

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046869**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.27**

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)  
*C07K 14/005* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201892648**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.05.17**

---



---

(54) **ВИРУСЫ ПИЧИНДЕ С ТРЕХСЕКМЕНТНЫМ ГЕНОМОМ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН**

---

(31) **62/338,400**

(32) **2016.05.18**

(33) **US**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/EP2017/061865**

(87) **WO 2017/198726 2017.11.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**УНИВЕРСИТЕТ БАЗЕЛЬ (СН);  
ХООКИПА БАЙОТЕК ГМБХ (АТ)**

(72) Изобретатель:  
**Бонилла Вельди, Пиншевер Даниэль  
Давид (СН), Орлингер Клаус (АТ)**

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

(56) **WO-A1-2016048949**

РЕКНА DHANWANI ET AL.: "A Novel Live Pichinde Virus-Based Vaccine Vector Induces Enhanced Humoral and Cellular Immunity after a Booster Dose", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 90, no. 5, 1 March 2016 (2016-03-01), pages 2551-2560, XP055393247, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.02705-15 cited in the application abstract

S. LAN ET AL.: "Development of Infectious Clones for Virulent and Avirulent Pichinde Viruses: a Model Virus To Study Arenavirus-Induced Hemorrhagic Fevers", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 83, no. 13, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 6357-6362, XP055226267, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00019-09, the whole document  
**WO-A1-2014140301**

(57) Изобретение относится к вирусам Пичинде (Pichinde) с реаранжировками их открытых рамок считывания ("ORF") в их геномах. В частности, описан модифицированный геномный сегмент вируса Пичинде, причем геномный сегмент вируса Пичинде сконструирован, чтобы служить носителем вирусной ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. Также описаны частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащие один L-сегмент и два S-сегмента или два L-сегмента и один S-сегмент. Описанный вирус Пичинде может быть подходящим для вакцин и/или лечения заболеваний и/или для применения в иммунотерапии.

**B1****046869****046869 B1**

Изобретение заявляет приоритет предварительной заявки на патент США с № 62/338400, поданной 18 мая 2016 года, которая включена таким образом посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Ссылка на список последовательностей, представленный в электронном виде**

Изобретение включает посредством ссылки список последовательностей, представленный вместе с этим изобретением в виде текстового файла под названием "Sequence\_Listing\_13194-020-228.TXT", созданного 16 мая 2017 года и имеющего размер 61423 байта.

### **1. Введение**

Настоящее изобретение относится к вирусам Пичинде (Pichinde) с реаранжировками их открытых рамок считывания (ORF) в их геномах. В частности, здесь описан модифицированный геномный сегмент вируса Пичинде, причем геномный сегмент вируса Пичинде сконструирован, чтобы служить носителем вирусной ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. Также здесь описаны частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащие один L-сегмент и два S-сегмента или два L-сегмента и один S-сегмент. Описанный здесь вирус Пичинде может быть подходящим для вакцин и/или лечения заболеваний и/или для применения в иммунотерапии.

### **2. Предпосылки создания изобретения**

#### **2.1. Общие сведения о вирусе Пичинде и организация его генома.**

Вирус Пичинде представляет собой аренавирус, выделенный из *Oryzomys albicularis* (рисовых крыс) в Колумбии (рассмотренный в McLay et al., 2014, *Journal of General Virology*, 95: 1-15). Вирус Пичинде является непатогенным и, как правило, не известно, что он вызывает заболевания у людей. Серологические данные свидетельствуют об очень низкой степени доминирования серотипа даже у местного населения (Trapido et al, 1971, *Am J Trop Med Hyg*, 20: 631-641). Семейство *Arenaviridae* подразделяется на две группы: аренавирусы Старого Света (OW), такие как вирус лихорадки Ласса (LASV) и вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и аренавирусы Нового Света (NW), такие как вирус Пичинде и вирус Хунин (вирус аргентинской геморрагической лихорадки) (Buchmeier et al., 2001, *Arenaviridae: The Viruses and Their Replication, Fields Virology Vol 2*, 1635-1668). Аренавирусы являются РНК-содержащими вирусами с оболочками. Их геном состоит из двух сегментов одноцепочечной РНК негативной полярности (минус-цепи РНК) (фиг. 1А) (McLay et al., 2014, *Journal of General Virology*, 95: 1-15). Каждый сегмент кодирует два вирусных гена в противоположных ориентациях. Короткий сегмент (S-сегмент) кодирует вирусный гликопротеин (GP) и нуклеопротеин (NP). Длинный сегмент (L-сегмент) экспрессирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp; L-белок) и матриксный белок Z (белок Z), белок с доменом "цинковый палец" гена RING. Два гена в каждом сегменте разделены некодирующей межгенной областью (IGR) и фланкированы 5'- и 3'-нетранслируемыми областями (UTR). IGR образует стабильную шпильчатую структуру и, как было показано, участвует в структурно-зависимой терминации транскрипции вирусной мРНК (Pinschewer et al., 2005, *J Virol* 79 (7): 4519-4526). Концевые нуклеотиды UTR демонстрируют высокую степень комплементарности, что, как считается, приводит к образованию вторичных структур. Известно, что эти структуры "сковородка с ручкой" служат в качестве вирусного промотора для транскрипции и репликации, а их анализ с помощью сайт-направленного мутагенеза выявил зависимость от последовательности и структуры, не допуская даже незначительных изменений последовательности (Perez and de la Torre, 2003, *Virol* 77 (2): 1184-1194).

#### **2.2. Обратная (реверсивная) генетическая система.**

Выделенные и очищенные РНК вирусов с минус-цепью, таких как вирус Пичинде, не могут непосредственно служить в качестве мРНК, т.е. не могут транслироваться при введении в клетки. Следовательно, трансфекция клеток вирусной РНК не приводит к продукции инфекционных вирусных частиц. Для образования инфекционных вирусных частиц вирусов с минус-цепью РНК из кДНК в культивируемых перmissive клетках, сегмент(ы) вирусной РНК должен быть транскрипирован минимальными факторами, необходимыми для транскрипции и репликации. С помощью минигеномной системы, которая была опубликована несколько лет назад, вирусные cis-действующие элементы и трансдействующие факторы, участвующие в транскрипции, репликации и образовании вирусных частиц, могли быть окончательно проанализированы (Lee et al., 2000, *J Virol* 74(8): 3470-3477; Lee et al., 2002, *J Virol* 76(12): 6393-6397; Perez and de la Torre 2003, *J Virol* 77(2): 1184-1194; Pinschewer et al., 2003, *J Virol* 77(6): 3882-3887; Pinschewer et al., 2005, *J Virol* 79(7): 4519-4526.). Были разработаны такие реверсивные генетические системы, которые успешно продемонстрировали спасение вируса Пичинде (смотрите, например, Liang et al, 2009, *Ann N Y Acad Sci*, 1171: E65-E74; Lan et al, 2009, *Journal of Virology*, 83 (13): 6357-6362).

#### **2.3. Рекомбинантный вирус Пичинде, экспрессирующий представляющие интерес гены.**

Создание рекомбинантных вирусов с минус-цепью РНК, экспрессирующих чужеродные гены, представляющие интерес, проводилось в течение длительного времени. Различные стратегии были опубликованы для других вирусов (Garcia-Sastre et al., 1994, *J Virol* 68(10): 6254-6261; Percy et al., 1994, *J Virol* 68(7): 4486-4492; Flick and Hobom, 1999, *Virology* 262(1): 93-103; Machado et al., 2003, *Virology* 313(1): 235-249). Были опубликованы векторы на основе живых вирусов Пичинде (Dhanwani et al., 2015, *Journal of Virology* 90: 2551-2560, публикация международной заявки на патент с № WO 2016/048949). Были опубликованы вирусы Пичинде с трехсегментным геномом (Dhanwani et al., 2015, *Journal of Virology* 90:

2551-2560, публикация международной заявки на патент с № WO 2016/048949). У вируса с трехсегментным геномом, опубликованном Dhanwani 2015, как NP, так и GP были сохранены в их соответствующем природном положении в S-сегменте и, таким образом, экспрессировались под контролем их природных промоторов во фланкирующей UTR.

#### 2.4. Дефектный по репликации аренавирус.

Было показано, что может быть сконструирована инфекционная аренавирусная частица, которая содержит геном с возможностью амплификации и экспрессии своей генетической информации в инфицированных клетках, но без способности давать дальнейшее потомство в нормальных, а не генетически сконструированных клетках (т.е. инфекционная, дефектная по репликации аренавирусная частица (публикация международной заявки с № WO 200 9/08 3210 A1 и публикация международной заявки с № WO 2014/140301 A1).

### 3. Краткое изложение сущности настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к вирусам Пичинде с реаранжировками их ORF в их геномах. В частности, настоящее изобретение относится к геномному сегменту вируса Пичинде, который был сконструирован, чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа. В настоящем изобретении также представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента или два L-сегмента и один S-сегмент, которые не рекомбинируются в компетентную по репликации частицу вируса Пичинде с двухсегментным геномом. В настоящем изобретении показано, что частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом может быть сконструирована для увеличения генетической стабильности и обеспечения длительной экспрессии трансгена.

В некоторых вариантах осуществления представленный здесь вирусный вектор является инфекционным, т.е. способным проникать внутрь или вводить свой генетический материал в клетку-хозяина. В некоторых более конкретных вариантах осуществления представленный здесь вирусный вектор является инфекционным, т.е. способным проникать внутрь или вводить свой генетический материал в клетку-хозяина с последующей амплификацией и экспрессией своей генетической информации внутри клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой инфекционный, дефектный по репликации вирусный вектор, сконструированный на основе вируса Пичинде так, что он содержит геном с возможностью амплификации и экспрессии своей генетической информации в инфицированных клетках, без способности давать дальнейшее потомство в виде инфекционных частиц в нормальных, а не генетически сконструированных клетках. В некоторых вариантах осуществления инфекционный вирусный вектор на основе вируса Пичинде является компетентным по репликации и способен давать дальнейшее потомство в виде инфекционных частиц в нормальных, а не генетически сконструированных клетках. В некоторых более конкретных вариантах осуществления такой компетентный по репликации вирусный вектор является аттенуированным (ослабленным) относительно вируса дикого типа, из которого происходит компетентный по репликации вирусный вектор.

#### 3.1. Неприродная открытая рамка считывания.

Соответственно, в одном аспекте здесь представлен геномный сегмент вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент сконструирован, чтобы служить носителем вирусной ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде выбирают из группы, состоящей из:

- (i) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (ii) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (iii) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (iv) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
  - (v) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
  - (vi) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
  - (vii) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (viii) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (ix) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (x) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
  - (xi) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- и
- (xii) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR вируса Пичинде представляет собой 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде или L-сегмента вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR вируса Пичинде представляет собой 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде или L-сегмента вируса Пичинде.

Также здесь представлена выделенная кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, представленного здесь. Также здесь представлен вектор для экспрессии ДНК, содержащий кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде.

Также здесь представлена клетка-хозяин, содержащая геномный сегмент вируса Пичинде, кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде или вектор, содержащий кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде.

Также здесь представлена частица вируса Пичинде, содержащая геномный сегмент вируса Пичинде и второй геномный сегмент вируса Пичинде, так что частица вируса Пичинде содержит S-сегмент и L-сегмент.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде является инфекционной и компетентной по репликации. В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде является аттенуированной. В других вариантах осуществления частица вируса Пичинде является инфекционной, но неспособной давать дальнейшее инфекционное потомство в некомплементирующих клетках.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена или функционально инактивирована.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В других вариантах осуществления только одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В более конкретном варианте осуществления ORF, кодирующая GP, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В других вариантах осуществления ORF, кодирующая NP, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления ORF, кодирующая белок Z, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В других вариантах осуществления ORF, кодирующая L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует репортерный белок. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена. В других вариантах осуществления кодируемый гетерологичной ORF антиген выбирают из антигенов вируса иммунодефицита человека, антигенов вируса гепатита С, поверхностного антигена вируса гепатита В, антигенов вируса ветряной оспы, антигенов цитомегаловируса, антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с опухолью антигенов и опухолеспецифических антигенов (таких как опухолевые неоантигены и опухолевые неопитопы).

В некоторых вариантах осуществления рост или инфективность (инвазивная способность) частицы вируса Пичинде не зависит от гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

Также здесь представлен способ получения геномного сегмента вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления способ включает транскрибирование кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде.

Также здесь представлен способ образования частицы вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления способ образования частицы вируса Пичинде включает:

- (i) трансфекцию в клетку-хозяина кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде;
- (ii) трансфекцию в клетку-хозяина плазмиды, содержащей кДНК для второго геномного сегмента вируса Пичинде;
- (iii) поддержание клетки-хозяина в условиях, подходящих для образования вируса; и
- (iv) сбор частиц вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления транскрипция L-сегмента и S-сегмента осуществляется с использованием двунаправленного промотора.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает трансфекцию в клетку-хозяина одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих полимеразу вируса Пичинде. В еще более конкретных вариантах осуществления полимеразы представляет собой L-белок. В других вариантах осуществления способ дополнительно включает трансфекцию в клетку-хозяина одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих NP.

В некоторых вариантах осуществления транскрипция каждого из L-сегмента и S-сегмента осуществляется под контролем промотора, выбираемого из группы, состоящей из:

- (i) промотора для РНК-полимеразы I;
- (ii) промотора для РНК-полимеразы II; и
- (iii) промотора T7.

В другом варианте осуществления здесь представлена вакцина, содержащая частицу вируса Пичинде, в которой по меньшей мере одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена

или функционально инактивирована; или в которой по меньшей мере одна ORF, кодирующая GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из другого организма, отличного от вируса Пичинде; или в которой только одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления вакцина дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления здесь представлена фармацевтическая композиция, содержащая частицу вируса Пичинде, в которой по меньшей мере одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена или функционально инактивирована; или в которой по меньшей мере одна ORF, кодирующая GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из другого организма, отличного от вируса Пичинде; или в которой только одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде или частица вируса Пичинде происходит из высоковирулентного изолята P2 штамма Munchique CoAn4763 после большого числа пассажей или штамма P2 после небольшого числа пассажей, или происходит из любого из нескольких изолятов, описанных Trapido с соавторами (Trapido et al., 1971, Am J Trop Med Hyg, 20: 631-641).

### 3.2. Вирус Пичинде с трехсегментным геномом.

В одном аспекте здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента. В некоторых вариантах осуществления размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом после 70 дней персистирующей инфекции у мышей, у которых отсутствует интерфероновый рецептор типа I, интерфероновый рецептор типа II и активирующий рекомбинацию ген 1 (RAG1), и которые были инфицированы  $10^4$  БОЕ частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах осуществления межсегментная рекомбинация двух S-сегментов, объединяющая две ORF вируса Пичинде только в одном, а не в двух отдельных сегментах, отменяет вирусную промоторную активность.

В другом аспекте здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент. В некоторых вариантах осуществления размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом после 70 дней персистирующей инфекции у мышей, у которых отсутствует интерфероновый рецептор типа I, интерфероновый рецептор типа II и активирующий рекомбинацию ген 1 (RAG1), и которые были инфицированы  $10^4$  БОЕ частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах осуществления межсегментная рекомбинация двух S-сегментов, объединяющая две ORF вируса Пичинде только в одном, а не в двух отдельных сегментах, отменяет вирусную промоторную активность.

В некоторых вариантах осуществления один из двух S-сегментов выбирают из группы, состоящей из:

- (i) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (ii) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (iii) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (iv) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- (v) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде; и
- (vi) S-сегмента, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления один из двух L-сегментов выбирают из группы, состоящей из:

- (i) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (ii) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (iii) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (iv) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- (v) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- и (vi) L-сегмента, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом представляет собой 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде или L-сегмента вируса Пичинде. В других вариантах осуществления 5'-UTR в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом представляет собой 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде или L-сегмента вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления два S-сегмента включают

(i) одну или две гетерологичных ORF из организма, отличного от вируса Пичинде; или

(ii) один или два дублета ORF вируса Пичинде; или

(iii) одну гетерологичную ORF из организма, отличного от вируса Пичинде, и один дублет ORF вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления два L-сегмента включают

(i) одну или две гетерологичных ORF из организма, отличного от вируса Пичинде; или

(ii) один или два дублета ORF вируса Пичинде; или

(iii) одну гетерологичную ORF из организма, отличного от вируса Пичинде, и один дублет ORF вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена. В других вариантах осуществления гетерологичную ORF, кодирующую антиген, выбирают из антигенов вируса иммунодефицита человека, антигенов вируса гепатита С, поверхностного антигена вируса гепатита В, антигенов вируса ветряной оспы, антигенов цитомегаловируса, антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с опухолью антигенов и опухолеспецифических антигенов (таких как опухолевые неоантигены и опухолевые неопитопы).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна гетерологичная ORF кодирует флуоресцентный белок. В других вариантах осуществления флуоресцентный белок представляет собой зеленый флуоресцентный белок (GFP) или красный флуоресцентный белок (RFP).

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом включает четыре ORF вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является инфекционной и компетентной по репликации.

В некоторых вариантах осуществления в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом отсутствует одна или более из четырех ORF Пичинде. В других вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является инфекционной, но неспособной давать дальнейшее инфекционное потомство в некомплементирующих клетках.

В некоторых вариантах осуществления в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом отсутствует одна из четырех ORF вируса Пичинде, причем частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является инфекционной, но неспособной давать дальнейшее инфекционное потомство в некомплементирующих клетках.

В некоторых вариантах осуществления в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом отсутствует ORF, кодирующая GP.

В дальнейшем аспекте здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента. В некоторых вариантах осуществления первый S-сегмент сконструирован, чтобы служить носителем ORF, кодирующей GP, в положении под контролем 3'-UTR вируса Пичинде и ORF, кодирующей первый представляющий интерес ген, в положении под контролем 5'-UTR вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления второй S-сегмент сконструирован, чтобы служить носителем ORF, кодирующей NP, в положении под контролем 3'-UTR вируса Пичинде и ORF, кодирующей второй представляющий интерес ген, в положении под контролем 5'-UTR вируса Пичинде.

В еще одном аспекте здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента. В некоторых вариантах осуществления первый S-сегмент сконструирован, чтобы служить носителем ORF, кодирующей GP, в положении под контролем 5'-UTR вируса Пичинде и ORF, кодирующей первый представляющий интерес ген, в положении под контролем 3'-UTR вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления второй S-сегмент сконструирован, чтобы служить носителем ORF, кодирующей NP, в положении под контролем 5'-UTR вируса Пичинде и ORF, кодирующей второй представляющий интерес ген, в положении под контролем 3'-UTR вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена. В других вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует антиген, выбираемый из антигенов вируса иммунодефицита человека, антигенов вируса гепатита С, поверхностного антигена вируса гепатита В, антигенов вируса ветряной оспы, антигенов цитомегаловируса, антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с опухолью антигенов и опухолеспецифических антигенов (таких как опухолевые неоантигены и опухолевые неопитопы). В еще одном варианте осуществления по меньшей мере один представляющий интерес ген кодирует флуоресцентный белок. В конкретном варианте осуществления флуоресцентный белок представляет собой GFP или RFP.

Также здесь представлена выделенная кДНК для генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. Также здесь представлен вектор для экспрессии ДНК, содержащий кДНК для генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. Также здесь представлен один или более векторов для экспрессии ДНК, включающих либо индивидуально, либо в совокупности кДНК для генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

Кроме того, здесь представлена клетка-хозяин, содержащая частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, кДНК для генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом или вектор, содержащий кДНК для генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является аттенуированной.

Также здесь представлен способ образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах осуществления способ образования частицы вируса Пичинде включает:

(i) трансфекцию в клетку-хозяина одной или более кДНК для одного L-сегмента и двух S-сегментов;

(ii) поддержание клетки-хозяина в условиях, подходящих для образования вируса; и

(iii) сбор частиц вируса Пичинде.

Также здесь представлен способ образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах осуществления способ образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом включает:

(i) трансфекцию в клетку-хозяина одной или более кДНК для двух L-сегментов и одного S-сегмента;

(ii) поддержание клетки-хозяина в условиях, подходящих для образования вируса; и

(iii) сбор частиц вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления транскрипция одного L-сегмента и двух S-сегментов осуществляется с использованием двунаправленного промотора. В некоторых вариантах осуществления транскрипция двух L-сегментов и одного S-сегмента осуществляется с использованием двунаправленного промотора.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает трансфекцию в клетку-хозяина одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих полимеразу вируса Пичинде. В еще более конкретных вариантах осуществления полимеразы представляет собой L-белок. В других вариантах осуществления способ дополнительно включает трансфекцию в клетку-хозяина одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих белок NP.

В некоторых вариантах осуществления транскрипция каждого из одного L-сегмента и двух S-сегментов осуществляется под контролем промотора, выбираемого из группы, состоящей из:

(i) промотора для РНК-полимеразы I;

(ii) промотора для РНК-полимеразы II; и

(iii) промотора T7.

В некоторых вариантах осуществления транскрипция каждого из двух L-сегментов и одного S-сегмента осуществляется под контролем промотора, выбираемого из группы, состоящей из:

(i) промотора для РНК-полимеразы I;

(ii) промотора для РНК-полимеразы II; и

(iii) промотора T7.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом имеет тот же тропизм, что и частица вируса Пичинде с двухсегментным геномом. В других вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является дефектной по репликации.

В другом варианте осуществления здесь представлена вакцина, содержащая частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления здесь представлена фармацевтическая композиция, содержащая частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде или частица вируса Пичинде происходит из высоковирулентного изолята P2 штамма Munchique CoAn4763 после большого числа пассажей или штамма P2 после небольшого числа пассажей, или происходит из любого из нескольких изолятов, описанных Trapido с соавторами (Trapido et al., 1971, Am J Trop Med Hyg, 20: 631-641).

### 3.3. Соглашения и сокращения.

Сокращение	Соглашение
APC	Антигенпредставляющая клетка
art	Искусственный
CAT	Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза
CMI	Клеточно-опосредованный иммунитет
CD8	Кластер дифференцировки 8
CD4	Кластер дифференцировки 4
GFP	Зеленый флуоресцентный белок
GP	Гликопротеин
IGR	Межгенная область
LCMV	Вирус лимфоцитарного хориоменингита
L protein	РНК-зависимая РНК-полимераза
L segment	Длинный сегмент
MHC	Главный комплекс гистосовместимости
Z protein	Матриксный белок Z
NP	Нуклеопротеин
ORF	Открытая рамка считывания
RFP	Красный флуоресцентный белок
r3PIC	Рекомбинантный вирус Пичинде с трехсегментным геномом
S segment	Короткий сегмент
UTR	Нетранслируемая область
VSV	Вирус везикулярного стоматита
VSVG	Гликопротеин вируса везикулярного стоматита
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
sP1AGM protein	Белок слияния i) сигнального пептида VSVG, ii) антигена P1A линии клеток мастоцитомы у мыши P815, iii) линкера GSG, iv) пептида 2A энтеровируса и v) GM-CSF мыши.
RNP	Рибонуклеопротеин
RAG1	Активирующий рекомбинацию ген
OW	Ареनावирусы Старого Света
NW	Ареनावирусы Нового Света
LASV	Вирус лихорадки Ласса

#### 4. Краткое описание чертежей

Фиг. 1A-1D. Схематическое представление геномной организации вируса Пичинде с двух- и трехсегментным геномом. Двухсегментный геном вируса Пичинде дикого типа состоит из одного S-сегмента, кодирующего GP и NP, и одного L-сегмента, кодирующего белок Z и L-белок. Оба сегмента фланкированы соответствующими 5'- и 3'-UTR. (фиг. 1A). Схематическое описание генома вируса Пичинде rPIC<sup>wt</sup>, который являлся вирусом Пичинде дикого типа, полученным исходя из кДНК, с его природными геномными сегментами S (SEQ ID NO:16) и L (SEQ ID NO:2), которые были модифицированы с помощью молчащих мутаций, введенных для удаления сайтов рестрикции BsmBI и BbsI в соответствующих кДНК. (фиг. 1B-1D). Геном рекомбинантных вирусов Пичинде с трехсегментным геномом (r3PIC) состоит из одного L- и двух S-сегментов с одним положением, в которое должен быть вставлен представляющий интерес ген (здесь слитый белок GFP/sP1AGM), в каждом из S-сегментов. (фиг. 1B). Схематическое описание трехсегментного генома вектора Пичинде с искусственной организацией. В одном из дублированных S-сегментов ORF, кодирующая гликопротеин (GP), располагается вместо ORF, кодирующей нуклеопротеин (NP), в природном S-сегменте, т.е. между 3'-UTR и IGR. (фиг. 1C) r3PIC-GFP<sup>art</sup> состоит из всех вирусных генов в их природном положении, за исключением кодирующей GP ORF, которая искусственно помещена рядом с 3'-UTR и экспрессируется под ее контролем (S-GP/GFP<sup>art</sup>; SEQ ID NO:13). (фиг. 1D). Схематическое описание генома вектора, основанного на вирусе Пичинде с трехсегментным геномом, sP1AGM-экспрессирующего r3PIC-sP1AGM<sup>art</sup>.



Фиг. 2. r3PIC-GFP<sup>att</sup> с трехсегментным геномом был аттенуированным по сравнению с родительским вирусом дикого типа с двухсегментным геномом. Кинетика роста указанных вирусов в клетках ВНК-21, инфицированных с множественностью заражения (MOI)=0,01 (вирус Пичинде дикого типа: черные квадраты, r3PIC-GFP<sup>att</sup>: черные кружки). Супернатант отбирали в указанные моменты времени после инфицирования, и титры вируса определяли путем анализа фокусообразования.

Фиг. 3. Схематическое описание экспрессионных кассет плазмид, используемых для экспериментов, описанных на фиг. 2 и 4.

Фиг. 4. Восстановление инфекционного, GFP-экспрессирующего вируса из кДНК в клетках с r3PIC-GFP<sup>att</sup>. Флуоресцентные изображения экспрессии GFP фиксировали через 48 или 168 ч после трансфекции клеток ВНК-21 следующими комбинациями плазмид:

S-сегментным минигеном: pC-PIC-L-Bsm, pC-PIC-NP-Bbs, pol-I-PIC-miniS-GFP;

L-сегментным минигеном: pC-PIC-L-Bsm, pC-PIC-NP-Bbs, pol-I-PIC-L-GFP-Bsm;

r3PIC-GFP<sup>att</sup>: pC-PIC-L-Bsm, pC-PIC-NP-Bbs, pol-I-PIC-L, pol-I-PIC-NP-GFP, pol-I-PIC-GP-GFP;

rPIC<sup>wt</sup>: pC-PIC-L-Bsm, pC-PIC-NP-Bbs, pol-I-PIC-L, pol-I-PIC-S.

Фиг. 5A, B. Вирусные векторы, основанные на вирусе Пичинде с трехсегментным геномом, являются в высокой степени иммуногенными. Мышей BALB/c инфицировали внутривенно 10<sup>е5</sup> ФОЕ r3PIC-sP1AGM<sup>att</sup>. Контрольные мыши оставались неиммунизированными. Спустя восемь дней частоты возникновения P1A-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови определяли окрашиванием тетрамера МНС класса I. Показаны приводимые в качестве примера графики FACS (фиг. 5A) и частоты тетрамер-связывающих клеток среди CD8<sup>+</sup> Т-клетке в периферической крови (фиг. 5B). Символы в B представляют отдельных мышей.

Фиг. 6. Схематическое описание генома вектора в виде вируса Пичинде с трехсегментным геномом, разработанного для экспрессии генов гликопротеина (GP) и нуклеопротеидов (NP) под контролем промоторов 5' и 3'-UTR, соответственно, т.е. в их соответствующем "природном" положении в контексте искусственно дублированных S-сегментов - S-GP/GFP<sup>nat</sup> (SEQ ID NO:15) и S-NP/GFP (также известного как PIC-NP-GFP; SEQ ID NO:11). Геном состоит из одного L и двух S-сегментов с одним положением, в которое должен быть вставлен представляющий интерес ген (здесь белок GFP), в каждом из S-сегментов.

Фиг. 7. Ранние пассажи r3PIC-GFP<sup>nat</sup> и r3PIC-GFP<sup>att</sup> с трехсегментным геномом были аттенуированными по сравнению родительским вирусом дикого типа с двухсегментным геномом. Кинетика роста указанных вирусов в клетках ВНК-21 в культуре, инфицированных с множественностью заражения (MOI)=0,01. Супернатант отбирали через 48 ч после инфицирования, и титры вируса определяли путем анализа фокусообразования. Символы показывают титры из отдельных параллельных ячеек клеточной культуры; "усы" обозначают среднее значение +/- SD.

Фиг. 8. В отличие от r3PIC-GFP<sup>att</sup>, который является стабильно аттенуированным, r3PIC-GFP<sup>nat</sup> достигал титров в пределах rPIC<sup>wt</sup> во время персистирующей инфекции у мышей. Мышей AGR (мышей, трижды дефицитных по интерфероновым рецепторам типа I и типа II, а также RAG1) инфицировали внутривенно с использованием 10<sup>е5</sup> ФОЕ вирусов, как показано на фигуре (вирус Пичинде дикого типа - rPIC<sup>wt</sup>: серые треугольники, r3PIC-GFP<sup>att</sup>: черные кружки, r3PIC-GFP<sup>nat</sup>: белые квадраты). Кровь собирали в день 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 77, 98, 120 и 147, и инфективность вирусов определяли в анализах фокусообразования, детектируя нуклеопротеин вируса Пичинде (ФОЕ с экспрессией NP).

Фиг. 9. В отличие от r3PIC-GFP<sup>att</sup>, который является стабильно аттенуированным, r3PIC-GFP<sup>nat</sup> достигал титров в пределах rPIC<sup>wt</sup> во время персистирующей инфекции у мышей. Мышей AGR (мышей, трижды дефицитных по интерфероновым рецепторам типа I и типа II, а также RAG1) инфицировали внутривенно с использованием 10<sup>е5</sup> ФОЕ вирусов, как показано на фигуре (вирус Пичинде дикого типа - rPIC<sup>wt</sup>: серые треугольники, r3PIC-GFP<sup>att</sup>: черные кружки, r3PIC-GFP<sup>nat</sup>: белые квадраты). Кровь собирали в день 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 77, 98, 120 и 147, и инфективность вирусов определяли в анализах фокусообразования, детектируя вирусные трансгены GFP в r3PIC-GFP<sup>nat</sup> и r3PIC-GFP<sup>att</sup> (ФОЕ с экспрессией GFP).

Фиг. 10. Основанные на вирусе Пичинде с трехсегментным геномом вирусные векторы с искусственными геномами являются в высокой степени иммуногенными. Мышей AGR (мышей, трижды дефицитных по интерфероновым рецепторам типа I и типа II, а также RAG1) инфицировали внутривенно с использованием 10<sup>е5</sup> ФОЕ вирусов, как показано на фигуре (r3PIC-GFP<sup>att</sup>: черные кружки, r3PIC-GFP<sup>nat</sup>: белые квадраты). Кровь собирали в день 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 77, 98, 120 и 147, и инфективность вирусов определяли с помощью анализа фокусообразования, как показано на фиг. 9 и фиг. 10. Полученные значения были использованы для расчета отношения ФОЕ с экспрессией NP:ФОЕ с экспрессией GFP для каждого животного и момента времени.

Фиг. 11. Вирус в мышиной сыворотке, собранной через 147 дней после инфицирования r3PIC-GFP<sup>att</sup>, показал ослабленный рост при прямых пассажах в культуре клеток, тогда как вирус, выращенный у мышей, инфицированных r3PIC-GFP<sup>nat</sup>, достигал титров, сравнимых с rPIC<sup>wt</sup>. Сыворотку, собранную в день 147 после инфицирования клеток ВНК-21, пассировали, и инфективность вирусов определяли с помощью анализов ФОЕ с экспрессией NP через 48 ч. Символы показывают титры вирусов, происходящих из сывороток отдельных мышей; "усы" обозначают среднее значение +/-SD.

Фиг. 12. Вирус, выделенный и размноженный из мышинной сыворотки, собранной через 147 дней после инфицирования r3PIC-GFP<sup>ant</sup>, показал ослабленный рост при прямых пассажах в культуре клеток, тогда как вирус, выделенный и размноженный из r3PIC-GFP<sup>nat</sup>-инфицированных мышей, достигал титров, сравнимых с rPIC<sup>wt</sup>. Клетки ВНК-21 инфицировали со стандартизированной множественностью заражения=0,01 вирусами, которые были получены из сыворотки, собранной в день 147 после инфицирования и ранее пассированы в течение 48 ч. Титры вирусов определяли через 48 ч. Символы показывают титры вирусов, происходящих из сывороток отдельных мышей; "усы" обозначают среднее значение +/-SD.

Фиг. 13. В r3PIC-GFP<sup>ant</sup> два его S-сегмента не рекомбинировались в течение 147-дневного периода персистирующей инфекции у мышей, тогда как молекулы РНК S-сегментов, содержащие последовательности как NP, так и GP, были обнаружены в сыворотке мышей с персистирующей инфекцией r3PIC-GFP<sup>nat</sup> в течение 147 дней. ОТ-ПЦР проводили на образцах сыворотки, собранных в день 147 после инфицирования вирусом, с использованием праймеров, которые были разработаны для связывания с NP и GP вируса Пичинде, соответственно, и которые охватывали межгенную область (IGR) S-сегмента вируса Пичинде, так что они, как прогнозировалось, давали ПЦР-ампликон из 357 п.о. на геномной матрице rPIC<sup>wt</sup>. Каждая полоса представляет собой продукт ОТ-ПЦР от одной отдельной мыши в эксперименте, показанном на фиг. 8-10.

### Подробное описание настоящего изобретения

#### 4.1. Вирусы Пичинде с открытой рамкой считывания в неприродном положении.

Здесь представлены вирусы Пичинде с реаранжировками их ORF. В некоторых вариантах осуществления такие вирусы Пичинде являются компетентными по репликации и инфекционными. Здесь приведены геномные последовательности таких вирусов Пичинде. В одном аспекте здесь, представлен геномный сегмент вируса Пичинде, причем геномный сегмент вируса Пичинде сконструирован, чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения, в котором соответствующий ген обнаруживается в выделенных из дикой природы вирусах, таких как изолят P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (смотрите SEQ ID NO:1 и 2 в Списке последовательностей) (называемого здесь "положением дикого типа"), ORF (т.е. неприродном положении).

Геномные сегменты вируса Пичинде дикого типа и их ORF известны в данной области техники. В частности, геном вируса Пичинде состоит из S-сегмента и L-сегмента. S-сегмент содержит ORF, кодирующие GP и NP. L-сегмент кодирует L-белок и белок Z. Оба сегмента фланкированы соответствующими 5'- и 3'-UTR (смотрите фиг. 1A). Иллюстративные геномные сегменты вируса Пичинде дикого типа представлены в SEQ ID NO:1 и 2.

В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде может быть сконструирован, чтобы служить носителем двух или более ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа. В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде может быть сконструирован, чтобы служить носителем двух ORF вируса Пичинде или трех ORF вируса Пичинде, или четырех ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления представленным здесь геномным сегментом вируса Пичинде может быть:

- (i) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (ii) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (iii) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (iv) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- (v) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- (vi) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- (vii) L-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (viii) L-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (ix) L-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
- (x) L-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- (xi) L-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде; и
- (xii) L-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 3'-

UTR вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления ORF, которая находится в неприродном положении геномного сегмента вируса Пичинде, описанного здесь, может находиться под контролем 3'-UTR вируса Пичинде или 5'-UTR вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления 3'-UTR вируса Пичинде представляет собой 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде. В другом конкретном варианте осуществления 3'-UTR вируса Пичинде представляет собой 3'-UTR L-сегмента вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления 5'-UTR вируса Пичинде представляет собой 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде. В других конкретных вариантах осуществления 5'-UTR представляет собой 5'-UTR L-сегмента.

В других вариантах осуществления ORF, которая находится в неприродном положении геномного сегмента вируса Пичинде, описанного здесь, может находиться под контролем консервативного элемента в виде концевой последовательности аренавируса (5'- и 3'-концевых 19-21-нуклеотидных районов) (смотрите, например, Perez & de la Torre, 2003, *J Virol.* 77 (2): 1184-1194).

В некоторых вариантах осуществления ORF, которая находится в неприродном положении геномного сегмента вируса Пичинде, может находиться под контролем промоторного элемента 5'-UTR (смотрите, например, Albarino et al., 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). В другом варианте осуществления ORF, которая находится в неприродном положении геномного сегмента вируса Пичинде, может находиться под контролем промоторного элемента 3'-UTR (смотрите, например, Albarino et al., 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). В более конкретных вариантах осуществления промоторный элемент 5'-UTR представляет собой промоторный элемент 5'-UTR S-сегмента или L-сегмента. В другом конкретном варианте осуществления промоторный элемент 3'-UTR представляет собой промоторный элемент 3'-UTR S-сегмента или L-сегмента.

В некоторых вариантах осуществления ORF, которая находится в неприродном положении геномного сегмента вируса Пичинде, может находиться под контролем усеченной 3'-UTR вируса Пичинде или усеченной 5'-UTR вируса Пичинде (смотрите, например, Perez & de la Torre, 2003, *J Virol.* 77 (2): 1184-1194; Albarino et al., 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). В более конкретных вариантах осуществления усеченная 3'-UTR представляет собой 3'-UTR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления усеченная 5'-UTR представляет собой 5'-UTR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде.

Также здесь представлена частица вируса Пичинде, содержащая первый геномный сегмент, который был сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, и второй геномный сегмент вируса Пичинде, так что частица вируса Пичинде содержит S-сегмент и L-сегмент. В конкретных вариантах осуществления ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, является одной из ORF вируса Пичинде.

В некоторых конкретных вариантах осуществления частица вируса Пичинде может содержать полный набор всех четырех ORF вируса Пичинде. В конкретных вариантах осуществления второй геномный сегмент вируса Пичинде был сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В другом конкретном варианте осуществления второй геномный сегмент вируса Пичинде может представлять собой геномный сегмент дикого типа (т.е. содержит ORF в сегменте в положении дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления первый геномный сегмент вируса Пичинде представляет собой L-сегмент, а второй геномный сегмент вируса Пичинде представляет собой S-сегмент. В других вариантах осуществления первый геномный сегмент вируса Пичинде представляет собой S-сегмент, а второй геномный сегмент вируса

Пичинде представляет собой L-сегмент.

Неограничивающие примеры частицы вируса Пичинде, содержащей геномный сегмент с ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, и второй геномный сегмент, показаны в табл. 1.

Таблица 1

## Частица вируса Пичинде

Положение 1	Положение 2	Положение 3	Положение 4
GP	NP	L	Z
GP	Z	L	NP
GP	Z	NP	L
GP	L	NP	Z
GP	L	Z	NP
NP	GP	L	Z
NP	GP	Z	L
NP	L	GP	Z
NP	L	Z	GP
NP	Z	GP	L
NP	Z	L	GP
Z	GP	L	NP
Z	GP	NP	L
Z	NP	GP	L
Z	NP	L	GP
Z	L	NP	GP
Z	L	GP	NP
L	NP	GP	Z
L	NP	Z	GP
L	GP	Z	NP
L	GP	NP	Z
L	Z	NP	GP
L	Z	GP	NP

\*Положение 1 находится под контролем 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 2 находится под контролем 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 3 находится под контролем 5'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 4 находится под контролем 3'-UTR L-сегмента вируса Пичинде.

