у яких можлива реплікація і продукування інфекційного вірусу. Для MVA прикладом такого типу клітин є фібробласти ембріона курчати (CEF) і BHL-клітини (Drexler I., Heller K., Wahren B., "Erflie V. and Sutter G Highly attenuated modified vaccinia Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells" J. Gen. Virol. (1998), 79, 347-352). CEF-клітини можна культивувати в умовах, відомих фахівцям у даній галузі. Переважно, клітини CEF культивують у безсироватковому середовищі у нерухомих колбах або у бутлях, що обертаються. Інкубування, переважно, здійснюють протягом 48-96 годин при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Для інфікування MVA, переважно, використовують множинність зараження (MOI) зі значенням від 0,05 до 1 TCID<sub>50</sub>, і інкубування, переважно, здійснюють 48-72 години при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Фахівцям у даній галузі відомі способи введення у вірусний геном експресійної касети або промотору за даним винаходом, зокрема, у геном вірусу вісповакцини, найбільш переважно, у геном MVA. Як приклад, експресійну касету або промотор, або його похідне, за даним винаходом, можна вбудувати у геном MVA шляхом гомологічної рекомбінації. З цією метою перемісивну клітинну лінію, таку як, наприклад, як CEF або BHK-клітини, трансфікують нуклеїновою кислотою, де нуклеїнова кислота містить експресійну касету або промотор, або його похідне за даним винаходом, фланковані нуклеотидними ділянками, які гомологічні області генома MVA, в яку необхідно вбудувати експресійну касету або промотор, або його похідне за даним винаходом. Клітини інфікують MVA, і в інфікованих клітинах відбувається гомологічна рекомбінація між нуклеїновою кислотою і вірусним

геномом. В іншому варіанті, також можливо спочатку інфікувати клітини MVA, а потім трансфікувати інфіковані клітини нуклеїновою кислотою. І знову у клітинах відбувається рекомбінація. Потім способами, відомими у даній галузі, відбирають рекомбінантний MVA. Конструювання рекомбінантного MVA не обмежується цим конкретним способом. Крім нього, для цієї мети можна використовувати будь-який придатний спосіб, відомий фахівцям у даній галузі.

Експресійну касету або промотор за даним винаходом можна вводити у будь-яку придатну частину вектора, зокрема, у вірусний геном. У випадку вірусів вісповакцини, вбудовування можна здійснювати у незначні ділянки вірусного генома або у міжгенну область генома вірусу. Термін "міжгенна область" відноситься, переважно, до тих ділянок вірусного генома, які розташовуються між двома сусідніми генами, які не містять кодуєчих послідовностей. Якщо вектор являє собою MVA, то вбудовування можна також здійснювати у природний делеційний сайт вірусного генома. Термін "природний делеційний сайт" відноситься до тих частин вірусного генома, які делетовані у порівнянні з геномом штаму Copenhagen вірусу вісповакцини. Однак, сайти вбудовування не обмежуються цими переважними інсерційними сайтами у геномі вірусу вісповакцини і у геномі MVA, оскільки, у межах даного винаходу експресійна касета може бути вбудована у будь-якому місці вірусного генома за умови, що можливо одержати рекомбінанти, які можна ампліфікувати і розмножити щонайменше в одній системі клітинної культури, такий як фібробласти ембріони курчати (клітини CEF).

Промотор за даним винаходом можна використовувати для експресії гена, який вже є частиною вектора, наприклад, геном MVA. Такий ген може являти собою природний ген вірусного генома або чужорідний ген, який вбудований у вектор. У цих випадках промотор за даним винаходом вбудовують у напрямі 3'-5' від гена у векторі, експресія якого повинна знаходитися під контролем цього промотору. MVA-вектор, що містить експресійну касету за даним винаходом, можна також створити шляхом заміни будь-якої відкритої рамки читування A42R, J6R, F6R, I2R, C7L і B9R на кодуєчу послідовність, експресія якої повинна знаходитися під контролем промотору, який є природним промотором експресії вказаної відкритої рамки читування. Так, як приклад, кодуєчу послідовність A42R або її частини можна замінити кодуєчою послідовністю, яку необхідно експресувати. В одержаній конструкції вказана кодуєча послідовність знаходиться під контролем промотору за даним винаходом, а саме під контролем промоторної послідовності SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:7. Ці експресійні касети також входять до складу даного винаходу.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення, даний винахід відноситься до вектора, що використовується відповідно до даного винаходу як вакцина або лікарський засіб. У загальному значенні, винахід відноситься до вакцини або до фармацевтичної композиції, що містить експресійну касету, ДНК або вектор за даним винаходом. Фахівцям у

