

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393013** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.02.06

(51) Int. Cl. **C12N 7/00 (2006.01)**
C12N 15/113 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.25

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕАССОРТАНТНОГО РОТАВИРУСА**

(31) **10-2021-0070036**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.05.31**

Ли Чон-Ын, Квон Тэу (KR)

(33) **KR**

(74) Представитель:

(86) **PCT/KR2022/004185**

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,**

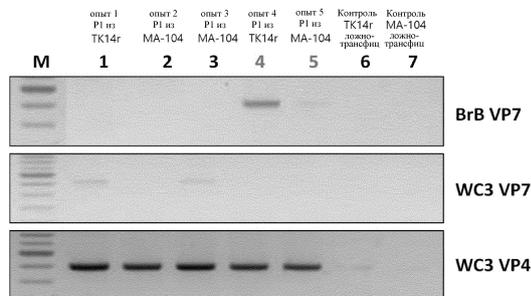
(87) **WO 2022/255607 2022.12.08**

**Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

(71) Заявитель:

СК БАЙОСАЙЕНС КО., ЛТД. (KR)

(57) Изобретение относится к способу получения реассортантного ротавируса, и в ней предложена платформа "обратной" генетики с применением ингибиторной РНК в качестве селективного давления на реассортантный ротавирус. Благодаря способу вероятность реассортации существенно увеличивается, таким образом реассортантный ротавирус может быть получен за короткое время и с низкими затратами.



202393013

A1

A1

202393013

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕАССОРТАНТНОГО РОТАВИРУСА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашиваются преимущества и приоритет заявки на патент Кореи № 10-2021-0070036, поданной 31 мая 2021 г., содержание которой включено в данную заявку во всей полноте путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данная заявка относится к способу получения реассортантного ротавируса, и в ней предложена генетическая платформа, с применением ингибиторной РНК в качестве селективного давления на реассортантный ротавирус.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ротавирус представляет собой наиважнейшую причину гастроэнтерита у детей грудного и младшего возраста во всем мире. Ежегодно приблизительно 100 миллионов человек в возрасте до 5 лет страдают от ротавирусного гастроэнтерита, и приблизительно 600000 человек в мире умирают. Летальные исходы имеют место в основном в развивающихся странах, однако распространенность заболевания в развивающихся и в развитых странах одинаковая. Таким образом, разработка вакцины имеет первостепенное значение для предотвращения ротавирусного гастроэнтерита и снижения уровня смертности вследствие ротавирусной инфекции.

Поскольку ротавирус имеет геном, состоящий из 11 сегментов двуцепочечной РНК (dsRNA), когда множество штаммов вируса совместно инфицируют одну клетку, может образовываться реассортантный вирус, в котором смешаны сегменты РНК разных штаммов. Например, может образовываться реассортантный вирус, в котором смешаны сегменты РНК ротавируса крупного рогатого скота, который не является вирулентным для человека, и сегменты РНК ротавируса человека, вызывающего гастроэнтерит у людей. Среди таких реассортантных вирусов крупного рогатого скота и человека, реассортантные вирусы, у которых сегмент, кодирующий VP4, демонстрирующий вирулентность для человека, состоит из сегмента РНК ротавируса крупного рогатого скота, а сегмент, кодирующий VP7, содержащий множество нейтрализующих эпитопов, состоит из сегмента РНК ротавируса человека, не являются вирулентными для человека и не вызывают гастроэнтерит, однако они могут индуцировать образование нейтрализующих антител против ротавируса

человека и, таким образом, могут применяться в качестве вакцин против ротавируса человека. Одним из таких примеров является Rotateq® («РотаТек»), пентавалентная вакцина, созданная посредством реассортации и аттенуирования ротавирусов, выделенных у крупного рогатого скота и человека.

Обычным способом получения реассортантного вируса является одновременное инфицирование одной линии клеток двумя типами ротавирусов с получением реассортантного вируса, однако для увеличения вероятности реассортации могут применяться методы «обратной» генетики. Методы «обратной» генетики включают трансфицирование клетки избыточным количеством мРНК гена, подлежащего реассортации, или ДНК, которая может транскрибироваться в мРНК, и одновременное инфицирование клетки ротавирусом-помощником для индукции реассортации трансфицированной мРНК и генов ротавируса-помощника.

Однако, несмотря на повышение вероятности реассортации благодаря «обратной» генетике, поскольку реассортантные вирусы очень немногочисленны и аттенуированы по сравнению с вирусами дикого типа (WT), в отсутствие селективного давления соотношение постепенно снижается при проведении пассажей, что сильно затрудняет выделение и сохранение нужного реассортантного вируса. Таким образом, для успешного получения реассортантного ротавируса необходимо внедрение соответствующего процесса отбора.