Также здесь представлена кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, сконструированного, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В более конкретных вариантах осуществления здесь представлена кДНК или совокупность кДНК для генома вируса Пичинде, описанная в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая сегмент генома вируса Пичинде, описанный здесь, может быть по меньшей мере в некоторой степени идентична по последовательности нуклеотидной последовательности, раскрытой здесь. Соответственно, в некоторых аспектах нуклеиновая кислота, кодирующая сегмент генома вируса Пичинде, идентична по последовательности по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, или быть полностью идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, раскрытой здесь под SEQ ID NO, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой здесь под SEQ ID NO. Условия гибридизации могут включать очень жесткие, умеренно жесткие или условия гибридизации низкой жесткости, которые хорошо известны специалисту в данной области техники, такие как те, которые описаны здесь. Аналогично, нуклеиновая кислота, которая используется для конструирования сегмента генома вируса Пичинде, описанного здесь, может быть по меньшей мере в некоторой степени идентична по последовательности нуклеиновой кислоте, раскрытой здесь под SEQ ID NO, или нуклеиновой кислоте, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой здесь под SEQ ID NO. Например, нуклеиновая кислота, которая используется для конструирования сегмента генома вируса Пичинде, может быть идентична по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, или быть полностью идентичной описанной здесь последовательности нуклеиновой кислоты.

Идентичность последовательностей (также известная как гомология или сходство) относится к

сходству последовательностей между двумя молекулами нуклеиновой кислоты или между двумя полипептидами. Идентичность может быть определена путем сравнения положения в каждой последовательности, которая может быть совмещена для целей сравнения. Когда положение в сравниваемой последовательности занято тем же основанием или аминокислотой, то молекулы в этом положении идентичны. Степень идентичности между последовательностями зависит от количества совпадающих или гомологичных положений, разделяемых последовательностями. Совмещение двух последовательностей для определения процента идентичности их последовательностей может быть выполнено с использованием реализованных программно программ, известных в данной области техники, таких как, например, те, которые описаны в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999). Предпочтительно, когда для совмещения используются параметры по умолчанию. Одной программой для совмещения, хорошо известной в данной области техники, которая может использоваться, является BLAST, установленная на параметры по умолчанию. В частности, программами являются BLASTN и BLASTP, используя следующие параметры по умолчанию: генетический код=стандартный; фильтр=ни один; цепи=обе; отсечка=60; ожидать=10; матрица=BLOSUM62; описания=50 последовательностей; сортировать по=HIGH SCORE; базы данных=нерезервированные, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+трансляции кодирующих последовательностей GenBank+SwissProtein+SPupdate+PIR. Детали этих программ можно найти в Национальном центре биотехнологической информации.

Жесткие условия гибридизации относятся к условиям, в которых гибридизированные полинуклеотиды являются стабильными. Как известно специалистам в данной области техники, температуре плавления ( $T_m$ ) гибридов отражает стабильность гибридизированных полинуклеотидов. В общем, стабильность гибридизированных полинуклеотидов зависит от концентрации соли, например, концентрации ионов натрия, и температуры. Реакцию гибридизации можно проводить в условиях более низкой жесткости с последующими промывками различной, но более высокой, жесткости. Ссылка на жесткость гибридизации относится к таким условиям промывки. Очень жесткая гибридизация включает условия, которые допускают гибридизацию только тех последовательностей нуклеиновых кислот, которые образуют стабильные гибридизированные полинуклеотиды в 0,018 М NaCl при 65°C, например, если гибрид нестабилен в 0,018 М NaCl при 65°C, он не будет стабильным в условиях высокой жесткости, как это предусмотрено здесь. Условия высокой жесткости могут быть обеспечены, например, путем гибридизации в 50% формамиде, 5X растворе Денхарта, 5X SSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующей промывкой в 0,1X SSPE и 0,1% SDS при 65°C. Условия гибридизации, отличные от очень жестких условий гибридизации, также могут использоваться для описания раскрытых здесь последовательностей нуклеиновых кислот. Например, выражение "умеренно жесткая гибридизация" относится к условиям, эквивалентным гибридизации в 50% формамиде, 5X растворе Денхарта, 5X SSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующей промывкой в 0,2X SSPE, 0,2% SDS при 42°C. Выражение "гибридизация низкой жесткости" относится к условиям, эквивалентным гибридизации в 10% формамиде, 5X растворе Денхарта, 6X SSPE, 0,2% SDS при 22°C с последующей промывкой в 1X SSPE, 0,2% SDS при 37°C. Раствор Денхарта содержит 1% Ficoll, 1% поливинилпирролидона и 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA). 20X SSPE (хлорид натрия, фосфат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)) содержит 3 М хлорид натрия, 0,2 М фосфат натрия и 0,025 М (EDTA). Другие подходящие буферы и условия гибридизации в условиях низкой, средней и высокой жесткости хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001); and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

В некоторых вариантах осуществления кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, который сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, является частью вектора для экспрессии ДНК или включена в него. В конкретном варианте осуществления кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, который сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, является частью вектора для экспрессии ДНК, который облегчает получение геномного сегмента вируса Пичинде, описанного здесь, или включена в него. В другом варианте осуществления описанная здесь кДНК может быть включена в плазмиду. Более подробное описание кДНК или нуклеиновых кислот и экспрессионных систем представлено в разделе 4.5.1. Методами получения кДНК являются распространенные и общепринятые методы молекулярной биологии и манипуляции и получения ДНК. Может использоваться любой метод клонирования, известный квалифицированному специалисту. Такие методы хорошо известны квалифицированному специалисту и доступны ему в лабораторных руководствах, таких как Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001).

В некоторых вариантах осуществления кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, который сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, вводится (например, трансфицируется) в клетку-хозяина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления здесь представлена клетка-хозяин, содержащая кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, который сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF ди-

кого типа (т.е. кДНК для геномного сегмента). В других вариантах осуществления описанная здесь кДНК является частью вектора для экспрессии ДНК или может быть включена в него и введена в клетку-хозяина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления здесь представлена клетка-хозяин, содержащая описанную здесь кДНК, которая включена в вектор. В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, описанный здесь, вводится в клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления здесь описан способ получения геномного сегмента вируса Пичинде, причем способ включает транскрибирование кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления белок в виде вирусной полимеразы может присутствовать во время транскрипции геномного сегмента вируса Пичинде *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления транскрипция геномного сегмента вируса Пичинде осуществляется с использованием двунаправленного промотора. В других вариантах осуществления транскрипция геномного сегмента вируса Пичинде осуществляется с использованием cassette для двунаправленной экспрессии (смотрите, например, Ortiz-Riaño et al., 2013 J Gen Virol., 94 (Pt 6): 1175-1188). В более конкретных вариантах осуществления cassette для двунаправленной экспрессии содержит как промотор для полимеразы I, так и промотор для полимеразы II, с осуществлением считывания с противоположных сторон в два конца вставленного геномного сегмента вируса Пичинде, соответственно. В еще более конкретных вариантах осуществления считывание в cassette для двунаправленной экспрессии с промоторами для pol-I и pol-II осуществляется с противоположных сторон в L-сегменте и S-сегменте.

В других вариантах осуществления транскрипция кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, описанного здесь, включает промотор. Конкретные примеры промоторов включают промотор для РНК-полимеразы I, промотор для РНК-полимеразы II, промотор для РНК-полимеразы III, промотор T7, промотор SP6 или промотор T3.

В некоторых вариантах осуществления способ получения геномного сегмента вируса Пичинде может дополнительно включать введение в клетку-хозяина кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления способ получения геномного сегмента вируса Пичинде может дополнительно включать введение в клетку-хозяина кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, причем клетка-хозяин экспрессирует все другие компоненты для образования геномного сегмента вируса Пичинде; и очистку геномного сегмента вируса Пичинде от супернатанта клетки-хозяина. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Здесь представлены линии клеток, культуры и способы культивирования клеток, инфицированных нуклеиновыми кислотами, векторами и композициями, представленными здесь. Более подробное описание нуклеиновых кислот, векторных систем и линий клеток, описанных здесь, представлено в разделе 4.5.

В некоторых вариантах осуществления описанная здесь частица вируса Пичинде дает в результате инфекционную и компетентную по репликации частицу вируса Пичинде. В конкретных вариантах осуществления описанная здесь частица вируса Пичинде является аттенуированной. В конкретном варианте осуществления частица вируса Пичинде является аттенуированной так, что вирус остается, по меньшей мере частично, способным распространяться и может реплицироваться *in vivo*, но может только порождать низкие концентрации вируса в крови, что приводит к субклиническим уровням инфекции, которые являются непатогенными. Такие аттенуированные вирусы могут использоваться в качестве иммуногенной композиции. Здесь представлены иммуногенные композиции, которые содержат вирус Пичинде с ORF в неприродном положении, как описано в разделе 4.7.

4.1.1. Дефектная по репликации частица вируса Пичинде с открытой рамкой считывания в неприродном положении.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлена частица вируса Пичинде, в которой (i) ORF находится в положении, отличном от положения ORF дикого типа; и (ii) ORF, кодирующая GP, NP, белок Z и L-белок, была удалена или функционально инактивирована, так что результирующей вирус не может в дальнейшем давать потомство в виде инфекционных вирусных частиц. Частица вируса Пичинде, содержащая генетически модифицированный геном, в котором одна или более ORF была удалена или функционально инактивирована, может быть образована в комплементирующих клетках (т.е. клетках, которые экспрессируют ORF вируса Пичинде, которая была удалена или функционально инактивирована). Генетический материал результирующей частицы вируса Пичинде может переноситься при заражении клетки-хозяина в клетку-хозяина, в которой генетический материал может быть экспрессирован и амплифицирован. Кроме того, геном генетически модифицированной частицы вируса Пичинде, описанной здесь, может кодировать гетерологичную ORF из организма, отличного от частицы вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна ORF, по меньшей мере две ORF, по меньшей мере три ORF или по меньшей мере четыре ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, могут быть удалены и заменены гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В конкретных вариантах осуществления только одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от частицы вируса Пичинде. В более

конкретных вариантах осуществления удалена ORF, которая кодирует GP, геномного сегмента вируса Пичинде. В другом конкретном варианте осуществления удалена ORF, которая кодирует NP, геномного сегмента вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления удалена ORF, которая кодирует белок Z, геномного сегмента вируса Пичинде. В еще одном конкретном варианте осуществления удалена ORF, кодирующая L-белок.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представленная здесь частица вируса Пичинде содержит геномный сегмент, который (i) сконструирован, чтобы служить носителем ORF в неприродном положении; (ii) ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, удалена; (iii) удаленная ORF заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления длина гетерологичной ORF составляет от 8 до 100 нуклеотидов, от 15 до 100 нуклеотидов, от 25 до 100 нуклеотидов, от 50 до 200 нуклеотидов, от 50 до 400 нуклеотидов, от 200 до 500 нуклеотидов или от 400 до 600 нуклеотидов, от 500 до 800 нуклеотидов. В других вариантах осуществления длина гетерологичной ORF составляет от 750 до 900 нуклеотидов, от 800 до 1000 нуклеотидов, от 850 до 1000 нуклеотидов, от 900 до 1200 нуклеотидов, от 1000 до 1200 нуклеотидов, от 1000 до 1500 нуклеотидов или от 10 до 1500 нуклеотидов, от 1500 до 2000 нуклеотидов, от 1700 до 2000 нуклеотидов, от 2000 до 2300 нуклеотидов, от 2200 до 2500 нуклеотидов, от 2500 до 3000 нуклеотидов, от 3000 до 3200 нуклеотидов, от 3000 до 3500 нуклеотидов, от 3200 до 3600 нуклеотидов, от 3300 до 3800 нуклеотидов, от 4000 до 4400 нуклеотидов, от 4200 до 4700 нуклеотидов, от 4800 до 5000 нуклеотидов, от 5000 до 5200 нуклеотидов, от 5200 до 5500 нуклеотидов, от 5500 до 5800 нуклеотидов, от 5800 до 6000 нуклеотидов, от 6000 до 6400 нуклеотидов, от 6200 до 6800 нуклеотидов, от 6600 до 7000 нуклеотидов, от 7000 до 7200 нуклеотидов, от 7200 до 7500 нуклеотидов или 7500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует пептид или полипептид длиной от 5 до 10 аминокислот, от 10 до 25 аминокислот, от 25 до 50 аминокислот, от 50 до 100 аминокислот, от 100 до 150 аминокислот, от 150 до 200 аминокислот, от 200 до 250 аминокислот, от 250 до 300 аминокислот, от 300 до 400 аминокислот, от 400 до 500 аминокислот, от 500 до 750 аминокислот, от 750 до 1000 аминокислот, от 1000 до 1250 аминокислот, от 1250 до 1500 аминокислот, от 1500 до 1750 аминокислот, от 1750 до 2000 аминокислот, от 2000 до 2500 аминокислот или более 2500 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует полипептид, длина которого не превышает 2500 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления гетерологичная ORF не содержит стоп-кодона. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF оптимизирована в отношении частоты использования кодонов. В некоторых вариантах осуществления может быть оптимизирован нуклеотидный состав, состав нуклеотидных пар или и то и другое. Способы таких оптимизаций известны в данной области техники и могут быть применены для оптимизации гетерологичной ORF.

Любая гетерологичная ORF из организма, отличного от вируса Пичинде, может быть включена в геномный сегмент вируса Пичинде. В одном варианте осуществления гетерологичная ORF кодирует репортерный белок. Более подробное описание репортерных белков приведено в разделе 4.3. В другом варианте осуществления гетерологичная ORF кодирует антиген инфекционного патогена или антиген, связанный с любым заболеванием, который способен вызвать иммунный ответ. В конкретных вариантах осуществления антиген происходит из инфекционного организма, опухоли (т.е. рака) или аллергена. Более подробное описание гетерологичных ORF приведено в разделе 4.3.

В некоторых вариантах осуществления рост и инфективность частицы вируса Пичинде не зависят от гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

Методы, известные специалисту в данной области техники, могут использоваться для образования частицы вируса Пичинде, содержащей геномный сегмент вируса Пичинде, сконструированный, чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа. Например, методы обратной генетики могут использоваться для образования такой частицы вируса Пичинде. В других вариантах осуществления дефектная по репликации частица вируса Пичинде (т.е., геномный сегмент вируса Пичинде, сконструированный, чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа, из которого была удалена ORF, кодирующая GP, NP, белок Z, L-белок) может быть образована в комплементирующей клетке.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к описанной здесь частице вируса Пичинде, подходящей для применения в качестве вакцины, и к способам применения такой частицы вируса Пичинде при вакцинации и лечении или профилактике, например, инфекций или рака. Более подробное описание способов применения частицы вируса Пичинде, описанной здесь, представлено в разделе 4.6.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлен набор, включающий, в одном или более контейнерах, одну или более кДНК, описанных здесь. В конкретном варианте осуществления набор включает, в одном или двух или более контейнерах, геномный сегмент вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде, описанный(ую) здесь. Набор может, кроме того, включать одно или более из следующего: клетку-хозяина, подходящую для спасения геномного сегмента вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде, реагенты, подходящие для трансфекции кДНК плазмиды в клетку-хозяина, хелпер-вирус, плазмиды, кодирующие вирусные белки, и/или один или более праймеров, специфических для геномного сег-

мента вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде или кДНК для него.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к описанной здесь частице вируса Пичинде, подходящей для применения в качестве фармацевтической композиции, и к способам применения такой частицы вируса Пичинде при вакцинации и лечении или профилактике, например, инфекций и рака. Более подробное описание способов применения частицы вируса Пичинде, описанной здесь, приведено в разделе 4.7.

#### 4.2. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

Здесь представлены частицы вирусов Пичинде с трехсегментным геномом с реаранжировками их ORF. В одном аспекте здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента или два L-сегмента и один S-сегмент. В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом не рекомбинируется в компетентную по репликации частицу вируса Пичинде с двухсегментным геномом. Конкретнее, в некоторых вариантах осуществления два из геномных сегментов (например, два S-сегмента или два L-сегмента соответственно) не могут рекомбинироваться таким образом, чтобы привести к одному вирусному сегменту, который мог бы заменить два родительских сегмента. В конкретных вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом содержит ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В еще одном конкретном варианте осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом содержит все четыре ORF вируса Пичинде. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является компетентной по репликации и инфекционной. В других вариантах осуществления в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом отсутствует одна из четырех ORF вируса Пичинде. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является инфекционной, но неспособной давать дальнейшее инфекционное потомство в некомплементирующих клетках.

В некоторых вариантах осуществления ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описываемой здесь, может находиться под контролем 3'-UTR вируса Пичинде или 5'-UTR вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления 3'-UTR вируса Пичинде с трехсегментным геномом представляет собой 3'-UTR S-сегмент(ов) вируса Пичинде. В другом конкретном варианте осуществления 3'-UTR вируса Пичинде с трехсегментным геномом представляет собой 3'-UTR L-сегмент(ов) вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В более конкретных вариантах осуществления 5'-UTR вируса Пичинде с трехсегментным геномом представляет собой 5'-UTR S-сегмент(ов) вируса Пичинде. В других конкретных вариантах осуществления 5'-UTR представляет собой 5'-UTR L сегмента(ов).

В других вариантах осуществления ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описываемой здесь, может находиться под контролем консервативного элемента в виде концевой последовательности аренавируса (5'- и 3'-концевых 19-21-нуклеотидных районов) (смотрите, например, Perez & de la Torre, 2003, *J Virol.* 77 (2): 1184-1194).

В некоторых вариантах осуществления ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описываемой здесь, может находиться под контролем промоторного элемента 5'-UTR (смотрите, например, Albarino et al., 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). В другом варианте осуществления ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом может находиться под контролем промоторного элемента 3'-UTR (смотрите, например, Albarino et al., 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). В более конкретных вариантах осуществления промоторный элемент 5'-UTR представляет собой промоторный элемент 5'-UTR S-сегмента(ов) или L-сегмента(ов). В другом конкретном варианте осуществления промоторный элемент 3'-UTR представляет собой промоторный элемент 3'-UTR S-сегмента(ов) или L-сегмента(ов).

В некоторых вариантах осуществления ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом может находиться под контролем усеченной 3'-UTR вируса Пичинде или усеченной 5'-UTR вируса Пичинде (смотрите, например, Perez & de la Torre, 2003, *J Virol.* 77 (2): 1184-1194; Albarino et al., 2011, *J Virol.*, 85 (8): 4020-4). В более конкретных вариантах осуществления усеченная 3'-UTR представляет собой 3'-UTR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления усеченная 5'-UTR представляет собой 5'-UTR S-сегмента(ов) или L-сегмента(ов) вируса Пичинде.

Также здесь представлена кДНК частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В более конкретных вариантах осуществления здесь представлена последовательность ДНК или совокупность последовательностей ДНК, кодирующих частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, определенная в табл. 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая геномный сегмент вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанный здесь, может быть идентична по последовательности по меньшей мере в некоторой степени последовательности нуклеиновой кислоты, раскрытой здесь. Соответственно, в некоторых аспектах нуклеиновая кислота, кодирующая геномный сегмент вируса Пичинде с трехсегментным геномом, идентична по последовательности по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по



меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, или полностью идентична последовательности нуклеиновой кислоты, раскрытой здесь под SEQ ID NO, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой здесь под SEQ ID NO. Условия гибридизации могут включать очень жесткие, умеренно жесткие или условия гибридизации низкой жесткости, которые хорошо известны специалисту в данной области техники, такие как те, которые здесь описаны. Аналогично, нуклеиновая кислота, которая может использоваться для получения геномного сегмента вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанного здесь, может быть по меньшей мере в некоторой степени идентична по последовательности нуклеиновой кислоты, раскрытой здесь под SEQ ID NO, или нуклеиновой кислоте, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой здесь под SEQ ID NO. Например, нуклеиновая кислота, которая используется для получения геномного сегмента вируса Пичинде с трехсегментным геномом, может быть идентична по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% или быть полностью идентична описанной здесь последовательности нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие геном вируса Пичинде с трехсегментным геномом, является частью одного или более векторов для экспрессии ДНК или включены в них. В конкретном варианте осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие геном частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, являются частью одного или более векторов для экспрессии ДНК, которые облегчают образование частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанной здесь, или включены в них. В другом варианте осуществления описанная здесь кДНК может быть включена в плазмиду. Более подробное описание кДНК или экспрессионных систем представлено в разделе 4.5.1. Методами получения кДНК являются распространенные и общепринятые методы молекулярной биологии и манипуляции и получения ДНК. Может использоваться любой метод клонирования, известный квалифицированному специалисту. Такие методы хорошо известны квалифицированному специалисту и доступны ему в лабораторных руководствах, таких как Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001).

В некоторых вариантах осуществления кДНК для трехсегментного генома вируса Пичинде введена (например, трансфицируется) в клетку-хозяина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления здесь представлена клетка-хозяин, содержащая кДНК для трехсегментного генома частицы вируса Пичинде (т.е. кДНК для геномных сегментов частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом). В других вариантах осуществления описанная здесь кДНК является частью вектора для экспрессии ДНК или может быть включена в него и введена в клетку-хозяина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления здесь представлена клетка-хозяин, содержащая описанную здесь кДНК, которая включена в вектор. В других вариантах осуществления геномные сегменты вируса Пичинде с трехсегментным геномом (т.е. L-сегмент и/или S-сегмент или сегменты), описанные здесь, введены в клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления здесь описан способ образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, причем способ включает транскрибирование кДНК для частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах осуществления белок в виде вирусной полимеразы может присутствовать во время транскрипции частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления транскрипция геномного сегмента вируса Пичинде осуществляется с использованием двунаправленного промотора.

В других вариантах осуществления транскрипция геномного сегмента вируса Пичинде осуществляется с использованием кассеты для двунаправленной экспрессии (смотрите, например, Ortiz-Riaño et al., 2013 *J Gen Virol.*, 94(Pt6): 1175-1188). В более конкретных вариантах осуществления кассета для двунаправленной экспрессии содержит как промотор для полимеразы I, так и промотор для полимеразы II, с осуществлением считывания с противоположных сторон в два конца вставленного геномного сегмента вируса Пичинде, соответственно.

В других вариантах осуществления транскрипция кДНК геномного сегмента вируса Пичинде, описанного здесь, включает промотор. Конкретные примеры промоторов включают промотор для РНК-полимеразы I, промотор для РНК-полимеразы II, промотор для РНК-полимеразы III, промотор T7, промотор SP6 или промотор T3.

В некоторых вариантах осуществления способ образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом может дополнительно включать введение в клетку-хозяина кДНК для частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах осуществления способ образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом может дополнительно включать введение в клетку-хозяина кДНК для частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, причем клетка-хозяин экспрессирует все другие компоненты для образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом; и очистку частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом от супернатанта клетки-хозяина. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Здесь представлены линии клеток, культуры и способы культивирования клеток, инфицированных нуклеиновыми кислотами, векторами и композициями, представленными здесь. Более подробное описание нуклеиновых кислот, векторных систем и линий клеток, описанных здесь, представлено в разделе 4.5.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанная здесь, приводит к образованию инфекционной и компетентной по репликации частицы вируса Пичинде. В конкретных вариантах осуществления описанная здесь частица вируса Пичинде является аттенуированной. В конкретном варианте осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является аттенуированной так, что вирус остается, по меньшей мере частично, компетентным по репликации и может реплицироваться *in vivo*, но может только порождать низкие концентрации вируса в крови, что приводит к субклиническим уровням инфекции, которые являются непатогенными. Такие аттенуированные вирусы могут использоваться в качестве иммуногенной композиции.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом имеет тот же тропизм, что и частица вируса Пичинде с двухсегментным геномом.

Также здесь представлен набор, включающий, в одном или более контейнерах, одну или более кДНК, описанных здесь. В конкретном варианте осуществления набор включает, в одном или двух или более контейнерах, частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанную здесь. Набор может, кроме того, включать одно или более из следующего: клетку-хозяина, подходящую для спасения частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, реагенты, подходящие для трансфекции кДНК плазмиды в клетку-хозяина, хелпер-вирус, плазмиды, кодирующие вирусные белки, и/или один или более олигонуклеотидных праймеров, специфических для модифицированного геномного сегмента вируса Пичинде, или частицы вируса Пичинде или кодирующих ее нуклеиновых кислот.

Здесь представлены иммуногенные композиции, которые содержат частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, как описано в разделе 4.6 и 4.7.

4.2.1. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента.

В одном аспекте здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента. В некоторых вариантах осуществления размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей один L-сегмент и два S-сегмента, не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом. В конкретных вариантах осуществления размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей один L-сегмент и два S-сегмента, не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом после по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 90 дней или по меньшей мере 100 дней персистирующей инфекции у мышей, у которых отсутствует интерфероновый рецептор типа I, интерфероновый рецептор типа II и активирующий рекомбинацию ген 1 (RAG1), и которые были инфицированы  $10^4$  БОЕ частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом (смотрите раздел 4.8.13). В других вариантах осуществления размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей один L-сегмент и два S-сегмента, не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом после по меньшей мере 10 пассажей, по меньшей мере 20 пассажей, по меньшей мере 30 пассажей, по меньшей мере 40 пассажей или по меньшей мере 50 пассажей.

В некоторых вариантах осуществления межсегментная рекомбинация двух S-сегментов частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, представленной здесь, которая объединяет две ORF арена-вируса в одном, а не в двух отдельных сегментах, приводит к образованию нефункционального промотора (т.е. геномного сегмента со структурой: 5'UTR-----5'UTR или 3'UTR-----3'UTR), в которой каждая UTR, образующая один конец генома, представляет собой последовательность инвертированного повтора другого конца того же генома.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, была сконструирована, чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В других вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, была сконструирована, чтобы служить носителем двух ORF вируса Пичинде или трех ORF вируса Пичинде, или четырех ORF вируса Пичинде, или пяти ORF вируса Пичинде, или шести ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа. В конкретных вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, содержит полный комплект из четырех ORF вируса Пичинде. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является инфекционной и компетентной по репликации частицей вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В конкретных вариантах осуществления два S-сегмента частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом были сконструированы, чтобы служить носителем одной из их ORF в положении, отличном от положения дикого типа. В более конкретных вариантах осуществления два S-сегмента содержат полный комплект ORF S-сегмента. В некоторых кон-

кретных вариантах осуществления L-сегмент был сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения дикого типа, или L-сегмент может быть геномным сегментом дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления одним из двух S-сегментов может быть:

(i) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;

(ii) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;

(iii) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;

(iv) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;

(v) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде; и

(vi) S-сегмент вируса Пичинде, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, может содержать дублет ORF (т.е. две ORF S-сегмента дикого типа, например GP или NP). В конкретных вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, может содержать один дублет ORF (например, (GP, GP)) или два дублета ORF (например, (GP, GP) и (NP, NP)).

Табл. 2А, приведенная ниже, является иллюстрацией организации генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей один L-сегмент и два S-сегмента, причем межсегментная рекомбинация двух S-сегментов в трехсегментном геноме вируса Пичинде не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом и отменяет аренавирусную промоторную активность (т.е. результирующий рекомбинированный S-сегмент состоит из двух 3'-UTR вместо 3'-UTR и 5'-UTR).

Таблица 2А

Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента

L	*ORF	Z	NP	*ORF	GP
L	NP	*ORF	Z	*ORF	GP
L	NP	Z	*ORF	GP	*ORF
L	*ORF	Z	*ORF	GP	NP
L	NP	Z	GP	*ORF	*ORF
L	NP	*ORF	Z	*ORF	GP
L	*ORF	Z	NP	*ORF	GP
L	Z	*ORF	GP	*ORF	NP
L	Z	*ORF	NP	*ORF	GP
Z	GP	*ORF	NP	*ORF	L
Z	GP	*ORF	*ORF	L	NP
Z	GP	*ORF	L	*ORF	NP
Z	*ORF	L	GP	*ORF	NP
Z	GP	*ORF	NP	*ORF	L
Z	GP	*ORF	L	*ORF	NP
Z	GP	L	NP	*ORF	*ORF
Z	GP	L	NP	*ORF	*ORF
Z	*ORF	L	NP	*ORF	GP
Z	NP	*ORF	*ORF	L	GP
Z	NP	*ORF	GP	*ORF	L
Z	NP	*ORF	*ORF	L	GP
Z	NP	*ORF	L	*ORF	GP
Z	NP	L	GP	*ORF	*ORF
Z	*ORF	L	GP	*ORF	NP
Z	NP	*ORF	GP	*ORF	L
Z	NP	*ORF	L	*ORF	GP
Z	*ORF	L	NP	*ORF	GP
Z	L	*ORF	GP	*ORF	NP

Положение 1 находится под контролем 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 2 находится под контролем 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 3 находится под контролем 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 4 находится под контролем 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде. положение 5 находится под контролем 5'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 6 находится под контролем 3'-UTR L-сегмента вируса Пичинде.

\*ORF означает, что была вставлена гетерологичная ORF.

В некоторых вариантах осуществления IGR между положением 1 и положением 2 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде; IGR между положением 2 и 3 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде; и IGR между положением 5 и 6 может представлять собой IGR L-сегмента вируса Пичинде. В конкретном варианте осуществления IGR между положением 1 и положением 2 может представлять собой IGR S-сегмента вируса Пичинде; IGR между положением 2 и 3 может представлять собой IGR S-сегмента вируса Пичинде; и IGR между положением 5 и 6 может представлять собой IGR L-сегмента вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления возможны и другие комбинации. Например, частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, в случае которой межсегментная рекомбинация двух S-сегментов в трехсегментном геноме вируса Пичинде не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом и отменяет аренавирусную промоторную активность (т.е. результирующий рекомбинированный S-сегмент состоит из двух 5'-UTR вместо 3'-UTR и 5'-UTR).

В некоторых вариантах осуществления межсегментная рекомбинация S-сегмента и L-сегмента в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей один L-сегмент и два S-сегмента, восстанавливает функциональный сегмент с двумя вирусными генами только в одном сегменте вместо двух отдельных сегментов. В других вариантах осуществления межсегментная рекомбинация S-сегмента и L-сегмента в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей один L-сегмент и два S-

сегмента, не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом.

Табл. 2В, приведенная ниже, является иллюстрацией организации генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей один L-сегмент и два S-сегмента, в которой межсегментная рекомбинация S-сегмента и L-сегмента в трехсегментном геноме вируса Пичинде не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом и отменяет аренавирусную промоторную активность (т.е. результирующий рекомбинированный S-сегмент состоит из двух 3'-UTR вместо 3'-UTR и 5'-UTR).

Таблица 2В

Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента

Положение 1	Положение 2	Положение 3	Положение 4	Положение 5	Положение 6
L	GP	*ORF	NP	Z	*ORF
L	GP	Z	*ORF*	*ORF	NP
L	GP	*ORF	NP	Z	*ORF
L	GP	Z	*ORF	*ORF	NP
L	NP	*ORF	GP	Z	*ORF
L	NP	Z	*ORF	*ORF	GP
L	NP	*ORF	GP	L	*ORF
L	NP	Z	*ORF	*ORF	GP
Z	GP	*ORF	NP	L	*ORF
Z	GP	L	*ORF	*ORF	NP
Z	GP	*ORF	NP	L	*ORF
Z	NP	L	*ORF	*ORF	GP
Z	NP	*ORF	GP	L	*ORF
Z	NP	L	*ORF	*ORF	GP

Положение 1 находится под контролем 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 2 находится под контролем 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 3 находится под контролем 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 4 находится под контролем 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 5 находится под контролем 5'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 6 находится под контролем 3'-UTR L-сегмента вируса Пичинде.

\*ORF означает, что была вставлена гетерологичная ORF.

В некоторых вариантах осуществления IGR между положением 1 и положением 2 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде; IGR между положением 2 и 3 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде; и IGR между положением 5 и 6 может представлять собой IGR L-сегмента вируса Пичинде. В конкретном варианте осуществления IGR между положением 1 и положением 2 может представлять собой IGR S-сегмента вируса Пичинде; IGR между положением 2 и 3 может представлять собой IGR S-сегмента вируса Пичинде; и IGR между положением 5 и 6 может представлять собой IGR L-сегмента вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления возможны и другие комбинации. Например, частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, в случае которой межсегментная рекомбинация двух S-сегментов в трехсегментном геноме вируса Пичинде не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом и отменяет аренавирусную промоторную активность (т.е. результирующий рекомбинированный S-сегмент состоит из двух 5'-UTR вместо 3'-UTR и 5'-UTR).

В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области техники мог бы сконструировать геном вируса Пичинде с организацией, проиллюстрированной в табл. 2А или 2В и описанной здесь, а затем использовать анализ, описанный в разделе 4.8, для определения того, является ли частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом генетически стабильной, т.е. не приводит ли к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом, как здесь обсуждалось.

4.2.2. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент.

В одном аспекте здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент. В некоторых вариантах осуществления размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей два L-сегмента и один S-сегмент, не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом. В конкретных вариантах осуществления размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержа-

шей два L-сегмента и один S-сегмент, не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом после по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 90 дней или по меньшей мере 100 дней персистирующей инфекции у мышей, у которых отсутствует интерфероновый рецептор типа I, интерфероновый рецептор типа II и активирующий рекомбинацию ген 1 (RAG1), и которые были инфицированы  $10^4$  БОЕ частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом (смотрите раздел 4.8.13). В других вариантах осуществления размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей два L-сегмента и один S-сегмент, не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом после по меньшей мере 10 пассажей, 20 пассажей, 30 пассажей, 40 пассажей или 50 пассажей.

В некоторых вариантах осуществления межсегментная рекомбинация двух L-сегментов частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, представленной здесь, которая объединяет две ORF вируса Пичинде в одном, а не в двух отдельных сегментах, приводит к образованию нефункционального промотора (т.е. геномного сегмента со структурой: 5'-UTR-----5'UTR или 3'UTR-----3'UTR), в которой каждая UTR, образующая один конец генома, представляет собой последовательность инвертированного повтора другого конца того же генома.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент, была сконструирована, чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В других вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент, была сконструирована, чтобы служить носителем двух ORF вируса Пичинде или трех ORF вируса Пичинде, или четырех ORF вируса Пичинде, или пяти ORF вируса Пичинде, или шести ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа. В конкретных вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент, содержит полный комплект из всех четырех ORF вируса Пичинде. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является инфекционной и компетентной по репликации частицей вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В конкретных вариантах осуществления два L-сегмента частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом были сконструированы, чтобы служить носителем одной из их ORF в положении, отличном от положения дикого типа. В более конкретных вариантах осуществления два L-сегмента содержат полный комплект ORF L-сегмента. В некоторых конкретных вариантах осуществления S-сегмент был сконструирован, чтобы служить носителем одной из их ORF в положении, отличном от положения дикого типа, или S-сегмент может быть геномным сегментом дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления одним из двух L-сегментов может быть:

- (i) L-сегмент, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (ii) L-сегмент, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (iii) L-сегмент, в котором ORF, кодирующая L-белок, находится под контролем 5'-UTR вируса Пичинде;
  - (iv) L-сегмент, в котором ORF, кодирующая GP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
  - (v) L-сегмент, в котором ORF, кодирующая NP, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде;
- и
- (vi) L-сегмент, в котором ORF, кодирующая белок Z, находится под контролем 3'-UTR вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмента, может содержать дублет ORF (т.е. две ORF L-сегмента дикого типа, например белок Z или L-белок). В конкретных вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент, может содержать один дублет ORF (например, (белок Z, белок Z)) или два дублета ORF (например, (белок Z, белок Z) и (L-белок, L-белок)).

Табл. 3А, приведенная ниже, является иллюстрацией организации генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей два L-сегмента и один S-сегмент, причем межсегментная рекомбинация двух L-сегментов в трехсегментном геноме вируса Пичинде не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом и отменяет аренавирусную промоторную активность (т.е. предположительно результирующий рекомбинированный L-сегмент будет состоять из двух 3'-UTR или двух 5'-UTR вместо 3'-UTR и 5'-UTR). На основе табл. 3 можно было бы представить аналогичные комбинации для образования частицы вируса Пичинде, состоящей из двух 5'-UTR, а не 3'-UTR и 5'-UTR.

Таблица 3А

Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент

Положение 1	Положение 2	Положение 3	Положение 4	Положение 5	Положение 6
ORF*	Z	ORF*	L	NP	GP
ORF*	Z	ORF*	L	GP	NP
ORF*	Z	GP	L	ORF*	NP
ORF*	Z	ORF*	GP	NP	L
ORF*	Z	GP	ORF*	NP	L
ORF*	Z	NP	ORF*	GP	L
ORF*	ORF*	NP	Z	GP	L
ORF*	Z	GP	NP	ORF*	L
ORF*	Z	NP	GP	ORF*	L
ORF*	L	ORF*	Z	NP	GP
ORF*	L	ORF*	Z	GP	NP
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	GP	Z	ORF*	NP
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	NP	Z	ORF*	GP
ORF*	L	GP	NP	ORF*	Z
ORF*	L	NP	GP	ORF*	Z
ORF*	GP	ORF*	L	NP	Z
ORF*	GP	NP	L	ORF*	Z
ORF*	GP	ORF*	Z	NP	L
ORF*	GP	NP	Z	ORF*	L
ORF*	NP	ORF*	L	GP	Z
ORF*	NP	GP	L	ORF*	Z
ORF*	NP	GP	Z	ORF*	L
ORF*	NP	ORF*	Z	GP	L

ORF*	L	ORF*	Z	NP	GP
ORF*	L	ORF*	Z	GP	NP
ORF*	L	ORF*	NP	GP	Z
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	NP	Z	ORF*	GP
ORF*	Z	ORF*	GP	NP	L
ORF*	Z	GP	L	ORF*	NP
ORF*	Z	NP	GP	ORF*	L
ORF*	Z	GP	NP	ORF*	L
ORF*	GP	ORF*	L	NP	Z
ORF*	GP	ORF*	L	Z	NP
ORF*	GP	ORF*	Z	GP	L
ORF*	GP	NP	L	ORF*	Z
GP	L	ORF*	Z	ORF*	NP
GP	L	ORF*	NP	ORF*	Z
GP	Z	ORF*	L	ORF*	NP
GP	Z	ORF*	L	ORF*	NP
GP	Z	ORF*	NP	ORF*	L
GP	NP	ORF*	Z	ORF*	L
NP	L	ORF*	Z	ORF*	GP
NP	L	ORF*	GP	ORF*	Z
NP	L	ORF*	Z	ORF*	GP

Положение 1 находится под контролем 5'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 2 находится под контролем 3'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 3 находится под контролем 5'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 4 находится под контролем 3'-UTR L-сегмента вируса Пичинде. положение 5 находится под контролем 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 6 находится под контролем 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде.

\*ORF означает, что была вставлена гетерологичная ORF.

В некоторых вариантах осуществления IGR между положением 1 и положением 2 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде; IGR между положением 2 и 3 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде; и IGR между положением 5 и 6 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде. В конкретном варианте осуществления IGR между положением 1 и положением 2 может представлять собой IGR L-сегмента вируса Пичинде; IGR между положением 2 и 3 может представлять собой IGR L-сегмента вируса Пичинде; и IGR между положением 5 и 6 может представлять собой IGR S-сегмента вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления также возможны и другие комбинации.

В некоторых вариантах осуществления межсегментная рекомбинация L-сегмента и S-сегмента из частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей два L-сегмента и один S-сегмента, восстанавливает функциональный сегмент с двумя вирусными генами только в одном сегменте вместо двух отдельных сегментов. В других вариантах осуществления межсегментная рекомбинация L-сегмента и S-сегмента в частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей два L-сегмента и один S-сегмент, не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом.

Табл. 3В, приведенная ниже, является иллюстрацией организации генома частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей два L-сегмента и один S-сегмент, в случае которой межсегментная рекомбинация L-сегмента и S-сегмента в трехсегментном геноме вируса Пичинде не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом и отменяет аренавирусную промоторную активность (т.е. результирующий рекомбинированный S-сегмент состоит из двух 3'-UTR вместо 3'-UTR и 5'-UTR).



Таблица 3В

Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент

Положение 1	Положение 2	Положение 3	Положение 4	Положение 5	Положение 6
NP	Z	*ORF	GP	L	*ORF
NP	Z	GP	*ORF*	*ORF	L
NP	Z	*ORF	GP	L	*ORF
NP	Z	GP	*ORF	*ORF	L
NP	L	*ORF	GP	Z	*ORF
NP	L	GP	*ORF	*ORF	Z
NP	L	*ORF	GP	Z	*ORF
NP	L	GP	*ORF	*ORF	Z
GP	Z	*ORF	NP	L	*ORF
GP	Z	NP	*ORF	*ORF	L
GP	Z	*ORF	NP	L	*ORF
GP	L	NP	*ORF	*ORF	Z
GP	L	*ORF	NP	Z	*ORF
GP	L	NP	*ORF	*ORF	Z

Положение 1 находится под контролем 5'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 2 находится под контролем 3'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 3 находится под контролем 5'-UTR L-сегмента вируса Пичинде; положение 4 находится под контролем 3'-UTR L-сегмента вируса Пичинде. положение 5 находится под контролем 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде; положение 6 находится под контролем 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде.