даній галузі відомі способи введення в організм тварини або людини вакцини або фармацевтичної композиції. У випадку ДНК і плазмідних векторів, ДНК і вектор можна просто вводити шляхом ін'єкції. Якщо вектор являє собою вірусний вектор, такий як вектор вірусу вісповакцини, зокрема, MVA-вектор, то його також можна вводити в організм тварини або людини на основі знань фахівця у даній галузі, наприклад, шляхом внутрішньовенного, внутрішньом'язового, інтраназального, інтрадермального або підшкірного введення. Додаткові подробиці про кількість вірусу, що вводиться, наведені нижче.

Фармацевтична композиція або вакцина може звичайно містити крім промотору, експресійної касети або вектора за даним винаходом один або декілька фармацевтично прийнятних і/або схвалених носіїв, домішок, антибіотиків, консервантів, ад'ювантів, розріджувачів і/або стабілізаторів. Такими допоміжними речовинами можуть бути вода, фізіологічний розчин, гліцерин, етанол, зволожуючі або емульгуючі засоби, речовини, що змінюють рН, або тому подібне. Відповідними носіями як правило, є великі молекули, що повільно метаболізуються, такі як білки, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, амінокислотні співполімери, ліпідні комплекси і тому подібне.

Для одержання фармацевтичних композицій або вакцин, ДНК, експресійну касету або вектор за даним винаходом, зокрема, рекомбінантний вірус вісповакцини, такий як рекомбінантний MVA, перетворюють у фізіологічно прийнятну форму. У випадку вірусів вісповакцини, зокрема, MVA, це можна здійснити на основі досвіду одержання поксвірусних вакцин, що використовуються для вакцинації проти вірусу натуральної віспи (як описано у Syickl H. et al. [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392). Наприклад, очищений вірус зберігають при  $-80^{\circ}\text{C}$  з титром  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл препарату у близько 10mM Tris, 140mM NaCl, рН 7,4. Для одержання доз вакцини, наприклад,  $10^1 \cdot 10^9$  частин рекомбінантного вірусу за даним винаходом, ліофілізують у фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS) у присутності 2% пептону і 1% альбуміну людини в ампулі, переважно, у скляній ампулі. В іншому варіанті, дози вакцин можна одержувати постадійним висушуванням заморожуванням препарату вірусу. Такий препарат може містити додаткові домішки, такі як маніт, декстран, цукор, гліцин, лактозу або полівінілпіролідон, або будь-які домішки, такі як антиоксиданти або інертний газ, стабілізатори або рекомбінантні білки (наприклад, альбумін сироватки крові людини), придатний для введення *in vivo*. Типова композиція, що містить вірус, придатна для висушування заморожуванням, містить 10mM Tris-буфер, 140mM NaCl, 18,9г/л декстрану (MW 36000-40000), 45г/л сахарози, 0,108г/л моногідрату монокалієвої солі L-глутамінової кислоти, рН 7,4. Скляну ампулу потім герметизують і зберігають протягом декількох місяців при температурі у діапазоні від  $4^{\circ}\text{C}$  до кімнатної температури. Однак, за відсутності необхідності в ампулах препарат зберігають переважно при температурах нижче  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для вакцинації або лікування ліофілізат або висушений заморожуванням продукт можна розчинити в 0,1-0,5мл водного розчину, переважно у воді, фізіологічному розчині або Tris-буфері, і вводити або системно, або місцево, тобто парентерально, внутрішньом'язово або будь-яким іншим шляхом введення, відомим практикуючому фахівцеві. Фахівець у даній галузі може підібрати режим введення, дозу і число введень відомим способом.

Таким чином, відповідно до супутнього варіанту здійснення, даний винахід відноситься до способу впливу, переважно, до індукції імунної відповіді в організмі тварини, у тому числі людини, що передбачає введення експресійної касети, ДНК, вектора, фармацевтичної композиції або вакцини за даним винаходом для лікування тварини або людини. Якщо вакцина являє собою вірус вісповакцини, зокрема MVA, то звичайна доза вакцини для людини містить щонайменше  $10^2$ , переважно, щонайменше  $10^4$ , більш переважно, щонайменше  $10^6$ , ще більш переважно  $10^7$  або  $10^8$  TCID<sub>50</sub> (інфекційна доза для тканинної культури) вірусу.