Способ, используемый в настоящее время в процессе отбора, заключается в применении моноклонального нейтрализующего антитела, которое специфически связывается и нейтрализует белок гена, подлежащего замене (например, гена VP7 ротавируса крупного рогатого скота), но не связывается с белком замещенного гена (например, гена VP7 ротавируса человека) (например, патент US 4571385). Однако, способ с применением моноклонального нейтрализующего антитела требует много времени для получения нейтрализующего антитела и является дорогостоящим, и проблема состоит в том, что получение нейтрализующего антитела, специфического в отношении белка конкретного штамма затруднительно, поскольку штаммы ротавируса имеют в своем составе гены со схожими последовательностями, функциями и структурами. Таким образом, существует потребность в исследовании и разработке отдельной технологии, позволяющей применять селективное давление.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ТЕХНИЧЕСКАЯ ЗАДАЧА

Данная заявка относится к способу получения реассортантного ротавируса, и в ней предложена платформа «обратной» генетики с применением ингибиторной РНК в качестве

селективного давления на реассортантный ротавирус.

ТЕХНИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ

В воплощении, описанном в данном документе, предложен способ получения реассортантного ротавируса, в котором: обеспечивают линию клеток, стабильно экспрессирующих ингибиторную РНК против конкретного генного сегмента из 11 генных сегментов первого ротавируса; вводят в эту линию клеток мРНК генного сегмента второго ротавируса или ДНК или кДНК, кодирующую мРНК, соответствующего указанному конкретному генному сегменту первого ротавируса; инфицируют линию клеток первым ротавирусом; и выделяют реассортантный ротавирус, содержащий генный сегмент второго ротавируса, соответствующий указанному конкретному генному сегменту первого ротавируса.

В другом воплощении, описанном в данном документе, предложен ингибиторный РНК-олигонуклеотид, ингибирующий любой один или более сайтов-мишеней, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, для применения в способе получения реассортантного ротавируса, как описано выше.

В другом воплощении, описанном в данном документе, предложена композиция для применения в способе получения реассортантного ротавируса, описанном выше, содержащая ингибиторный РНК-олигонуклеотид, ингибирующий любой один или более сайтов-мишеней, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В другом воплощении, описанном в данном документе, предложен двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, образованный любой одной или более чем одной парой последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, для применения в способе получения реассортантного ротавируса, как описано выше.

В другом воплощении, описанном в данном документе, предложена композиция для применения в способе получения реассортантного ротавируса, описанном выше, содержащая двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, образованный любой одной или более чем одной парой последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

В другом воплощении, описанном в данном документе, предложена композиция для получения линии клеток с подавленным продуцированием ротавируса WC3 (штамм крупного рогатого скота Wistar Calf 3) дикого типа, содержащая ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид.

В другом воплощении, описанном в данном документе, предложена композиция для получения линии клеток с подавленным продуцированием белка VP7 ротавируса крупного рогатого скота, содержащая ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид.

В другом воплощении, описанном в данном документе, предложена линия клеток с подавленным продуцированием ротавируса WC3 дикого типа, где в линию клеток введен ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид.

В другом воплощении, описанном в данном документе, предложена линия клеток с подавленным продуцированием белка VP7 ротавируса крупного рогатого скота, где в линию клеток введен ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид.

ПОЛЕЗНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Поскольку в способе реассортации ротавируса по данному изобретению применяется метод «обратной» генетики, вероятность реассортации существенно выше по сравнению со стандартным способом получения реассортантного вируса посредством одновременного инфицирования одной линии клеток двумя типами ротавируса. Таким образом, ожидается, что необходимое время может быть значительно укорочено. Кроме того, поскольку для отбора реассортантных вирусов не применяются моноклональные нейтрализующие антитела, стоимость и время, необходимые для получения моноклональных нейтрализующих антител, могут быть сокращены. Таким образом, применяя данное изобретение, можно получать нужный реассортантный ротавирус за более короткое время и с меньшими расходами, чем традиционными способами, и можно применять в качестве вакцины.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1a-1c показаны результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей гена VP7 (SEQ ID NO: 1) ротавируса WC3 и гена VP7 (SEQ ID NO: 2) ротавируса Vrb9. Серая штриховка обозначает области, где нуклеиновые кислоты двух генов различаются, а подчеркнуты и выделены жирным шрифтом три отобранных сайта-мишени согласно одному из воплощений, описанных в данном документе.