\*ORF означает, что была вставлена гетерологичная ORF.

В некоторых вариантах осуществления IGR между положением 1 и положением 2 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде; IGR между положением 2 и 3 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде; и IGR между положением 5 и 6 может представлять собой IGR S-сегмента или L-сегмента вируса Пичинде. В конкретном варианте осуществления IGR между положением 1 и положением 2 может представлять собой IGR L-сегмента вируса Пичинде; IGR между положением 2 и 3 может представлять собой IGR L-сегмента вируса Пичинде; и IGR между положением 5 и 6 может представлять собой IGR S-сегмента вируса Пичинде. В некоторых вариантах осуществления также возможны и другие комбинации.

В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области техники мог бы сконструировать геном вируса Пичинде с организацией, проиллюстрированной в табл. 3А или 3В и описанной здесь, а затем использовать анализ, описанный в разделе 4.8, для определения того, является ли частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом генетически стабильной, т.е. не приводит ли к компетентной по репликации вирусной частице с двухсегментным геномом, как здесь обсуждалось.

4.2.3. Частица дефектного по репликации вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, в которой (i) ORF находится в положении, отличном от положения ORF дикого типа; и (ii) ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, была удалена или функционально инактивирована, так что результирующий вирус не может давать в дальнейшем потомство в виде инфекционных вирусных частиц (т.е. является дефектным по репликации). В некоторых вариантах осуществления третьим сегментом вируса Пичинде может быть S-сегмент. В других вариантах осуществления третьим сегментом вируса Пичинде может быть L-сегмент. В более конкретных вариантах осуществления третий сегмент вируса Пичинде может быть сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, или третьим сегментом вируса Пичинде может быть геномный сегмент вируса Пичинде дикого типа. В еще более конкретных вариантах осуществления в третьем сегменте вируса Пичинде отсутствует ORF вируса Пичинде, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок.

В некоторых вариантах осуществления сегмент трехсегментного генома может быть гибридом S- или L-сегмента (т.е. геномным сегментом, который может представлять собой комбинацию S-сегмента и L-сегмента). В других вариантах осуществления гибридный сегмент представляет собой S-сегмент, содержащий IGR L-сегмента. В другом варианте осуществления гибридный сегмент представляет собой L-сегмент, содержащий IGR S-сегмента. В других вариантах осуществления гибридный сегмент представляет собой UTR S-сегмента с IGR L-сегмента. В другом варианте осуществления гибридный сегмент представляет собой UTR L-сегмента с IGR S-сегмента. В конкретных вариантах осуществления гибридный сегмент представляет собой 5'-UTR S-сегмента с IGR L-сегмента или 3'-UTR S-сегмента с IGR L-

сегмента. В других конкретных вариантах осуществления гибридный сегмент представляет собой 5'-UTR L-сегмента с IGR S-сегмента или 3'-UTR L-сегмента с IGR S-сегмента.

Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая генетически модифицированный геном, в котором одна или более ORF была удалена или функционально инактивирована, может быть образована в комплементирующих клетках (т.е. клетках, которые экспрессируют ORF вируса Пичинде, которая была удалена или функционально инактивирована). Генетический материал результирующей частицы вируса Пичинде может переноситься при инфицировании клетки-хозяина в клетку-хозяина, в которой генетический материал может быть экспрессирован и амплифицирован. Кроме того, геном генетически модифицированной частицы вируса Пичинде, описываемой здесь, может кодировать гетерологичную ORF из организма, отличного от частицы вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна ORF, по меньшей мере две ORF, по меньшей мере три ORF или по меньшей мере четыре ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, могут быть удалены и заменены гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В конкретных вариантах осуществления только одна из четырех ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от частицы вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления удалена ORF, которая кодирует GP, геномного сегмента вируса Пичинде. В другом конкретном варианте осуществления удалена ORF, которая кодирует NP, геномного сегмента вируса Пичинде. В более конкретных вариантах осуществления удалена ORF, которая кодирует белок Z, геномного сегмента вируса Пичинде. В еще одном конкретном варианте осуществления удалена ORF, кодирующая L-белок.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, в которой (i) ORF находится в положении, отличном от положения ORF дикого типа; и (ii) кодирующая GP или NP ORF была удалена или функционально инактивирована, так что результирующий вирус является дефектным по репликации и не является инфекционным. В конкретном варианте осуществления одна ORF удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В другом конкретном варианте осуществления две ORF удалены и заменены гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В других конкретных вариантах осуществления три ORF удалены и заменены гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В конкретных вариантах осуществления кодирующая GP ORF удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В других конкретных вариантах осуществления ORF, кодирующая NP, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В еще более конкретных вариантах осуществления ORF, кодирующая NP, и ORF, кодирующая GP, удалены и заменены одной или двумя гетерологичными ORF из организма, отличного от частицы вируса Пичинде. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом содержит (i) один L-сегмент и два S-сегмента; (ii) ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа; (iii) одну или более гетерологичных ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлена частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая два L-сегмента и один S-сегмент, в которой (i) ORF находится в положении, отличном от положения ORF дикого типа; и (ii) ORF, кодирующая белок Z, и/или L-белок, была удалена или функционально инактивирована, так что результирующий вирус является дефектным по репликации и неинфекционным. В конкретном варианте осуществления одна ORF удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В другом конкретном варианте осуществления две ORF удалены и заменены гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В конкретных вариантах осуществления ORF, кодирующая белок Z, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В других конкретных вариантах осуществления ORF, кодирующая L-белок, удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде. В еще более конкретных вариантах осуществления ORF, кодирующая белок Z, и ORF, кодирующая L-белок, удалены и заменены гетерологичной ORF из организма, отличного от частицы вируса Пичинде. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом включает (i) два L-сегмента и один S-сегмент; (ii) ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа; (iii) гетерологичную ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, представленная здесь, включает частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом (т.е. одним L-сегментом и двумя S-сегментами или двумя L-сегментами и одним S-сегментом), которая i) сконструирована, чтобы служить носителем ORF в неприродном положении; ii) в которой ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, удалена; iii) удаленная ORF заменена одной или более гетерологичных ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления длина гетерологичной ORF составляет от 8 до 100 нуклеотидов, от 15 до 100 нуклеотидов, от 25 до 100 нуклеотидов, от 50 до 200 нуклеотидов, от 50 до 400 нук-

леотидов, от 200 до 500 нуклеотидов или от 400 до 600 нуклеотидов, от 500 до 800 нуклеотидов. В других вариантах осуществления длина гетерологичной ORF составляет от 750 до 900 нуклеотидов, от 800 до 1000 нуклеотидов, от 850 до 1000 нуклеотидов, от 900 до 1200 нуклеотидов, от 1000 до 1200 нуклеотидов, от 1000 до 1500 нуклеотидов или от 10 до 1500 нуклеотидов, от 1500 до 2000 нуклеотидов, от 1700 до 2000 нуклеотидов, от 2000 до 2300 нуклеотидов, от 2200 до 2500 нуклеотидов, от 2500 до 3000 нуклеотидов, от 3000 до 3200 нуклеотидов, от 3000 до 3500 нуклеотидов, от 3200 до 3600 нуклеотидов, от 3300 до 3800 нуклеотидов, от 4000 нуклеотидов до 4400 нуклеотидов, от 4200 до 4700 нуклеотидов, от 4800 до 5000 нуклеотидов, от 5000 до 5200 нуклеотидов, от 5200 до 5500 нуклеотидов, от 5500 до 5800 нуклеотидов, от 5800 до 6000 нуклеотидов, от 6000 до 6400 нуклеотидов, от 6200 до 6800 нуклеотидов, от 6600 до 7000 нуклеотидов, от 7000 до 7200 нуклеотидов, от 7200 до 7500 нуклеотидов или 7500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует пептид или полипептид длиной от 5 до 10 аминокислот, от 10 до 25 аминокислот, от 25 до 50 аминокислот, от 50 до 100 аминокислот, от 100 до 150 аминокислот, от 150 до 200 аминокислот, от 200 до 250 аминокислот, от 250 до 300 аминокислот, от 300 до 400 аминокислот, от 400 до 500 аминокислот, от 500 до 750 аминокислот, от 750 до 1000 аминокислот, от 1000 до 1250 аминокислот, от 1250 до 1500 аминокислот, от 1500 до 1750 аминокислот, от 1750 до 2000 аминокислот, от 2000 до 2500 аминокислот или более чем 2500 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует полипептид, длина которого не превышает 2500 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления гетерологичная ORF не содержит стоп-кодона. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF оптимизирована в отношении частоты использования кодонов. В некоторых вариантах осуществления может быть оптимизирован нуклеотидный состав, состав нуклеотидных пар или и то и другое. Способы таких оптимизаций известны в данной области техники и могут быть применены для оптимизации гетерологичной ORF.

Любая гетерологичная ORF из организма, отличного от вируса Пичинде, может быть включена в частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В одном варианте осуществления гетерологичная ORF кодирует репортерный белок. Более подробное описание репортерных белков приведено в разделе 4.3. В другом варианте осуществления гетерологичная ORF кодирует антиген инфекционного патогена или антиген, связанный с любым заболеванием, причем антиген способен индуцировать иммунный ответ. В конкретных вариантах осуществления антиген происходит из инфекционного организма, опухоли (т.е. рака) или аллергена. Более подробное описание гетерологичных ORF приведено в разделе 4.3.

В некоторых вариантах осуществления рост и инфективность частицы вируса Пичинде не зависит от гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

Методы, известные специалисту в данной области техники, могут использоваться для образования частицы вируса Пичинде, содержащей геномный сегмент вируса Пичинде, сконструированный, чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа. Например, методы обратной генетики могут использоваться для образования такой частицы вируса Пичинде. В других вариантах осуществления дефектная по репликации частица вируса Пичинде (т.е., геномный сегмент вируса Пичинде, сконструированный, чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения дикого типа, из которого была удалена ORF, кодирующая GP, NP, белок Z, L-белок) может быть образована в комплементирующей клетке.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к частице вируса Пичинде, описанной здесь, подходящей для применения в качестве вакцины, и к способам применения такой частицы вируса Пичинде при вакцинации и лечении или профилактике, например, инфекций или рака. Более подробное описание способов применения частицы вируса Пичинде, описанной здесь, представлено в разделе 4.6.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к частице вируса Пичинде, описанной здесь, подходящей для применения в качестве фармацевтической композиции, и к способам применения такой частицы вируса Пичинде при вакцинации и лечении или профилактике, например, инфекций и рака. Более подробное описание способов применения частицы вируса Пичинде, описанной здесь, приведено в разделе 4.6.

4.3. Частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая гетерологичную ORF.

В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде и соответствующая частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом может содержать гетерологичную ORF. В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде и соответствующая частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом может содержать представляющий интерес ген. В более конкретных вариантах осуществления гетерологичная ORF или представляющий интерес ген кодирует антиген. В более конкретных вариантах осуществления гетерологичная ORF или представляющий интерес ген кодирует репортерный белок или флуоресцентный белок.

В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом может содержать одну или более гетерологичных ORF или один или более представляющих интерес генов. В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсег-

ментным геномом может содержать по меньшей мере одну гетерологичную ORF, по меньшей мере две гетерологичных ORF, по меньшей мере три гетерологичных ORF или более гетерологичных ORF. В других вариантах осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом содержит по меньшей мере один представляющий интерес ген, по меньшей мере два представляющих интерес гена, по меньшей мере три представляющих интерес гена или более представляющих интерес генов.

Широкий ряд антигенов может быть экспрессирован с помощью геномного сегмента вируса Пичинде, частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом настоящего изобретения. В одном варианте осуществления гетерологичная ORF кодирует антиген инфекционного патогена или антиген, связанный с любым заболеванием, который способен индуцировать иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF может кодировать антиген, происходящий из вируса, бактерии, гриба, паразита, или может экспрессироваться при опухолевом или ассоциируемом с опухолью заболевании (т.е. раке), аутоиммунном заболевании, дегенеративном заболевании, наследственном заболевании, лекарственной зависимости, ожирении или аллергическом заболевании.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует вирусный антиген. Неограничивающие примеры вирусных антигенов включают антигены вирусов семейства *Adenoviridae* (например, мастаденовируса и авиаденовируса), вирусов семейства *Herpesviridae* (например, вируса простого герпеса 1, вируса простого герпеса 2, вируса простого герпеса 5, вируса простого герпеса 6, вируса Эпштейна-Барра, HHV6-HHV8 и цитомегаловируса), вирусов семейства *Leviviridae* (например, левивируса, энтеробактериофага MS2, аллолевируса), вирусов семейства *Roxyviridae* (например, *Chordoroxvirinae*, парапоксвируса, авипоксвируса, каприпоксвируса, лепориипоксвируса, суипоксвируса, вируса рода *Molluscipoxvirus* и *Entomoroxvirinae*), вирусов семейства *Parovaviridae* (например, полиомавируса и папилломавируса), вирусов семейства *Paramyxoviridae* (например, парамиксовируса, вируса парагриппа 1, морбилливируса (например, вируса кори), рубулавируса (например, вируса эпидемического паротита), *Pneumovirinae* (например, пневмовируса, респираторно-синцитиального вируса человека), респираторно-синцитиального вируса человека и метапневмовируса (например, пневмовируса птиц и метапневмовируса человека), вирусов семейства *Picornaviridae* (например, энтеровируса, риновируса, гепатовируса (например, вируса гепатита А человека), кардиовируса и аптоввируса), вирусов семейства *Reoviridae* (например, ортороевируса, орбивируса, ротавируса, циповируса, Фиджи-вируса, фитороевируса и оризавируса), вирусов семейства *Retroviridae* (например, ретровирусов типа В млекопитающих, ретровирусов типа С млекопитающих, ретровирусов типа С птиц, группы ретровирусов типа D, ретровирусов BLV-HTLV, лентивируса (например вируса иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV) 1 и ВИЧ-2 (например, gp160 ВИЧ), спумавируса), вирусов семейства *Flaviviridae* (например, вируса гепатита С, вируса денге, вируса Западного Нила), вирусов семейства *Herpadnaviridae* (например, вируса гепатита В), вирусов семейства *Togaviridae* (например, альфавируса (например, вируса синдбиса) и рубивируса (например, вируса краснухи)), вирусов семейства *Rhabdoviridae* (например, везикуловируса, лиссавируса, эфемеровируса, циторабдовируса и нуклеорабдовируса), вирусов семейства *Agenaviridae* (например, аренавируса, вируса лимфоцитарного хориоменингита, вируса Иппай и вирус лихорадки Ласса) и вирусов семейства *Coronaviridae* (например, коронавируса и торовируа). В конкретном варианте осуществления вирусным антигеном является gp120 HIV, gp41, Nef HIV, F-гликопротеин RSV, G-гликопротеин RSV, белок TAX HTLV, гликопротеин вируса простого герпеса (например, gB, gC, gD и gE) или поверхностный антиген вируса гепатита В, белок Е вируса гепатита С или белок шипов коронавируса. В одном варианте осуществления вирусным антигеном не является антиген HIV (ВИЧ).

В других вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует бактериальный антиген (например, белок бактериальной оболочки). В других вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует антиген паразита (например, антиген простейшего). В других вариантах осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность кодирует антиген гриба.

Неограничивающие примеры бактериальных антигенов включают антигены бактерий семейства *Aquaspirillum*, семейства *Azospirillum*, семейства *Azotobacteraceae*, семейства *Bacteroidaceae*, *Bartonella* spp., семейства *Bdellovibrio*, *Campylobacter* spp., *Chlamydia* spp. (например, *Chlamydia pneumoniae*), рода *Clostridium*, семейства *Enterobacteriaceae* (например, *Citrobacter* spp., *Edwardsiella*, *Enterobacter aerogenes*, *Envinia* spp., *Escherichia coli*, *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Morganella* spp., *Proteus vulgaris*, *Providencia*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens* и *Shigella flexneri*), семейства *Gardinerella*, *Haemophilus influenzae*, семейства *Halobacteriaceae*, семейства *Helicobacter*, семейства *Legionellaceae*, *Listeria* spp., семейства *Methylococcaceae*, микобактерий (например, *Mycobacterium tuberculosis*), семейства *Neisseriaceae*, семейства *Oceanospirillum*, семейства *Pasteurellaceae*, *Pneumococcus* spp., *Pseudomonas* spp., семейства *Rhizobiaceae*, семейства *Spirillum*, семейства *Spirosomaceae*, *Staphylococcus* (например, устойчивых к метициллину *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus pyrogenes*), *Streptococcus* (например, *Streptococcus enteritidis*, *Streptococcus faeciae* и *Streptococcus pneumoniae*), *Vampirovibrio*, семейства *Helicobacter*, семейства *Yersinia*, *Bacillus anthracis* и семейства *Vampirovibrio*.

Неограничивающие примеры антигенов паразитов включают антигены такого паразита, как амеба, малярийный паразит, плазмодий, *Trypanosoma cruzi*. Неограничивающие примеры антигенов грибов

включают антигены гриба *Absidia* spp. (например, *Absidia corymbifera* и *Absidia ramosa*), *Aspergillus* spp. (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus terreus*), *Basidiobolus ranarum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* spp. (например, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kern*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida quillermondii*, *Candida rugosa*, *Candida stellatoidea* и *Candida tropicalis*), *Coccidioides immitis*, *Conidiobolus* spp., *Cryptococcus neoforms*, *Cunninghamella* species, дерматофиты, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium gypseum*, *Mucor pusillus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhinosporidium seeberi*, *Pneumocystis carinii*, *Rhizopus* spp. (например, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* и *Rhizopus microsporus*), *Saccharomyces* spp., *Sporothrix schenckii*, зоомицеты, и таких классов, как *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes* и *Oomycetes*.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует опухолевый антиген или ассоциированный с опухолью антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген или ассоциированный с опухолью антиген включает антигены в случае связанных с опухолью заболеваний, включая острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, адренокортикальный рак, адренокортикальный рак у детей, связанные со СПИДом раки, саркому Капоши, анальный рак, рак аппендикса, астроцитомы, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль, базальноклеточный рак, рак желчных протоков, внепеченочный рак (см. холангиокарциному), рак мочевого пузыря, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей, глиому ствола головного мозга, рак головного мозга, опухоль головного мозга, астроцитому мозжечка, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, опухоль головного мозга, эпендимому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиому зрительного пути и гипоталамуса, рак молочной железы, бронхиальные аденомы/карциноиды, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, карциноидную желудочно-кишечную опухоль, карциному неизвестной первичной локализации, лимфому центральной нервной системы, первичную, мозжечковую астроцитому, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, рак шейки матки, раки у детей, хронический бронхит, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелолейкоз, хронические миелолиферативные нарушения, рак толстой кишки, Т-клеточную лимфому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эмфизему, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга в семействе опухолей типа саркомы Юинга, экстракраниальную эмбрионально-клеточную опухоль, внегонадную эмбрионально-клеточную опухоль, внепеченочный рак желчных протоков, внутриглазную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, эмбрионально-клеточную опухоль: экстракраниальную, внегонадную или гестационную трофобластическую опухоль яичника, глиому ствола головного мозга, глиому, церебральную астроцитому у детей, глиому зрительного пути и гипоталамуса у детей, карциноидный рак желудка, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак (печени), лимфому Ходжкина, рак гипофарингеальной области, глиому гипоталамуса и зрительного пути, внутриглазную меланому, инсуному (рак эндокринной части поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почки (почечноклеточный рак), рак гортани, острую лимфобластную лимфому, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелолейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, рак губ и ротовой полости, липосаркому, рак (первичный) печени, рак легкого, немелкоклеточный, мелкоклеточный, связанную со СПИДом лимфому, лимфому Беркитта, Т-клеточную лимфому кожи, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лимфому, первичную центральной нервной системы, макроглобулинемию, болезнь Вальденстрема, рак молочной железы у мужчин, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому, медуллобластому, меланому, внутриглазную (глаз), рак из клеток Меркеля, мезотелиому, злокачественную мезотелиому у взрослых, метастатический плоскоклеточный рак шеи неизвестного происхождения первичный, рак полости рта, синдром множественных эндокринных неоплазий, множественную миелому/плазмноклеточное новообразование, грибовидную гранулему, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелолиферативные заболевания, миелолейкоз, хронический, миелоидный лейкоз, острый у взрослых, миелоидный лейкоз, острый у детей, миелому, множественную (рак костного мозга), миелолиферативные нарушения, хронические, рак полости носа и придаточных пазух носа, рак носоглотки, нейробластому, немелкоклеточный рак легкого, олигодендроглиому, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичника, эпителиальный рак яичника (поверхностную эпителиально-стромальную опухоль), эмбрионально-клеточную опухоль яичника, опухоль с низким потенциалом злокачественности яичника, рак поджелудочной железы, из инсулярных клеток, рак придаточных пазух нос и носовой полости, рак парашитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, астроцитому шишковидной железы, герминому шишковидной железы, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденому гипофиза, плазмноклеточное новообразование/множественную миелому, плевропульмонарную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечноклеточный рак (рак почки), рак почечной лоханки и мочеточника, переходноклеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, у детей, рак слюнной железы, саркому, семейство опухолей типа саркомы Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, рак кожи (не

являющийся меланомой), рак кожи (меланому), рак из клеток Меркеля кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак - см. рак кожи (не являющийся меланомой), плоскоклеточный рак шеи неизвестного происхождения первичный, метастатический, рак желудка, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, Т-клеточную лимфому, кожи - см. грибовидную гранулему и синдром Сезари, рак яичек, рак горла, тимому и рак вилочковой железы, рак щитовидной железы, переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника у детей, гестационную трофобластическую опухоль, неизвестной первичной локализации, карциному, неизвестной первичной локализации у взрослых, рак у детей мочеточника и почечной лоханки, переходноклеточный рак, ректальный рак, рак матки, саркому эндометрия матки, бронхиальную опухоль, эмбриональную опухоль центральной нервной системы; хордому у детей, колоректальный рак, краниофарингиому, эпендимобластому, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз (у взрослых/у детей), мелкоклеточный рак легкого, медуллоэпителиому, рак полости рта, папилломатоз, паренхиматозные опухоли промежуточной дифференцировки шишковидной железы, опухоль гипофиза, карциному дыхательных путей с участием гена NUT на хромосоме 15, опухоль спинного мозга, тимому, рак щитовидной железы, рак влагалища; рак женских наружных половых органов и опухоль Вильмса.

Неограничивающие примеры опухолевых антигенов или ассоциированных с опухолью антигенов включают Адипофилин (Adipophilin), AIM-2, ALDH1A1, BCLX(L), BING-4, CALCA, CD45, CPSF, циклин D1, DKK1, ENAH (hMena), EpCAM, EphA3, EZH2, FGF5, глипикан-3, G250/MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13R $\alpha$ 2, карбоксилэстеразу кишечника, альфа-фетопротеин, Калликреин (Kallikrein) 4, KIF20A, Ленгсин (Lengsin), M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53, PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, secernin 1, SOX10, STEAP1, survivin, теломеразу, VEGF, или WT1, EGF-R, CEA, CD52, белок gp100, MELANA/MART1, NY-ESO-1, p53 MAGE1, MAGE3 и CDK4, альфа-актинин-4, ARTC1, гибридный белок BCR-ABL (b3a2), B-RAF, CASP-5, CASP-8, бета-катенин, Cdc27, CDK4, CDKN2A, CLPP, COA-1, гибридный белок dek-can, EFTUD2, фактор элонгации 2, гибридный белок ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, гибридный белок LDLR-фукозилтрансферазу AS, NFYC, OGT, OS-9, гибридный белок pml-RAR $\alpha$ , PRDX5, PTPRK, K-ras, N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, гибридный белок SYT-SSX1 или -SSX2, TGF- $\beta$ RII, Триозофосфатизомераза, Ленгсин, M-CSF, MCSP или mdm-2.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует антиген респираторного патогена. В конкретном варианте осуществления респираторный патоген представляет собой вирус, такой как RSV, коронавирус, метапневмовирус человека, вирус парагриппа, вирус Хендра, вирус Нипах, аденовирус, риновирус или PRRSV. Неограничивающие примеры антигенов респираторных вирусов включают белки F, G и M2 респираторно-синцитиального вируса, белки шипов (S) коронавируса (SARS, HCoV), гибридные белки метапневмовируса человека, гибридные белки вируса парагриппа и белки гемагглютинины (F, HN), гликопротеины (G и F) для прикрепления вируса Хендра (HeV) и вируса Нипах (NiV), белки капсида аденовируса, белки риновирусов и белки GP5 и M дикого типа PRRSV или модифицированные белки GP5 и M PRRSV.

В конкретном варианте осуществления респираторный патоген представляет собой бактерии, такие как *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis* и *Haemophilus influenzae*. Неограничивающие примеры антигенов респираторных бактерий включают протективный антиген PA *Bacillus anthracis*, микобактериальный антиген 85A и белок теплового шока (Hsp65) *Mycobacterium tuberculosis*, коклюшный анатоксин (PT) и нитевидный гемагглютинин (FHA) *Bordetella pertussis*, сортазу А и поверхностный адгезин А (PsaA) *Streptococcus pneumoniae*, субъединицы F1 и V *Yersinia pestis* и белки из *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis* и *Haemophilus influenzae*.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует Т-клеточный эпителий. В других вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует цитокин или фактор роста.

В других вариантах осуществления гетерологичная ORF кодирует антиген, экспрессируемый при аутоиммунном заболевании. В более конкретных вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием может быть диабет I типа, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, красная волчанка и псориаз.

Неограничивающие примеры антигенов аутоиммунного заболевания включают Ro60, дцДНК или рибонуклеопротеин (RNP).

В других вариантах осуществления ORF кодирует антиген, экспрессируемый при аллергическом заболевании. В более конкретных вариантах осуществления аллергическое заболевание может включать, но без ограничения этим, сезонный и круглогодичный риноконъюнктивит, астму и экзему.

Неограничивающие примеры аллергических антигенов включают Bet v 1 и Fel d 1.

В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом дополнительно содержит репортерный белок. Репортерный белок способен экспрессироваться одновременно с описанным здесь антигеном. В идеаль-

ном случае экспрессия является видимой в обычном свете или при других длинах волн света. В некоторых вариантах осуществления интенсивность эффекта, создаваемого репортерным белком, может использоваться для непосредственного измерения частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и контроля за ней.

Гены-репортеры будут легко распознаны специалистом в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде представляет собой флуоресцентный белок. В других вариантах осуществления репортерным геном является GFP. GFP излучает ярко-зеленый свет при воздействии ультрафиолетового или синего цвета.

Неограничивающие примеры репортерных белков включают различные ферменты, такие как, но без ограничения ими,  $\beta$ -галактозидаза, хлорамфеникол-ацетилтрансфераза, неомицинфосфотрансфераза, люцифераза или RFP.

В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, обладает желаемыми свойствами для применения в качестве вектора для вакцинации (смотрите, например, раздел 4.6). В другом варианте осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, способен индуцировать иммунный ответ у хозяина (например, мыши, кролика, козы, осла, человека). В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, описанную здесь, индуцирует врожденный иммунный ответ. В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, индуцирует адаптивный иммунный ответ. В более конкретных вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, индуцирует как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ.

В другом варианте осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, индуцирует Т-клеточный ответ. В еще более конкретных вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, индуцирует CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ. В других вариантах осуществления частица вируса Пичинде, несущая чужеродный ген, представляющий интерес, индуцирует мощный CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ с высокой частотой и функциональностью. В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, индуцирует CD8<sup>+</sup> Т-клетки, специфические в отношении одного или более эпитопов соответствующего представляющий интерес чужеродного гена.

В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, может индуцировать дифференцировку Т-хелпера 1, формирование памяти CD4<sup>+</sup> Т-клеток и/или вызывать долговременную выработку антител. Эти антитела могут быть нейтрализующими, опсонизирующими, токсичными для опухолевых клеток или имеют другие подходящие биологические особенности. В других вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) гетерологичную ORF, обладает сильным тропизмом к дендритным клеткам и активирует их при инфекции. Это усиливает представление антигена антигенпредставляющими клетками.

В некоторых вариантах осуществления геномный сегмент вируса Пичинде, частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующий(ая) антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, индуцирует низкие или неопределяемые титры нейтрализующих антител против вируса Пичинде и высокий уровень продукции протективных нейтрализующих антител против соответствующего чужеродного трансгена. В некоторых вариантах осуществления остов вируса Пичинде, образующий частицу или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, обладает низкой способностью к индукции иммунитета к компонентам остова вируса Пичинде.

#### 4.4. Образование частицы вируса Пичинде и частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом

Как правило, частицы вируса Пичинде могут быть рекомбинантно получены с помощью стандартных методов обратной генетики, как описано для LCMV, другого аренавируса (смотрите Flatz et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103: 4663-4668; Sanchez et al., 2006, Virology 350: 370, Ortiz-Riaño et al., 2013, J Gen Virol, 94: 1175-88, которые включены сюда посредством ссылки). Для образования частиц вируса Пичинде, представленных здесь, эти методы могут применяться, как описано ниже. Геном вирусов может быть модифицирован, как описано в разделе 4.1 и разделе 4., соответственно.

##### 4.4.1. Открытая рамка считывания в неприродном положении.

Частица вируса Пичинде, содержащая геномный сегмент, который был сконструирован, чтобы

служить носителем вирусной ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, может быть рекомбинантно получена любым методом обратной генетики, известным специалисту в данной области техники.

(i) Инфекционная и компетентная по репликации частица вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления способ образования частицы вируса Пичинде включает (i) трансфекцию в клетку-хозяина кДНК для первого геномного сегмента вируса Пичинде; (ii) трансфекцию в клетку-хозяина кДНК для второго геномного сегмента вируса Пичинде; (iii) трансфекцию в клетку-хозяина плазмид, экспрессирующих минимальные транс-действующие факторы NP и L вируса Пичинде (iv) поддержание клетки-хозяина в условиях, подходящих для образования вируса; и (v) сбор частиц вируса Пичинде. В некоторых более конкретных вариантах осуществления кДНК содержится в плазмиде.

После образования, исходя из кДНК, частицы вируса Пичинде (т.е. инфекционные и компетентные по репликации) могут быть размножены. В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде может быть размножена в любой клетке-хозяине, которая делает возможным рост вируса до титров, которые позволяют использовать вирус, как здесь описано. В одном варианте осуществления клетка-хозяин позволяет частицам вируса Пичинде расти до титров, сравнимых с таковыми, которые определены для соответствующего дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде может быть размножена в клетках-хозяевах. Конкретные примеры клеток-хозяев, которые могут использоваться, включают ВНК-21, НЕК 293, VERO или другие. В конкретном варианте осуществления частица вируса Пичинде может быть размножена в линии клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяев поддерживают в культуре и трансфицируют одной или несколькими плазмидой(ами). Плазида(ы) экспрессирует геномный сегмент(ы) вируса Пичинде, который должен быть сконструирован под контролем одной или более экспрессионных кассет, подходящих для экспрессии в клетках млекопитающих, например, состоящей из промотора для полимеразы I и терминатора.

Плазмиды, которые могут использоваться для образования частицы вируса Пичинде, могут включать: i) плазмиду, кодирующую геномный S-сегмент, например, pol-I S, ii) плазмиду, кодирующую геномный L-сегмент, например, pol-I L. В некоторых вариантах осуществления плазида, кодирующая полимеразу вируса Пичинде, которая управляет внутриклеточным синтезом вирусных L- и S-сегментов, может быть включена в смесь для трансфекции. Например, может присутствовать плазида, кодирующая L-белок, и/или плазида, кодирующая NP (pC-L и pC-NP, соответственно). L-белок и NP являются минимальными транс-действующими факторами, необходимыми для транскрипции и репликации вирусной РНК. Альтернативно, внутриклеточный синтез вирусных L- и S-сегментов вместе с NP и L-белком может быть осуществлен с использованием экспрессионной кассеты с промоторами pol-I и pol-II, считывающими с противоположных сторон в кДНК для L- и S-сегментов двух отдельных плазмид, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления геномные сегменты вируса Пичинде находятся под контролем промотора. Как правило, могут использоваться кассеты для экспрессии под управлением РНК-полимеразы I, кассеты под управлением полимеразы II или кассеты под управлением РНК-полимеразы бактериофага T7. В некоторых вариантах осуществления плазида(ы), кодирующая геномные сегменты вируса Пичинде, может быть одной и той же, т.е. последовательность генома и транс-действующие факторы могут транскрибироваться с помощью промотора из одной плазмиды. Конкретные примеры промоторов включают промотор для РНК-полимеразы I, промотор для РНК-полимеразы II, промотор для РНК-полимеразы III, промотор T7, промотор SP6 или промотор T3.

Кроме того, плазида(ы) может обладать селекционным маркером у млекопитающих, например устойчивостью к пуромицину, под контролем экспрессионной кассеты, подходящей для экспрессии генов в клетках млекопитающих, например кассеты для экспрессии под управлением полимеразы II, как указано выше, или транскрипт(ы) вирусного гена сопровождается внутренним участком посадки рибосомы, таким как таковой вируса энцефаломиокардита, с последующим маркером устойчивости у млекопитающих. Для продукции в *E.coli* плазида дополнительно обладает бактериальным селекционным маркером, таким как кассета устойчивости к ампициллину.

Трансфекцию клетки-хозяина плазмидой(ами) можно выполнять с использованием любой из широко применяемых стратегий, таких как кальций-фосфатная трансфекция, протоколы с использованием липосом или электропорация. Через несколько дней подходящий селективный агент, например пуромицин, добавляют в точно известных концентрациях. Выживающие клоны выделяют и субклонируют в соответствии со стандартными процедурами, и интенсивно экспрессирующие клоны идентифицируют с использованием методов Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии с использованием антител, направленных против представляющего интерес вирусного белка(ов).

Для выделения описанной здесь частицы вируса Пичинде предусмотрены следующие процедуры. Первый день: клетки, обычно конфлюэнтные на 80%, в М6-луночных планшетах, трансфицируют смесью плазмид, как описано выше. Для этого могут использоваться любые широко применяемые стратегии, такие как кальций-фосфатная трансфекция, протоколы с использованием липосом или электропора-



ция.

Через 3-5 дней: супернатант (препарат вектора в виде вируса Пичинде) после культивирования собирают, делят на аликвоты и хранят при 4, -20 или -80°C, в зависимости от того, как долго должен храниться вектор в виде вируса Пичинде перед использованием. Инфекционный титр препарата вектора в виде вируса Пичинде оценивают с помощью иммунологического анализа бляшкообразования. Альтернативно, трансфицированные клетки и супернатант могут быть пассированы в больший сосуд (например, матрас для культивирования ткани T75) в день 3-5 после трансфекции, и культуральный супернатант собирают вплоть до пяти дней после пассажа.

Кроме того, настоящее изобретение относится к экспрессии гетерологичной ORF, причем плазида, кодирующая геномный сегмент, модифицирована с включением гетерологичной ORF. Гетерологичная ORF может быть включена в плазмиду с использованием рестрикционных ферментов.

(ii) Инфекционная, дефектная по репликации частица вируса Пичинде.

Инфекционные, дефектные по репликации частицы вируса Пичинде могут быть спасены, как описано выше. Однако, как только они образуются, исходя из кДНК, инфекционные дефектные по репликации вирусы Пичинде, представленные здесь, могут размножаться в комплементирующих клетках. Комплементирующими клетками являются клетки, которые обеспечивают функциональность, которая была исключена у дефектного по репликации вируса Пичинде в результате модификации его генома (например, если ORF, кодирующая белок GP, удалена или функционально инактивирована, комплементирующая клетка действительно обеспечивает белок GP).

Из-за удаления или функциональной инактивации одной или более ORF в векторах в виде вирусов Пичинде (делеция гликопротеина, GP, будет считаться примером), векторы в виде вирусов Пичинде могут быть образованы и размножены в клетках, обеспечивающих *in trans* удаленный вирусный ген(ы), например GP в настоящем примере. Такая линия комплементирующих клеток, впрямь называемая С-клетками, создается путем трансфекции такой линии клеток, как ВНК-21, НЕК 2 93, VERO или другая, одной или несколькими плазидами для экспрессии вирусного гена(ов) (плазмидой для комплементации, называемой С-плазмидой). С-плазида(ы) экспрессирует вирусный ген(ы), удаленный в векторе в виде вируса Пичинде, который должен быть сконструирован под контролем одной или более экспрессионных каскад, подходящих для экспрессии в клетках млекопитающих, например под контролем промотора для полимеразы II млекопитающих, такого как промотор EF1 $\alpha$  с сигналом полиаденилирования. Кроме того, плазида для комплементации обладает селекционным маркером у млекопитающих, например устойчивостью к пурамицину, под контролем экспрессионной каскады, подходящей для экспрессии генов в клетках млекопитающих, например каскады для экспрессии под управлением полимеразы II, как указано выше, или транскрипт(ы) вирусного гена сопровождается внутренним участком посадки рибосомы, таким как таковой вируса энцефаломиокардита, с последующим маркером устойчивости у млекопитающих. Для продукции в *E.coli* плазида дополнительно обладает бактериальным селекционным маркером, таким как каскада устойчивости к ампициллину.

Клетки, которые могут использоваться, например, ВНК-21, НЕК 293, MC57G или другие, поддерживаются в культуре и трансфицируются плазмидой(ами) для комплементации с использованием любой из широко применяемых стратегий, таких как кальций-фосфатная трансфекция, протоколы с использованием липосом или электропорация. Через несколько дней подходящий селективный агент, например пурамицин, добавляют в точно известных концентрациях. Выживающие клоны выделяют и субклонировать в соответствии со стандартными процедурами, и интенсивно экспрессирующие клоны идентифицируют с использованием методов Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии с использованием антител, направленных против представляющего интерес вирусного белка(ов). В качестве альтернативы использованию стабильно трансфицированных С-клеток транзитная трансфекция нормальных клеток может комплементировать недостающий вирусный ген(ы) на каждой из стадий, на которых С-клетки будут далее использоваться. Кроме того, вирус-помощник может использоваться для обеспечения отсутствующей функциональности *in trans*.

Плазмиды могут быть двух типов: i) две плазмиды, называемые TF-плазидами, для экспрессии внутриклеточно в С-клетках минимальных транс-действующих факторов вируса Пичинде, происходят, например, из NP и L-белков вируса Пичинде в настоящем примере; и ii) плазмиды, называемые GS-плазидами, для экспрессии внутриклеточно в С-клетках сегментов генома вектора в виде вируса Пичинде, например сегментов с разработанными модификациями. TF-плазмиды экспрессируют NP и L-белки соответствующего вектора в виде вируса Пичинде под контролем экспрессионной каскады, подходящей для экспрессии белков в клетках млекопитающих, как правило, например под контролем промотора для полимеразы II у млекопитающих, такого как промотор CMV или EF1 $\alpha$ , либо один из них предпочтительно вместе с сигналом полиаденилирования. GS-плазмиды экспрессируют короткие (S) и длинные (L) сегменты генома вектора. Как правило, могут использоваться каскады для экспрессии под управлением полимеразы I или каскады для экспрессии под управлением РНК-полимеразы бактериофага T7, причем последние предпочтительно с 3'-концевым рибозимом для процессирования первичного транскрипта, чтобы получить правильный конец. В случае использования системы на основе T7, экспрессия

T7 в С-клетках должна быть обеспечена или включением в процесс восстановления дополнительной экспрессионной плазмиды, сконструированной аналогично TF-плазмидам, обеспечивающей T7, или конструируют С-клетки для дополнительной экспрессии T7 стабильным образом. В некоторых вариантах осуществления TF- и GS-плазмиды могут быть одними и теми же, т.е. последовательность генома и транс-действующие факторы могут транскрибироваться с помощью промоторов T7, *polI* и *polIII* из одной плазмиды.