Якщо вакцина являє собою рекомбінантний MVA, зокрема рекомбінантний MVA-BN, і його похідні, то вірус можна використовувати для первинної імунізації. Таким чином, даний винахід також відноситься до способу, в якому вектор являє собою MVA, зокрема MVA-BN, і його похідні, і в якому вказаний вектор, або композицію або вакцину, що містить вказаний вектор, вводять тварині, у тому числі людині, за необхідності такого введення у терапевтично ефективних кількостях для першої імунізації ("первинна вакцинація") і для другої імунізації ("ревакцинація").

Даний винахід також відноситься до способу введення кодувчої послідовності у мішеневу клітину, що передбачає введення вектора, експресійної касети або ДНК за даним винаходом у мішеневу клітину. Якщо вектор являє собою вірус вісповакцини, зокрема MVA, такий як MVA-BN, то мішенева клітина може являти собою клітину, в якій вірус здатний реплікуватися, таку як клітини CEF або BHK, або клітину, яку можна інфікувати MVA, але в якій вірус не може реплікуватися (таку, наприклад, як всі типи клітин людини, що інфікуються штамом MVA-BN).

Даний винахід також відноситься до способу одержання пептиду, білка і/або вірусу, що передбачає інфікування клітини-хазяїна вірусним вектором за даним винаходом, з подальшим культивуванням інфікованої клітини-хазяїна у відповідних умовах, а також з подальшим виділенням і/або збагаченням пептиду і/або білка і/або вірусів, що продукуються вказаною клітиною-хазяїном. Якщо передбачається одержання, тобто ампліфікація вірусу за даним винаходом, то клітина повинна являти собою клітину, в якій вірус здатний реплікуватися. У випадку вірусів вісповакцини, зокрема MVA, придатними клітинами є клітини CEF або BHK. Якщо передбачається одержання пептиду/білка, що кодується вірусним вектором за даним винаходом, то клітина може бути будь-якою клітиною, яку можна інфікувати вірусним вектором, і в якій можлива експресія білків/пептидів, що кодуються вірусом.

Даний винахід також відноситься до способу одержання пептиду, білка і/або вірусу, що передбачає трансфекцію клітини з експресійною касетою, ДНК або плазмідним вектором за даним винаходом, з подальшим інфікуванням клітини вірусом вісповакцини. Інфіковану клітину-хазяїна культивують у відповідних умовах. Додаткова стадія передбачає виділення і/або збагачення пептиду і/або білка і/або вірусів, що продукуються клітиною-хазяїном. Стадію інфікування клітини-хазяїна за допомогою вірусу вісповакцини здійснюють до або після стадії трансфекції клітин.

Даний винахід також відноситься до клітин, що містять промотор, ДНК, експресійну касету або вектор за даним винаходом. Зокрема, даний винахід відноситься до клітин, інфікованих вірусним вектором за даним винаходом.

Короткий опис Фігур

Фіг.1: активність GUS після експресії під контролем різних промоторів

Клітини інфікували MVA-BN і трансфікували відповідними плазмідами. Через 48 годин клітини екстрагували, і визначали активність GUS безпосередньо шляхом вимірювання екстинкції при 415nm після ферментативної реакції, яка викликає розвиток жовтого забарвлення. Zex = негативний контроль (клітини, інфіковані MVA-BN).

Фіг.2: активність GUS після ранньої і ранньої/пізньої експресії

Клітини інфікували MVA-BN і трансфікували відповідними плазмідами. Через 24 години клітини екстрагували, і активність GUS безпосередньо визначали шляхом вимірювання екстинкції при 415nm після ферментативної реакції, яка викликає розвиток жовтого забарвлення. Zex = негативний контроль (клітини, інфіковані MVA-BN). Що стосується цієї ферментативної реакції, то зразки без AgaC (рання + пізня) експресії повинні бути інкубовані протягом 5 годин, а зразки з AgaC (рання експресія) повинні бути інкубовані протягом ночі для одержання кольорової реакції.

Фіг.3: активність GUS після експресії під контролем різних промоторів

Клітини інфікували за допомогою MVA-BN і трансфікували відповідними плазмідами. Через 24 години клітини екстрагували, і активність GUS безпосередньо визначали шляхом вимірювання екстинкції при 415nm після ферментативної реакції, яка викликає розвиток кольорової реакції. Контроль = негативному контролю (клітини, інфіковані MVA-BN).