Для выделения вектора в виде вируса Пичинде могут использоваться следующие процедуры. Первый день: С-клетки, обычно конфлюэнтные на 80%, в М6-луночных планшетах, трансфицируют смесью двух TF-плазмид плюс две GS-плазмиды. В некоторых вариантах осуществления TF- и GS-плазмиды могут быть одними и теми же, т.е. последовательность генома и трансдействующие факторы могут транскрибироваться с помощью промоторов T7, *polI* и *polIII* из одной плазмиды. Для этого может использоваться любая из широко применяемых стратегий, таких как кальций-фосфатная трансфекция, протоколы с использованием липосом или электропорация.

Через 3-5 дней: супернатант (препарат вектора в виде вируса Пичинде) после культивирования собирают, делят на аликвоты и хранят при 4, -20 или -80°C, в зависимости от того, как долго должен храниться вектор в виде вируса Пичинде перед использованием. Инфекционный титр препарата вектора в виде вируса Пичинде оценивают с помощью иммунологического анализа бляшкообразования на С-клетках. Альтернативно, трансфицированные клетки и супернатант могут быть пассированы в больший сосуд (например, матрас для культивирования ткани T75) в день 3-5 после трансфекции, и культуральный супернатант собирают вплоть до пяти дней после пассажа.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к экспрессии антигена в культуре клеток, причем культура клеток инфицирована инфекционным, дефектным по репликации вирусом Пичинде, экспрессирующим антиген. При использовании для экспрессии антигена в культивируемых клетках могут использоваться следующие две процедуры:

i) представляющий интерес тип клетки инфицируют препаратом вектора в виде вируса Пичинде, описанным здесь, с множественностью заражения (МОИ), равной 1 или более, например, 2, 3 или 4, что приводит к продукции антигена во всех клетках уже вскоре после инфицирования;

ii) в качестве альтернативы можно использовать более низкое значение МОИ, и отдельные клеточные клоны могут быть отобраны по уровню экспрессии в них антигена с помощью вируса. Впоследствии отдельные клоны могут быть неограниченно размножены из-за нецитолитической природы векторов в виде вируса Пичинде. Независимо от подхода, антиген может быть впоследствии собран (и очищен) или из культурального супернатанта, или из самих клеток, в зависимости от свойств продуцируемого антигена. Однако настоящее изобретение не ограничивается этими двумя стратегиями, и могут рассматриваться другие способы стимулирования экспрессии антигена с использованием инфекционных, дефектных по репликации вирусов Пичинде в качестве векторов.

#### 4.4.2. Образование частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

Частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом можно рекомбинантно продуцировать с помощью методов обратной генетики, известных в данной области техники, например, как описано Emonet et al., 2008, PNAS, 106(9):3473-3478; Popkin et al., 2011, J. Virol., 85 (15):7928-7932; Dhanwani et al., 2015, Journal of Virology, doi:10.1128/JVI.02705-15, которые включены сюда посредством ссылки. Образование частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, представленной здесь, может быть модифицирована, как описано в разделе 4.2.

(i) Инфекционная и компетентная по репликации частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

В некоторых вариантах осуществления способ образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом включает (i) трансфекцию в клетку-хозяина кДНК для одного L-сегмента и двух S-сегментов или двух L-сегментов и одного S-сегмента; (ii) трансфекцию в клетку-хозяина плазмид, экспрессирующих минимальные транс-действующие факторы NP и L вируса Пичинде (iii) поддержание клетки-хозяина в условиях, подходящих для образования вируса; и (v) сбор частиц вируса Пичинде.

После образования, исходя из кДНК, частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом (т.е. инфекционные и компетентные по репликации) могут быть размножены. В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом может быть размножена в любой клетке-хозяине, которая делает возможным рост вируса до титров, которые позволяют использовать вирус, как здесь описано. В одном варианте осуществления клетка-хозяин позволяет частицам вируса Пичинде с трехсегментным геномом расти до титров, сравнимых с таковыми, которые определены для соответствующего дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом может быть размножена в клетках-хозяевах. Конкретные примеры клеток-хозяев, которые могут использоваться, включают ВНК-21, НЕК 293, VERO или другие. В конкретном варианте осуществления частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом может быть размножена в линии клеток.

В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяев поддерживаются в культуре и трансфицируют одной или несколькими плазмидами. Плазида(ы) экспрессирует геномный сегмент(ы) вируса Пи-

чинде, который должен быть сконструирован под контролем одной или более экспрессионных кассет, подходящих для экспрессии в клетках млекопитающих, например, состоящей из промотора для полимеразы I и терминатора.

Плазмиды, которые могут использоваться для образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащей один L-сегмент и два S-сегмента, могут включать: i) две плазмиды, каждая из которых кодирует S-сегмент генома, например, pol-I-PIС-S, ii) плазмиду, кодирующую L-сегмент генома, например, pol-I-PIС-L. Плазмидами, необходимыми для вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащего два L-сегмента и один S-сегменты, являются: i) две плазмиды, каждая из которых кодирует L-сегмент генома, например, pol-I-PIС-L, ii) плазмиду, кодирующую S-сегмент генома, например, Pol-I-PIС-S.

В некоторых вариантах осуществления плазида, кодирующая полимеразу вируса Пичинде, которая управляет внутриклеточным синтезом вирусных L- и S-сегментов, может быть включена в смесь для трансфекции. Например, может присутствовать плазида, кодирующая L-белок, и плазида, кодирующая NP (pC-PIС-L и pC-PIС-NP, соответственно). L-белок и NP являются минимальными трансдействующими факторами, необходимыми для транскрипции и репликации вирусной РНК. Альтернативно, внутриклеточный синтез вирусных L- и S-сегментов вместе с NP и L-белком может быть осуществлен с использованием экспрессионной кассеты с промоторами для pol-I и pol-II, считывающими с противоположных сторон в кДНК для L- и S-сегментов двух отдельных плазмид, соответственно.

Кроме того, плазида(ы) может обладать селекционным маркером у млекопитающих, например устойчивостью к пурамицину, под контролем экспрессионной кассеты, подходящей для экспрессии генов в клетках млекопитающих, например кассеты для экспрессии под управлением полимеразы II, как указано выше, или транскрипт(ы) вирусного гена сопровождается внутренним участком посадки рибосомы, таким как таковой вируса энцефаломиокардита, с последующим маркером устойчивости у млекопитающих. Для продукции в *E.coli* плазида дополнительно обладает бактериальным селекционным маркером, таким как кассета устойчивости к ампициллину.

Трансфекцию клетки ВНК-21 плазмидой(ами) можно выполнять с использованием любой из широко применяемых стратегий, таких как кальций-фосфатная трансфекция, протоколы с использованием липосом или электропорация. Через несколько дней подходящий селективный агент, например пурамицин, добавляют в точно известных концентрациях. Выживающие клоны выделяют и субклонируют в соответствии со стандартными процедурами, и интенсивно экспрессирующие клоны идентифицируют с использованием методов Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии с использованием антител, направленных против представляющего интерес вирусного белка(ов).

Как правило, могут использоваться кассеты для экспрессии под управлением полимеразы I, кассеты для экспрессии под управлением полимеразы II или кассеты для экспрессии под управлением РНК-полимеразы бактериофага T7, причем последние предпочтительно с 3'-концевым рибозимом для процессирования первичного транскрипта, чтобы получить правильный конец. В некоторых вариантах осуществления плазмиды, кодирующие геномные сегменты вируса Пичинде, могут быть одними и теми же, т.е. последовательность генома и трансдействующие факторы могут транскрибироваться с помощью промоторов T7, polI и polII из одной плазмиды.

Для выделения вектора в виде вируса Пичинде с трехсегментным геномом предусмотрены следующие процедуры. Первый день: клетки, обычно конфлюэнтные на 80%, в М6-луночных планшетах, трансфицируют смесью плазмид, как описано выше. Для этого может использоваться любая из широко применяемых стратегий, таких как кальций-фосфатная трансфекция, протоколы с использованием липосом или электропорация.

Через 3-5 дней: супернатант (препарат вектора в виде вируса Пичинде) после культивирования собирают, делят на аликвоты и хранят при 4°C, -20°C или -80°C, в зависимости от того, как долго должен храниться вектор в виде вируса Пичинде перед использованием. Инфекционный титр препарата вектора в виде вируса Пичинде оценивают с помощью иммунологического анализа бляшкообразования. Альтернативно, трансфицированные клетки и супернатант могут быть пассированы в больший сосуд (например, матрас для культивирования ткани T75) в день 3-5 после трансфекции, и культуральный супернатант собирают вплоть до пяти дней после пассажа.

Кроме того, настоящее изобретение относится к экспрессии гетерологичной ORF и/или представляющего интерес гена, причем плазида, кодирующая геномный сегмент, модифицирована с включением гетерологичной ORF и/или представляющего интерес гена. Гетерологичная ORF и/или представляющий интерес ген может быть включена в плазмиду с использованием рестрикционных ферментов.

(ii) Инфекционная, дефектная по репликации частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом

Инфекционные, дефектные по репликации частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом могут быть спасены, как описано выше. Однако, как только они образуются, исходя из кДНК, инфекционные дефектные по репликации вирусы Пичинде, представленные здесь, могут размножаться в комплементирующих клетках. Комплементирующими клетками являются клетки, которые обеспечивают функциональность, которая была исключена у дефектного по репликации вируса Пичинде в результате модификации его генома (например, если ORF, кодирующая белок GP, удалена или функционально инактивирована).

виروвана, комплементирующая клетка действительно обеспечивает белок GP).

Из-за удаления или функциональной инактивации одной или более ORF в векторах в виде вирусов Пичинде (делеция гликопротеина, GP, будет считаться примером), векторы в виде вирусов Пичинде могут быть образованы и размножены в клетках, обеспечивающих *in trans* удаленный вирусный ген(ы), например GP в настоящем примере. Такая линия комплементирующих клеток, впредь называемая С-клетками, создается путем трансфекции такой линии клеток, как ВНК-21, НЕК 293, VERO или другая (здесь ВНК-21 будет считаться примером), одной или несколькими плазмидами для экспрессии вирусного гена(ов) (плазмидой для комплементации, называемой С-плазмидой). С-плазида(ы) экспрессирует вирусный ген(ы), удаленный в векторе в виде вируса Пичинде, который должен быть сконструирован под контролем одной или более экспрессионных кассет, подходящих для экспрессии в клетках млекопитающих, например под контролем промотора для полимеразы II у млекопитающих, такого как промотор CMV или EF1 $\alpha$ , с сигналом полиаденилирования. Кроме того, плазида для комплементации может обладать селекционным маркером у млекопитающих, например устойчивостью к пуромицину, под контролем экспрессионной кассеты, подходящей для экспрессии генов в клетках млекопитающих, например кассеты для экспрессии под управлением полимеразы II, как указано выше, или транскрипт(ы) вирусного гена сопровождается внутренним участком посадки рибосомы, таким как таковой вируса энцефаломиокардита, с последующим маркером устойчивости у млекопитающих. Для продукции в *E.coli* плазида дополнительно обладает бактериальным селекционным маркером, таким как кассета устойчивости к ампициллину.

Клетки, которые могут использоваться, например, ВНК-21, НЕК 293, MC57G или другие, поддерживаются в культуре и трансфицируются плазмидой(ами) для комплементации с использованием любой из широко применяемых стратегий, таких как кальций-фосфатная трансфекция, протоколы с использованием липосом или электропорация. Через несколько дней подходящий селективный агент, например пуромицин, добавляют в точно известных концентрациях. Выживающие клоны выделяют и субконируют в соответствии со стандартными процедурами, и интенсивно экспрессирующие клоны С-клеток идентифицируют с использованием методов Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии с использованием антител, направленных против представляющего интерес вирусного белка(ов). В качестве альтернативы использованию стабильно трансфицированных С-клеток транзиторная трансфекция нормальных клеток может комплементировать недостающий вирусный ген(ы) на каждой из стадий, на которых С-клетки будут далее использоваться. Кроме того, вирус-помощник может использоваться для обеспечения отсутствующей функциональности *in trans*.

Могут использоваться плазмиды двух типов: i) две плазмиды, называемые TF-плазмидами, для экспрессии внутриклеточно в С-клетках минимальных транс-действующих факторов вируса Пичинде, происходят, например, из NP и L-белков вируса Пичинде в настоящем примере; и ii) плазмиды, называемые GS-плазмидами, для экспрессии внутриклеточно в С-клетках сегментов генома вектора в виде вируса Пичинде, например сегментов с разработанными модификациями. TF-плазмиды экспрессируют NP и L-белки соответствующего вектора в виде вируса Пичинде под контролем экспрессионной кассеты, подходящей для экспрессии белков в клетках млекопитающих, как правило, например, промотора для полимеразы II у млекопитающих, такого как промотор CMV или EF1 $\alpha$ , любого одного из них предпочтительно вместе с сигналом полиаденилирования. GS-плазмиды экспрессируют короткие (S) и длинные (L) сегменты генома вектора. Как правило, могут использоваться кассеты для экспрессии под управлением полимеразы I или кассеты для экспрессии под управлением РНК-полимеразы бактериофага T7, причем последние предпочтительно с 3'-концевым рибозимом для процессирования первичного транскрипта, чтобы получить правильный конец. В случае использования системы на основе T7, экспрессия T7 в С-клетках должна быть обеспечена или включением в процесс восстановления дополнительной экспрессионной плазмиды, сконструированной аналогично TF-плазмидам, обеспечивающей T7, или создают С-клетки для дополнительной экспрессии T7 стабильным образом. В некоторых вариантах осуществления TF- и GS-плазмиды могут быть одними и теми же, т.е. последовательность генома и транс-действующие факторы могут транскрибироваться с помощью промоторов T7, роII и роIII из одной плазмиды.

Для выделения вектора в виде вируса Пичинде могут использоваться следующие процедуры. Первый день: С-клетки, обычно конфлюэнтные на 80%, в М6-луночных планшетах, трансфицируют смесью двух TF-плазмид плюс две GS-плазмиды. В некоторых вариантах осуществления TF- и GS-плазмиды могут быть одними и теми же, т.е. последовательность генома и трансдействующие факторы могут транскрибироваться с помощью промоторов T7, роII и роIII из одной плазмиды. Для этого может использоваться любая из широко применяемых стратегий, таких как кальций-фосфатная трансфекция, протоколы с использованием липосом или электропорация.

Через 3-5 дней: супернатант (препарат вектора в виде вируса Пичинде) после культивирования собирают, делят на аликвоты и хранят при 4, -20 или -80°C, в зависимости от того, как долго должен храниться вектор в виде вируса Пичинде перед использованием. Затем инфекционный титр препарата вектора в виде вируса Пичинде оценивают с помощью иммунологического анализа бляшкообразования на С-клетках. Альтернативно, трансфицированные клетки и супернатант могут быть пассированы в боль-

ший сосуд (например, матрас для культивирования ткани T75) в день 3-5 после трансфекции, и культуральный супернатант собирают вплоть до пяти дней после пассажа.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к экспрессии антигена в культуре клеток, причем культура клеток инфицирована инфекционным, дефектным по репликации вирусом Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующим антиген. При использовании для экспрессии антигена CMV в культивируемых клетках могут использоваться следующие две процедуры:

i) представляющий интерес тип клетки инфицируют препаратом вектора в виде вируса Пичинде, описанным здесь, с множественностью заражения (МОИ), равной 1 или более, например, 2, 3 или 4, что приводит к продукции антигена во всех клетках уже вскоре после инфицирования;

ii) в качестве альтернативы можно использовать более низкое значение МОИ, и отдельные клеточные клоны могут быть отобраны по уровню экспрессии в них антигена с помощью вируса. Впоследствии отдельные клоны могут быть неограниченно размножены из-за нецитолитической природы векторов в виде вируса Пичинде. Независимо от подхода, антиген может быть впоследствии собран (и очищен) или из культурального супернатанта, или из самих клеток, в зависимости от свойств продуцируемого антигена. Однако настоящее изобретение не ограничивается этими двумя стратегиями, и могут рассматриваться другие способы стимулирования экспрессии антигена CMV с использованием инфекционных, дефектных по репликации вирусов Пичинде в качестве векторов.

#### 4.5. Нуклеиновые кислоты, векторные системы и линии клеток.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлены кДНК, содержащие или состоящие из геномного сегмента вируса Пичинде, или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, которые описаны в разделе 4.1 и разделе 4.2 соответственно. 4.5.1 Открытая рамка считывания в неприродном положении

В одном варианте осуществления здесь представлены нуклеиновые кислоты, которые кодируют геномный сегмент вируса Пичинде, описанный в разделе 4.1. В более конкретных вариантах осуществления здесь представлены нуклеотидные последовательности ДНК или совокупность нуклеотидных последовательностей ДНК, приведенная в таблице 1. Клетки-хозяева, которые содержат такие нуклеиновые кислоты, также представлены в разделе 4.1.

В конкретных вариантах осуществления здесь представлена кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, сконструированного, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, причем геномный сегмент вируса Пичинде кодирует гетерологичную ORF, как описано в раздел 4.1.

В одном варианте осуществления здесь представлена векторная система экспрессии ДНК, которая кодирует геномный сегмент вируса Пичинде, сконструированный, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В частности, здесь представлена векторная система экспрессии ДНК, в которой один или более векторов кодируют два геномных сегмента вируса Пичинде, а именно L-сегмент и S-сегмент частицы вируса Пичинде, описанной здесь. Такая векторная система может кодировать одну или более отдельных молекул ДНК.

В другом варианте осуществления здесь представлена кДНК для S-сегмента вируса Пичинде, который был сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения дикого типа, и является частью системы экспрессии ДНК или включенной в нее. В других вариантах осуществления кДНК для L-сегмента вируса Пичинде, который был сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения дикого типа, является частью системы экспрессии ДНК или включенной в нее. В некоторых вариантах осуществления здесь представлена кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, который был сконструирован, чтобы служить носителем (i) ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа; и в которой (ii) ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, была удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления кДНК, представленная здесь, может происходить из специфического штамма вируса Пичинде. Штаммы вируса Пичинде включают Munchique CoAn4763 изолят P18 и его производные, P2 и его производные, или происходят из любого из нескольких изолятов, описанных Trapido и его коллегами (Trapido et al., 1971, Am J Trop Med Hyg, 20: 631-641). В конкретных вариантах осуществления кДНК происходит из штамма Munchique CoAn4763 изолята P18 вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления вектор, сконструированный для кодирования частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанной здесь, может быть основан на специфическом штамме вируса Пичинде. Штаммы вируса Пичинде включают Munchique CoAn4763 изолят P18 и его производные, P2 и его производные, или происходят от любого из нескольких изолятов, описанных Trapido и его коллегами (Trapido et al, 1971, Am J Trop Med Hyg, 20: 631-641). В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанная здесь, может быть основана на изоляте P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде. Последовательность S-сегмента изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде указана как SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления последовательность S-сегмента изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:1. Последовательность L-сегмента вируса Пичинде указана как SEQ ID

NO:2.

В другом варианте осуществления здесь представлена клетка, которая содержит кДНК или векторную систему, описанную выше в этом разделе. Здесь также представлены линии клеток, происходящие от таких клеток, культуры, содержащие такие клетки, способы культивирования таких инфицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления здесь представлена клетка, которая содержит кДНК для геномного сегмента вируса Пичинде, который был сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит S-сегмент и/или L-сегмент.

#### 4.5.2. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

В одном варианте осуществления здесь представлены нуклеиновые кислоты, которые кодируют частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанную в разделе 4.2. В более конкретных вариантах осуществления здесь представлена нуклеотидная последовательность ДНК или совокупность нуклеотидных последовательностей ДНК, например, как указано в табл. 2 или 3. Клетки-хозяева, которые содержат такие нуклеиновые кислоты, также представлены в разделе 4.2.

В конкретных вариантах осуществления здесь представлена кДНК, состоящая из кДНК для частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, которая была сконструирована, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа. В других вариантах осуществления здесь представлена кДНК частицы Пичинде с трехсегментным геномом, которая была сконструирована, (i) чтобы служить носителем ORF вируса Пичинде в положении, отличном от положения ORF дикого типа; и (ii), причем частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом кодирует гетерологичную ORF, как описано в разделе 4.2.

В одном варианте осуществления здесь представлена векторная система экспрессии ДНК, которая вместе кодирует частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанную здесь. В частности, здесь представлена векторная система экспрессии ДНК, в которой один или более векторов кодируют три геномных сегмента вируса Пичинде, а именно один L-сегмент и два S-сегмента или два L-сегмента и один S-сегмент частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанной здесь. Такая векторная система может кодировать одну или более отдельных молекул ДНК.

В другом варианте осуществления здесь представлена кДНК для S-сегмента(ов) вируса Пичинде, которая была сконструирована, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения дикого типа, и является частью системы экспрессии ДНК или включенной в нее. В других вариантах осуществления кДНК для L-сегмента(ов) вируса Пичинде, который был сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения дикого типа, является частью системы экспрессии ДНК или включенной в нее. В некоторых вариантах осуществления здесь представлена кДНК для частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, который был сконструирован, чтобы служить носителем (i) ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа; и в котором (ii) ORF, кодирующая GP, NP, белок Z или L-белок, была удалена и заменена гетерологичной ORF из организма, отличного от вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления представленная здесь кДНК может происходить из специфического штамма вируса Пичинде. Штаммы вируса Пичинде включают Munchique CoAn4763 изолят P18 и его производные, P2 и его производные, или происходят из любого из нескольких изолятов, описанных Trapido и его коллегами (Trapido et al, 1971, Am J Trop Med Hyg, 20: 631-641). В конкретных вариантах осуществления кДНК происходит из изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления вектор, сконструированный для кодирования частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанной здесь, может быть основан на специфическом штамме вируса Пичинде. Штаммы вируса Пичинде включают Munchique CoAn4763 изолят P18 и его производные, P2 и его производные, или происходят от любого из нескольких изолятов, описанных Trapido и его коллегами (Trapido et al, 1971, Am J Trop Med Hyg, 20: 631-641). В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанная здесь, может быть основана на изоляте P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде. Последовательность S-сегмента изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде указана как SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления последовательность S-сегмента изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:1. Последовательность L-сегмента вируса Пичинде указана как SEQ ID NO:2.

В другом варианте осуществления здесь представлена клетка, которая содержит кДНК или векторную систему, описанную выше в этом разделе. Здесь также представлены линии клеток, происходящие от таких клеток, культуры, содержащие такие клетки, способы культивирования таких инфицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления здесь представлена клетка, которая содержит кДНК для частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит S-сегмент и/или L-сегмент.

#### 4.6. Способы применения.

Вакцины были успешными для профилактики и/или лечения таких инфекционных заболеваний, как

вызываемое вирусом полиомиелита заболевание и корь. Однако терапевтическая иммунизация при установлении хронического заболевания, включая как хронические инфекции, так и рак, была менее успешной. Возможность образовывать частицу вируса Пичинде и/или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом представляет новую стратегию для новой вакцины.

В одном варианте осуществления здесь представлены способы лечения инфекции и/или рака у субъекта, включающие введение субъекту одного или более типов частиц вируса Пичинде или частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанных здесь, или их композиции. В конкретном варианте осуществления способ лечения инфекции и/или рака, описанный здесь, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества одной или более частиц вируса Пичинде или частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанных здесь, или их композиции. Субъектом может быть млекопитающее, такое как, но без ограничения этим, человек, мышь, крыса, морская свинка, одомашненное животное, такое как, но без ограничения этим, корова, лошадь, овца, свинья, коза, кошка, собака, хомяк, осел. В конкретном варианте осуществления субъектом является человек. Являющимся человеком субъектом могут быть мужчины, женщины, взрослые, дети, пожилые люди (65 лет и старше) и люди с множественным заболеваниями (т.е. полиморбидные субъекты). В некоторых вариантах осуществления субъектами являются те, болезнь у которых прогрессировала после лечения с использованием химиотерапии, лучевой терапии, хирургического вмешательства и/или биологических агентов.

В другом варианте осуществления здесь представлены способы индукции иммунного ответа против антигена, происходящего из инфекционного организма, опухоли или аллергена, у субъекта, включающие введение субъекту частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена, или ее композиции.

В другом варианте осуществления субъекты, которым вводят частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена, описанную здесь, или ее композицию, являются восприимчивыми к или подвержены риску инфицирования(ю), развития(ю) рака или аллергии или имеют предраковое поражение тканей. В другом конкретном варианте осуществления субъекты, которым вводят частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена, описанную здесь, или ее композицию, инфицированы, являются восприимчивыми к, подвержены риску или являются пациентами с поставленным диагнозом инфекция, рак, предраковое поражение тканей или аллергия.

В другом варианте осуществления субъекты, которым вводят частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена, описанную здесь, или ее композицию, страдают, являются восприимчивым к или подвержены риску инфицирования, рака, предракового поражения или аллергии в легочной системе, центральной нервной системе, лимфатической системе, желудочно-кишечном тракте или сердечнососудистой системе среди прочих. В конкретном варианте осуществления субъекты, которым вводят частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена, описанную здесь, или ее композицию, страдают, являются восприимчивым к или подвержены риску инфицирования, рака или аллергии в одном или более органах тела, включая, но без ограничения ими, головной мозг, печень, легкие, глаза, уши, кишечник, пищевод, матку, носоглотку или слюнные железы.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту, который страдает от симптомов, включающих, но без ограничения ими, лихорадку, ночную потливость, усталость, недомогание, беспокойство, боль в горле, опухшие железы, боль в суставах, боль в мышцах, потерю аппетита, потерю веса, диарею, желудочно-кишечные изъязвления, желудочно-кишечное кровотечение, одышку, пневмонию, язвы рта, проблемы со зрением, гепатит, желтуху, энцефалит, судороги, кому, зуд, эритему, гиперпигментацию, изменения в лимфатическом узле или потере слуха.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту любой возрастной группы, страдающему, восприимчивому к или подверженному риску инфицирования, рака или аллергии. В конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту с нарушенной иммунной системой, беременному субъекту, субъекту, подвергающему трансплантации органа или костного мозга, субъекту, принимающему иммунодепрессанты, субъекту, подвергающемуся гемодиализу, субъекту с раком или субъекту, который страдает от, является восприимчивым к или подвержен риску инфицирования, рака или аллергии. В более конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма,

рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту, который является ребенком возрастом 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 лет, страдающим, восприимчивым к и подверженным риску инфицирования, рака или аллергии. В еще одном конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту, который является младенцем, страдающим, восприимчивым к или подверженным риску инфицирования, рака или аллергии. В еще одном конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту, который является младенцем возрастом 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, страдающим, восприимчивым к или подверженным риску инфицирования, рака или аллергии. В еще одном конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту старшего возраста, который страдает, является восприимчивым к и подвержен риску инфицирования, рака или аллергии. В более конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту, который является пожилым человеком возрастом 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, или 90 лет.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъектам с повышенным риском диссеминированной инфекции, рака или аллергии. В конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъектам в период новорожденности с неонатальной и, следовательно, незрелой иммунной системой.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту, имеющему скрытую инфекцию, рак или аллергию. В конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту, имеющему скрытую инфекцию, скрытый рак или скрытую аллергию, которая может реактивироваться при нарушении иммунной системы. Таким образом, здесь представлен способ предотвращения реактивации инфекции, рака или аллергии.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту, имеющему рецидивирующую инфекцию, рак или аллергию.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъекту с генетической предрасположенностью к инфекции, раку или аллергии. В другом варианте осуществления субъекту вводят частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанную здесь, или ее композицию. В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, вводят субъекту с факторами риска. Примеры факторов риска включают старение, табак, воздействие солнца, облучение, химическое воздействие, случаи заболевания в семье, алкоголь, плохая диета, отсутствие физической активности или избыточный вес.

В другом варианте осуществления введение частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, уменьшает симптоматическую инфекцию, рак или аллергию. В другом варианте осуществления введение частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, уменьшает бессимптомную инфекцию, рак или аллергию.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, описанную здесь, или ее композицию вводят субъектам или животным, инфицированным одним или несколькими штаммами вируса гриппа, инфекционным, вызывающим бурсальную болезнь вирусом, ротавирусом, вирусом инфекционного бронхита, вирусом инфекционного ларинготрахеита, вирусом анемии у кур, вызы-



вающим болезнь Марека вирусом, вирусом птичьего лейкоза, аденовирусом птиц или пневмовирусом птиц, вирусом, вызывающим SARS, респираторно-синцитиальным вирусом человека, вирусом иммунодефицита человека, вирусом гепатита А, вирусом гепатита В, вирусом гепатита С, полиовирусом, вирусом бешенства, вирусом Хендра, вирусом Нипах, вирусом парагриппа 3 у человека, вирусом кори, вирусом эпидемического паротита, вирусом Эбола, вирусом Марбурга, вирусом, вызывающим болезнь Западного Нила, вирусом японского энцефалита, вирусом денге, хантавирусом, вирусом лихорадки Рифт-Валли, вирусом лихорадки Ласса, вирусом простого герпеса и вирусом желтой лихорадки.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из рака, описанную здесь, или ее композицию вводят субъектам, страдающим одним или несколькими видами рака. В других вариантах осуществления любой вид рака, чувствительный к лечению вакцинами, описанными здесь, может быть мишенью. В более конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из рака, описанную здесь, или ее композицию вводят субъектам, страдающим, например, меланомой, раком предстательной железы, раком молочной железы, раком легких, нейробластомой, гепатоцеллюлярной карциномой, карциномой шейки матки и раком желудка, лимфомой Беркитта; неходжкинской лимфомой; лимфомой Ходжкина; раком носоглотки (раком верхней части горла за носом), лейкемией, лимфомой лимфоидной ткани, связанной со слизистой оболочкой.

В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъектам, страдающим одной или несколькими аллергиями. В более конкретном варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из аллергена, описанную здесь, или ее композицию вводят субъектам, страдающим, например, сезонной аллергией, круглогодичной аллергией, риноконъюнктивитом, астмой, экземой, пищевой аллергией.

В другом варианте осуществления введение субъектам частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанной здесь, или ее композиции обеспечивает клеточно-опосредованный иммунитет (СМИ) против инфекции, рака или аллергена. Не ограничиваясь теорией, в другом варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанная здесь, или ее композиция инфицирует и экспрессирует представляющие интерес антигены в антигенпредставляющих клетках (АПК) хозяина (например, макрофагах, дендритных клетках или В-клетках) для непосредственного представления антигенов около главных комплексов гистосовместимости (МНС) класса I и II. В другом варианте осуществления введение субъектам частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллергена, описанной здесь, или ее композиции индуцирует плюрифункциональные цитолитические, а также IFN- $\gamma$ - и TNF- $\alpha$ -продуцирующие CMV-специфические CD4+ и CD8+ Т-клеточные реакции большой силы для лечения или профилактики инфекции, рака или аллергии.

В другом варианте осуществления введение частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанной здесь, или ее композиции снижает риск развития у индивидуума инфекции, рака, аллергии на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или более, по сравнению с риском развития инфекции, рака или аллергии в отсутствие такого лечения.

В другом варианте осуществления введение частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, или ее композиции уменьшает симптомы инфекции, рака или аллергии на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или более, по сравнению с проявлением симптомов инфекции, рака, аллергии в отсутствие такого лечения.

В некоторых вариантах изобретения частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, предпочтительно вводят в виде множества инъекций (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 45 или 50 инъекций) или с помощью непрерывной инфузии (на-

пример, используя насос) во множество мест (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 или 14 мест). В некоторых вариантах осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, вводят в виде двух или более отдельных инъекций в течение 6-месячного периода, 12-месячного периода, 24-месячного периода или 48-месячного периода. В некоторых вариантах осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, вводят с первой дозой в выбранный день, второй дозой по меньшей мере через 2 месяца после первой дозы и третьей дозой через 6 месяцев после первой дозы.

В одном примере кожные инъекции выполняются во множество мест тела, чтобы уменьшить степень местных кожных реакций. В определенный день вакцинации пациент получает назначенную общую дозу клеток, вводимых из одного шприца в виде 3-5 отдельных внутрикожных инъекций дозы (например, по меньшей мере 0,4 мл, 0,2 мл или 0,1 мл), каждая в крайней точке, расположенной на расстоянии по меньшей мере приблизительно 5 см (например, по меньшей мере 4,5, 5, 6, 7, 8 или 9 см) на входе иглы от ближайшей соседней инъекции. В последующие дни вакцинации места инъекции чередуют по разным конечностям по часовой стрелке или против часовой стрелки.

В другом варианте осуществления введение инфекционного, дефектного по репликации вируса Пичинде, экспрессирующего антиген CMV, или его композиции у субъектов с неонатальной и, следовательно, незрелой иммунной системой индуцирует клеточно-опосредованный иммунный ответ (СМІ) против инфекции, рака или аллергии, превышающий на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или более, ответ СМІ против инфекции, рака или аллергии в отсутствие такого лечения.

В некоторых вариантах осуществления введение субъекту частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанной здесь, индуцирует детектируемый титр антител в течение как минимум по меньшей мере четырех недель. В другом варианте осуществления введение субъекту частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанной здесь, увеличивает титр антител на по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500% или по меньшей мере 1000%.

В некоторых вариантах осуществления первичная антигенная стимуляция индуцирует функциональный, (титр нейтрализующих антител) и минимальный титр антител, составляющий по меньшей мере 50%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500% или по меньшей мере 1000% от среднего значения в контрольной сыворотке от являющихся людьми субъектов с инфекционным иммунитетом. В более конкретных вариантах осуществления среднее геометрическое титра первичных нейтрализующих антител увеличивается до максимального значения по меньшей мере 1:50, по меньшей мере 1:100, по меньшей мере 1:200 или по меньшей мере 1:1000 в течение по меньшей мере 4 недель после иммунизации. В другом варианте осуществления иммунизация частицей вируса Пичинде или частицей вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанной здесь, дает высокие титры антител, которые сохраняются в течение по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет, по меньшей мере 4 лет или по меньшей мере 5 лет после иммунизации после одного введения вакцины, или после двух или более последовательных иммунизаций.

В еще одном варианте осуществления вторичная антигенная стимуляция увеличивает титр антител по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000%. В другом варианте осуществления вторичная антигенная стимуляция индуцирует функциональный, (титр нейтрализующих антител) и минимальный титр антител, составляющий по меньшей мере 50%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500% или по меньшей мере 1000% от среднего значения в контрольной сыворотке от являющихся людьми субъектов с инфекционным иммунитетом. В более конкретных вариантах осуществления среднее геометрическое титра вторичных нейтрализующих антител увеличивается до максимального значения по меньшей мере 1:50, по меньшей мере 1:100, по меньшей мере 1:200 или по меньшей мере 1:1000 в течение по меньшей мере 4 недель после иммунизации. В другом варианте осуществления вторичная иммунизация с использованием частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанной здесь, дает высокие титры антител, которые сохраняются в течение по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 8 недель, по

меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет, по меньшей мере 4 лет или по меньшей мере 5 лет после иммунизации.

В еще одном варианте осуществления третья бустер-иммунизация увеличивает титр антител на по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500% или по меньшей мере 1000%. В другом варианте осуществления бустер-иммунизация индуцирует функциональный, (титр нейтрализующих антител) и минимальный титр антител, составляющий по меньшей мере 50%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500% или по меньшей мере 1000% от среднего значения в контрольной сыворотке от являющихся людьми субъектов с инфекционным иммунитетом. В более конкретных вариантах осуществления третья бустер-иммунизация индуцирует функциональный, (титр нейтрализующих антител) и минимальный титр антител, составляющий по меньшей мере 50%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 300%, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500% или по меньшей мере 1000% от среднего значения в контрольной сыворотке от являющихся людьми субъектов с инфекционным иммунитетом. В другом варианте осуществления третья бустер-иммунизация продлевает титр антитела на по меньшей мере 4 недели, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 2 года, по меньшей мере на 3 года, по меньшей мере 4 года или по меньшей мере 5 лет после иммунизации.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, индуцирует независимый от Т-клеток или зависимый от Т-клеток ответ. В других вариантах осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, индуцирует Т-клеточный ответ. В других вариантах изобретения частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанная здесь, индуцирует ответ Т-хелперов. В другом варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, индуцирует ответ в направлении Th1-типа или ответ в направлении Th2-типа.

В более конкретных вариантах осуществления на ответ в направлении Th1-типа указывает преобладание антител в виде IgG2 в сравнении с IgG1. В других вариантах осуществления отношение IgG2:IgG1 больше 1:1, больше 2:1, больше 3:1 или больше 4:1. В другом варианте осуществления инфекционная частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанная здесь, характеризуется преобладанием антител в виде IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA или IgE.

В некоторых вариантах осуществления инфекционный, дефектный по репликации вирус Пичинде, экспрессирующий антиген CMV или его фрагмент, индуцирует CD8+ Т-клеточный ответ. В другом варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, индуцирует и CD4+ и CD8+ Т-клеточные ответы, в сочетании с антителами или без них.

В некоторых вариантах осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящих из инфекционного организма, рака или аллергена, описанная здесь, индуцирует высокие титры нейтрализующих антител. В другом варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанная здесь, индуцирует более высокие титры нейтрализующих антител, чем экспрессия компонентов белкового комплекса по отдельности.

В другом варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая один, два, три, четыре, пять или более антигенов, происходящих из инфекционного организма, рака или аллергена, индуцирует более высокие титры нейтрализующих антител, чем частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая один антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают совместное введение частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и по меньшей мере одной дополнительной терапии. В некоторых вариантах осуществления совместное введение является одновременным. В другом варианте осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом вводят до назначения дополнительной терапии. В других вариантах осуществления частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом вводят после назначения дополнительной терапии. В некоторых вариантах осуществления введение частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и дополнительной терапии составляет приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 3 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 ч, приблизительно 7 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 9 ч, приблизительно 10 ч, приблизительно 11 ч или приблизительно 12 ч. В некоторых вариантах осуществления интервал

между введением частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и указанной дополнительной терапией составляет приблизительно 1 день, 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 9 недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 11 недель, приблизительно 12 недель. В некоторых вариантах осуществления интервал между введением частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и дополнительной терапией составляет приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления введение частицы вируса Пичинде, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, или ее композиции уменьшает количество антител, обнаруживаемых в образце крови пациента, или образце сыворотки. В некоторых вариантах осуществления введение частицы вируса Пичинде, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, или ее композиции уменьшает количество инфекционного организма, степень рака или аллергии, обнаруживаемого в моче, слюне, крови, слезах, сперме, образце слущивающихся клеток или женском молоке.

В другом варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанная здесь, или ее композиция может дополнительно содержать репортерный белок. В более конкретном варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, и репортерный белок, описанный здесь, или композиция вводятся субъектам с целью лечения и/или профилактики инфекции, рака или аллергии. В еще одном конкретном варианте осуществления репортерный белок может использоваться для мониторинга экспрессии генов, локализации белка и доставки вакцины *in vivo*, *in situ* и в реальном времени.

В другом варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанная здесь, или ее композиция может дополнительно содержать флуоресцентный белок. В более конкретном варианте осуществления частица вируса Пичинде или частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующая антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, описанная здесь, или ее композиция вводятся субъектам с целью лечения и/или профилактики инфекции, рака или аллергии. В еще одном конкретном варианте осуществления флуоресцентным белком может быть репортерный белок, который может использоваться для мониторинга экспрессии генов, локализации белка и доставки вакцины *in vivo*, *in situ* и в реальном времени.