Приклади

Наведений(і) нижче приклад(и) додатково ілюструють даний винахід. Фахівцям у даній галузі очевидно, що наведений(і) приклад(и) в жодному разі не може бути інтерпретований таким, що обмежує застосовність способу за даним винаходом цим(и) прикладом(ами).

Приклад 1: Аналіз промоторів для експресії кодуєчих послідовностей у геномі MVA-BN

1.1. Мета експерименту:

Метою наведеного тут аналізу є ідентифікація промоторів, придатних для експресії кодуєчих послідовностей у геномі MVA, переважно, кодуєчих послідовностей, які гетерологічні природному

геному MVA. Зокрема, вбудовування двох або більшого числа генів в єдиний сайт вбудовування є перевагою застосування різних промоторів для експресії одиничних генів для зниження ризику рекомбінаційних подій, які можуть привести до делеції одного з чужорідних генів. Крім того, бажано мати промотори різної сили для можливості експресувати чужорідні гени, вбудовані у рекомбінантний штам MVA-BN у різній кількості, в залежності від сили даного промотору. Усього було виділено 11 вірогідних промоторів. Ці вірогідні промоторні послідовності клонують у плазмідну конструкцію (pBSKS+). Для того, щоб проаналізувати можливу активність промоторів, їх зливають з репортерним геном GUS ( $\beta$ -глюкуронідаза *E. coli*). Клітини ВНК (нирки хом'ячка) інфікують MVA-BN і трансфікують плазмідами, що містять вірогідні промотори, злиті з геном GUS. Якщо промотор функціональний, то GUS експресується, і може бути кількісно визначений шляхом ферментативної реакції з GUS. Як позитивний контроль і як еталон використовують відомі і охарактеризовані промотори p7.5 і Ps вірусу вісповакцини, які зливають з GUS і паралельно аналізують. Вимірюючи експресію GUS вірогідні промотори скринують на активність, силу і/або ранню/пізню експресію. Ранню/пізню експресію перевіряють шляхом додавання у культуральне середовище AgaC (арабінозид-цитозин). Функціонально активні промотори, а саме Ps, p7.5, 7.5L і ATI-промотор, які були відомі з рівня техніки, а також ідентифіковані промоторні послідовності, які звичайно беруть участь у контролі експресії відкритих рамок зчитування MVA, A42L, B9R, C7L, F6R, I2R, J6R, переважно можуть використовуватися для експресії чужорідних генів у рекомбінантних MVA-конструкціях (recMVA-BN).

1.2 Матеріал

Клітини: ВНК-клітини

Вірус: стандартний вихідний штам MVA-BN ( $7.5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>)

ДНК: pAB-GUS (Ps-промотор + GUS)

pBNX71 (pBluescript + вірус коров'ячої віспи pr 7.5 + GUS)

pBNX73 (pBluescript + ATI-промотор вірусу коров'ячої віспи + GUS)

pBNX81 (pBluescript + модифікований H5R-промотор + GUS1)

pBNX61 (pBluescript + B1R-промотор MVA + GUS)

pBNX62 (pBluescript + B2R-промотор MVA + GUS)

pBNX63 (pBluescript + B3R-промотор MVA + GUS)

pBNX60 (pBluescript + A30R-промотор MVA + GUS)

pBNX82 (pBluescript + 7.5L-промотор вірусу коров'ячої віспи + GUS)

pBNX83 (pBluescript + MVA-C7L-промотор (SEQ ID NO:5 + GUS))

pBNX49 (pBluescript + MVA-A42R-промотор (SEQ ID NO:1 + GUS))

pBNX69 (pBluescript + MVA-1-промотор (SEQ ID NO:4 + GUS))

pBNX72 (pBluescript + K5L-промотор MVA + GUS)



pBNX83 (pBluescript + MVA-F6R-промотор (SEQ ID NO:3 + GUS))

pBNX84 (pBluescript + MVA-B9R-промотор (SEQ ID NO:6 + GUS))

pBNX85 (pBluescript + MVA-J6R-промотор (SEQ ID NO:2 + GUS))

Набір для трансфекції: Effectene transfection kit (Qiagen)

Середовище і домішки: DMEM (Gibco BRL) і 10% FCS

Хімічні реагенти і буфери: Буфер для лізису (PBS + 0,1% тритону + 1мМ протеазного інгібітору) AraC (Sigma, Cat. No. C1768)

Субстрат GUS: 1мМ (пара-нітрофеніл-бета-(D)-глюкуронід; Sigma, Cat. No. N1627)

Стоп-розчин: 2,5М (2-аміно-2-метил-1,3-пропандіол; Sigma, Cat. No. A9754)

### 1.3 Методи

#### Посів клітин

В ямки 6-ямкового планшета висівають  $5 \times 10^5$  клітин BHK для реакції трансфекції і підтримують їх в DMEM/10%FCS протягом ночі при 37°C і 5% CO<sub>2</sub>.