Изменения функции-ответа СМІ против инфекции, рака или аллергии, индуцированного введением частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака, аллергена, или ее композиции у субъектов может быть определено с помощью любого исследования, известного специалисту в данной области техники, включая, но без ограничения ими, проточную цитометрию (смотрите, например, Perfetto SP et al., 2004, *Nat Rev Immunol.*, 4(8) :648-55), анализы пролиферации лимфоцитов (смотрите, например, Bonilla FA et al., 2008, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 101: 101-4 и Hicks MJ et al., 1983, *Am J Clin Pathol.*, 80:159-63), исследования для измерения активации лимфоцитов, включая определение изменений экспрессии маркеров поверхности после инициации измерения цитокинов Т-лимфоцитов (смотрите, например, Caruso A. et al., *Cytometry*, 1997; 27:71-6), ELISPOT-анализы (смотрите, например, Czerkinsky C.C. et al., 1983, *J Immunol Methods*, 65:109-121; и Hutchings P.R. et al., 1989, *J Immunol Methods*, 120:1-8), или анализы цитотоксичности клеток природных киллеров (смотрите, например, Bonilla F.A. et al., 2006, *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 94(5 Suppl 1):S1-63).

Успешное лечение страдающего раком пациента можно определить как продление ожидаемой выживаемости, индукцию противоопухолевого иммунного ответа или улучшение специфической характеристики рака. Примеры характеристик рака, которые могут быть улучшены, включают размер опухоли (например, T0, Tis или T1-4), состояние метастазирования (например, M0, M1), количество наблюдаемых опухолей, вовлечение узлов (например, N0, N1-4, Nx), степень (т.е. степени 1, 2, 3 или 4), стадию (например, 0, I, II, III или IV), наличие или концентрацию определенных маркеров на клетках или в жидкостях организма (например, AFP, B2M,  $\beta$ -HCG, BTA, CA 15-3, CA 27.29, CA 125, CA 72.4, CA 19-9, кальцитонина, CEA, хромогранина A, EGFR, гормональных рецепторов, HER2, HCG, иммуноглобулинов, NSE, NMP22, PSA, PAP, PSMA, S-100, TA-90 и тиреоглобулина) и/или связанные с ним патологии (например, асцит или отек) или симптомы (например, кахексия, лихорадка, анорексия или боль). Улучшение, если его можно измерить в процентах, может составлять по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% (например, выживаемость или объемные или линейные размеры опухоли).

В другом варианте осуществления здесь описан способ применения описанной здесь частицы вируса Пичинде, экспрессирующей антиген, происходящий из инфекционного организма, рака или аллергена, в которой по меньшей мере одна из ORF, кодирующих GP, NP, белок Z и L-белок, заменена нуклеотид-

ной последовательностью, кодирующей нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, происходящий из инфекционного организма, рака, аллергена, или его антигенный фрагмент.

#### 4.7. Композиции, введение и дозировка

Кроме того, настоящее изобретение относится к вакцинам, иммуногенным композициям (например, вакцинным препаратам) и фармацевтическим композициям, содержащим частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанную здесь. Такие вакцины, иммуногенные композиции и фармацевтические композиции могут быть составлены в соответствии со стандартными процедурами в данной области техники.

Специалисту со средним уровнем компетентности в соответствующих областях техники будет понятно, что подходящие модификации и адаптации описанных здесь способов и применений могут быть очевидными и могут быть осуществлены без отклонения от объема любого их вариантов осуществления.

В другом варианте осуществления здесь представлены композиции, содержащие частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанную здесь. Такие композиции могут использоваться в способах лечения и профилактики заболевания. В конкретном варианте осуществления композиции, описанные здесь, используются для лечения субъектов, инфицированных или восприимчивых к инфекции. В других вариантах осуществления композиции, описанные здесь, используются для лечения субъектов, восприимчивых к или проявляющих симптомы, характерные для рака или онкогенеза, или субъектов с поставленным диагнозом рак. В другом конкретном варианте осуществления иммуногенные композиции, представленные здесь, могут использоваться для индукции иммунного ответа у хозяина, которому вводится композиция. Иммуногенные композиции, описанные здесь, могут использоваться в качестве вакцин и могут быть соответственно составлены в виде фармацевтических композиций. В конкретном варианте осуществления иммуногенные композиции, описанные здесь, используются для профилактики инфекции или рака у субъектов (например, являющихся людьми субъектов). В других вариантах осуществления вакцина, иммуногенная композиция или фармацевтическая композиция пригодны для введения животным и/или людям.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлены иммуногенные композиции, содержащие вектор в виде вируса Пичинде, описанный здесь. В некоторых вариантах осуществления такая иммуногенная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления такая иммуногенная композиция дополнительно содержит адъювант. Адъювант для введения в комбинации с композицией, описанной здесь, может вводиться до, одновременно с или после введения указанной композиции. В некоторых вариантах осуществления термин "адъювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании с или в составе композиции, описанной здесь, увеличивает, усиливает и/или усиливает иммунный ответ против частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и, что наиболее важно, продуктов генов в векторе в виде указанной частицы, но когда соединение вводится отдельно, не индуцирует иммунный ответ против частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и продуктов генов в векторе в виде указанной частицы. В некоторых вариантах осуществления адъювант индуцирует иммунный ответ против частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и продуктов генов в векторе в виде указанной частицы, и не вызывает аллергию или другую неблагоприятную реакцию. Адъюванты могут усиливать иммунный ответ с помощью нескольких механизмов, включая, например, рекрутмент лимфоцитов, стимуляцию В- и/или Т-клеток и стимуляцию макрофагов или дендритных клеток. Когда вакцина или иммуногенная композиция настоящего изобретения содержат адъюванты или вводятся вместе с одним или более адъювантов, адъюванты, которые могут использоваться, включают, но без ограничения ими, адъюванты в виде минеральных солей или гелевые адъюванты с минеральными солями, адъюванты в виде частиц, адъюванты в виде микрочастиц, адъюванты слизистой оболочки и иммуностимулирующие адъюванты. Примеры адъювантов включают, но без ограничения ими, соли алюминия (квасцы) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия), 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (MPL) (смотрите GB 2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), полисорбат 80 (Твин 80, ICL Americas, Inc.), имидазопиридиновые соединения (смотрите международную заявку с № PCT/US2007/064857, опубликованную как публикация международной заявки с № WO 2007/109812), соединения - производные имидазохиноксалина (смотрите международную заявку с № PCT/US2007/064858, опубликованную как публикация международной заявки с № WO 2007/109813) и сапонины, такие как QS21 (смотрите Kensil et al., 1995, in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY); патент США с № 5057540). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой адъювант Фрейнда (полный или неполный). Другие адъюванты представляют собой эмульсии типа "масло в воде" (например, сквален или арахисовое масло), необязательно в сочетании с иммунными стимуляторами, такими как монофосфориллипид А (смотрите Stoute et al., 1997, N. Engl. J. Med., 336, 86-91).

Композиции содержат частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанную здесь отдельно или вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Могут использоваться суспензии или дисперсии частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, особенно изотонические водные суспензии или дисперсии. Фармацевтические компо-

зиции могут быть стерилизованы и/или могут содержать наполнители, например, консерванты, стабилизаторы, смачивающие агенты и/или эмульгаторы, солюбилизаторы, соли для регулирования осмотического давления и/или буферы, и приготовлены хорошо известным образом, например с помощью обычных процессов диспергирования и суспендирования. В некоторых вариантах осуществления такие дисперсии или суспензии могут содержать агенты, регулирующие вязкость. Суспензии или дисперсии выдерживают при температурах от 2 до 8°C или предпочтительно в случае более длительного хранения могут быть заморожены, а затем разморожены незадолго до использования или, альтернативно, могут быть лиофилизированы для хранения. Для инъекций вакцинные или иммуногенные препараты могут быть составлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой раствор. Раствор может содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции дополнительно содержат консервант, например производное ртути тимеросал. В конкретном варианте осуществления описанные здесь фармацевтические композиции содержат 0,001-0,01% тимеросала. В других вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные здесь, не содержат консерванта.

Фармацевтические композиции содержат от приблизительно  $10^3$  до приблизительно  $10^{11}$  бляшкообразующих единиц частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

В одном варианте осуществления введение фармацевтической композиции является парентеральным введением. Парентеральное введение может быть внутривенным или подкожным введением. Соответственно, формами стандартной дозы для парентерального введения являются, например, ампулы или флаконы, например флаконы, содержащие от приблизительно  $10^3$  до  $10^{10}$  бляшкообразующих единиц или от  $10^5$  до  $10^{15}$  физических частиц частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах осуществления термин "10eX" означает 10 в степени X.

В другом варианте осуществления вакцину или иммуногенную композицию, представленную здесь, вводят субъекту, в том числе, но без ограничения, перорально, внутривожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, местно, подкожно, чрескожно, интраназально и путем ингаляции, и с помощью скарификации (царапания через верхние слои кожи, например, с использованием раздвоенной иглы). В частности, могут использоваться подкожные или внутривенные пути.

Для введения интраназально или путем ингаляции препарат для применения в соответствии с настоящим изобретением может быть удобно доставлен в виде аэрозольного распыления из упаковок под давлением или распылителя, с использованием подходящего пропеллента, например дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением единица дозирования может определяться путем обеспечения клапана для доставки дозированного количества. Капсулы и патроны, например, желатина для использования в ингаляторе или инсуффляторах, могут быть составлены с использованием порошковой смеси соединения и в виде подходящей порошкообразной основы, такой как лактоза или крахмал.

Доза активного ингредиента зависит от типа вакцинации и от субъекта, а также от его возраста, веса, индивидуального состояния, индивидуальных фармакокинетических данных и способа введения. В некоторых вариантах осуществления анализ *in vitro* используется, чтобы помочь в определении оптимальных диапазонов доз. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых зависимости от дозы, полученных из тест-систем *in vitro* или систем тестирования моделей на животных.

В некоторых вариантах осуществления вакцина, иммуногенная композиция или фармацевтическая композиция, содержащая частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, может использоваться в качестве живой вакцинации. Примерные дозы для живой частицы вируса Пичинде могут варьировать от 10 до 100 или более, БОЕ живого вируса на дозу. В некоторых вариантах осуществления подходящие дозы частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом составляют  $10^2$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$  или  $10^{12}$  БОЕ, и могут вводиться субъекту один раз, два, три или более раз с интервалами так часто, как это необходимо. В другом варианте осуществления живой вирус Пичинде готовят таким образом, что 0,2-мл доза содержит  $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$  единиц в виде флуоресцирующих фокусов живой частицы вируса Пичинде. В другом варианте осуществления инактивированная вакцина составлена таким образом, что она содержит от приблизительно 15 мкг до приблизительно 100 мкг, от приблизительно 15 мкг до приблизительно 75 мкг, от приблизительно 15 мкг до приблизительно 50 мкг или от приблизительно 15 мкг до приблизительно 30 мкг вируса Пичинде.

В некоторых вариантах осуществления для введения детям две дозы частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанной здесь, или ее композиции, назначаемые с интервалом, составляющим по меньшей мере один месяц, вводятся ребенку. В конкретных вариантах осуществления для введения взрослым вводится однократная доза частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанной здесь, или ее композиции. В другом варианте осуществления взрослому вводятся две дозы частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанной здесь, или ее композиции, назначаемые с интервалом, составляю-

щим по меньшей мере один месяц. В другом варианте осуществления маленькому ребенку (от шести месяцев до девяти лет) можно вводить частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанную здесь, или ее композицию в первый раз в виде двух доз, назначаемых с интервалом, составляющим один месяц. В конкретном варианте осуществления ребенок, который получил только одну дозу в первый год вакцинации, должен получить две дозы в следующем году. В некоторых вариантах осуществления две дозы, вводимые с интервалом в 4 недели, являются предпочтительными для детей в возрасте от 2 до 8 лет, которым впервые вводят иммуногенную композицию, описанную здесь. В некоторых вариантах осуществления для детей в возрасте 6-35 месяцев может быть предпочтительной половина дозы (0,25 мл), в противоположность 0,5 мл, которая может быть предпочтительной для субъектов старше трех лет.

В некоторых вариантах осуществления композиции могут вводиться пациенту в однократной дозе, содержащей терапевтически эффективное количество частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. В некоторых вариантах изобретения частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом можно вводить пациенту в однократной дозе, содержащей терапевтически эффективное количество частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом и одну или более фармацевтических композиций, каждая в терапевтически эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят пациенту в виде однократной дозы с последующей второй дозой через три-шесть недель. В соответствии с этими вариантами осуществления бустерные прививки могут назначаться субъектам с интервалами от шести до двенадцати месяцев после второй прививки. В некоторых вариантах осуществления в бустерных прививках может использоваться другой вирус Пичинде или его композиция. В некоторых вариантах осуществления введение той же композиции, что и описанная здесь композиция, может повторяться и разделяться по меньшей мере 1 днем, 2 днями, 3 днями, 4 днями, 5 днями, 10 днями, 15 днями, 30 днями, 45 днями, 2 месяцами, 75 днями, 3 месяцами или по меньшей мере 6 месяцами.

Также здесь представлены способы и применения частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом для производства вакцин в форме фармацевтических препаратов, которые содержат частицу вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом в качестве активного ингредиента. Фармацевтические композиции настоящего изобретения готовят хорошо известным образом, например, посредством обычных процессов смешивания и/или диспергирования.

#### 4.8. Анализы.

##### 4.8.1. Анализы на обнаружение вируса Пичинде.

Квалифицированный специалист мог бы обнаружить геномный сегмент вируса Пичинде или частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом, описанной здесь, используя известные в данной области техники способы. Например, ОТ-ПЦР (RT-PCR) может использоваться с праймерами, специфическими для вируса Пичинде, для обнаружения и количественного определения геномного сегмента вируса Пичинде, который был сконструирован, чтобы служить носителем ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. Вестерн-блоттинг, ELSA, радиоиммунологический анализ, иммунопреципитация, иммуноцитохимия или иммуноцитохимия в сочетании с FACS (клеточным сортером с возбуждением флуоресценции) могут использоваться для количественного определения генных продуктов геномного сегмента вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

##### 4.8.2. Анализ для измерения инфективности.

Любой анализ, известный специалисту в данной области техники, может использоваться для измерения инфективности препарата вектора в виде вируса Пичинде. Например, определение титра вируса/вектора может быть выполнено с помощью "анализа фокусообразования" (анализа ФОЕ). Вкратце, комплементирующие клетки, например клетки MC57, высевают и инокулируют различными разведениями образца вируса/вектора. После инкубационного периода для допуска образования клетками монослоя и прикрепления вируса к клеткам, монослой покрывают метилцеллюлозой. Когда планшеты дополнительно инкубируются, исходные инфицированные клетки высвобождают вирусное потомство. Из-за покрытия метилцеллюлозой распространение новых вирусов ограничено соседними клетками. Следовательно, каждая инфекционная частица образует кольцевую зону инфицированных клеток, называемую фокусом. Такие фокусы можно сделать видимыми и тем самым счетными с использованием антител против NP вируса Пичинде или другого белка, экспрессируемого частицей вируса Пичинде или частицей вируса Пичинде с трехсегментным геномом, и цветной реакции на основе HRP. Титр вируса/вектора можно рассчитать в фокусообразующих единицах на миллилитр (ФОЕ/мл).

##### 4.8.3. Рост частицы вируса Пичинде.

Рост частицы вируса Пичинде, описанной здесь, может быть оценен любым способом, известным в данной области техники или описанным здесь (например, с использованием клеточной культуры). Рост вируса может быть определен путем инокуляции серийных разведений описанной здесь частицы вируса Пичинде в клеточные культуры (например, клетки ВНК-21). После инкубации вируса в течение определенного времени вирус выделяют, используя стандартные методы.

#### 4.8.4. ELISA для сыворотки.

Определение гуморального иммунного ответа при вакцинации животных (например, мышей, морских свинок) может быть выполнено с помощью антигенспецифических сывороточных ELISA (иммуноферментных твердофазных иммуносорбентных анализов). Вкратце, планшеты покрывают антигеном (например, рекомбинантным белком), блокируют во избежание неспецифического связывания антител и инкубируют с серийными разведениями сывороток. После инкубации связанные антитела из сывороток могут быть обнаружены, например, с использованием связанного с ферментом специфического для вида (например, мыши, морской свинки) антитела (для обнаружения подклассов IgG или IgG в целом) и последующей цветной реакции. Титры антител могут быть определены, например, как конечный среднегеометрический титр.

#### 4.8.5. Анализ для измерения нейтрализующей активности индуцированных антител.

Определение нейтрализующих антител в сыворотках проводят с использованием следующего анализа клеток, используя клетки ARPE-19 из ATCC и GFP-меченный вирус. Кроме того, используется дополнительная сыворотка морской свинки в качестве источника экзогенного комплемента. Анализ начинается с посева  $6,5 \times 10^3$  клеток/лунку (50 мкл/лунку) в 384-луночный планшет за один или два дня до культивирования тканей без клеток в течение 1 ч при 37°C. После стадии инкубации-нейтрализации смесь добавляют к клеткам и инкубируют в течение еще 4 дней для обнаружения GFP с помощью считывающего устройства для планшетов. Положительная (нейтрализующая) сыворотка человека используется в качестве положительного контроля анализа в каждом планшете для проверки достоверности всех результатов. Титры (EC50) определяют, используя подбор 4-х параметрической логистической кривой. В качестве дополнительной проверки лунки проверяют с помощью флуоресцентного микроскопа.

#### 4.8.6. Анализ подавления бляшкообразования.

Вкратце, анализы подавления (нейтрализации) бляшкообразования для вируса Пичинде могут быть выполнены с использованием компетентного или дефектного по репликации вируса Пичинде, который помечен зеленым флуоресцентным белком, 5% сыворотка кролика может использоваться в качестве источника экзогенного комплемента, и бляшки могут быть подсчитаны с помощью флуоресцентной микроскопии. Титры нейтрализации могут быть определены как наибольшее разведение сыворотки, которое приводит к 50, 75, 90 или 95% подавлению бляшкообразования, по сравнению с таковыми в контрольных (до иммунизации) образцах сыворотки.

кПЦР: РНК-геномы вируса Пичинде выделяют с использованием набора QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) в соответствии с протоколом, предоставленным изготовителем. Эквиваленты РНК-генома вируса Пичинде детектируют с помощью количественной ПЦР, проводимой в ПЦР-системе StepOnePlus в режиме реального времени (Applied Biosystems) с использованием набора Superscript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) и праймеров и зондов (репортера FAM и гасителя NFQ-MG), специфических для части кодирующей NP вируса Пичинде области или другого геномного участка частицы вируса Пичинде или частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом. Профилем температур реакции может быть: 30 мин при 60°C, 2 мин при 95°C, а затем 45 циклов из 15 с при 95°C, 30 с при 56°C. РНК может быть количественно определена путем сопоставления результатов для образцов со стандартной кривой, построенной исходя из десятичного логарифма серии разведений спектрофотометрически количественно определяемого, *in vitro* транскрибированного фрагмента РНК, соответствующего фрагменту последовательности, кодирующей NP, или другого геномного участка частицы вируса Пичинде или частице вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащего сайты связывания праймера и зонда.

#### 4.8.7. Вестерн-блоттинг.

Инфицированные клетки, выращенные в матрасах для культивирования тканей или в суспензии, лизируют в указанные моменты времени после инфицирования с использованием буфера RIPA (Thermo Scientific) или используют непосредственно без лизиса клеток. Образцы нагревают до 99°C в течение 10 мин вместе с восстановителем и буфером для образца NuPage LDS (NOVEX) и охлаждают до комнатной температуры перед загрузкой в 4-12% SDS-гели для электрофореза. Белки блоттируют на мембраны с использованием устройства для переноса iBlot Gel и визуализируют путем окрашивания с использованием диазокрасителя Понсо. Наконец, препараты исследуют с помощью первых антител, направленных против представляющих интерес белков, и вторых антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой, с последующим окрашиванием с использованием раствора 1-Step NBT/BCIP (INVITROGEN).

#### 4.8.8. Анализ окрашивания пептид-МНС-мультимерных комплексов для обнаружения пролиферации антигенспецифических CD8+ Т-клеток.

Любое исследование, известное специалисту в данной области техники, может использоваться для исследования антигенспецифических CD8+ Т-клеточных ответов. Например, можно использовать анализ окрашивания пептид-МНС-мультимерных комплексов (смотрите, например, Altman JD et al., *Science*, 1996, 274: 94-96 и Murali-Krishna K. et al., *Immunity*, 1998; 8: 177-187). Вкратце, анализ включает следующие этапы, для выявления присутствия антигенспецифических Т-клеток используют анализ тетраме-



ров. Для того чтобы Т-клетка обнаруживала пептид, в отношении которого она является специфической, она должна распознавать как пептид, так и тетрамер молекул МНС, специализированный в отношении определенной антигенной специфичности и гаплотипа МНС Т-клеток (обычно флуоресцентно меченых). Затем тетрамер обнаруживается с помощью проточной цитометрии через флуоресцентную метку.

#### 4.8.9. Анализ ELISPOT для обнаружения пролиферации антигенспецифических CD4+ Т-клеток.

Любое исследование, известное специалисту в данной области техники, может использоваться для исследования антигенспецифических CD4+ Т-клеточных ответов. Например, может быть использован анализ ELISPOT (смотрите, например, Czerkinsky CC et al., *J. Immunol Methods*, 1983, 65: 109-121, Hutchings PR et al., *J. Immunol Methods*, 1989; 120: 1-8). Вкратце, анализ включает следующие этапы: Планшет для спот-иммуноанализа покрывают антителом против цитокина. Клетки инкубируют в планшете для спот-иммуноанализа. Клетки секретируют цитокины и затем смываются. Затем планшеты покрывают вторым биотинилированным антителом против цитокина и визуализируют с помощью системы авидин-HRP.

#### 4.8.10. Анализ внутриклеточных цитокинов для определения функциональности CD8+ и CD4+ Т-клеточных ответов.

Любое исследование, известное специалисту в данной области техники, может использоваться для проверки функциональности CD8+ и CD4+ Т-клеточных ответов. Например, можно использовать анализ внутриклеточных цитокинов в сочетании с проточной цитометрией (смотрите, например, Suni MA et al., *J. Immunol Methods*, 1998; 212: 89-98; Nomura LE et al., *Cytometry*, 2000; 40:60-68 и Ghanekar SA et al., *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2001; 8: 628-63). Вкратце, анализ включает следующие стадии: активацию клеток через специфические пептиды или белок, ингибирование переноса белков (например, брэфельдин А добавляют для сохранения цитокинов внутри клетки). После определенного периода инкубации, обычно 5 ч, следуют стадии промывки, и к клеткам могут быть добавлены антитела к другим клеточным маркерам. Затем клетки фиксируют и нарушают проницаемость их мембраны. Добавляют конъюгированные с флуорохромом антитела против цитокинов, и клетки могут быть проанализированы с помощью проточной цитометрии.

#### 4.8.11. Анализ для подтверждения дефектности по репликации вирусных векторов.

Любое исследование, известное специалисту в данной области техники, с помощью которого определяется концентрация инфекционных и компетентных по репликации вирусных частиц, также может использоваться для измерения дефектных по репликации вирусных частиц в образце. Например, для этой цели могут быть использованы анализы ФОВ с использованием некомплементирующих клеток.

Кроме того, анализы на основе бляшек являются стандартным методом, используемым для определения концентрации вируса в бляшкообразующих единицах (БОЕ) в образце вируса. В частности, конфлюэнтный монослой некомплементирующих клеток-хозяев инфицируют вирусом в различных разведениях и покрывают полутвердой средой, такой как агар, для предотвращения бесконтрольного распространения вирусной инфекции. Вирусная бляшка образуется, когда вирус успешно инфицирует и реплицирует себя в клетке в монослое фиксированных клеток и распространяется на окружающие клетки (смотрите, например, Kaufmann, S.H.; Kabelitz, D. (2002) *Methods in Microbiology Vol.32: Immunology of Infection*. Academic Press. ISBN 0-12-521532-0). Образование бляшек может занять от 2 до 14 дней, в зависимости от анализируемого вируса. Бляшки обычно подсчитывают вручную, и результаты в сочетании с коэффициентом разбавления, используемым для приготовления чашки, используют для расчета количества бляшкообразующих единиц на единицу объема образца (БОЕ/мл). Результат в БОЕ/мл представляет собой количество инфекционных компетентных по репликации частиц в образце. Когда используются С-клетки, один и тот же анализ может быть использован для титрования дефектных по репликации частиц вируса Пичинде или частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом.

#### 4.8.12. Анализ экспрессии вирусного антигена.

Любой анализ, известный специалисту в данной области техники, может использоваться для измерения экспрессии вирусных антигенов. Например, анализы ФОВ могут быть выполнены. Для обнаружения используют препараты моно- или поликлональных антител против соответствующих вирусных антигенов (трансген-специфические ФОВ).

#### 4.8.13. Модели на животных.

Для исследования рекомбинации и инфективности частицы вируса Пичинде, описанной здесь, могут использоваться *in vivo* модели на животных. В некоторых вариантах осуществления модели на животных, которые могут использоваться для исследования рекомбинации и инфективности частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом, включают мышь, морскую свинку, кролика и обезьяну. В предпочтительном варианте осуществления модели на животных, которые могут использоваться для исследования рекомбинации и инфективности вируса Пичинде, включают мышь. В более конкретном варианте осуществления мыши, которые могут использоваться для исследования рекомбинации и инфективности частицы вируса Пичинде, является трижды дефицитными по интерфероновому рецептору типа I, интерфероновому рецептору типа II и активирующему рекомбинацию гену 1 (RAG1).

В некоторых вариантах осуществления модели на животных могут использоваться для определения инфективности вируса Пичинде и стабильности трансгена. В некоторых вариантах осуществления ви-

русная РНК может быть выделена из сыворотки модели на животном. Способы хорошо известны специалистам в данной области техники. Вирусная РНК может быть подвергнута обратной транскрипции, и кДНК, несущая ORF вируса Пичинде, может быть амплифицирована с помощью ПЦП с использованием ген-специфических праймеров. Проточная цитометрия также может использоваться для исследования инфективности вируса Пичинде и стабильности трансгена.

### 5. Примеры

Эти примеры демонстрируют, что векторная технология на основе вируса Пичинде может быть использована для успешной разработки (1) геномного сегмента вируса Пичинде с вирусной ORF в положении, отличном от положения ORF дикого типа, и (2) частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом, которая не приводит к образованию компетентной по репликации частицы вируса с двухсегментным геномом.

#### 5.1. Материалы и методы.

##### 5.1.1. Клетки.

Клетки ВНК-21 культивировали в модифицированной по Дульбекко среде Игла с высоким содержанием глюкозы (DMEM, Sigma), дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сывороткой (FCS, Biocrom), 10 mM HEPES (Gibco), 1 mM пируватом натрия (Gibco) и 1× триптозофосфатным бульоном. Клетки культивировали при 37°C во влажной камере с 5% CO<sub>2</sub>. 293-T-клетки культивировали в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM, содержащей глутамакс, Sigma), дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сывороткой (FCS).

##### 5.1.2. Трансгены.

(1) Зеленый флуоресцентный белок (GFP) синтезировали как GFP-Bsm (SEQ ID NO:9) с фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI для клонирования методом "бесшовного соединения". (2) Слитый белок, состоящий из i) сигнального пептида вируса гликопротеина вируса везикулярного стоматита (VSVG), ii) антигена P1A линии клеток мастоцитомы мыши P815, iii) линкера GSG, iv) пептида 2A энтеровируса и v) GM-CSF мыши. Этот слитый белок будет называться sP1AGM. Авторы настоящего изобретения синтезировали его с фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI как sP1AGM-Bsm (SEQ ID NO:10) для клонирования методом "бесшовного соединения". (3) GP вируса Пичинде с фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI для клонирования методом бесшовного соединения для воссоздания плазмиды для экспрессии S-сегмента вируса Пичинде дикого типа (в S-сегменте отсутствуют сайты для BbsI) (SEQ ID NO:8).

##### 5.1.3. Плазмиды.

Авторы настоящего изобретения синтезировали модифицированную кДНК для кодирующей L-белок ORF изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EF529747.1), в которую была введена некодирующая мутация для удаления сайта рестрикции BsmBI. Эта синтетическая ORF с подходящим образом фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI, а также сайтами рестрикции EcoRI и NheI (LABsmBI; SEQ ID NO:3) была введена в вектор для экспрессии под управлением полимеразы-II (pol-II) pCAGGS, получая pC-PIC-L-Bsm (фиг. 3) для экспрессии L-белка вируса Пичинде в эукариотических клетках.

Авторы настоящего изобретения синтезировали модифицированный L-сегмент (PIC-L-GFP-Bsm; SEQ ID NO:4) изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EF529747.1), в котором кодирующая L-белок ORF была удалена и заменена на кодирующую GFP ORF с фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI с каждой стороны. Эта синтетическая кДНК вводилась в кассету для экспрессии под управлением полимеразы I (pol-I) (Pinschewer et al., J Virol, 2003 Mar, 77 (6): 3882-7), получая pol-I-PIC-L-GFP-Bsm (фиг. 3).

Авторы настоящего изобретения расщепили PIC-L-Bsm с помощью BsmBI, чтобы вставить BsmBI-мутированную кодирующую L-белок ORF в одинаково расщепленный остов pol-I-PIC-L-GFP-Bsm, тем самым заменяя ORF, кодирующую GFP, кодирующей L-белок ORF, чтобы "бесшовно" воссоздать кДНК для L-сегмента вируса Пичинде, с удалением всех сайтов рестрикции для клонирования.

Результирующая плазида pol-I-PIC-L (фиг. 3) была предназначена для внутриклеточной экспрессии полноразмерного L-сегмента вируса Пичинде (PIC-L-seg; SEQ ID NO:2) в эукариотических клетках.

Авторы настоящего изобретения синтезировали кДНК для модифицированного S-сегмента изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EF529746.1), названную PIC-miniS-GFP (SEQ ID NO:5), в которой кодирующая GP ORF была заменена на два сайта рестрикции BsmBI, и кодирующая NP ORF была заменена кодирующей GFP ORF с двумя фланкирующими сайтами рестрикции BbsI. Эта синтетическая кДНК была введена в кассету для экспрессии под управлением полимеразы I мыши (pol-I) (Pinschewer et al., J Virol, 2003 Mar, 77 (6): 3882-7), получая pol-I-PIC-miniS-GFP (фиг. 3).

Авторы настоящего изобретения синтезировали модифицированную кДНК для кодирующей NP ORF изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: Eb529747.1), в которую была введена некодирующая мутация для удаления обоих сайтов рестрикции BbsI. Эта синтетическая ORF с подходящим образом фланкирующими сайтами рестрикции BbsI, а также сайтами рест-

рикции EcoRI и NheI (NPABbsI; SEQ ID NO:6) была введена в вектор для экспрессии под управлением полимеразы-II (pol-II) pCAGGS, получая pC-PIC-NP-Bbs (фиг. 3) для экспрессии белка NP вируса Пичинде в эукариотических клетках.

Авторы настоящего изобретения расщепили NPABbsI с помощью BbsI, чтобы вставить BbsI-мутированную кодирующую NP ORF в одинаково расщепленный остов pol-I-PIC-miniS-GFP, тем самым заменяя ORF, кодирующую GFP, кодирующей NP ORF, чтобы "бесшовно" воссоздать часть 3'-UTR-NP-IGR кДНК для S-сегмента вируса Пичинде, с удалением всех сайтов рестрикции для целей клонирования. Результирующая плаزمида pol-I-PIC-NP-Bsm (фиг. 3), экспрессирующая PIC-NP-Bsm (SEQ ID NO:7) под контролем pol-I, была предназначена для приема представляющих интерес трансгенов, которые должны быть вставлены между 5'-UTR и IGR, путем "бесшовной" замены сайтов рестрикции BsmBI для экспрессии результирующего рекомбинантного S-сегмента вируса Пичинде в эукариотических клетках.

Авторы настоящего изобретения синтезировали модифицированную кДНК для кодирующей GP ORF изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EN529747.1), в которую была введена некодирующая мутация для удаления обоих сайтов рестрикции BbsI. Аналогично NPABbsI, эта синтетическая ORF была введена в остов pol-I-PIC-miniS-GFP, тем самым заменяя ORF, кодирующую GFP, кодирующей GP ORF, чтобы "бесшовно" воссоздать часть 3'-UTR-GP-IGR кДНК для S-сегмента вируса Пичинде, с удалением всех сайтов рестрикции для целей клонирования. Результирующая плазмида pol-I-PIC-GP-Bsm (фиг. 3), экспрессирующая PIC-GP-Bsm (SEQ ID NO:8), была предназначена для приема представляющих интерес трансгенов, которые должны быть вставлены между 5'-UTR и IGR, путем "бесшовной" замены сайтов рестрикции BsmBI, для экспрессии рекомбинантного S-сегмента вируса Пичинде в эукариотических клетках.

Затем авторы настоящего изобретения ввели в pol-I-PIC-NP-Bsm следующие гены и трансгены: 1. GFP, 2. sP1AGM и 3. GP вируса Пичинде, все с фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI.

Результирующие плазмиды были обозначены: pol-I-PIC-NP-GFP (экспрессирующая PIC-NP-GFP, также известная как S-NP/GFP, SEQ ID NO:11) и pol-I-PIC-NP-sP1AGM (экспрессирующая PIC-NP-sP1AGM; SEQ ID NO:12) и pol-I-PIC-S (экспрессирующая PIC-S, SEQ ID NO:1). Аналогично, авторы настоящего изобретения ввели GFP или sP1AGM в pol-I-PIC-GP-Bsm, получая pol-I-PIC-GP-GFP (экспрессирующую PIC-GP-GFP, также известную как S-GP/GFP; SEQ ID NO:13) и pol-I-PIC-GP-sP1AGM (экспрессирующую PIC-GP-sP1AGM; SEQ ID NO:14).

#### 5.1.4. ДНК-трансфекция клеток и спасение рекомбинантных вирусов.

Клетки ВНК-21, стабильно трансфицированные для экспрессии гликопротеина вируса лимфоцитарного хориоменингита (клетки ВНК-GP, Flatz et al. Nat Med., 2010 Mar; 16(3): 339-45), высевали в 6-луночные планшеты с плотностью  $5 \times 10^5$  клеток/лунку и трансфицировали через 24 ч различными количествами ДНК с использованием того или другого липофектамина (приблизительно 3 мкл/мкг ДНК, Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Для спасения рекомбинантных вирусов с двухсегментным геномом полностью из плазмидной ДНК, два минимальных вирусных транс-действующих фактора NP и L были доставлены из плазмид под управлением pol-II (0,8 мкг pC-PIC-NP-Bbs, 1,4 мкг pC-PIC-L-Bsm) и были котрансфицированы с использованием 1 мкг pol-I-PIC-L и 0,8 мкг pol-I-PIC-S. В случае спасения вируса r3PIC с трехсегментным геномом, состоящего из одного L- и двух S-сегментов, в смесь для трансфекции включали 0,8 мкг обоих S-сегментов под управлением pol-I. Через 72 ч после трансфекции клетки и супернатант переносили в 75 см<sup>2</sup> матрас для культивирования тканей, и супернатант собирали еще через 48-96 ч. Инфективность вирусов определяли в анализе фокусообразования, и вирус пассировали в течение 48 ч на нормальных клетках ВНК-21 для дальнейшей амплификации (множественность заражения=0,01 в течение 48 ч). Титры вируса в полученных таким образом вирусных биомассах снова определяли путем анализа фокусообразования.

#### 5.1.5. Вирусы и кинетика роста вирусов.

Биомассы вирусов дикого типа и рекомбинантных вирусов получали путем инфицирования либо клеток ВНК-21, либо 293-Т-клеток с множественностью заражения (MOI)=0,01, и супернатант собирали через 48 ч после инфицирования. Кривые роста вирусов получали *in vitro* в формате матраса для культивирования клеток Т75. Клетки ВНК021 высевали с плотностью  $5 \times 10^6$  клеток/матрас и инфицировали через 24 ч путем инкубации клеток вместе с 5 мл вирусного инокулята с MOI=0,01 в течение 90 мин на качающемся планшете при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Добавляли свежую среду и клетки инкубировали при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Супернатант отбирали в заданные моменты времени (обычно 24, 48, 72 ч) и титры вируса анализировали путем анализа фокусообразования.

#### 5.1.6. Анализ фокусообразования.

Затем титры вируса Пичинде определяют с помощью анализа фокусообразования. 293-Т-клетки или клетки 3Т3 использовали для анализа фокусообразования, если не указано иное. Клетки высевали с плотностью  $3 \times 10^4$  клеток на лунку в 96-луночном планшете и смешивали с 100 мкл 3,17-кратных серийных разведений вируса, приготовленных в MEM/2% FCS. Спустя 2-4 ч инкубации при 37°C в каждую лунку добавляли 80 мкл вязкой среды (2% метилцеллюлозы в 2× дополненной DMEM) для обеспечения распространения вирусных частиц только на соседние клетки. Через 48 ч при 37°C супернатант отбрасы-

вали, и клетки фиксировали добавлением 100 мкл метанола в течение 20 мин при комнатной температуре (все последующие этапы выполняют при комнатной температуре). Проницаемость мембраны клеток нарушали с использованием 100 мкл на лунку BSS/1% Triton X-100 (Merck Millipore) в течение 20 мин, и впоследствии клетки блокировали в течение 60 мин PBS/5% FCS. Для окрашивания на NP в качестве первого окрашивающего антитела использовали моноклональное антитело крысы против NP вируса Пичинде, разведенное в PBS/2,5% FCS, в течение 60 мин. Планшеты промывали три раза водопроводной водой, и второе конъюгированное с HRP козье антикроличье антитело в виде IgG добавляли в разведении 1:100 в PBS/2,5% FCS и инкубировали в течение 1 ч. Планшет снова трижды промывали водопроводной водой. Добавляли цветную реакцию (0,5 г/л DAB (Sigma D-5637), 0,5 г/л сульфата никеля-аммония в PBS/0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), и реакцию останавливали через 10 мин с помощью водопроводной воды. Были подсчитаны окрашенные фокусы, и конечный титр рассчитывали в соответствии с разведением.

#### 5.1.7. Мыши.

Мышей BALB/c покупали в Charles River Laboratories и размещали в специальных условиях без патогенов (SPF) для экспериментов. Все эксперименты на животных проводились в University of Basel в соответствии со швейцарским законодательством о защите животных и разрешением соответствующих ответственных кантональных органов власти. Инфицирование мышей проводили внутривенно в дозе  $1 \times 10^5$  ФОЕ на мыш.

#### 5.1.8. Проточная цитометрия.

Кровь окрашивали тетрамерами MHC класса I, загружаемыми с помощью иммунодоминантного происходящего от P1A H-2L<sup>d</sup>-рестрицированного эпитопа LPYLGWLVF (Aa35-43) в комбинации с антителами против CD8a и против B220, и частоты возникновения эпитоп-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток определяли на проточном цитометре BD LSRFortessa, и данных обрабатывали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

#### 5.1.9. Статистический анализ.

Статистическую значимость определяли с помощью двухстороннего t-критерия для независимых выборок, используя программное обеспечение Graphpad Prism (версии 6.0d).

### 5.2. Результаты.

5.2.1. Разработка на основе вируса Пичинде с трехсегментным геномом векторов с искусственной организацией генома.

Геном вируса Пичинде дикого типа состоит из двух одноцепочечных РНК-сегментов негативной полярности (одного L-, одного S-сегмента) (фиг. 1A). Для векторов в виде компетентных по репликации вирусов Пичинде с трехсегментным геномом с искусственной организацией генома (r3PIC-art, фиг. 1B, 1C и 1D), авторы настоящего изобретения разработали систему спасения кДНК под управлением полимеразы I/II, основанную на кассетной системе, позволяющей "бесшовное" введение выбранных трансгенов по выбору между 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR) и межгенной областью (IGR) дублированных S-сегментов. Стратегия молекулярного клонирования для "бесшовной" вставки (т.е. без участков остаточных нуклеотидов, происходящих от молекулярного клонирования и, таким образом, без дополнительных сайтов распознавания рестрикционными ферментами) трансгенов в S-сегменты аренавируса с использованием сайтов рестрикции BsmBI, которые полностью удаляются при вставке трансгена и, таким образом, отсутствуют в результирующем рекомбинантном вирусе, была подробно описана Pirschewer et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24; 100 (13): 7895-900, поддерживающий фиг. 4. Фермент BbsI использовали для "бесшовного" клонирования аналогично, как описано Flick et al. J Virol. 2001 Feb, 75 (4): 1643-55. Эти геномы r3PIC-art, основанные на вирусах Пичинде, состояли из L-сегмента вируса Пичинде дикого типа вместе с искусственно дублированными S-сегментами, предназначенными для службы носителем либо нуклеопротеина (NP), либо гликопротеина (GP) под контролем 3'-UTR, т.е. между 3'-UTR и IGR. Это оставило в каждом S-сегменте одно положение для вставки трансгена, т.е. один трансген, каждый, мог быть вставлен между 5'-UTR и IGR каждого из двух S-сегментов, соответственно.