#### Інфікування/трансфікування

Клітини інфікують MVA-BN (moi 0,1) в 0,5мл DMEM/10%FCS на ямку та інкубують протягом 1год. при кімнатній температурі на шейкері. Трансфекцію здійснюють, як описано у протоколі виробників. У буфері EB (загальний об'єм 100мкл) розбавляють 2мкл плазміди. Після додавання 3,2мкл енхансерного розчину, розчин перемішують та інкубують протягом 5хв. при кімнатній температурі. Потім додають 10мкл реактиву Effectene, суспензію перемішують та інкубують протягом 10хв. при кімнатній температурі. Суспензію вірусу відділяють від клітин і додають 1,6мл DMEM/10%FCS. До ДНК-Effectene-суміші додають 0,6мл DMEM/10%FCS і по краплях додають на клітини при обертанні культурального планшета. Потім клітини інкубують 7, 24 або 48 годин, в залежності від аналізу. Для аналізу ранньої/пізньої експресії у культуральне середовище під час інфікування і трансфекції додають AraC (40мкг/мл).

#### Збір культивованих клітин

Середовище відділяють від клітин і додають 0,5мл буферу для лізису. Після струшування протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, клітини зішкрібають у літичний буфер, переносять їх в 1,5мл-ову реакційну пробірку і енергійно струшують. Лізовані клітини центрифугують протягом 1хв. при 500об./хв. і прозорий супернатант з температурою 4°C переносять у чисту пробірку і зберігають при -20°C перед використанням.

#### Визначення GUS-активності

В 1мл заздалегідь нагрітого розчину субстрату (37°C) додають 10мкл клітинного екстракту (= білку з  $2 \times 10^4$  клітин) та інкубують при 37°C до появи жовтого забарвлення. Потім зразки відразу вміщують на лід і додають 0,4мл стоп-розчину. Визначають екстинкцію при 415nm і порівнюють з активністю GUS, як екстинкцію, значення знаходить лінійний ряд від 0,05 до 2,0. Розчин субстрату використовують як стандарт, а клітинний екстракт з клітин, інфікованих MVA-BN, використовують як негативний контроль.

### 1.4 Експерименти і Результати

Експеримент 1: Визначення функції умовних промоторів

У першому експерименті аналізують всі плазміди, які містять вірогідний MVA-промотор або охарактеризований промотор злитий з геном GUS. Клітини інфікують MVA-BN (moi 0.1) і трансфікують відповідною плазмідною. Через 48 годин клітини збирають, лізують і визначають активність GUS. Експеримент здійснюють для визначення, які промотори є функціональними. Результати подані на Фіг.1. Негативний контроль (екстракт клітин, інфікованих MVA-BN) чітко свідчить про відсутність активності GUS (Zex; екстинкція 0,001). Показано, що відомий сильний синтетичний промотор Ps досить ефективний (Ps; екстинкція 0,87), оскільки через 48год. експресії визначається високий рівень GUS. Крім того, відомий природний промотор рг 7.5 вірусу коров'ячої віспи також виявляє досить високу активність (р7.5; екстинкція 0,41). Пізня частина рг7.5 (7.5L; екстинкція 0,25) також демонструє активність, що чітко визначається. АТІ-промотор вірусу вісповакцини виразно демонструє досить ефективну експресію чужорідних генів під MVA-BN (АТІ; екстинкція 0,76). Що стосується областей вірогідних промоторів генома MVA-BN, було показано, що А42R (А42; екстинкція 0,48), В9R (В9; екстинкція 0,06), С7L (С7; екстинкція 0,055), F6R (F6; екстинкція 0,208), І2R (І2; екстинкція 0,130) і J6R (J6; екстинкція 0,290) являють собою функціональні промотори. Промотори, які чітко виявляють активність (екстинкція > 0,05) у першому попередньому експерименті, потім були охарактеризовані більш детально (Експеримент 2).

Експеримент 2: Характеристика експресії промоторів

Промотори, які виявили активність в експерименті 1, були охарактеризовані відносно параметрів їх експресії. З цією метою клітини, інфіковані за допомогою MVA-BN і трансфіковані відповідною плазмідною, інкубують з AraC. AraC інгібує реплікацію ДНК, що є істотною передумовою для пізньої експресії генів протягом реплікаційного циклу MVA. Паралельно такий же експеримент здійснюють без додавання AraC. Інфіковані і трансфіковані клітини збирають через 24 години і активність GUS визначають у трьох повторюваннях. На Фіг.2 показана середня екстинкція кожного зразка.

Після інкубування без AraC (-AraC) протягом 24 годин для всіх промоторів чітко визначається сумарна експресія GUS (рання + пізня) (Фіг.2: праві колонки). Активність ідентифікованих промоторів утворює безперервний ряд, що знижується: І2R (І2) > А42R (А42) > F6R (F6) > J6R (J6) > В9R (В9) = С7L (С7). Показано, що промотори В9, С7 і J6 беруть участь, в основному, у пізній експресії протягом життєвого циклу MVA, у той час як інкубація з AraC (+AraC), який придушує пізню експресію, приводить до рівня експресії GUS, порівнянного з рівнем експресії у негативному контролі (Zex). Хоча промотор С7L, очевидно, виявляє відносно слабку активність і ознаки того, що він грає істотну роль під час ранньої експресії.

Промотори А42R, І2R і F6R чітко демонструють дуже ефективну ранню експресію. Що стосу-

ється визначення ранньої експресії, то зразки інкубують протягом ночі для одержання кольорової реакції, що візуалізується. Дані результати не можуть бути напряму порівняні з величинами ранньої + пізньої експресії (Фіг.2: - AraC), оскільки інкубацію проводили лише протягом 5 годин. Промотори, які не показали ранньої експресії, знову аналізують через 7 годин експресії, і результати, одержані через 24 години, можуть підтвердитися (дані не представлені).

#### 1.5 Висновок

Було чітко показано, що можна одержувати промотори різної сили, і що у наш час є спектр доступних промоторів, які демонструють приклади різних параметрів експресії в залежності від тривалості інкубації і можливості реплікації MVA-BN. Коли рання + пізня експресія є переважною, тоді, переважно, використовують промотори A42R, I2R і F6R. Якщо ранню експресію необхідно виключити (наприклад, для чужорідних генів, які містять стоп-сигнал TTTTNT для ранньої експресії), переважно, використовувати промотори B9R, J6R або C7L.

Приклад 2: Аналіз мінімальних промоторних елементів, що одержують з SEQ ID NO:1-4

У прикладі 1 ідентифіковано декілька послідовностей, які зокрема можуть використовуватися для експресії чужорідних генів в MVA-геномі. Щоб перевірити, чи задовольняють більш короткі фрагменти цю ж мету, здійснюють додаткові експерименти. Більш короткі фрагменти SEQ ID NO:1-4 виділяють за допомогою ПЛР і клонують у плазмідну конструкцію (pBSKS+). Всього протестовано 6 вірогідних мінімальних промоторів. Для аналізу їх можливої активності, дані промотори зливають з репортерним геном GUS. ВНК-клітини інфікують MVA-BN і трансфікують плазмідами, що містять вірогідні мінімальні промотори, злиті з геном GUS. Вимірюючи експресію GUS умовні промотори скринують на активність і силу експресії (див. приклад 1). Як позитивний контроль і як стандарт відомий як пізній промотор Ps вірусу віспаки зливають з GUS і аналізують паралельно. Мінімальні промоторні елементи розміром близько 30п.н. можна використовувати для експресії чужорідних генів у рекомбінантних MVA-конструкціях (гесMVA-BN) без ризику гомологічної рекомбінації між гомологічними послідовностями основного і додаткового промотору, що клонується.

#### 2.1 Матеріал і метод

Матеріали і методи, що використовуються у прикладі 2, відповідають методам з прикладу 1, якщо не вказано інакше. ПЛР здійснюють відповідно до стандартних методів.