5.2.2. Инфекционный GFP-экспрессирующий вирус, спасенный из являющихся рекомбинантными вирусами с трехсегментным геномом векторов с искусственной организацией генома.

Для образования рекомбинантного вируса Пичинде с трехсегментным геномом авторы настоящего изобретения синтезировали множество плазмид, описанных в разделе 5.1.3. Клетки ВНК-21 были трансфицированы следующей комбинацией плазмид:

- (A) S-сегментным минигеном: pC-PIC-L-Bsm, pC-PIC-NP-Bbs, pol-I-PIC-miniS-GFP;
- (B) L-сегментным минигеном: pC-PIC-L-Bsm, pC-PIC-NP-Bbs, pol-I-PIC-L-GFP-Bsm;
- (C) r3PIC-GFP<sup>art</sup>: pC-PIC-L-Bsm, pC-PIC-NP-Bbs, pol-I-PIC-L, pol-I-PIC-NP-GFP, pol-I-PIC-GP-GFP;
- (D) rPIC<sup>wt</sup>: pC-PIC-L-Bsm, pC-PIC-NP-Bbs, pol-I-PIC-L, pol-I-PIC-S.

Авторы настоящего изобретения обнаружили экспрессию GFP через 48 ч после трансфекции S- и L-сегментных минигеномов (фиг. 4, комбинаций плазмид А и В, описанных выше), документально подтверждая внутриклеточное восстановление функциональных аналогов S- и L-сегментов вируса Пичинде в виде рибонуклеопротеинов (RNP), которые были активны в отношении экспрессии генов. Аналогично, трансфекция С, нацеленная на образование r3PIC-GFP<sup>art</sup>, показала GFP-позитивные клетки через 48 ч после трансфекции, тогда как комбинация плазмид D для образования rPIC<sup>wt</sup> не показала зеленой флуо-

ресценции, как и ожидалось. Через 168 ч после трансфекции GFP-позитивные клетки в основном исчезали в случае трансфекций S- и L-сегментных минигеномов, но часто встречались среди клеток с гЗРiC-GFP<sup>art</sup>, что указывает на то, что инфекционный, GFP-экспрессирующий вирус был восстановлен из кДНК и размножен в культуре клеток.

5.2.3. Рекомбинантные вирусы с трехсегментным геномом растут до более низких титров, чем вирус Пичинде дикого типа.

Сравнительные кривые роста были получены с вирусами, полученными с использованием гРiC<sup>wt</sup> и гЗРiC-GFP<sup>art</sup> (фиг. 2). Супернатант от трансфекции С и D из раздела 5.2.2 собирали и пассировали параллельно на клетках ВНК-21 (множественность заражения=0,01, фиг. 2). Для обоих вирусов максимальная инфективность была достигнута через 48 ч, но для гЗРiC-GFP<sup>art</sup> она была значительно ниже, чем для гРiC<sup>wt</sup>. Это указывало на то, что гЗРiC-GFP<sup>art</sup> с трехсегментным геномом был аттенуированным по сравнению с родительским вирусом дикого типа с двухсегментным геномом.

5.2.4. Рекомбинантный гЗРiC, экспрессирующий sP1AGM, индуцирует быстрый, сильный и полифункциональный P1A-специфический CD8+ Т-клеточный ответ.

Для проверки полезности технологии доставки векторов гЗРiC<sup>art</sup> с целью вакцинации, авторы настоящего изобретения сконструировали векторную вакцину гЗРiC-sP1AGM<sup>art</sup> (фиг. 1D) с организацией генома, аналогичной гЗРiC-GFP<sup>art</sup> (фиг. 1C). Авторы настоящего изобретения создали вирус, экспрессирующий sP1AGM (гЗРiC-sP1AGM<sup>art</sup>), с помощью процедур, аналогичных описанным выше для гЗРiC-GFP<sup>art</sup>, но используя плазмиды pol-I-PiC-NP-sP1AGM и pol-I-PiC-GP-sP1AGM вместо pol-I-PiC-NP-GFP и pol-I-PiC-GP-GFP, соответственно. Авторы настоящего изобретения иммунизировали мышью BALB/c внутривенно 10e5 фокусообразующих единиц (ФОЕ) гЗРiC-sP1AGM<sup>art</sup>, и через восемь дней измеряли CD8+ Т-клеточные ответы против иммунодоминантного P1A-происходящего H-2Ld-рестрицированного эпитопа LPYLGWLVF (Aa35-43) с помощью проточной цитометрии с использованием тетрамеров МНС класса I. Мыши, иммунизированные гЗРiC-sP1AGM<sup>art</sup>, демонстрировали очень значительные популяции P1A35-43-специфических CD8 Т-клеток в периферической крови, которые отсутствовали в крови неиммунизированных мышей (фиг. 5A и 5B). Эти наблюдения показали, что вирусные векторы на основе гЗРiC<sup>art</sup> являются в высокой степени иммуногенными, что делает их перспективными средствами для иммунотерапии и вакцинации.

5.2.5. При тестировании в раннем пассаже после спасения из кДНК как рекомбинантный вирус с трехсегментным геномом, предназначенный для экспрессии генов гликопротеина и нуклеопротеина в их соответствующем природном положении, так и рекомбинантный вирус с трехсегментным геномом, искусственно сконструированный для экспрессии его гликопротеина под контролем промотора 3' его не-транслируемой области (UTR), вырастают до более низких титров, чем вирус Пичинде дикого типа.

Авторы настоящего изобретения сконструировали вирус Пичинде с трехсегментным геномом, который экспрессировал свои гены гликопротеина (GP) и нуклеопротеина (NP) под контролем промоторов 5' и 3'-UTR, соответственно, т.е. в их соответствующем "природном" положении в контексте искусственно дублированных S-сегментов, состоящих из S-GP/GFP<sup>nat</sup> (SEQ ID NO:15) и S-NP/GFP (также известно как PiC-NP-GFP, SEQ ID NO:11) (фиг. 6). Этот вирус гЗРiC-GFP<sup>nat</sup> был создан с помощью процедур, аналогичных описанным выше для вируса с трехсегментным геномом гЗРiC-GFP<sup>art</sup>. гЗРiC-GFP<sup>nat</sup> экспрессировал GFP, как схематично показано на фиг. 6. При выращивании в клетках ВНК-21 в культуре (множественность заражения=0,01, со сбором через 48 ч) гЗРiC-GFP<sup>nat</sup> достигал существенно более низких титров, чем гРiC<sup>wt</sup>, титров, которые были так же низки, как и в случае гЗРiC-GFP<sup>art</sup> (фиг. 7, символы показывают титры из отдельных параллельных ячеек клеточной культуры, "усы" обозначают среднее значение +/- SD (стандартное отклонение)). Это указывало на то, что гЗРiC-GFP<sup>nat</sup> с трехсегментным геномом был аттенуированным по сравнению с родительским вирусом дикого типа с двухсегментным геномом.

5.2.6. Во время персистирующей инфекции у иммунодефицитных мышей рекомбинантные вирусы с трехсегментным геномом с искусственной организацией генома (гЗРiC-GFP<sup>art</sup>) сохраняют экспрессию трансгена GFP и остаются в неизменно более низких титрах вирусов в крови, чем вирус Пичинде дикого типа (гРiC<sup>wt</sup>), тогда как вирус с трехсегментным геномом, разработанный для экспрессии своих генов гликопротеина и нуклеопротеина в их соответствующем природном положении (гЗРiC-GFP<sup>nat</sup>), в конечном итоге утрачивает экспрессию GFP и достигает концентрации вируса в крови, эквивалентной таковой у животных, инфицированных гРiC<sup>wt</sup>.

Авторы настоящего изобретения инфицировали мышей, трижды дефектных по интерфероновым рецепторам типа I и типа II, а также RAG1 (мышей AGR, Grob et al, 1999, Role of the individual interferon systems and specific immunity in mice in controlling systemic dissemination of attenuated pseudorabies virus infection. *J Virol*, 4748-54), с использованием 10e5 фокусообразующих единиц (ФОЕ) одного из вирусов гЗРiC-GFP<sup>art</sup>, гЗРiC-GFP<sup>nat</sup> или гРiC<sup>wt</sup> внутривенно (iv) в день 0. Авторы настоящего изобретения в день 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 77, 98, 120 и 147 определяли инфективность вируса с помощью анализа ФОЕ. В этих анализах авторы настоящего изобретения обнаружили либо нуклеопротеин вируса Пичинде (ФОЕ с экспрессией NP, фиг. 8), или вирусные трансгены GFP в гЗРiC-GFP<sup>nat</sup> и гЗРiC-GFP<sup>art</sup> (ФОЕ с экспрессией GFP, фиг. 9). Исходя из этих значений, авторы настоящего изобретения рассчитали для каждого живот-

ного и момента времени отношение ФОЕ с экспрессией NP: ФОЕ с экспрессией GFP, фиг. 10).

В течение первых 21 дней после инфицирования общая инфективность гЗРІС-GFP<sup>nat</sup> и гЗРІС-GFP<sup>art</sup> (как определено с помощью анализа ФОЕ с экспрессией NP) сохранялась на схожих уровнях в крови мышей AGR и была приблизительно в десять раз ниже, чем у гРІС<sup>wt</sup>-инфицированных контролей (фиг. 8). Однако с дня 28 инфективность гЗРІС-GFP<sup>nat</sup>, определяемая с помощью анализа ФОЕ с экспрессией NP, достигла уровней, которые были неотличимы от гРІС<sup>wt</sup>. Напротив, титры гЗРІС-GFP<sup>art</sup>, определенные с помощью ФОЕ с экспрессией NP, оставались приблизительно в 10 раз ниже, чем в случае гРІС<sup>wt</sup> на протяжении всего 147-дневного периода наблюдения (фиг. 8).

Помимо обнаружения вирусного структурного белка NP для определения общей вирусной инфективности (фиг. 8), авторы настоящего изобретения также выполнили анализы ФОЕ для оценки инфективности с экспрессией GFP, с экспрессией трансгена в крови инфицированных гЗРІС-GFP<sup>nat</sup>- и гЗРІС-GFP<sup>art</sup>-инфицированных мышей AGR (ФОЕ с экспрессией GFP, фиг. 9). В отличие от титров в ФОЕ с экспрессией NP (фиг. 8), титры в ФОЕ с экспрессией GFP у инфицированных гЗРІС-GFP<sup>nat</sup> мышей AGR снижались со дня 28 и не определялись с дня 120 (фиг. 9). Это контрастировало с постоянными в значительной степени титрами в ФОЕ с экспрессией GFP в крови инфицированных гЗРІС-GFP<sup>art</sup> мышей (фиг. 9). Рассчитав отношение "ФОЕ с экспрессией NP: ФОЕ с экспрессией GFP" (фиг. 10), авторы настоящего изобретения определили, что у мышей, инфицированных гЗРІС-GFP<sup>art</sup>, практически все ФОЕ с экспрессией NP (вся инфективность) также экспрессировали трансген GFP. Это подтверждается отношением "ФОЕ с экспрессией NP: ФОЕ с экспрессией GFP" в пределах 1 на протяжении всего 147-дневного периода наблюдения (фиг. 10). Резко контрастируя, отношения "ФОЕ с экспрессией NP: ФОЕ с экспрессией GFP" в крови инфицированных гЗРІС-GFP<sup>nat</sup> мышей также начинались с приблизительно 1, но достигали сотен и выше с дня 28 (фиг. 10). Это указывает на то, что в популяции вирионов, циркулирующих в крови мышей, инфицированных гЗРІС-GFP<sup>nat</sup>, в день 28 и после этого только приблизительно один из ста или менее все еще экспрессировал трансген GFP, и что инфективность с экспрессией GFP в конечном итоге снижалась до уровня ниже детектируемого уровня. Следовательно, гЗРІС-GFP<sup>art</sup> сохранял экспрессию трансгена GFP в течение 147 дней персистирующей инфекции у мышей AGR.

5.2.7. Вирусы, выделенные из сыворотки инфицированных гЗРІС-GFP<sup>art</sup> мышей, оставались аттенуированными по сравнению с вирусами от инфицированными гЗРІС-GFP<sup>nat</sup> животных, которые достигали титров, схожих с таковыми вируса, выделенного из инфицированных гЗРІС<sup>wt</sup> животных.

Для оценки характеристик роста вирусов, циркулирующих в сыворотке мышей AGR с персистирующей инфекцией, авторы настоящего изобретения пассировали зараженную вирусом сыворотку, собранную в день 147 после инфицирования, на клетках ВНК-21 и определяли инфективность вирусов с помощью анализов ФОЕ с экспрессией NP через 48 ч. Вирусы, выращенные из сыворотки мышей, инфицированных гЗРІС-GFP<sup>nat</sup>, достигли титров IFF, схожих или выше, чем у инфицированных вирусом гРІС<sup>wt</sup> животных (фиг. 11, символы показывают титры отдельных вирусов, происходящих из сыворотки мыши, "усы" обозначают среднее значение +/- SD). И наоборот, вирусные титры, полученные после прохождения сыворотки от гЗРІС-GFP<sup>art</sup>-инфицированных мышей, были существенно ниже, чем в любой из вышеупомянутых групп (фиг. 11).

Из этих вирусов, которые были пассированы в течение 48 ч, авторы настоящего изобретения выбрали случайным образом четыре из каждой группы для дальнейшего анализа роста клеточной культуры. В отличие от эксперимента, показанного на фиг. 11 (прямого пассажа инфективности из сыворотки), этот эксперимент (фиг. 12) был приведен к инфективности на входе и тем самым исключал дифференциальные количества инфективности на входе в качестве потенциального фактора, искажающего результаты при оценке титров вируса, достигнутых в культуре. Соответственно, клетки ВНК-21 были инфицированы со стандартизированной множественностью заражения=0,01, и титры вируса определялись через 48 ч (фиг. 12, символы показывают титры отдельных вирусов, полученных из сыворотки мыши, "усы" обозначают среднее значение +/- SD). Аналогично различиям в титрах, обнаруженным после прямого *ex vivo* пассажа из сыворотки, вирусы, происходящие из гЗРІС-GFP<sup>nat</sup>, достигали титров, которые были по меньшей мере равны таковым вирусам, происходящим из гРІС<sup>wt</sup>. И наоборот, титры, достигаемые вирусами, происходящими из *in vivo* пассируемого гЗРІС-GFP<sup>art</sup>, были значительно ниже, чем титры вышеупомянутых двух групп.

Было высказано предположение, что вирус, выделенный из сыворотки инфицированных гЗРІС-GFP<sup>nat</sup> животных, уже не был аттенуированным, в то время как вирус, циркулирующий в крови инфицированных гЗРІС-GFP<sup>art</sup> мышей, был все еще явно аттенуированным по сравнению с вирусами, происходящими от гРІС<sup>wt</sup>. Следовательно, как судили по более низкой гЗРІС-GFP<sup>art</sup>-вирусии, чем гРІС<sup>wt</sup>-вирусии на протяжении всего эксперимента у мышей AGR (смотрите раздел 5.2.6), а также по более низким титрам гЗРІС-GFP<sup>art</sup>, чем титр гРІС<sup>wt</sup> при реамплификации из крови в клеточной культуре, гЗРІС-GFP<sup>art</sup> оставался аттенуированным на протяжении всего 147-дневного периода *in vivo* репликации у мышей.

5.2.8. В отличие от гЗРІС-GFP<sup>nat</sup>, рекомбинантный вирус с трехсегментным геномом с искусственной организацией генома (гЗРІС-GFP<sup>art</sup>) не демонстрировал рекомбинацию своих двух S-сегментов и сохранял свои трансгены.

Авторы настоящего изобретения хотели определить, могут ли в ходе персистирующей инфекции у

мышей AGR в г3PIC-GFP<sup>nat</sup> два его S-сегмента рекомбинироваться с воссоединением генов NP и GP в одном сегменте РНК, тем самым с элиминируя трансгены GFP. Для проверки этой вероятности, авторы настоящего изобретения экстрагировали вирусную РНК из образцов сыворотки, собранных у каждого животного в день 147 после инфицирования вирусом. Авторы настоящего изобретения выполнили ОТ-ПЦР с использованием праймеров, которые были разработаны для связывания с NP и GP вируса Пичинде, соответственно, и которые охватывали межгенную область ("IGR") S-сегмента вируса Пичинде, так что они, как прогнозировалось, давали ПЦР-ампликон из 357 п.о. на геномной матрице гPIC<sup>wt</sup>. Такие ампликоны были действительно получены при использовании вирусной РНК от животных, инфицированных либо гPIC<sup>wt</sup>, либо г3PIC-GFP<sup>nat</sup>, но не при использовании вирусной РНК из крови инфицированных г3PIC-GFP<sup>att</sup> мышей (фиг. 13, каждая полоса представляет собой продукт ОТ-ПЦР от одной отдельной мыши в эксперименте, показанном на фиг. 8-10).

Вместе взятые, эти данные показали, что в ходе персистирующей инфекции у мышей AGR в г3PIC-GFP<sup>nat</sup> два его S-сегмента (S-GP/GFP<sup>nat</sup>, S-NP/GFP) рекомбинировались с воссоединением кодирующих NP и GP открытых рамок считывания в одном сегменте РНК. Таким образом, он утрачивал экспрессию трансгенов GFP и увеличивал свою способность к росту до таковой у гPIC<sup>wt</sup>, и у мышей, что очевидно из уровней виремии, и в клеточной культуре, что видно из сбора из крови и повторного размножения в клеточной культуре. Напротив, в г3PIC-GFP<sup>att</sup> два его S-сегмента не рекомбинировались, что было очевидно из-за отсутствия ампликона ОТ-ПЦР, охватывающего гены NP и GP.

#### 6. Эквиваленты

Вирусы, нуклеиновые кислоты, способы, клетки-хозяева и композиции, описанные здесь, не должны ограничиваться в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными здесь. Действительно, различные модификации вирусов, нуклеиновых кислот, способов, клеток-хозяев и композиций в дополнение к тем, которые описаны, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Такие модификации, как предполагается, находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Здесь приводятся различные публикации, патенты и заявки на патенты, раскрытие которых включено посредством ссылки во всей их полноте.

Здесь приводятся различные публикации, патенты и заявки на патенты, раскрытие которых включено посредством ссылки во всей их полноте.

## 7. Список последовательностей

SEQ ID	Описание	Последовательность
NO:		
1	<p>PIC-S: S-сегмент  изолята P18 штамм  Munchique CoAn4763  вируса Пичинде (номер  доступа в Genbank:  EF529746.1), полная  последовательность.  Геномный сегмент  представляет собой РНК,  последовательность в  SEQ ID NO:1 показана  для ДНК; однако замена  всех тимидинов («Т») в  SEQ ID NO:1 на уридины  («U») обеспечивает  последовательность РНК.</p>	<p>gcgaccggg gatcctaggc ataccttggg  cgcgcatatt acttgatcaa agatgggaca  agttgtgact ttgatccagt ctatacccca  agtcctgcag gaggtcttca atgtcgcctt  aatcattgtc tcaaccctat gcatcatcaa  aggatttgtc aatctgatga gatgtggcct  attccaactc atcaccttcc tcattttggc  tggcagaagt tgtgatggca tgatgattga  taggaggcac aatctcacc acgttgagtt  caacctcaca agaatgtttg acaacttgcc  acaatcatgt agcaagaaca acacacatca  ttactacaaa ggaccatcta acacaacatg  gggaattgaa ctcactttga caaacacatc  cattgcaaat gaaactactg gaaacttttc  caacatcaga agccttgcat atggtaacat  tagtaattgt gataagacag aagaagcagg  tcacacatta aatggttgc ttaatgagtt  acacttcaat gtgctccatg tcaactcgtca  tgtaggtgcc agatgcaaaa cagttgaggg  tgctggggtg ttgatccagt acaacttgac  agttggggat agaggaggtg aggttggcag  acatcttatt gcgtcgcttg ctcaaatcat  tggggacca aaaattgctg gggttgaaa  atgtttcaat aactgtagtg gaggtcttg  cagactaaca aactgtgaag gtgggacaca  ttacaatttc ctgatcatac agaacaccac  atgggaaaat cactgtacat atactccaat  ggcaacaata aggatggctc tccaaaaaac  tgcttatagt tctgtgagca ggaaactcct  tgctttttc acttgggact tgagtgactc  tactgggcaa catgtcccag gtggttactg</p>



	<p>tttgagcaa tgggctattg tttgggctgg</p> <p>aataaaatgt tttgataaca ctgtgatggc  aaaatgcaac aaagatcaca atgaagaatt</p> <p>ttgcgatagc atgaggttat ttgatttcaa  tcagaatgct atcaaaacct tacaacttaa</p> <p>tgttgagaat tcggtgaatc tctttaaaaa  gactatcaac ggacttattt ctgactcact</p> <p>tgtgattaga aacagtctca aacagcttgc  caaaatccct tattgcaact atacaaaatt</p> <p>ttggtacatc aatgatacca tcacaggaag  acattcttta ccgcagtggt ggtagttca</p> <p>caatggctcg tacctcaatg aaacgcattt  taagaatgat tggttgtggg agagccagaa</p> <p>tctgtacaat gaaatgctga taaaagaata  tgaagaaaga caaggaaga ctccactagc</p> <p>attgacagac atttgcttct ggtctttggt  gttttacacc atcacagtgt ttctccactt</p> <p>agttggaata ccactcata ggcacatcat  tggatgatggc tgtccgaagc cacataggat</p> <p>tactaggaac tctctttgca gctgtgggta  ttataaaatc ccaaagaaac cctacaaatg</p> <p>ggtgagactg ggtaaataag ccctagcctc  gacatgggcc tcgacgtcac tcccaatag</p> <p>gggagtgacg tcgaggcctc tgaggacttg  agctcagagg ttgatcagat ctgtgttgtt</p> <p>cctgtacagc gtgtcaatag gcaagcatct  catcggttc tggccctaa ccagcctgt</p> <p>cactgttgca tcaaacatga tggatcaag  caatgcacag tgaggattcg cagtggtttg</p> <p>tgcagccccc ttcttcttct tctttatgac  caaaccttta tgtttgggtgc agagtagatt</p>
--	--

	<p>gtatctctcc cagatctcat cctcaaaggt gcgtgcttgc tcggcactga gtttcacgtc</p> <p>aagcactttt aagtctcttc tcccatgcat ttcgaacaaa ctgattatat catctgaacc</p> <p>ttgagcagtg aaaaccatgt tttgaggtaa atgtctgatg attgaggaaa tcaggcctgg</p> <p>ttggcatca gccaaagtcc ttaaaagaag accatgtgag tacttgcttt gctctttgaa</p> <p>ggacttctca tcgtggggaa atctgtaaca atgtatgtag ttgccctgt caggctggta</p> <p>gatggccatt tccaccgat catttgggtg tccttcaatg tcaatccatg tggtagcttt</p> <p>tgaatcaagc atctgaattg aggacacaac agtgtcttct ttctccttag ggatttgttt</p> <p>aaggtecggt gatcctcgt ttcttactgg tggtggata gcactcggct tcgaatctaa</p> <p>atctacagtg gtggtatccc aagccctccc ttgaacttga gaccttgagc caatgtaagg</p> <p>ccaaccatcc cctgaaagac aaatcttgta tagtaaatth tcataaggat ttctctgtcc</p> <p>gggtgtagtg ctcaaaaaca taccttcacg attctttatt tgcaatagac tctttatgag</p> <p>agtactaac atagaaggct tcacctggat ggtctcaagc atatgccac catcaatcat</p> <p>gcaagcagct gctttgactg ctgcagacaa actgagattg taccctgaga tgtttatggc</p> <p>tgatggctca ttactaatga tttttagggc actgtggtgc tgtgtgagtt tctctagatc</p> <p>tgtcatgttc gggaaactga cagtgtagag caaaccaagt gcactcagcg cttggacaac</p> <p>atcattaagt tgttcaccoc cttgctcagt</p>
--	---

		<p>catacaagcg atggttaagg ctggcattga</p> <p>tccaaattga ttgatcaaca atgtattatc cttgatgtcc cagatcttca caaccccatc</p> <p>tctgttgctt gtgggtctag cattagcgaa ccccattgag cgaaggattt cggctctttg</p> <p>ttccaactga gtgtttgtga gattgcccc ataaacacca ggctgagaca aactctcagt</p> <p>tctagtgact ttctttctta acttgccaa atcagatgca agctccatta gctcctcttt</p> <p>ggctaagcct cccaccttaa gcacattgtc cctctggatt gatctcatat tcatcagagc</p> <p>atcaacctct ttgttcatgt ctcttaactt ggtcagatca gaatcagtcc ttttatcttt</p> <p>gcgcatcatt ctttgaactt gagcaacttt gtgaaagtca agagcagata acagtgtctt</p> <p>tgtgtccgac aacacatcag ccttcacagg atgggtccag ttggatagac cctcctaag</p> <p>ggactgtacc cagcggaatg atgggatgtt gtcagacatt ttggggttgt ttgcacttcc</p> <p>tccgagtcag tgaagaagtg aacgtacagc gtgatctaga atcgcttagg atccactgtg cg</p>
2	<p>Р1С-L-seg: L-сегмент изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EF529747.1), полная последовательность с некодирующими мутациями, введенными для удаления сайтов рестрикции BsmBI. Геномный сегмент представляет собой РНК; однако, замена всех</p>	<p>gcgcaaccggg gatcctaggc atctttgggt cacgcttcaa atttgtccaa tttgaaccsa</p> <p>gctcaagtcc tggtaaaaac ttgggatggg actcagatat agcaaagagg tcaggaagag</p> <p>acatggcgac gaagatgtgg tgggaagggg ccccatgacc ctcaatctac cacagggcct</p> <p>gtatggcagg ttcaactgca aatcttgctg gttcgtcaac aaaggtctca tcaggtgcaa</p> <p>agaccactat ctgtgtcttg ggtgcttaac caaaatgcac tccagaggca atctctgcga</p> <p>gatatgcggc cactcactgc caaccaagat</p>

<p>ТИМИДИНОВ («Т») В SEQ ID NO:4 на уридины («U») обеспечивает последовательность РНК.</p>	<pre> ggagttccta gaaagcccct ctgcaccacc       ctacgagcca taaaccaggg cccctgggcg ccccccctc cgggggtgcg cccgggggcc       cccggcccca tggggccggt tgtttactcg atctccactg actcattgtc ctcaaacaaac       tttcgacacc tgattccctt gatcttgaag ggtcctgtct cgtctgcaat cataacagat       cctagagtct tactttctat tatactaaag tgaccacaat tcaaccaatc tttggcatca       tgcaacatgt gttcaaacac ttcggggaaa ttttcaatca tgagtcttaa atcctgctcg       ttcatactta ttcccttggt gtgagactgt gcacttgaaa ggtactgaaa aaggttgga       ataaatcttg gccttttctc aggttctaат gcttccagtg caatgatgac cacctttgag       tctaagttca cttccaatct agaaaccact ctgttgccct ctttgatcaa cccaccctct       aaaatgaggg gttgcatccc aacatcagga ccaatcaact tataggaaaa tttgtttttc       aatccttga aacgattttt caaatctatt ctcaccttct ggaacacagt tgaccttgac       ttgaagtгаа tgtcttgacc ttccaataga tcattgaagt ctagaacatc ttttcggtg       atgagaggat tcagaaccaa aagtгacaca ccatccagac ttatgtgatt cccggaagat       tgagaacat aatactcaac agaatggggg ttcaacaata ggtaaccatc agagtccaat       gagtccagca atgactccct ttcaataaga aatcttaatt ttaatatgta attggtagac       ctctcatatc taaatttggt gctcactctc ttatgagaaa atgttagggt gagctcaatg </pre>
--	---

	<p>ggaatgacct cagaaggatga tgctaaaatg agttgttcaa tgttctcata gttatctcta</p> <p>ttcaccagct caagttcatt aataaatata ctaattgtca aattaacaca ggacaaaatc</p> <p>agtttgctgc ttacaaagcc aacatccaag tcatccagat tcattgtcct agaagtgtta</p> <p>ttctttttgc agtcacaaat gaactgggtt aattgtttca gatcatgttg tgcattgttt</p> <p>ggcaacaatt caagctcacc aaacaaaaa tatttcttga actgagatgt tgacataatc</p> <p>acaggcacca acattgactc aaacaaaatc tgtatcaaga aatttgtgca cacttcttct</p> <p>ggttcaaggt tgaatcctct ctccagtgga tgagactctc tgctatggga cattgcaagc</p> <p>tcattttgct ttacaatata caattcttct ctgcgatgtt ttataatatg actaacaata</p> <p>ccaagacatt ctgatgttat atcaattgcc acacaaaggt ctaagaactt ttcctctga</p> <p>accatgata gcctcagcat attcaaatca gacagaaaag gggatatgtg ttcacaaat</p> <p>agtgtaggga agttcctcct gattgagtaa agtatgtggt tgatgccac cttgtcctca</p> <p>agctcagaat gtgtgcttgg ttttattggc cagaagtgat tgggattgtt tagtgagtg</p> <p>actatcttgg gtacttcagc tttttgaaac accagttac ccaactcgca agcattgggt</p> <p>aacacaagag caaaataatc ccaaattaag ggtctggagt actcacttac ttcaccaagt</p> <p>gctgctttac aataaacacc tttgcgctga ttacaaaagt gacaatcacg gtgtaagata</p> <p>atcttgcttg taatatccct gatatactta</p>
--	--

	<p>aatcctcctt tcccatctct tacacatfff</p> <p>gagccatac ttttgcaaac tcctatgaat cctgatgcta tgctgctctg aaaagctgat</p> <p>ttgtgatag catcagccaa aatcttctta gccccctga catagtctct tgataattg</p> <p>gactgtacgg atttgacaag actgggtatt tcttctcgct gcacagttct tgttgtgctc</p> <p>attaacttag tacgaagcac caatctgaga tcaccatgaa cccttaaatt taaccaccta</p> <p>atattaagag catcctcaat agcctcagtc tcgacatcac aagtctctaa taactgtfff</p> <p>aagcagtcac ccggtgattg ctgaagagtt gttacaatat aactttcttc cagggctcca</p> <p>gactgtatff tgtaaaatat tttcctgcat gcctttctga ttattgaaag tagcagatca</p> <p>tcaggaaata gtgtctcaat tgatcgctga agtctgtacc ctctcgaccc attaacccaa</p> <p>tcgagtacat ccatttcttc caggcacaaa aatggatcat ttgaaaccc actatagatt</p> <p>atcatgctat ttgttcgfff tgcaatggcc cctacaacct ctattgacac cccgttagca</p> <p>acacattggt ccagtattgt gtcaattgta tctgcttget gattgggtgc tttagcctff</p> <p>atgttgta gagctgcagc aacaaactff gtaaggagg ggacttcttg tgaccaaatg</p> <p>aagaatctcg atttgaactc acttgcaaag gtccccacaa ctgttttagg gctcacaac</p> <p>ttgttgagtt tgtctgatag aaagtagtga aactccatac agtccaatac caattcaaca</p> <p>ttcaactcat ctctgtcctt aaatttgaaa ccctcattca aggataacat gatctcatca</p>
--	---

		<p>tcaactcgaag tatatgagat gaaccgtgct ccataacaaa gctccaatgc gtaattgatg</p> <p>aactgctcag tgattagacc atataagtca gaggtgttgt gtaggatgcc ctgaccata</p> <p>tctaagactg aagagatgtg tgatggtacc ttgcccttct caaagtaccc aaacataaat</p> <p>tcctctgcaa ttgtgcaccc ccctttatcc atcataccca accccctttt caagaaacct</p> <p>ttcatgtatg cctcaacgac attgaaggc acttccacca tcttgtgaat gtgcatagc</p> <p>aatatgttga tgactgcagc attgggaact tctgacccat ctttgagttt gaactcaaga</p> <p>ccttttaata atgcggaaca gataaccggc gacatgtgtg gccccattt tgaatggfcc</p> <p>attgacaccg caagaccact ttgcctaaca actgacttca tgtctaataa tgctctctca</p> <p>aactctttct cgttgttcag acaagtatac ctcatgtttt gcataagga ttcagagtaa</p> <p>tcctcaatga gtctggttgt gagtttagta tttaaatcac cgacataaag ctccctgttg</p> <p>ccaccacct gttctttata agaaagacca aatttcaatc tcctacatt ggtggataca</p> <p>ccagacctct ctgtgggaga ctcatctgaa tagaaacaga gatttcgtaa ggatgagttg</p> <p>gtaaaaaagc ttgatccaa tcttttagct atcgattcag aattgctctc tcttgagctt</p> <p>atacgtgatg tctctctaat ttgtagtgct gcatctgtga acccaagtct gcttctactt</p> <p>ttgtgatcat atcttccgac tcgattatca taatcgcttg caatgagaat gtatttaaag</p> <p>cactcaaaat aatcagcttc tttgtacgcc</p>
--	--	---

	<p>ttcaatgtga ggttctttat taaaaactcc</p> <p>agaggacacg gattcattag tctgtctgca aagtacactg atctagcagt gacatcctca</p> <p>tagatcaagt ttacaagatc ctcatacact tctgtgaaa acaggctgta atcaaaatcc</p> <p>tttacaatcat gaagtgaagt ctctcttttg atgacaacca ttgtcgattt gggccataat</p> <p>ctctctagtg gacatgaagt ctttaagggtg gttttgacat tgggtgcaac cttagacaat</p> <p>acttttgcaa ctctgtctc aatttcttta agacagtcac cctgatcttc tgatagtaac</p> <p>tcttcaactc catcaggctc tattgactcc ttttttattt ggatcaatga tgacaacctc</p> <p>ttcagaatct tgaatttac ctcctttgga tctaacttgt atttaccctt agttttgaaa</p> <p>tgttcaatca tttccacaac aacagcagac acaatggaag agtaatcata ttcagtgatg</p> <p>acctcaccaa cttcattgag ttttggaaacc accacacttt tgttgctgga catatccaag</p> <p>gctgtacttg tgaaggaggg agtcataggg tcacaaggaa gcagggggtt cacttccaat</p> <p>gagctactgt taaatagtga tagacaaaca ctaagtacat ccttattcaa ccccggcctt</p> <p>ccctcacatt tggattccag ctttttacca agtagtctct ctatatcatg caccatcttc</p> <p>tcttcttctc cagtaggaag ttccatacta ttagaagggt tgaccaagac tgaatcaaac</p> <p>tttaactttg gttccaagaa cttctcaaaa catttgattt gatcagttaa tctatcaggg</p> <p>gtttctttgg ttataaaatg gcataaatag gagacattca aaacaaactt aaagatctta</p>
--	--



	<p>gccatatctt cctctctgga gttgctgagt accagaagta tcaaatac atc aataagcatt</p> <p>gctgtctgcc attctgaagg tgtagcata acgactttca atttctcaaa caattcttta</p> <p>aatgaactt catttcaaaa ggcataatg taatatctaa agccttgcaa gtaaaactga</p> <p>atacgttgg aaggggtgca cagtatgcag agaataagtc gtctgagtaa atcagaaaca</p> <p>gaatccaaga ggggttgga cataaagtc aaccaggata acatctccac acaagtcctt</p> <p>tgaatcacat ctgcactaaa gatcggtaag aaaaatctct tgggatcaca gtaaaaagac</p> <p>gcttttgttt catacaaacc cccacttttg gatctataag caacagcata acacctggac</p> <p>ctctcccctg tcttctggta cagtagtggtg agagaacctc cttctcaaaa tgcctggaag</p> <p>aaaacttctg cacagtaaac cttcccataa aactcatcag cattgttcac cttcatctta</p> <p>ggaactgctg ctgtcttcat gctattaatg agtgacaaac tcaaacttga caatgttttc</p> <p>agcaattcct caaactcact ttcgcccattg atggtataat caggctgccc tcttctggc</p> <p>ctacccccac acatacactg tgactttgtc ttgtattgaa gacagggttt agcaccocat</p> <p>tcatctaaca ctgatgtttt cagattgaag taatattcaa catcagggtt ccgtagaaga</p> <p>gggagaatgt catcaagggg aagttcacca cagaccgagc tcagtctctt cttagccttc</p> <p>tctaaccagt tggggttttt aatgaatttt ttagtattt gttccatcag gaagtogaca</p> <p>ttaatcaacc tgcatttac agacggtaac</p>
--	---

	<p>ccttgatta ggagcacctc tctgaacaca</p> <p>gcacctggag aagactgtc caagtcacac aaaatgttgt acatgataag gtccagaacc</p> <p>aacatggtgt tctccttgt gttaaaaacc ttttgagact taattttgtt gcatattgaa</p> <p>agtactctaa aatattctct gctttcagtt gatgaatgct tgacctcaga ttgcctgagt</p> <p>tgccctatta tgcccaaat gtgtactgag caaaactcac ataatctgat ttctgattta</p> <p>ggtacatctt tgacagaaca ttggataaat tcatggttct gaagtctaga aatcatatct</p> <p>tcctatctg tagcctgcag tttcctatcg agttgaccag caagttgcaa cattttaaat</p> <p>tgctgaaaga tttccatgat tttgttcta cattgatctg ttgtcagttt attattaatg</p> <p>ccagacatta atgcctttc caacctcact ttgtaaggaa gtcccctttc ctttacagca</p> <p>agtagtgact ccagaccgag actctgattt tctaaggatg agaggaact tataaggcgt</p> <p>tcgtactcca actcctcaac ttcttcacca gatgtcctta atccatccat gagttttaa</p> <p>agcaaccacc gaagtctctc taccaccaa tcaggaacaa attctacata ataactggat</p> <p>ctaccgtcaa taacaggtac taaggttatg ttctgtctct tgagatcaga actaagctgc</p> <p>aacagcttca aaaagtctg gttgtatttc ttctcaaatg cttcttgact ggtcctcaca</p> <p>aacacttcca aaagaatgag gacatctcca accatacagt aacctctgg tgtaacatcc</p> <p>ggcaatgtag gacatgttac tctcaactcc ctaaggatag cattgacagt catctttgtg</p>
--	--

		<p>ttgtgtttgc aggagtgttt cttgcatgaa tccacttcca ctagcatgga caaaagcttc</p> <p>aggccctcta tcgtgatggc cctatctttg acttgtgcaa gaacgttggt tttctgttca</p> <p>gatagctctt cccattcggg aaccattttt ctgactatgt ctttaagttc gaaaacgtat</p> <p>tctccatga tcaagaaatg cctaggatcc tcggtgcg</p>
3	<p><b>LABsmBI:</b> Репрезентативная кДНК для кодирующей L-белок ORF изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EF529747.1), в которую была введена некодирующая мутация для удаления сайта рестрикции BsmBI. ORF также содержит фланкирующие сайты рестрикции BsmBI (жирный шрифт), а также сайты рестрикции EcoRI (заглавные буквы) и NheI (заглавные и курсивные буквы).</p>	<p><b>GAATTCggtc tctgatcatg</b> gaggaatacg ttttogaact taaagacata gtcagaaaat</p> <p>gggttcccga atgggaagag ctatctgaac agaaaaacaa cgttcttgca caagtcaaag</p> <p>atagggccat cacgatagag ggcctgaagc ttttgtccat gctagtggaa gtggattcat</p> <p>gcaagaaaca ctctgcaaa cacaacacaa agatgactgt caatgctatc cttagggagt</p> <p>tgagagtaac atgtcctaca ttgccgatg ttacaccaga tggttactgt atggttggag</p> <p>atgtcctcat tcttttgaa gtgtttgta ggaccagtca agaagcattt gagaagaaat</p> <p>acaaccagga ctttttgaag ctgttgacg ttagtctga tctcaagaga cagaacataa</p> <p>ccttagtacc tgttattgac ggtagatcca gttattatgt agaatttggt cctgattggg</p> <p>tggtagagag acttcggtg ttgcttttaa aactcatgga tggattaagg acatctggtg</p> <p>aagaagtga ggagttggag tacgaacgcc ttataagttc cctctcatcc ttagaaaatc</p> <p>agagtctcgg tctggagtca ctacttgctg taaaggaag gggacttcct taaaaagtga</p> <p>ggttgaaaa ggcattaatg tctggcatta</p>