#### 2.2 Експерименти і результати

Злиття промоторів з геном GUS за допомогою ПЛР

Методи ПЛР дозволяють зливати наведені нижче мінімальні промоторні послідовності з GUS-геном:

SEQ ID NO:7 ("A42 короткий пізній")

TCTTATTAAAAAACATATATAATAAATAACA

SEQ ID NO:8 ("J6R короткий пізній")

GATAAAAAATTTAAAGTGTAATATAAATACT

SEQ ID NO:9 ("F6R короткий ранній")

AGAGTGTAGTATCATAGATAAATCTCTTCTATAAAAT

SEQ ID NO:10 ("F6R короткий пізній")

ATTGTAAATAAATAATGGATAGTATAAAAT

SEQ ID NO:11 ("I2R короткий ранній")

AGTAAAAAATATGTTAGGTTTACAAAA

SEQ ID NO:12 ("I2R короткий пізній")

ATTTATTTTCAGTTTTATTATACGCATAAAAT

Всі умовні мінімальні промотори, злиті з геном GUS, клонують в pBSKS+ і секвенують.

Визначають функцію даних умовних мінімальних промоторів. Для того, щоб проаналізувати активність умовних мінімальних промоторних елементів, клітини ВНК інфікують MVA-BN (мої 1.0) і трансфікують відповідною плазмідною. Через 24 години клітини збирають, лізують і визначають GUS-активність (Фіг.3).

Негативний контроль (екстракт з клітин, інфікованих MVA-BN) виразно свідчить про відсутність активності GUS (контроль; середня екстинкція 0,00167). Показано, що відомий як сильний синтетичний промотор Ps досить ефективний (Ps; середня екстинкція 2,05267), оскільки через 24 години визначається велика кількість GUS. Що стосується мінімальних промоторних елементів умовного промотору MVA-BN-генома, то було показано, що короткий ранній F6R, короткий пізній F6R, короткий ранній I2R, короткий пізній I2R, короткий пізній A42R і короткий пізній J6R всі вони є функціональними промоторами.

Усього було виділено шість функціональних мінімальних промоторних елементів. Два придатні для більш слабкої ранньої транскрипції (короткий ранній I2R: середня екстинкція 0,06933; короткий ранній F6R: середня екстинкція 0,189), а чотири придатні для пізньої експресії різного рівня (короткий пізній F6R: середня екстинкція 0,09833; короткий пізній I2R: середня екстинкція 0,391; короткий пізній J6R: середня екстинкція 0,80167, і короткий пізній A42R: середня екстинкція 2,07).

#### 2.3 Висновок

Чітко показано, що можна виділяти промотори різної сили, і що у наш час доступні найрізноманітніші промотори. Якщо переважною є рання експресія, то переважно використовувати мінімальний промотор - короткий ранній F6R або короткий ранній I2R. Якщо ж переважний пізній промотор, а ранню експресію потрібно виключити (наприклад, для чужорідних генів, які містять стоп-сигнал TTTTNT для ранньої експресії), то переважно використовувати мінімальні промоторні елементи: короткий пізній F6R, короткий пізній J6R і короткий пізній A42R.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Bavarian Nordic A/S