	<p> ataataaact gacaacagat caatgtagaa    caaaaatcat ggaaatcttt cagcaattta  aatggttgca acttgctggt caactcgata    gaaactgca ggctacagat agggaagata  tgatttctag acttcagaac catgaattta    tccaatgttc tgtcaaagat gtacctaaat  cagaaatcag attatgtgag ttttgctcag    tacacatttt gggcataata ggccaactca  ggcaatctga ggcaagcat tcatcaactg    aaagcagaga atattttaga gtactttcaa  tatgcaacaa aattaagtct caaaaggttt    ttaacacaag gaggaacacc atgttggttc  tggaccttat catgtacaac attttggtg    acttgacaa gtcttctcca ggtgctgtgt  tcagagaggt gctcctaag caagggttac    cgtctgtaa tgacaggttg attaagtgcg  acttctgat ggaacaaatc actaaaaaat    tcattaaaa cccaactgg ttagagaagg  ctaagaagag actgagctcg gtctgtggtg    aacttcccct tgatgacatt ctccctcttc  tacgggaacc tgatgttgaa tattacttca    atctgaaaac atcagtgta gatgaatggg  gtgctaaacc ctgtcttcaa tacaagacaa    agtcacagtg tatgtgtggg ggtaggccag  gaagaggca gcctgattat accatcatgg    gcgaaagtga gtttgaggaa ttgctgaaaa  cattgtcaag tttgagtttg tcaactcatta    atagcatgaa gacagcagca gttcctaaga  tgaagggtgaa caatgctgat gagttttatg    ggaaggttta ctgtgacgaa gtttcttcc  agcgatttgg agaaggaggt tctctcacac </p>
--	---

	<p>tactgtacca gaagacaggg gagaggtcca ggtgttatgc tgttgcttat agatccaaaa</p> <p>gtgggggttt gtatgaaca aaagcgtctt tttactgtga tccaagaga tttttcttac</p> <p>cgatctttag tgcagatgtg attcaaagga cttgtgtgga gatgttatcc tggttggact</p> <p>ttatgtccca acccctcttg gattctgttt ctgatttact cagacgactt attctctgca</p> <p>tactgtgcac cccttccaag cgtattcaag tttacttgca aggctttaga tattacatta</p> <p>tggcctttgt aatgaagtt cattttaag aattgtttga gaaattgaaa gtcgttatgc</p> <p>taacaccttc agaatggcag acagcaatgc ttattgatga tttgatactt ctggtactca</p> <p>gcaactccag agaggaagat atggctaaga tctttaagtt tgttttgaat gtctcctatt</p> <p>tatgccattt tataaccaa gaaaccctg atagattaac tgatcaaac aatgttttg</p> <p>agaagttctt ggaaccaaag ttaaagtttg attcagtctt ggtcaaccct tctaatagta</p> <p>tggaacttcc tactgaggaa gaagagaaga tgggtcatga tatagagaga ctacttggtg</p> <p>aaaagctgga atccaaatgt gagggaaggc cggggttgaa taaggatgta cttagtgttt</p> <p>gtctatcact atttaacagt agctcattgg aagtgaacc cctgcttcct tgtgacccta</p> <p>tgactccctc cttcacaagt acagccttgg atatgtccag caacaaaagt gtggtggttc</p> <p>caaaactcaa tgaagttggt gaggtcatca ctgaatatga ttactcttcc atttgtctg</p> <p>ctgttggtgt ggaaatgatt gaacatttca</p>
--	--

	<p>aaactaaggg taaatacaag ttagatccaa</p> <p>aggaggtaaa tttcaagatt ctgaagaggt tgtcatcatt gatccaaata aaaaaggagt</p> <p>caatagagcc tgatggagtt gaagagttac tatcagaaga tcagggtgac tgtcttaaag</p> <p>aaattgagac cagagttgca aaagtattgt ctaaggttga caccaatgtc aaaaccaacc</p> <p>ttaagacttc atgtccacta gagagattat ggcccaaadc gacaatgggt gtcacaaaa</p> <p>gagagacttc acttcatgat gtaaaggatt ttgattacag cctgttttca gcagaagtgt</p> <p>atgaggatct tgtaaacttg atctatgagg atgtcactgc tagatcagtg tactttgcag</p> <p>acagactaat gaatccgtgt cctctggagt ttttaataaa gaacctcaca ttgaaggcgt</p> <p>acaaagaagc tgattatfff gagtgcctta aatacattct cattgcaagc gattatgata</p> <p>atcgagtcgg aagatatgat cacaaaagta gaagcagact tgggttcaca gatgcagcac</p> <p>tacaaattag agagacatca cgtataagct caagagagag caattctgaa tcgatagcta</p> <p>aaagattgga tcaaagcttt tttaccaact catccttacg aaatctctgt ttctattcag</p> <p>atgagtctcc cacagagagg tctgggtgat ccaccaatgt aggagattg aaatttggtc</p> <p>tttcttataa agaacagggt ggtggcaaca gggagcttta tgtcgggtgat ttaaatacta</p> <p>aactcacaac cagactcatt gaggattact ctgaatccct tatgcaaac atgaggtata</p> <p>cttgtctgaa caacgagaaa gattttgaga gagcattatt agacatgaag tcagttgtta</p>
--	--

	<p> ggcaaagtgg tcttgcggtg tcaatggacc  attcaaaatg ggggccacac atgtcgccgg    ttatctttgc cgcattatta aaaggtcttg  agttcaaact caaagatggg tcagaagttc    ccaatgctgc agtcatcaac atattgctat  ggcacattca caagatgggt gaagtgcctt    tcaatgtcgt tgaggcatac atgaaaggtt  tcttgaaaag ggggttgggt atgatggata    aaggggggtg cacaattgca gaggaattta  tgtttgggta ctttgagaag ggcaaggtag    catcacacat ctcttcagtc ttagatatgg  gtcagggcat cctacacaac acctctgact    tatatggtct aatcactgag cagtcatca  attacgcatt ggagctttgt tatggagcac    ggttcatctc atatacttcg agtgatgatg  agatcatggt atccttgaat gagggtttca    aatttaagga cagagatgag ttgaatggtg  aattggtatt ggactgtatg gagtttctact    actttctatc agacaaactc aacaagtttg  tgagccctaa aacagttgtg gggacctttg    caagtgagtt caaatcgaga ttcttcattt  ggtcacaaga agtccccctc cttacaaagt    ttgttgctgc agctctacac aacataaagg  ctaaagcacc caatcagcaa gcagatacaa    ttgacacaat actggaccaa tgtgttgcta  acgggggtgc aatagagggt gtaggggcca    ttgcaaaacg aacaaatagc atgataatct  atagtgggtt tccaaatgat ccatttttgt    gcctggaaga aatggatgta ctcgattggg  ttaatgggtc gagagggtag agacttcagc    gatcaattga gacactatct cctgatgatc </p>
--	---

	<p> tgctactttc aataatcaga aaggcatgca    gaaaaatatt ttacaaaata cagtctggag  ccctggaaga aagttatatt gtaacaactc    ttcagcaatc accggatgac tgcttaaaac  agttattaga gacttgatgat gtcgagactg    aggctattga ggatgctctt aatattaggt  ggttaaattt aagggttcat ggtgatctca    gattggtgct tcgtactaag ttaatgagca  caacaagaac tgtgcagcga gaagaatac    ccagtcttgt caaatccgta cagtccaaat  tatcaaagaa ctatgtcaga ggggctaaga    agatthttgac tgatgctatc aacaaatcag  cttttcagag cagcatagca tcaggattca    taggagtttg caaaagtatg ggctcaaaat  gtgtaagaga tgggaaagga ggatttaagt    atatcaggga tattacaagc aagattatct  tacaccgta ttgtcacttt tgtaatcagc    gcaaagggtg ttattgtaa gcagcacttg  gtgaagtaag tgagtactcc agacccttaa    tttgggatta ttttgctctt gtgtaacca  atgcttgca gttgggtaac tgggtgtttc    aaaaagctga agtacccaag atagtcactc  acctaataca tccaatcac ttctggcaa    taaaaccaag cacacattct gagcttgagg  acaagggtgg catcaaccac atactttact    caatcaggag gaacttcoct acaactattg  atgaacacat atcccctttc ctgtctgatt    tgaatatgct gaggctatca tgggttcaga  ggataaagtt cttagacctt tgtgtggcaa    ttgatataac atcagaatgt cttggattg  ttagtcatat tataaaacat cgcagagaag </p>
--	---



		<p>aattgtatat tgtaaagcaa aatgagcttg caatgtccca tagcagagag tctcatccac</p> <p>tgagagagagg attcaacctt gaaccagaag aagtgtgcac aaatttcttg atacagattt</p> <p>tgtttgagtc aatgttggg cctgtgatta tgtcaacatc tcagttcaag aaatattttt</p> <p>ggtttggtga gcttgaattg ttgccaaaca atgcacaaca tgatctgaaa caattaaccc</p> <p>agttcatttg tgactgcaaa aagaataaca cttctaggac aatgaatctg gatgacttgg</p> <p>atgttggtt tgtaagcagc aaactgattt tgtcctgtgt taatttgaac attagtgtat</p> <p>ttattaatga acttgactgg gtgaatagag ataactatga gaacattgaa caactcattt</p> <p>tagcatcacc ttctgaggtc attcccattg agctcaacct aacattttct cataagagag</p> <p>tgagccacaa atttagatat gagaggctta ccaattacat attaaaatta agatttctta</p> <p>ttgaaagga gtcattgctg gactcattgg actctgatgg ttacctattg ttgaacccc</p> <p>attctgttga gtattatggt tctcaatctt ccgggaatca cataagtctg gatggtgtgt</p> <p>cacttttgggt tctgaatcct ctcatcaacg gaaaagatgt tctagacttc aatgatctat</p> <p>tggaaggta agacattcac ttcaagtcaa ggtcaactgt gttccagaag gtgagaatag</p> <p>attgaaaaa tcgtttcaag gatttgaaaa acaaattttc ctataagttg attggtctg</p> <p>atgttgggat gcaaccctc attttagagg gtgggttgat caaagagggc aacagagtgg</p> <p>tttctagatt ggaagtgaac ttagactcaa</p>
--	--	--

		<p>aggtggtcat cattgcactg gaagcattag</p> <p>aacctgagaa aaggccaaga tttattgcca acctttttca gtacctttca agtgcacagt</p> <p>ctcacaacaa ggaataagt atgaacgagc aggatttaag actcatgatt gaaaatttcc</p> <p>ccgaagtgtt tgaacacatg ttgcatgatg ccaaagattg gttgaattgt ggtcacttta</p> <p>gtataataag aagtaagact ctaggatctg ttatgattgc agacgagaca ggacccttca</p> <p>agatcaaggg aatcaggtgt cgaagttgt ttgaggacaa tgagtcagtg gagatcgagt</p> <p>aaacaaagag acgGCTAGC</p>
4	<p>PIC-L-GFP-Bsm: Репрезентативная кДНК для модифицированного L-сегмента изолята P18 штамма Munchique СоAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EBC529747.1), в которой кодирующая L- белок ORF была удалена и заменена ORF, кодирующей GFP, с фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI (жирный шрифт) с каждой стороны.</p>	<p>gcgcaccgag gatcctaggc atttcttgat <b>cgagacgat</b> ggtgagcaag ggcgaggagc</p> <p>tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt</p> <p>tcagcgtgtc cggcgagggc gaggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagtcca</p> <p>tctgaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ttgacctagc</p> <p>gcgtgcagtg cttcgtccgc taccocgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg</p> <p>ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca</p> <p>agaccocgoc cgaggtgaag ttcgagggoc acaccctggt gaaccgcatc gagctgaagg</p> <p>gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac aactacaaca</p> <p>gccacaaggt ctatatcacc gccgacaagc agaagaacgg catcaaggty aactcaaga</p> <p>cccgccacia catcgaggac ggcagcgtgc</p>

		<p>agctcgccga ccaactaccag cagaacaccc</p> <p>ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc cagtccgccc</p> <p>tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggctcct gctggagttc gtgaccgccc</p> <p>ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaacg <b>tctct</b>acaac cggccccatg</p> <p>gggcccgggg cccccggcg cacccccgga gggggggtgcg cccaggggcc ctggtttatg</p> <p>gctcgtaggg tggtgacagag gggctttcta ggaactccat cttggttggc agtgagtggc</p> <p>cgcatatctc gcagagattg cctctggagt gcatttttgt taagcaccca agacacagat</p> <p>agtggctctt gcacctgatg agacctttgt tgacgaacca gcaagatttg cagttgaacc</p> <p>tgccatacag gccctgtggt agattgaggg tcatggggac ccttcccacc acatcttcgt</p> <p>cgccatgtct cttcctgacc tctttgctat atctgagtcc catcccagt tttgaccagg</p> <p>acttgagctg ggttcaaatt ggacaaattt gaagcgtgac ccaaagatgc ctaggatccc</p> <p>cggtgcg</p>
5	<p>PIC-miniS-GFP: Репрезентативная кДНК для модифицированного S-сегмента изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EF529746.1), в которой кодирующая GP ORF была заменена двумя сайтами рестрикции BsmBI (жирный шрифт), а кодирующая NP ORF была</p>	<p>gcgcaccggg gatcctaggc ataccttgga cgcgcatatt acttgatcaa <b>agagagacg</b>ga</p> <p>ggcct<b>cgctct</b> <b>ct</b>gccctagc ctcgacatgg gcctcgacgt cactcccca taggggagtg</p> <p>acgtcgaggc ctctgaggac ttgagcatgt cttcttactt gtacagctcg tccatgccga</p> <p>gagtgatccc ggccggcggtc acgaactcca gcaggaccat gtgatcgcgc ttctcgttgg</p> <p>ggtctttgct cagggcggac tgggtgctca</p>

	<p>заменена GFP с двумя фланкирующими сайтами рестрикции BbsI (курсивные буквы).</p>	<p>ggtagtggtt gtcgggcagc agcacggggc cgtcgccgat ggggggttcc tgctggtagt ggtcggcgag ctgcacgctg ccgtcctcga tggtgtggcg ggtcttgaag ttcaccttga tgccgttctt ctgcttgctg gcggtgatat agaccttgct gctgctttag ttgtactcca gcttgctgcc caggatgctg ccgtcctcct tgaagtcgat gcccttcagc tcgatgcggt tcaccagggt gtcgccctcg aacttcacct cggcgcggtt cttgtagttg ccgtcgtcct tgaagaagat ggtgcgctcc tggacgtagc cttcgggcat ggaggacttg aagaagtcgt gctgcttcat gtggtcgggg tagcggacga agcactgcac gccgtaggtc aagggtgtca cgagggtggg ccagggcacg ggcagcttgc cggtggtgca gatgaacttc agggtcagct tgccgtaggt ggcacgccc tcgccctcgc cggacacgct gaacttgctg ccgtttacgt cgccgtccag ctgcaccagg atgggcacca ccccggtgaa cagctcctcg cccttgctca ccatgaagac attttggggg tgtttgcaact tcctccgagt cagtgaagaa gtgaacgtac agcgtgatct agaatcgcct aggatccact gtgcg</p>
6	<p>NPΔBbsI: Репрезентативная кДНК для модифицированной ORF, кодирующей NP, изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EF529747.1), в которую некодирующая мутация</p>	<p>GAATC<i>Gaag</i> <i>acatcaaaat</i> gtctgacaac atcccatcat tccgctgggt acagtccctt aggaggggtc tatccaactg gaccatcct gtgaaggctg atgtgttctg ggacacaaga gcactgttat ctgctcttga ctttcacaaa gttgctcaag ttcaaagaat gatgcgcaaa gataaaagga ctgattctga tctgaccaag</p>

	<p>была введена для удаления обоих сайтов рестрикции BbsI (курсивные буквы). Эта ORF также содержит фланкирующие сайты рестрикции BbsI, а также сайты рестрикции EcoRI (заглавные буквы) и NheI (заглавные и курсивные буквы)</p>	<pre> ttaagagaca tgaacaaaga ggttgatgct       ctgatgaata tgagatcaat ccagagggac aatgtgctta aggtgggagg cttagccaaa       gaggagctaa tggagcttgc atctgatttg gacaagttaa gaaagaaagt cactagaact       gagagtttgt ctcagcctgg tgtttatggg ggcaatctca caaacactca gttggaacaa       agagccgaaa tccttcgctc aatggggttc gctaattgcta gacccacagg caacagagat       ggggttgatga agatctggga catcaaggat aatacattgt tgatcaatca atttggatca       atgccagcct taaccatcgc ttgtatgact gagcaagggg gtgaacaact taatgatggt       gtccaagcgc tgagtgcact tggtttgctc tacctgtca agttcccga catgacagat       ctagagaaac tcacacagca acacagtgcc ctaaaaatca ttagtaatga gccatcagcc       ataaacatct cagggtacaa tctcagtttg tctgcagcag tcaaagcagc tgcttgcattg       attgatggtg gcaatatgct tgagaccatc cagggtgaagc cttctatggt tagtactctc       ataaagagtc tattgcaaat aaagaatcgt gaaggatgtt ttgtgagcac tacacccgga       cagagaaatc cttatgaaaa ttactatac aagatttgct tttcagggga tggttggcct       tacattggct caaggtctca agttcaaggg agggcttggg ataacaccac tgtagattta       gattcgaagc cgagtgcctat ccagccacca gtaagaaacg gaggatcacc ggaccttaaa       caaatcccta aggagaaaga agatactggt gtgtcctcaa ttcagatgct tgattcaaaa </pre>
--	---	---

		<p>gctaccacat ggattgacat tgaaggaaca ccaaatgacg cggtggaat ggccatctac</p> <p>cagcctgaca cgggcaacta catacattgt tacagatttc cccacgatga gaagtccttc</p> <p>aaagagcaaa gcaagtactc acatgggtctc cttttaaagg acttggtgga tgcccaacca</p> <p>ggcctgattt cctcaatcat cagacattta cctcaaaaca tggttttcac tgctcaaggt</p> <p>tcagatgata taatcagttt gttcgaaatg catggggaaa gagacttaa agtgcttgac</p> <p>gtgaaactca gtgccgagca agcacgcacc tttgaggatg agatctggga gagatacaat</p> <p>ctactctgca ccaaacataa aggtttggtc ataaagaaga agaagaagg ggctgcacaa</p> <p>accactgcca atcctcactg tgcattgctt gataccatca tgtttgatgc aacagtgaca</p> <p>ggctgggtta gggaccagaa gccgatgaga tgcttgctta ttgacacgct gtacaggaac</p> <p>aacacagatc tgatcaacct ctgagctcat gtcttcGCTA GC</p>
7	<p>PIC-NP-Bsm: Репрезентативная кДНК, полученная, когда NPΔBbsI расщепляли BbsI, чтобы вставить BbsI-мутированную ORF, кодирующую NP, в одинаково расщепленный остов pol-I-PIC-miniS- GFP, тем самым заменяя ORF, кодирующую GFP, кодирующей NP ORF.</p>	<p>gcgcaccggg gatcctaggc ataccttggg cgcgcatatt acttgatcaa ag<b>agagacgga</b></p> <p>ggcct<b>cgctct</b> ctgccctagc ctcgacatgg gcctcgacgt cactccccaa taggggagtg</p> <p>acgtcgaggc ctctgaggac ttgagctcag aggttgatca gatctgtggt gttcctgtac</p> <p>agcgtgtcaa taggcaagca tctcatcggc ttctgggtccc taaccagcc tgtcactggt</p> <p>gcatcaaaaca tgatggtatc aagcaatgca cagtgaggat tcgcagtggg ttgtgcagcc</p> <p>cccttcttct tcttctttat gaccaaacct ttatgtttgg tgcagagtag attgtatctc</p>

		<p>tcccagatct catcctcaaa ggtgcgtgct  tgctcggcac tgagtttcac gtcaagcact</p> <p>ttaagtctc ttctcccatg catttcgaac  aaactgatta tatcatctga accttgagca</p> <p>gtgaaaacca tgttttgagg taaatgtctg  atgattgagg aaatcaggcc tggttgggca</p> <p>tcagccaagt cctttaaaag gagaccatgt  gagtacttgc tttgctcttt gaaggacttc</p> <p>tcatcgtggg gaaatctgta acaatgtatg  tagttgcccg tgtcaggctg gtatagggcc</p> <p>atttcaccog gatcatttgg tgttccttca  atgtcaatcc atgtggtagc ttttgaatca</p> <p>agcatctgaa ttgaggacac aacagtatct  tctttctcct tagggatttg ttaaggctc</p> <p>ggtgatcctc cgtttcttac tgggtgctgg  atagcactcg gcttcgaatc taaatctaca</p> <p>gtggtgttat cccaagccct cccttgaact  tgagaccctg agccaatgta aggccaacca</p> <p>tcccctgaaa gacaaatctt gtatagtaaa  ttttcataag gatttctctg tccgggtgta</p> <p>gtgctcacia acataccttc acgattcttt  atttgaata gactctttat gagagtacta</p> <p>aacatagaag gcttcacctg gatggtctca  agcatattgc caccatcaat catgcaagca</p> <p>gctgctttga ctgctgcaga caaactgaga  ttgtaccctg agatgtttat ggctgatggc</p> <p>tcattactaa tgatttttag ggcactgtgt  tgctgtgtga gtttctctag atctgtcatg</p> <p>ttcgggaact tgacagtgta gagcaaacca  agtgcactca gcgcttgac aacatcatta</p> <p>agttgttcac ccccttgctc agtcatacaa</p>
--	--	---

		<p>gcgatggtta aggctggcat tgatccaaat</p> <p>tgattgatca acaatgtatt atccttgatg tcccagatct tcacaacccc atctctgttg</p> <p>cctgtgggtc tagcattagc gaacccatt gagcgaagga tttcggctct ttgttccaac</p> <p>tgagtgtttg tgagattgcc cccataaaca ccaggctgag acaaactctc agttctagtg</p> <p>actttctttc ttaactgtc caaatcagat gcaagctcca ttagctcctc tttggctaag</p> <p>cctccacct taagcacatt gtcctctgg attgatctca tattcatcag agcatcaacc</p> <p>tctttgttca tgtctcttaa cttggtcaga tcagaatcag tccttttate tttgcgcatc</p> <p>attctttgaa cttgagcaac tttgtgaaag tcaagagcag ataacagtgc tcttgtgtcc</p> <p>gacaacacat cagcctcac aggatgggtc cagttggata gaccctcct aagggactgt</p> <p>accagcgga atgatgggat gttgtcagac atthtgggtg tgtttgact tcctccgagt</p> <p>cagtgaagaa gtgaacgtac agcgtgatct agaatgcct aggatccact gtgcg</p>
8	<p>PIC-GP-Bsm: Репрезентативная кДНК, полученная, когда GPΔBbsI расщепляли BbsI, чтобы вставить BbsI-мутированную ORF, кодирующую GP, в одинаково расщепленный остов pol-I-PIC-miniS- GFP, тем самым заменяя ORF, кодирующую GFP, кодирующей GP ORF.</p>	<p>gcgaccggg gatcctaggc ataccttgga cgcgcatatt acttgatcaa ag<b>agagacga</b></p> <p>ggcct<b>cgctct</b> ctgccctagc ctgcacatgg gcctcgacgt cactcccca taggggagtg</p> <p>acgtcgaggc ctctgaggac ttgagcttat ttaccagtc tcaccattt gtagggtttc</p> <p>tttgggattt tataataccc acagctgcaa agagagttcc tagtaatcct atgtggcttc</p> <p>ggacagccat caccaatgat gtgcctatga gtgggtattc caactaagtg gagaacact</p> <p>gtgatgggtg aaaacacca agaccagaag</p>



	<p> caaagtctg tcaatgctag tggagtctta    ccttgcttt cttcatattc tttatcagc  atctcattgt acagattctg gctctccac    accaatcat tcttaaaatg cgtttcattg  aggtacgagc cattgtgaac taaccaacac    tgcggtaaag aatgtctccc tgtgatggta  tcattgatgt accaaaattt tgtatagttg    caataaggga ttttgcaag ctgtttgaga  ctgtttctaa tcacaagtga gtcagaaata    agtcogttga tagtcttttt aaagagattc  aacgaattct caacattaag ttgtaaggtt    ttgatagcat tctgattgaa atcaaatac  ctcatcgtat cgcaaaattc ttcattgtga    tctttgttgc attttgccat cacagtgtta  tcaaaacatt ttattccagc ccaacaata    gccattgct ccaaacagta accacctggg  acatgttgcc cagtagagtc actcaagtcc    caagtgaaaa agccaaggag tttcctgctc  acagaactat aagcagtttt ttggagagcc    atccttattg ttgccattgg agtatatgta  cagtgatttt cccatgtggt gttctgtatg    atcaggaaat tgtaatgtgt cccaccttca  cagtttgta gtctgcaaga cctccacta    cagttattga aacattttcc aacctcagca  atttttgggt cccaatgat ttgagcaagc    gacgcaataa gatgtctgcc aacctcacct  cctctatccc caactgtcaa gttgtactgg    atcaacaccc cagcacctc aactgttttg  catctggcac ctacatgacg agtgacatgg    agcacattga agtgtaactc attaagcaac  cattttaatg tgtgacctgc ttcttctgctc </p>
--	---

		<p>ttatcacaat tactaatggt accatatgca aggcttctga tgttgaaaa gttccagta</p> <p>gtttcatttg caatggatgt gttgtcaaa gtgagttcaa ttcccatgt tgtgttagat</p> <p>ggtcctttgt agtaatgatg tgtgtgttc ttgctacatg attgtggcaa gttgtcaaac</p> <p>attcttgtga gttgaactc aacgtgggtg agattgtgcc tcctatcaat catcatgcca</p> <p>tcacaacttc tgccagccaa aatgaggaag gtgatgagtt ggaataggcc acatctcatc</p> <p>agattgacaa atcctttgat gatgcatagg gttgagacaa tgattaaggc gacattgaac</p> <p>acctcctgca ggacttcggg tatagactgg atcaaagtca caactgtcc cttttgggg</p> <p>ttgtttgcac ttctccgag tcagtgaaga agtgaacgta cagcgtgatc tagaatcgcc</p> <p>taggatccac tgtgcg</p>
9	GFP-Bsm: <b>зеленый</b> флуоресцентный белок (GFP), синтезированный с фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI (жирный шрифт).	<p><b>cgctctct</b>aaa gatggtgagc aaggcgagc agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg</p> <p>tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg</p> <p>atgccacctc cggcaagctg accctgaagt tcactctgac caccggcaag ctgccctgac</p> <p>cctggccac cctcgtgacc accttgacct acggcgtgca gtgcttcgtc cgctaccccg</p> <p>accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc</p> <p>gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagaccgc cgcggaggtg aagttcgagg</p> <p>gcgacacct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca</p> <p>tcctggggca caagctggag tacaactaca</p>

		<p>acagccacaa ggtctatatc accgccgaca</p> <p>agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agaccgcgcca caacatcgag gacggcagcg</p> <p>tgacgctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc</p> <p>ccgacaacca ctacctgagc acccagtccg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg</p> <p>atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc</p> <p>tgtacaagta agccc<b>agaga cg</b></p>
10	<p>sP1AGM-Bsm: Слитый белок, состоящий из i) сигнального пептида вируса гликопротеина вируса везикулярного стоматита (VSVG), ii) антигена P1A линии клеток мастоцитомы мыши P815, iii) линкера GSG, iv) пептида энтеровируса 2A и v) GM-CSF мыши, синтезированный с фланкирующими сайтами рестрикции BsmBI (жирный шрифт).</p>	<p><b>cgctctctaag</b> gatgaaatgc ctctctacc ttgcatttct cttcattgga gtcaactgca</p> <p>tgagtgacaa caagaagcct gacaaggccc actctggcag tggaggagat ggtgatggca</p> <p>acagatgcaa cctgctgcac agatacagcc tggaaagat cctgccctac ctgggctggc</p> <p>tggtgtttgc tgtggtgaca acaagcttcc tggccctgca gatgttcatt gatgccctgt</p> <p>atgaggaaca gtatgagagg gatgtggcct ggattgccag acagagcaag agaatgagca</p> <p>gtgtggatga ggatgaggat gatgaggatg atgaagatga ctactatgat gatgaggatg</p> <p>atgatgatga tgccttctat gatgatgagg atgatgaaga ggaagaactg gaaaacctga</p> <p>tgatgatga gtctgaggat gaggctgagg aagagatgag tgtggaaatg ggggctgggg</p> <p>cagaagagat gggagcaggt gccaaactgtg cttgtgtgcc aggacaccac ctgagaaaga</p> <p>atgaagtgaa gtgcaggatg atctacttct tccatgacct caactttctg ggtccatcc</p> <p>ctgtgaacct caaagaacag atggaatgca</p>

		<p>gatgtgagaa tgcagatgaa gaggtggcca</p> <p>tggaagaaga agaggaagag gaagaagaag aagaagagga agaaatgggc aaccagatg</p> <p>gcttcagccc tggaagtggc caccatcacc accatcatgg cagtggggca accaacttca</p> <p>gcctgctgaa acaggctggg gatgtggaag aaaatcctgg ccccatgtgg ctccagaatc</p> <p>tgctttttct gggcattgtg gtttacagcc tgagtgcacc cacaagatct cccatcacag</p> <p>tgacaagacc ttggaagcat gtggaagcaa tcaaagaggc cctgaatctg cttgatgaca</p> <p>tgccagtgac cctgaatgaa gaagtggaag tgggtgcaaa tgagttcagc ttcaaaaaac</p> <p>tgacctgtgt gcagaccagg ctgaaaattt ttgaacaggg cctgagagga aacttcacaa</p> <p>agctgaaggg agctctgaac atgactgcca gctactacca gacctactgc cccccaccc</p> <p>cagagacaga ttgtgagaca caagtgacca cctatgctga cttcattgac agcctgaaaa</p> <p>ccttctgac tgacatcccc tttgagtgca agaaacctgt gcagaagtga agaa<b>agagac</b></p> <p><b>g</b></p>
11	PIC-NP-GFP (S-NP/GFP)	<p>gcgcaccggg gatcctaggc ataccttggg cgcgcatatt acttgatcaa agatggtgag</p> <p>caagggcgag gagctgttca ccgggggtgt gcccacctg gtcgagctgg acggcgacgt</p> <p>aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggagggggc gatgccacct acggcaagct</p> <p>gacctgaag ttcactgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac</p> <p>cacctgacc tacggcgtgc agtgcttctg</p>

	<p> cgcgtacccc gaccacatga agcagcacga    ctttttcaag tccgcatgc ccgaaggcta  cgtccaggag cgcaccatct ttttcaagga    cgacggcaac tacaagacct gcgccgaggt  gaagttagag ggcgacacct tggtagaccg    catcgagctg aagggcatcg acttcaagga  ggacggcaac atcctggggc acaagctgga    gtacaactac aacagccaca aggtctatat  caccgccgac aagcagaaga acggcatcaa    ggtgaacttc aagacctgcc acaacatcga  ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta    ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc  cgtgctgctg ccgacaacc actacctgag    caccagctcc gccctgagca aagacctcaa  cgagaagcgc gatcacatgg tctgctgga    gttcgtgacc gccgccgga tcaactctcg  catggacgag ctgtacaagt aagccctagc    ctcgacatgg gcctcgacgt cactcccaa  taggggagtg acgtcgagc ctctgaggac    ttgagctcag aggttgatca gatctgtgtt  gttctgttac agcgtgtcaa taggcaagca    tctcatcggc ttctggctcc taaccagcc  tgtcactgtt gcatcaaaca tgatggtatc    aagcaatgca cagtgaggat tcgcagtgg  ttgtgcagcc ccctcttct tcttctttat    gaccaaacct ttatgtttg tgcagagtag  attgtatctc tccagatct catcctcaa    ggtgcgtgct tgctcggcac tgagttcac  gtcaagcaact ttaagtctc ttctccatg    catttgaac aaactgatta tatcatctga  accttgagca gtgaaaacca tgttttgagg </p>
--	--

	<p>taaatgtctg atgattgagg aaatcaggcc  tggttgggca tcagccaagt cctttaaag</p> <p>gagaccatgt gactacttgc ttgctcttt  gaaggacttc tcactgtggg gaaatctgta</p> <p>acaatgtatg tagttgccg tgtcaggctg  gtagatggcc atttccaccg gatcatttgg</p> <p>tgttccttca atgtcaatcc atgtggtagc  tttgaatca agcatctgaa ttgaggacac</p> <p>aacagtatct tctttctct tagggatttg  ttaaaggtcc ggtgatcctc cgtttcttac</p> <p>tggtggctgg atagcactcg gcttcgaatc  taaacttaca gtggtgttat cccaagcct</p> <p>cccttgaact tgagaccttg agccaatgta  aggccaacca tcccctgaaa gacaaatctt</p> <p>gtatagtaaa ttttcataag gatttctctg  tccgggtgta gtgctcacia acataccttc</p> <p>acgattcttt atttgcaata gactctttat  gagagtacta aacatagaag gcttcacctg</p> <p>gatggtctca agcatattgc caccatcaat  catgcaagca gctgcttga ctgctgcaga</p> <p>caaactgaga ttgtaccctg agatgtttat  ggctgatggc tcattactaa tgatttttag</p> <p>ggcactgtgt tgctgtgtga gtttctctag  atctgtcatg ttcgggaact tgacagtgta</p> <p>gagcaaacca agtgactca gcgcttggac  aacatcatta agttgttcac ccccttgctc</p> <p>agtcatacaa gcgatggtta aggctggcat  tgatccaaat tgattgatca acaatgtatt</p> <p>atccttgatg tcccagatct tcacaacccc  atctctgttg cctgtgggtc tagcattagc</p> <p>gaacccatt gagcgaagga tttcggtctt</p>
--	--

		<p>ttgttccaac tgagtgtttg tgagattgcc</p> <p>cccataaaca ccaggctgag acaaactctc agttctagtg actttctttc ttaacttgtc</p> <p>caaatcagat gcaagctcca ttagctcctc tttggttaag cctcccacct taagcacatt</p> <p>gtccctctgg attgatctca tattcatcag agcatcaacc tctttgttca tgtctcttaa</p> <p>cttggtcaga tcagaatcag tccttttacc tttgcgcatc attctttgaa cttgagcaac</p> <p>tttgtgaaag tcaagagcag ataacagtgc tcttgtgtcc gacaacacat cagccttcac</p> <p>aggatgggtc cagttggata gaccctcct aagggactgt acccagcgga atgatgggat</p> <p>gttgtcagac attttggggt tgtttgcact tcctccgagt cagtgaagaa gtgaacgtac</p> <p>agcgtgatct agaatcgcct aggatccact gtgcg</p>
12	PIC-NP-sPLAGM	<p>gcgcaccggg gatcctaggc atacctgga cgcgcatatt acttgatcaa agatgaaatg</p> <p>cctcctctac ctgcatcttc tcttcattgg agtcaactgc atgagtgaca acaagaagcc</p> <p>tgacaaggcc cactctggca gtggaggaga tggatgatggc aacagatgca acctgctgca</p> <p>cagatacagc ctggaagaga tcctgcctta cctgggctgg ctggtgtttg ctgtggtgac</p> <p>aacaagcttc ctggccctgc agatgttcat tgatgcctg tatgaggaac agtatgagag</p> <p>ggatgtggcc tggattgcca gacagagcaa gagaatgagc agtgtggatg aggatgagga</p> <p>tgatgaggat gatgaagatg actactatga tgatgaggat gatgatgatg atgccttcta</p> <p>tgatgatgag gatgatgaag aggaagaact</p>

		<p> ggaaaacctg atggatgatg agtctgagga    tgaggctgag gaagagatga gtgtggaaat  gggggctggg gcagaagaga tgggagcagg    tgccaactgt gcttgtgtgc caggacacca  cctgagaaag aatgaagtga agtgcaggat    gatctacttc ttccatgacc ccaactttct  ggtgtccatc cctgtgaacc ccaaagaaca    gatggaatgc agatgtgaga atgcagatga  agaggtggcc atggaagaag aagaggaaga    ggaagaagaa gaagaagagg aagaaatggg  caaccagat ggcttcagcc ctggaagtgg    tcacatcac caccatcatg gcagtggggc  aaccaacttc agcctgctga aacaggctgg    ggatgtggaa gaaaatcctg gccctggct  ccagaatctg ctttttctgg gcattgtggt    ttacagcctg agtgcacca caagatctcc  catcacagtg acaagacctt ggaagcatgt    ggaagcaatc aaagaggccc tgaatctgct  tgatgacatg ccagtgaccc tgaatgaaga    agtggaagtg gtgtcaaag agttcagctt  caaaaaactg acctgtgtgc agaccaggct    gaaaattttt gaacagggcc tgagaggaaa  cttcacaaag ctgaagggag ctctgaacat    gactgccagc tactaccaga cctactgccc  ccccaccca gagacagatt gtgagacaca    agtgaccacc tatgctgact tcattgacag  cctgaaaacc ttctgactg acatcccctt    tgagtgaag aaacctgtgc agaagtgagc  cctagcctcg acatgggcct cgacgtcact    ccccaatagg ggagtgacgt cgaggcctct  gaggacttga gctcagagggt tgatcagatc </p>
--	--	--



	<p>           tgtgttggtc ctgtacagcg tgtcaatagg            caagcatctc atcggttctt ggtccctaac              ccagcctgtc actggtgcat caaacatgat            ggatcaagc aatgcacagt gaggattcgc              agtggtttgt gcagccccct tcttcttctt            ctttatgacc aaacctttat gtttggtgca              gagtagattg tatctctccc agatctcadc            ctcaaaggty cgtgcttgct cggcactgag              tttcacgtca agcactttta agtctcttct            cccatgcatt tcgaacaaac tgattatadc              atctgaacct tgagcagtga aaaccatggt            ttgaggtaaa tgtctgatga ttgaggaaat              caggcctggt tgggcatcag ccaagtcctt            taaaaggaga ccatgtgagt acttgctttg              ctctttgaag gacttctcat cgtggggaaa            tctgtaacaa tgtatgtagt tgcccgtgct              aggctggtag atggccattt ccaccggatc            atttgggtgt ccttcaatgt caatccatgt              ggtagctttt gaatcaagca tctgaattga            ggacacaaca gtatcttctt tctccttagg              gatttgttta aggtccggtg atcctccggt            tcttactggt ggctggatag cactcggctt              cgaatctaaa tctacagtgg tgttatccca            agccctcctt tgaacttgag accttgagcc              aatgtaaggc caaccatccc ctgaaagaca            aatcttgat agtaaatttt cataaggatt              tctctgtccg ggtgtagtgc tcacaaacat            acctcacga ttctttattt gcaatagact              ctttatgaga gtactaaaca tagaaggctt            cacctggatg gtctcaagca tattgccacc              atcaatcatg caagcagctg ctttgactgc         </p>
--	--