<120> Промотори експресії модифікованого вірусу штаму Анкара  
коров'ячої віспи

<130> BN54PCT

<150> DK PA200301730

<151> 2003-11-24

<150> EP04000943.3

<151> 2004-01-17

<160> 12

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 171

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 1

tctgcaatat tgttatcgta attggaaaa tagtggtcga gtgagttgga ttatgtgagt 60

attggattgt atattttatt ttatatttta tattttgtag taagaataga atgctaattgt 120

caagtttatt ccaatagatg tcttattaaa aaacatatat aataaataac a 171

<210> 2

<211> 105

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 2

gataaaaatt taaagtgtaa atataactat tttttatag ttgtaataaa aagggaatt 60

tgattgtata ctttcggttc tttaaaagaa actgactga taaaa 105

<210> 3

<211> 136

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 3

gcatttcac tttctcaat actaatcaa attgttaaat aaataatgga tagtataat 60

agttattagt gataaaatag taaaaaatat tattagaata agagtgtagt atcatagata 120

actctctct ataaaa 136

<210> 4

<211> 98

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 4

gatctataaa ggtagaccta atcgtctcgg atgaccatat atttatttc agttttatta 60

tacgcataaa tagtaaaaaa tatgttaggt ttacaaaa 98

<210> 5

<211> 160

<212> ДНК

25

90098

26

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 5

ggtaaacctt aagacatgtg tgtatacta agatgggttg cttattccat agtagcttgt 60

ggaatttata aacttatgat agtaaaacta gtaccaata tgtaaagatg aaaaagtaaa 120

ttactattaa cgccgtcggg attcgttcac ccattcagtt 160

<210> 6

<211> 156

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 6

atttctcggg agcacatcaa atgatgttac cacttttctt agcatgctta acttgactaa 60

atattcataa ctaattttta ttaatgatac aaaaacgaaa taaaactgca tattatacac 120

tggttaacgc ccttataggc tctaaccatt ttcaag 156

<210> 7

<211> 31

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 7

tcttattaaa aaacatatat aataaataac a 31

<210> 8

<211> 30

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 8

gataaaaatt taaagtgtaa atataactat 30

<210> 9

<211> 37

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 9

agagtgtagt atcatagata actctcttct ataaaaat 37

<210> 10

<211> 30

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 10

attgttaaatt aaataatgga tagtataaat 30

<210> 11

<211> 27

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 11

agtaaaaaat atgtaggtt taaaaa 27

<210> 12

<211> 31

<212> ДНК

<213> Модифікований вірус вісповакцини штаму Анкара

<400> 12

attttatttc agttttatta tacgcataaa t 31

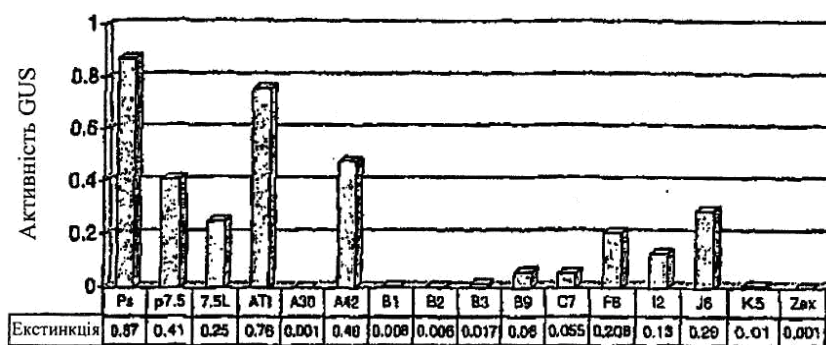


Fig. 1

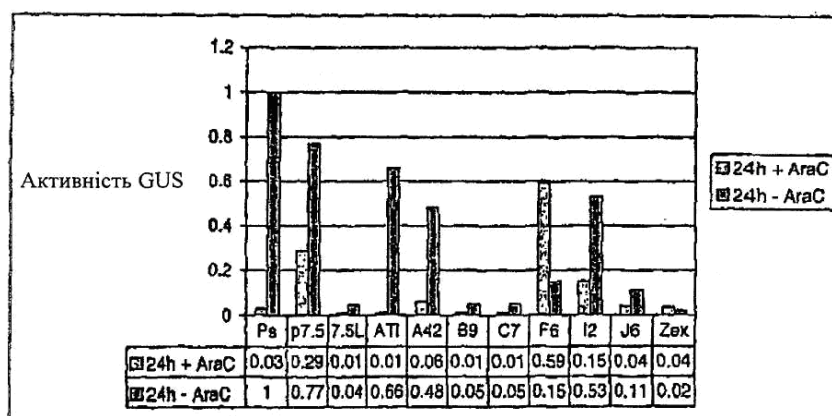


Fig. 2

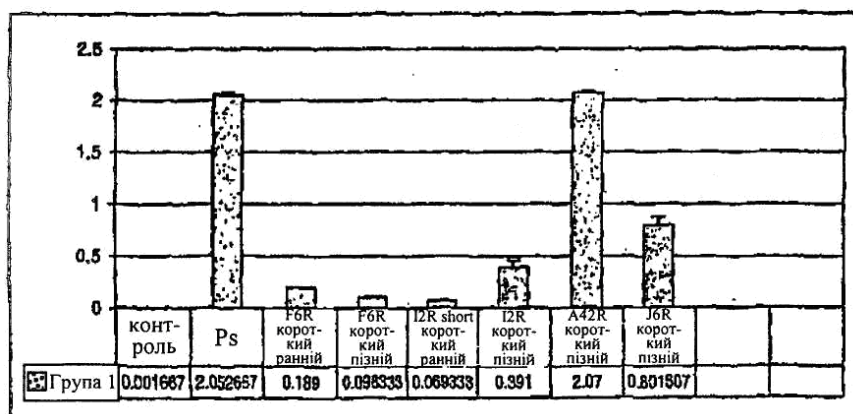


Fig. 3