		<p>tgcagacaaa ctgagattgt accctgagat</p> <p>gtttatggct gatggctcat tactaatgat          ttttagggca ctgtgttgct gtgtgagttt</p> <p>ctctagatct gtcattgttcg ggaacttgac          agtgtagagc aaaccaagtg cactcagcgc</p> <p>ttggacaaca tcattaagtt gttcaccccc          ttgctcagtc atacaagcga tggtaaggc</p> <p>tggcattgat ccaaattgat tgatcaacaa          tgtattatcc ttgatgtccc agatcttcac</p> <p>aaccccatct ctggttgctg tgggtctagc          attagcgaac cccattgagc gaaggatttc</p> <p>ggctctttgt tccaactgag tgtttgtag          attgccccca taaacaccag gctgagacaa</p> <p>actctcagtt ctagtgactt tctttcttaa          cttgtccaaa tcagatgcaa gctccattag</p> <p>ctcctctttg gctaagcctc ccaccttaag          cacattgtcc ctctggattg atctcatatt</p> <p>catcagagca tcaacctctt tgttcattgc          tcttaacttg gtcagatcag aatcagtcct</p> <p>tttatctttg cgcattcattc tttgaacttg          agcaactttg tgaaagtcaa gagcagataa</p> <p>cagtgtcttt gtgtccgaca acacatcagc          cttcacagga tgggtccagt tggatagacc</p> <p>cctcctaagg gactgtaccc agcggaatga          tgggatgttg tcagacattt tggggttggt</p> <p>tgcacttctt ccgagtcagt gaagaagtga          acgtacagcg tgatctagaa tcgcctagga</p> <p>tccactgtgc g</p>
13	PIC-GP-GFP (S-GP/GFPpart)	<p>gcgacccggg gatcctaggc ataccttggg          cgcgcatatt acttgatcaa agatgggtgag</p> <p>caagggcgag gagctgttca ccgggggtgt</p>

	<p>gcccacacctg gtcgagctgg acggcgacgt</p> <p>aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga ggcgaggggc gatgccacct acggcaagct</p> <p>gacctgaag ttcactgca ccaccggcaa gtgcccgtg cctggcca cctcgtgac</p> <p>caccttgacc tacggcgtgc agtgcttcgt ccgtacccc gaccacatga agcagcacga</p> <p>cttttcaag tccgcatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tttcaagga</p> <p>cgacggcaac tacaagacc gcgcccaggt gaagttcgag ggcgacacc tggtagaccg</p> <p>catcgagctg aaggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctga</p> <p>gtacaactac aacagccaca aggtctatat caccgccgac aagcagaaga acggcatcaa</p> <p>ggtgaacttc aagaccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta</p> <p>ccagcagaac accccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag</p> <p>caccagtcc gccctgagca aagacccaa cgagaagcgc gatcacatgg tctgctgga</p> <p>gttcgtgacc gccgccgga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aagccctagc</p> <p>ctcgacatgg gcctcgacgt cactcccaa taggggagtg acgtcgaggc ctctgaggac</p> <p>ttgagcttat ttaccagtc taccattt gtagggtttc tttggattt tataatacc</p> <p>acagctgca agagagtcc tagtaatcct atgtggcttc ggacagccat caccaatgat</p> <p>gtgcctatga gtgggtatt caactaagt gagaaacact gtgatggtgt aaaacaccaa</p>
--	---

	<p>agaccagaag caaatgtctg tcaatgctag  tggagtctta ccttgtcttt cttcatattc</p> <p>ttttatcagc atttcattgt acagattctg  gctctccac aaccaatcat tcttaaaatg</p> <p>cgtttcattg aggtacgagc cattgtgaac  taaccaaac tgcggtaaag aatgtctccc</p> <p>tgtgatgta tcattgatgt accaaaattt  tgtatagttg caataaggga tttggcaag</p> <p>ctgtttgaga ctgtttctaa tcacaagtga  gtcagaaata agtccgttga tagtcttttt</p> <p>aaagagattc aacgaattct caacattaag  ttgtaaggtt ttgatagcat tctgattgaa</p> <p>atcaaataac ctcatcgtat cgcaaaattc  ttcattgtga tctttgttgc attttgccat</p> <p>cacagtgtta tcaaacatt ttattccagc  ccaacaata gccattgct ccaaacagta</p> <p>accacctggg acatgttgcc cagtagagtc  actcaagtcc caagtgaaa agccaaggag</p> <p>tttctgctc acagaactat aagcagtttt  ttggagagcc atccttattg ttgccattgg</p> <p>agtatatgta cagtgatttt cccatgtggt  gttctgtatg atcaggaaat tgtaatgtgt</p> <p>cccaccttca cagtttgta gtctgcaaga  ccctccacta cagttattga aacattttcc</p> <p>aaccacgca atttttgggt cccaatgat  ttgagcaagc gacgcaataa gatgtctgcc</p> <p>aacctcacct cctctatccc caactgtcaa  gttgtactgg atcaacacc cagcacctc</p> <p>aactgttttg catctggcac ctacatgacg  agtgacatgg agcacattga agtgtaactc</p> <p>attaagcaac cattttaatg tgtgacctgc</p>
--	---

		<p>ttcttctgtc ttatcacaat tactaatggt</p> <p>accatgatgca aggccttctga tgttgaaaa gtttcagta gtttcatttg caatggatgt</p> <p>gtttgtcaaa gtgagttcaa ttccccatgt tgtgttagat ggtcctttgt agtaatgatg</p> <p>tgtgttggtc ttgctacatg attgtggcaa gttgtcaaac attcttctga ggttgaactc</p> <p>aacgtgggtg agattgtgcc tcctatcaat catcatgcca tcacaacttc tgccagcaa</p> <p>aatgaggaag gtgatgagtt ggaataggcc acatctcatc agattgaaa atcctttgat</p> <p>gatgcatagg gttgagaaa tgattaaggc gacattgaac acctcctgca ggacttcggg</p> <p>tatagactgg atcaaagtca caacttgtcc cattttgggg ttgtttgac ttctccgag</p> <p>tcagtgaaga agtgaacgta cagcgtgatc tagaatgcc taggatccac tgtgcg</p>
14	PIC-GP-sPLAGM	<p>gcgacccggg gatcctaggc atacctgga cgcgcatatt acttgatcaa agatgaaatg</p> <p>cctcctctac cttgcatttc tcttcattgg agtcaactgc atgagtgaca acaagaagcc</p> <p>tgacaaggcc cactctggca gtggaggaga tggatgatggc aacagatgca acctgctgca</p> <p>cagatacagc ctggaagaga tcctgccta cctgggctgg ctggtgtttg ctgtggtgac</p> <p>aacaagcttc ctggccctgc agatgttcat tgatgccctg tatgaggaac agtatgagag</p> <p>ggatgtggcc tggattgcca gacagagcaa gagaatgagc agtgtggatg aggatgagga</p> <p>tgatgaggat gatgaagatg actactatga tgatgaggat gatgatgatg atgccttcta</p> <p>tgatgatgag gatgatgaag aggaagaact</p>

	<p> ggaaaacctg atggatgatg agtctgagga    tgaggctgag gaagagatga gtgtggaat  gggggctggg gcagaagaga tgggagcagg    tgccaactgt gcttgtgtgc caggacacca  cctgagaaag aatgaagtga agtgcaggat    gatctacttc ttccatgacc ccaactttct  ggtgtccatc cctgtgaacc ccaaagaaca    gatggaatgc agatgtgaga atgcagatga  agaggtggcc atggaagaag aagaggaaga    ggaagaagaa gaagaagagg aagaaatggg  caaccagat ggcttcagcc ctggaagtgg    tcacatcac caccatcatg gcagtggggc  aaccaacttc agcctgctga aacaggctgg    ggatgtggaa gaaaatcctg gccctggct  ccagaatctg ctttttctgg gcattgtggt    ttacagcctg agtgcacca caagatctcc  catcacagtg acaagacctt ggaagcatgt    ggaagcaatc aaagaggccc tgaatctgct  tgatgacatg ccagtgacct tgaatgaaga    agtggaagtg gtgtcaaatg agttcagctt  caaaaaactg acctgtgtgc agaccaggct    gaaaattttt gaacagggcc tgagaggaaa  cttcacaaag ctgaaggag ctctgaacat    gactgccagc tactaccaga cctactgcc  ccccaccca gagacagatt gtgagacaca    agtgaccacc tatgctgact tcattgacag  cctgaaaacc ttcctgactg acatcccctt    tgagtgcaag aaacctgtgc agaagtgagc  cctagcctcg acatgggcct cgacgtcact    ccccaatagg ggagtgacgt cgaggcctct  gaggacttga gcttatttac ccagtctcac </p>
--	---

	<p>ccattttag ggtttctttg ggattttata ataccacag ctgcaaagag agttcctagt</p> <p>aatcctatgt ggcttcggac agccatcacc aatgatgtgc ctatgagtgg gtattccaac</p> <p>taagtggaga aacactgtga tgggtgaaaa caccaaagac cagaagcaaa tgtctgtcaa</p> <p>tgctagtgga gtcttacctt gtctttcttc atattctttt atcagcattt cattgtacag</p> <p>attctggctc tcccacaacc aatcattctt aaaatgcgtt tcattgaggt acgagccatt</p> <p>gtgaactaac caacactgcg gtaaagaatg tctccctgtg atggtatcat tgatgtacca</p> <p>aaatthttgta tagttgcaat aagggtttt ggcaagctgt ttgagactgt ttctaatac</p> <p>aagtgagtca gaaataagtc cgttgatagt ctttttaag agattcaacg aattctcaac</p> <p>attaagttgt aaggthttga tagcattctg attgaaatca aataacctca tcgtatcgca</p> <p>aaattcttca ttgtgatctt tgttgcatth tgccatcaca gtgttatcaa aacatthttat</p> <p>tccagcccaa acaatagccc attgctcaa acagtaacca cctgggacat gttgcccagt</p> <p>agagtcactc aagtcccaag tgaaaaagcc aaggagtthc ctgctcacag aactataagc</p> <p>agththtttg agagccatcc ttattgttg cattggagta tatgtacagt gattthccca</p> <p>tgtggtgttc tgtatgatca ggaaattgta atgtgtccca ccttcacagt ttgttagtct</p> <p>gcaagaccct cactacagt tattgaaaca thttccaacc cacgcaatth ttgggtcccc</p> <p>aatgatttga gcaagcgacg caataagatg</p>
--	--

		<p>tctgcccaacc tcacctcctc tatccccaac</p> <p>tgcaagttg tactggatca acaccccagc accctcaact gttttgcac tggcacctac</p> <p>atgacgagtg acatggagca cattgaagtg taactcatta agcaaccatt ttaatgtgtg</p> <p>acctgttct tctgtcttat cacaattact aatgttacca tatgcaaggc ttctgatgtt</p> <p>ggaaaagttt ccagtagttt catttgcaat ggatgtgttt gtcaaagtga gttcaattcc</p> <p>ccatgttgtg ttagatggtc cttttagta atgatgtgtg ttgttcttgc tacatgattg</p> <p>tggcaagttg tcaaacattc ttgtgaggtt gaactcaacg tgggtgagat tgtgcctcct</p> <p>atcaatcatc atgcatcac aacttctgcc agccaaaatg aggaaggtga tgagttggaa</p> <p>taggccacat ctcatcagat tgacaaatcc tttgatgatg catagggttg agacaatgat</p> <p>taaggcgaca ttgaacacct cctgcaggac ttcgggtata gactggatca aagtcacaac</p> <p>ttgtccatt ttggggtgtt ttgcacttcc tccgagtcag tgaagaagtg aacgtacagc</p> <p>gtgatctaga atcgcctagg atccactgtg cg</p>
15	S-GP/GFPnat	<p>gcgaccggy gatcctaggc ataccttga</p> <p>cgcgcatatt acttgatcaa agatgggaca</p> <p>agttgtgact ttgatccagt ctatacccga</p> <p>agtctgcag gaggtgttca atgtgcctt</p> <p>aatcattgtc tcaacctat gcatcatcaa</p> <p>aggatttgtc aatctgatga gatgtggcct</p> <p>attccaactc atcaccttcc tcattttggc</p> <p>tggcagaagt tgtgatggca tgatgattga</p> <p>taggaggcac aatctcacc acgttgagtt</p> <p>caacctcaca agaatgtttg acaacttggc</p> <p>acaatcatgt agcaagaaca acacacatca</p> <p>ttactacaaa ggaccatcta acacaacatg</p> <p>gggaattgaa ctcaacttga caaacacatc</p>



	cattgcaaat	gaaactactg	gaaacttttc
	caacatcaga	agccttgcac	atggtaacat
	tagtaattgt	gataagacag	aagaagcagg
	tcacacatta	aatgggttgc	ttaatgagtt
	acacttcaat	gtgctccatg	tcactcgtca
	tgtaggtgcc	agatgcaaaa	cagttgaggg
	tgctggggtg	ttgatccagt	acaacttgac
	agttggggat	agaggagggtg	aggttggcag
	acatccttatt	gcgtcgcttg	ctcaaatcat
	tggggaccca	aaaattgcgt	gggttggaaa
	atgtttcaat	aactgtagtg	gagggctctg
	cagactaaca	aactgtgaag	gtgggacaca
	ttacaatttc	ctgatcatac	agaacaccac
	atgggaaaat	cactgtacat	atactccaat
	ggcaacaata	aggatggctc	tccaaaaaac
	tgcttatagt	tctgtgagca	ggaaactcct
	tggctttttc	acttgggact	tgagtgactc
	tactgggcaa	catgtcccag	gtggttactg
	tttgagcaa	tgggctattg	tttgggctgg
	aataaaatgt	tttgataaca	ctgtgatggc
	aaaatgcaac	aaagatcaca	atgaagaatt
	ttgcgatacg	atgaggttat	ttgatttcaa
	tcagaatgct	atcaaaacct	tacaacttaa
	tgttgagaat	tcgttgaatc	tctttaaaaa
	gactatcaac	ggacttattt	ctgactcact
	tgtgattaga	aacagtctca	aacagcttgc
	caaaaatccct	tattgcaact	atacaaaatt
	ttggtacatc	aatgatacca	tcacagggag
	acattcttta	ccgcagtgtt	ggttagtcca
	caatggctcg	tacctcaatg	aaacgcattt
	taagaatgat	tggttgtggg	agagccagaa
	tctgtacaat	gaaatgctga	taaaagaata
	tgaagaaaga	caaggtgaaga	ctccactagc
	attgacagac	atgtgcttct	ggtctttggt
	gttttacacc	atcacagtgt	ttctccactt
	agttggaata	cccactcata	ggcacatcat
	tggtgatggc	tgtccgaagc	cacataggat
	tactaggaac	tctctttgca	gctgtgggta
	ttataaaatc	ccaagaaac	cctacaaatg
	ggtgagactg	ggtaaataag	ccctagcctc
	gacatgggcc	tcgacgtcac	tccccaatag
	gggagtgacg	tcgaggcctc	tgaggacttg

		agcatgtcct	cttacttgta	cagctcgtcc
		atgccgagag	tgatcccggc	ggcggtcacg
		aactccagca	ggaccatgtg	atcgcgcttc
		tcgttggggg	ctttgctcag	ggcggactgg
		gtgctcaggt	agtggttgtc	gggcagcagc
		acggggccgt	cgccgatggg	ggtgttctgc
		tggtagtggg	cgccgagctg	cacgctgccg
		tcctcgatgt	tgtggcgggt	cttgaagttc
		accttgatgc	cgttcttctg	cttgtcggcg
		gtgatataga	ccttgtaggt	ggttagttg
		tactccagct	tgtgcccag	gatgttgccg
		tcctccttga	agtcgatgcc	cttcagctcg
		atgcggttca	ccaggggtgc	gccctcgaac
		ttcaactcgg	cgccgggtctt	gtagttgccg
		tcgtccttga	agaagatggg	gcgctcctgg
		acgtagcctt	cgggcatggc	ggacttgaag
		aagtcgtgct	gcttcatgtg	gtcggggtag
		cggacgaagc	actgcacgcc	gtaggtcaag
		gtggtcacga	gggtgggcca	gggcacgggc
		agcttgccgg	tggtgcagat	gaacttcagg
		gtcagcttgc	cgtaggtggc	atcgcctcgc
		ccctcgcggg	acacgctgaa	cttgtggccg
		tttacgtcgc	cgccagctc	gaccaggatg
		ggcaccacc	cggtgaacag	ctcctcggcc
		ttgctcacca	tgaagacatt	ttggggttgt
		ttgcacttcc	tccgagtcag	tgaagaagtg
		aacgtacagc	gtgatctaga	atcgcctagg
		atccactgtg	cg	
16	SABbs: S-сегмент изолята P18 штамма Munchique CoAn4763 вируса Пичинде (номер доступа в Genbank: EF529746.1), в который были введены некодирующие мутации для удаления четырех сайтов рестрикции BbsI. Геномный сегмент представляет собой РНК, для ДНК показана последовательность в	gcccaccggg	gatcctaggc	ataccttggg
		cgccgatatt	acttgatcaa	agatgggaca
		agttgtgact	ttgatccagt	ctatacccga
		agtcctgcag	gaggtgttca	atgtcgcctt
		aatcattgtc	tcaaccctat	gcatcatcaa
		aggatttgtc	aatctgatga	gatgtggcct
		attccaactc	atcaccttcc	tcattttggc
		tggcagaagt	tgtgatggca	tgatgattga
		taggaggsac	aatctcacc	acgttgagtt
		caacctcaca	agaatgtttg	acaacttgcc
		acaatcatgt	agcaagaaca	acacacatca
		ttactacaaa	ggaccatcta	acacaacatg
		gggaattgaa	ctcactttga	caaacacatc
		cattgcaaat	gaaactactg	gaaacttttc

	SEQ ID NO:16; однако замена всех ТИМИДИНОВ («Т») в SEQ ID NO:1 на уридины («У») обеспечивает последовательность РНК.	caacatcaga tagtaattgt tcacacatta acacttcaat tgtaggtgcc tgcctgggtg agttggggat acatcttatt tggggaccca atgtttcaat cagactaaca ttacaatttc atgggaaaat ggcaacaata tgcttatagt tggctttttc tactgggcaa tttggagcaa aataaaatgt aaaatgcaac ttgcgatacg tcagaatgct tgttgagaat gactatcaac tgtgattaga caaaatccct ttggtacatc acattcttta caatggctcg taagaatgat tctgtacaat tgaagaaaga attgacagac gttttacacc agttggaata tggatgatggc tactaggaac ttataaaatc ggtgagactg gacatgggcc gggagtgacg agctcagagg	agccttgcat gataagacag aaatgggtgc gtgctccatg agatgcaaaa ttgatccagt agaggagggtg gcgtcgcttg aaaattgctg aactgtagtg aactgtgaag ctgatcatac cactgtacat aggatggctc tctgtgagca acttgggact catgtcccag tgggctattg tttgataaca aaagatcaca atgaggttat atcaaacct tcgttgaatc ggacttattt aacagtctca tattgcaact aatgatacca ccgcagtgtt tacctcaatg tggttgtggg gaaatgctga caaggtgaaga atttgcttct atcacagtgt cccactcata tgtccgaagc tctctttgca ccaaagaaac ggtaaataag tcgacgtcac tcgaggcctc ttgatcagat	atggtaacat aagaagcagg ttaatgagtt tcactcgtca cagttgaggg acaacttgac aggttgccag ctcaaatcat gggttggaaa gagggctctg gtgggacaca agaacaccac atactccaat tccaaaaaac ggaaactcct tgagtgactc gtggttactg tttgggctgg ctgtgatggc atgaagaatt ttgatttcaa tacaacttaa tctttaaaaa ctgactcact aacagcttgc atacaaaatt tcacagggag ggttagttca aaacgcattt agagccagaa taaaagaata ctccactagc ggtctttggt ttctccactt ggcacatcat cacataggat gctgtgggta cctacaaatg ccctagcctc tccccaatag tgaggacttg ctgtgttgtt
--	--	---	---	--

cctgtacagc	gtgtcaatag	gcaagcatct
catcggttc	tggccctaa	cccagcctgt
cactgttgca	tcaaacatga	tggtatcaag
caatgcacag	tgaggattcg	cagtggtttg
tcagagcccc	ttctttctct	tctttatgac
caaaccttta	tgtttgggtc	agagtagatt
gtatctctcc	cagatctcat	cctcaaaggt
gcggtcttgc	tcggcactga	gtttcacgtc
aagcactttt	aagtctcttc	tcccatgcat
ttcgaacaaa	ctgattatat	catctgaacc
ttgagcagtg	aaaaccatgt	tttgaggtaa
atgtctgatg	attgaggaaa	tcaggcctgg
ttgggcatca	gccaaagcct	ttaaaggag
accatgtgag	tacttgcttt	gctctttgaa
ggacttctca	tcgtggggaa	atctgtaaca
atgtatgtag	ttgccgtgt	caggctggta
gatggccatt	tccaccgat	catttgggtg
tccttcaatg	tcaatccatg	tggtagcttt
tgaatcaagc	atctgaattg	aggacacaac
agtatcttct	ttctccttag	ggatttgttt
aaggctccgt	gatcctccgt	ttcttactgg
tggctggata	gcactcggct	tcgaatctaa
atctacagtg	gtgttatccc	aagccctccc
ttgaacttga	gaccttgagc	caatgtaagg
ccaaccatcc	cctgaaagac	aaatcttgta
tagtaaattt	tcataaggat	ttctctgtcc
gggtgtagtg	ctcacaacaa	taccttcacg
attctttatt	tgcaatagac	tctttatgag
agtactaaac	atagaaggct	tcacctggat
ggctcgaagc	atattgccac	catcaatcat
gcaagcagct	gctttgactg	ctgcagacaa
actgagattg	taccctgaga	tgtttatggc
tgatggctca	ttactaatga	tttttagggc
actgtgttgc	tgtgtgagtt	tctctagatc
tgtcatgttc	gggaacttga	cagtgtagag
caaaccaagt	gcactcagcg	cttggaacac
atcattaagt	tgttcacccc	cttgctcagt
catacaagcg	atggttaagg	ctggcattga
tccaaattga	ttgatcaaca	atgtattatc
cttgatgtcc	cagatcttca	caacccatc
tctgttgctc	gtgggtctag	cattagcgaa
ccccattgag	cgaaggattt	cggctctttg

		ttccaactga	gtgtttgtga	gattgcccc
		ataaacacca	ggctgagaca	aactctcagt
		tctagtgact	ttctttctta	acttgccaa
		atcagatgca	agctccatta	gctcctcttt
		ggctaagcct	cccaccttaa	gcacattgtc
		cctctggatt	gatctcatat	tcatcagagc
		atcaacctct	ttgttcatgt	ctcttaacct
		ggtcagatca	gaatcagtcc	ttttatcttt
		gcgcatcatt	ctttgaactt	gagcaacttt
		gtgaaagtca	agagcagata	acagtgtctt
		tgtgtccgac	aacacatcag	ccttcacagg
		atgggtccag	ttggatagac	ccctcctaag
		ggactgtacc	cagcggaatg	atgggatgtt
		gtcagacatt	ttggggttgt	ttgcacttcc
		tccgagtcag	tgaagaagtg	aacgtacagc
		gtgatctaga	atgcctagg	atccactgtg cg

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом, содержащая один L-сегмент и два S-сегмента, где

первый S-сегмент содержит открытую рамку считывания ("ORF"), кодирующую гликопротеин (GP) вируса Пичинде, в положении под контролем геномной 3'-нетранслируемой области ("UTR") вируса Пичинде и ORF, кодирующую первый представляющий интерес ген, в положении под контролем геномной 5'-UTR вируса Пичинде, и

второй S-сегмент содержит ORF, кодирующую нуклеопротеин ("NP") вируса Пичинде, в положении под контролем геномной 3'-UTR вируса Пичинде и ORF, кодирующую второй представляющий интерес ген, в положении под контролем геномной 5'-UTR вируса Пичинде, и L-сегмент содержит ORF, кодирующую РНК-зависимую РНК-полимеразу ("L-белок"), в положении под контролем геномной 3'-UTR вируса Пичинде и ORF, кодирующую матриксный белок Z ("белок Z"), в положении под контролем геномной 5'-UTR вируса Пичинде.

2. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по п.1, причем размножение частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом не приводит к образованию компетентной по репликации вирусной частицы с двухсегментным геномом после 70 дней персистирующей инфекции у мышей, у которых отсутствует интерфероновый рецептор типа I, интерфероновый рецептор типа II и активирующий рекомбинацию ген 1 (RAG1), и которые были инфицированы  $10^4$  БОЕ частиц вируса Пичинде с трехсегментным геномом, где необязательно указанная межсегментная рекомбинация двух S-сегментов, объединяющая две ORF вируса Пичинде только в одном, а не в двух отдельных сегментах, отменяет вирусную промоторную активность.

3. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по п.1, где межсегментная рекомбинация двух S-сегментов, объединяющая две ORF вируса Пичинде только в одном, а не в двух отдельных сегментах, отменяет вирусную промоторную активность.

4. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-3, где геномная 3'-UTR вируса Пичинде представляет собой 3'-UTR S-сегмента вируса Пичинде или L-сегмента вируса Пичинде, и где геномная 5'-UTR вируса Пичинде представляет собой 5'-UTR S-сегмента вируса Пичинде или L-сегмента вируса Пичинде.

5. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-4, где первый и/или второй представляющий интерес ген кодирует антиген, происходящий из инфекционного организма, опухоли или аллелгена.

6. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по п.5, где антиген выбирают из антигенов вируса иммунодефицита человека, антигенов вируса гепатита С, антигенов вируса ветряной оспы, антигенов цитомегаловируса, антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, антигенов папилломавируса человека, ассоциированных с опухолью антигенов и опухолеспецифических антигенов, таких как опухолевые неантигены и опухолевые неопитопы.

7. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-4, где первый и/или второй представляющий интерес ген кодирует флуоресцентный белок.

8. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-7, где частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом является инфекционной и компетентной по репликации.

9. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-8, где частица вируса

Пичинде с трехсегментным геномом является аттенуированной.

10. Частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-9, где частица вируса Пичинде с трехсегментным геномом получена из изолята P18 штамма Munchique CoAn4763, или штамма P2.

11. кДНК или совокупность кДНК, кодирующих геномный сегмент или сегменты частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-10.

12. Вектор для экспрессии ДНК или совокупность векторов для экспрессии ДНК, содержащие кДНК или совокупность кДНК по п.11.

13. Клетка-хозяин, содержащая частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-10, кДНК или совокупность кДНК по п.11 или вектор для экспрессии ДНК или набор векторов для экспрессии ДНК по п.12.

14. Способ образования частицы вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-10, который включает:

(i) трансфекцию в клетку-хозяина одной или более кДНК для одного L-сегмента и двух S-сегментов;

(ii) поддержание клетки-хозяина в условиях, подходящих для образования вируса; и

(iii) сбор частиц вируса Пичинде.

15. Способ по п.14, где транскрипция одного L-сегмента и двух S-сегментов осуществляется с использованием двунаправленного промотора.

16. Способ по п.14 или 15, где способ дополнительно включает трансфекцию в клетку-хозяина одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих полимеразу вируса Пичинде, необязательно, где полимеразы вируса Пичинде представляет собой L-белок.

17. Способ по любому из пп.14-16, где способ дополнительно содержит трансфекцию в клетку-хозяина одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих NP.

18. Способ по п.14, где транскрипция каждого из одного L-сегмента и двух S-сегментов осуществляется под контролем промотора, выбранного из группы, состоящей из:

(i) промотора для РНК-полимеразы I;

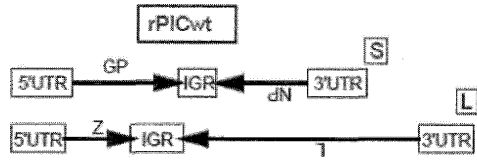
(ii) промотора для РНК-полимеразы II; и

(iii) промотора T7.

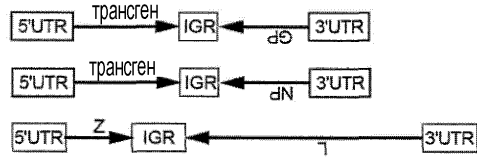
19. Вакцина, содержащая частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая частицу вируса Пичинде с трехсегментным геномом по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

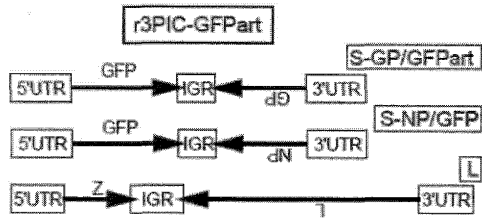
A



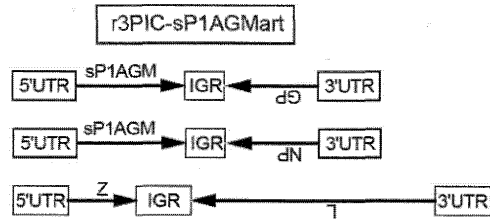
B



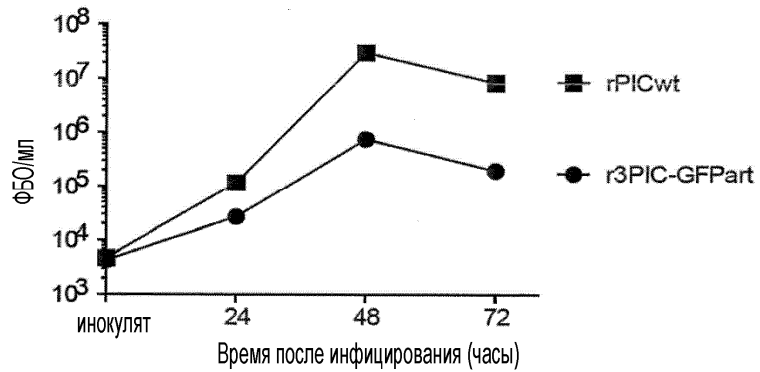
C



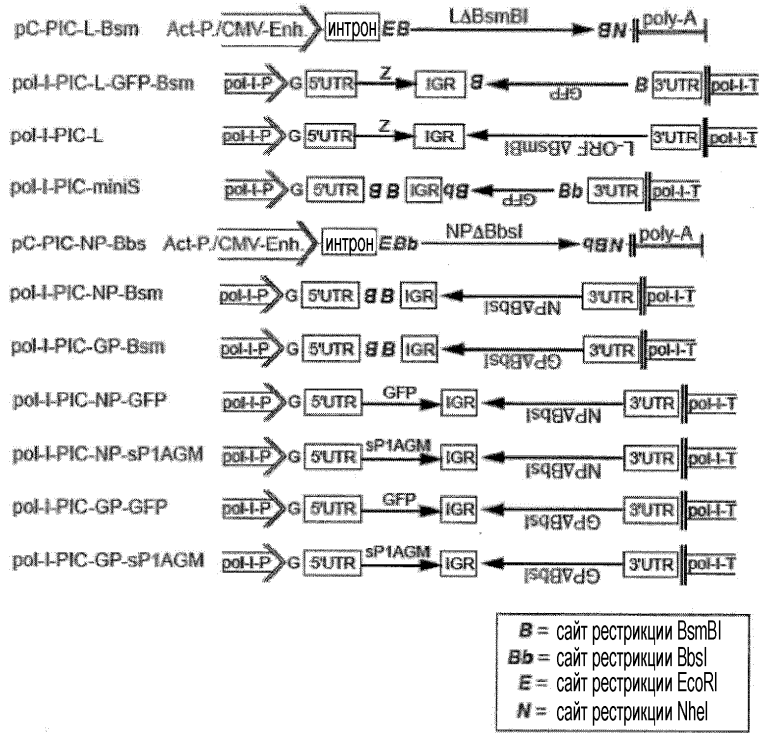
D



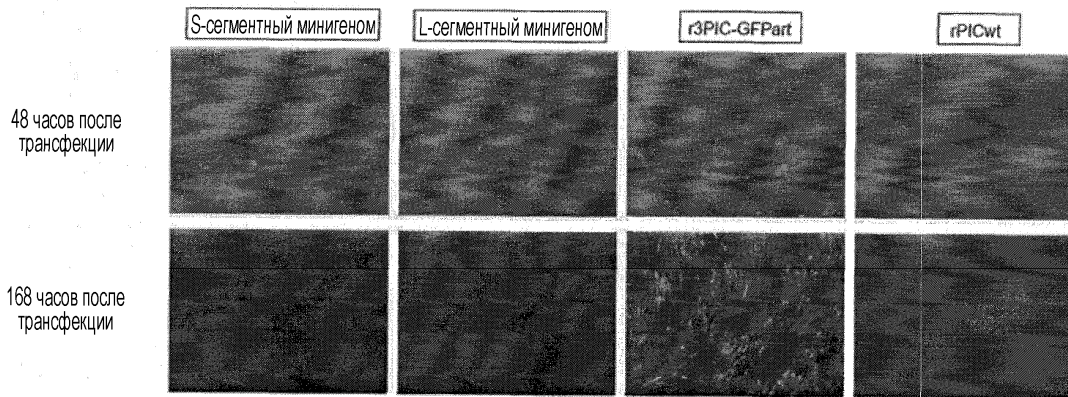
Фиг. 1



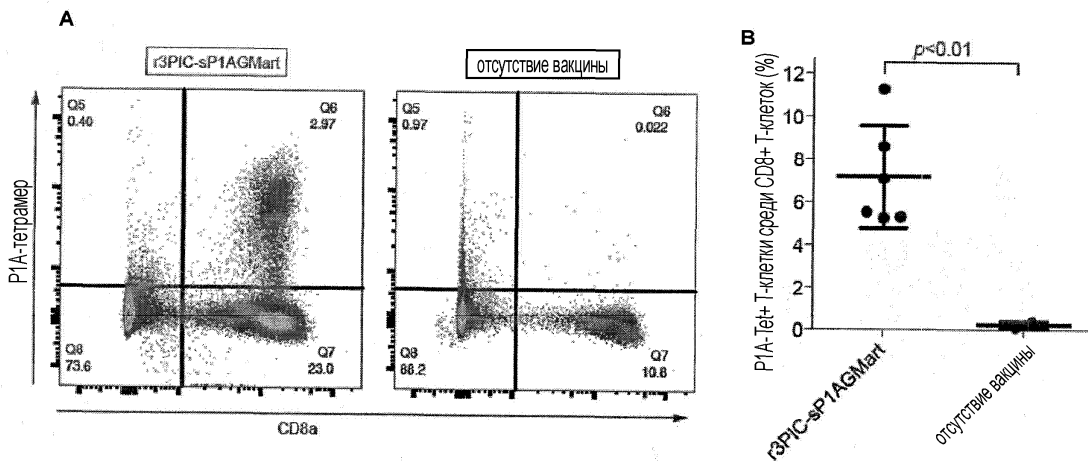
Фиг. 2



Фиг. 3

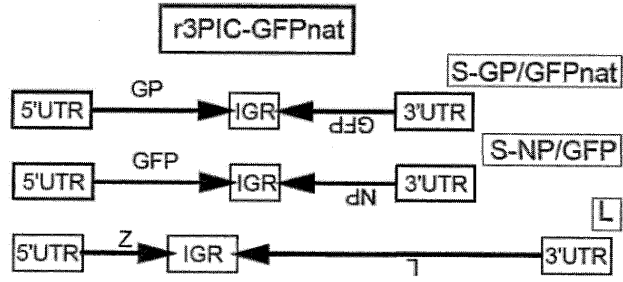


Фиг. 4

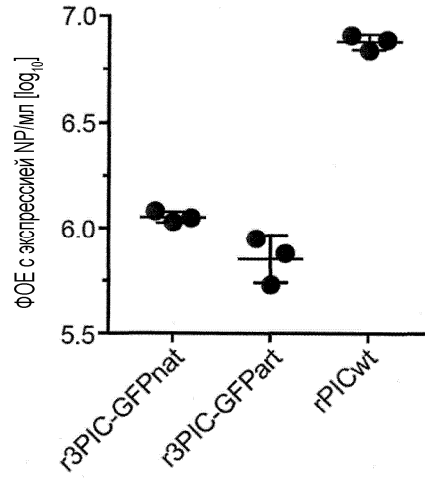


Фиг. 5

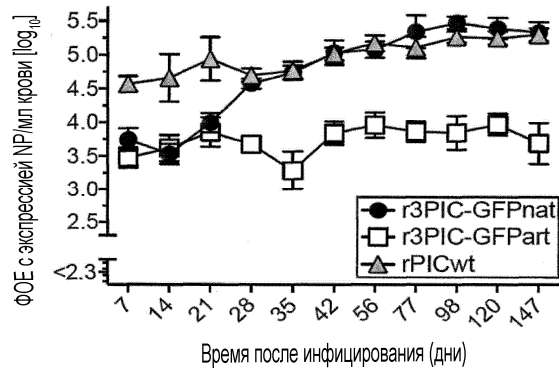




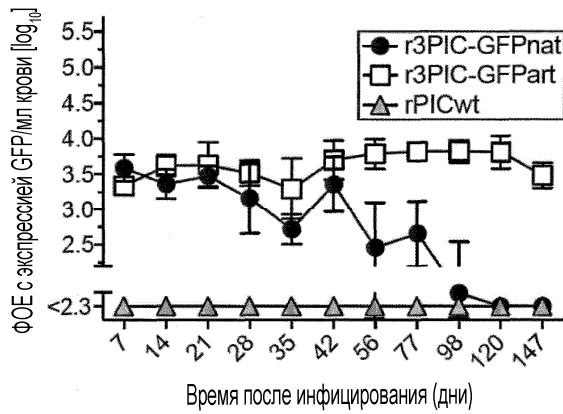
Фиг. 6



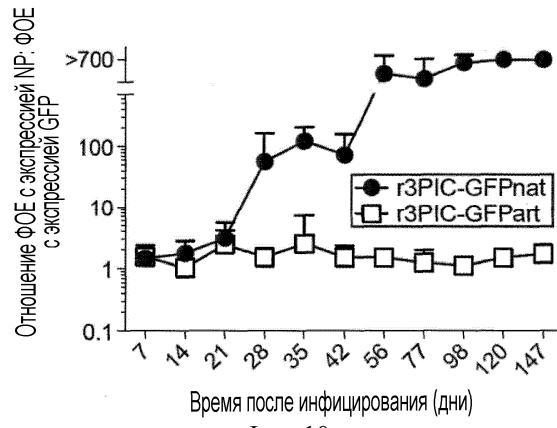
Фиг. 7



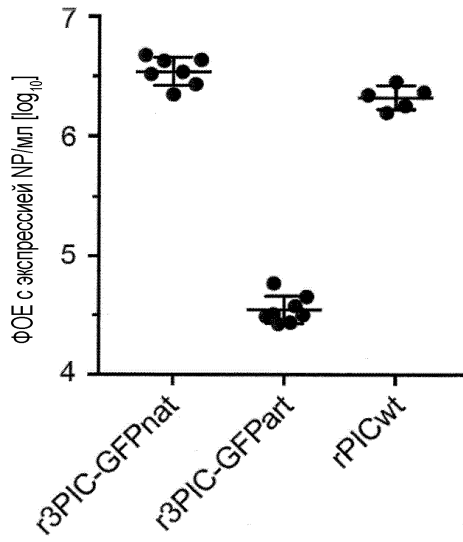
Фиг. 8



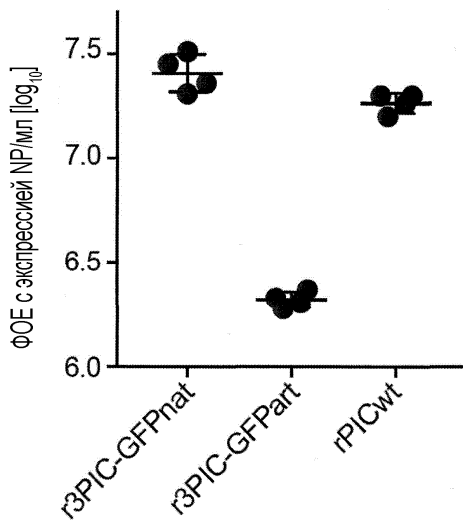
Фиг. 9



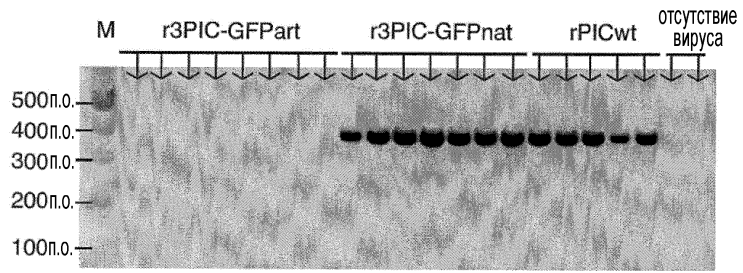
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