На Фиг. 2 показана последовательность сайта-мишени miRNA (микроРНК), выбранного из гена VP7 ротавируса WC3, верхняя цепь, содержащая последовательность ДНК, кодирующую pre-miRNA (предшественник микроРНК) для miRNA, способной связываться (гибридизоваться) с сайтом-мишенью, и нижняя цепь, которая ей комплементарна, и dsDNA-олигонуклеотид, образованный путем комбинирования двух

цепей с липким концом в 4 нуклеотида.

На Фиг. 3 представлено схематическое изображение вектора для экспрессии трех miRNA, мишенью которых является ген VP7 WC3 согласно одному из воплощений, описанных в данном документе.

На Фиг. 4 представлено схематическое изображение конструкции ДНК-матрицы для продуцирования мРНК VP7 Vrb9 согласно одному из воплощений, описанных в данном документе.

На Фиг. 5 показаны результаты RT-PCR для подтверждения реассортации вируса P1 (пассаж 1) согласно одному из воплощений, описанных в данном документе.

На Фиг. 6 показаны результаты RT-PCR для подтверждения реассортации в 10 клонах, выделенных из P1 (пассаж 1) посредством выделения из бляшек согласно одному из воплощений, описанных в данном документе. Каждая из дорожек 1-10 представляет отдельный клон; W обозначает РНК вируса WC3 (отрицательный контроль ПЦР); G обозначает вирусную РНК G4 (положительный контроль ПЦР); М обозначает маркер длины ДНК 100bp (пар нуклеотидов).

На Фиг. 7 показана бляшка из наработанного вирусного материала реассортанта G4 (реассортантный вирусный материал нарабатывали путем культивирования клонов 6 и 8, выявленных на Фиг. 6, в клетках линии MA-104), полученного методом «обратной» генетики согласно одному из воплощений, описанных в данном документе.

На Фиг. 8 показаны результаты подтверждения реассортации в наработанном вирусном материале реассортанта G4 с применением RT-PCR. Дорожка 1 и дорожка 2 представляют продукты RT-PCR, полученных путем культивирования клонов 6 и 8 и выявленных на Фиг. 6, в клетках линии MA-104, соответственно, с применением в качестве матрицы РНК реассортантного вируса; дорожка 3 представляет продукт RT-PCR, полученный с применением в качестве матрицы РНК вируса WC3 (отрицательный контроль); дорожка 4 представляет продукт RT-PCR (контроль ПЦР-реакции), полученный с применением в качестве матрицы смеси синтетической ДНК Vrb9 и РНК вируса WC3.

ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте данного изобретения предложен способ получения реассортантного ротавируса, в котором: обеспечивают линию клеток, стабильно экспрессирующих ингибиторную РНК против конкретного генного сегмента из 11 генных сегментов первого ротавируса; вводят в эту линию клеток мРНК генного сегмента второго ротавируса или ДНК или кДНК, кодирующую мРНК, соответствующего указанному конкретному генному сегменту первого ротавируса; инфицируют линию клеток первым ротавирусом; и выделяют

реассортантный ротавирус, содержащий генный сегмент второго ротавируса, соответствующий указанному конкретному генному сегменту первого ротавируса.

В одном воплощении первый ротавирус может представлять собой ротавирус, не являющийся человеческим, например, ротавирус крупного рогатого скота, ротавирус обезьян, ротавирус свиней, ротавирус собак или ротавирус коз. В качестве предпочтительного примера он может представлять собой ротавирус штамма WC3 или его потомство.

В одном воплощении второй ротавирус представляет собой ротавирус человека, например, ротавирус человека серотипа P1, P2, G1, G2, G3, G4 или G9. Кроме того, второй ротавирус может представлять собой штамм ротавируса WI79, Wa, D, WISC2, DS-1, WI78, P, HCR3A, Br (Bricout) B, ST-3, BrB-9, WI79-9, SC2-9 или WI78-8 или его потомство.

В одном воплощении определенный генный сегмент может представлять собой генный сегмент, кодирующий белок, выбранный из VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5, и в качестве предпочтительного примера, генный сегмент, кодирующий VP7 или VP4.

В одном воплощении ингибиторная РНК может представлять собой miRNA, siRNA (малая интерферирующая РНК) или shRNA (короткая шпилечная РНК).

В одном воплощении ингибиторная РНК может представлять собой две или более ингибиторных РНК, мишенями которых являются различные сайты-мишени в определенном генном сегменте, подлежащем супрессии, и две или более ингибиторных РНК могут содержаться в отдельных векторах или содержаться в одном векторе и вводиться в линию клеток.

В одном воплощении мишенью ингибиторной РНК может быть по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из сайтов-мишеней с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В одном воплощении ингибиторная РНК может представлять собой miRNA, а в линию клеток можно вводить вектор, содержащий двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, кодирующий pre-miRNA для miRNA.

В одном воплощении двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид может представлять собой один или более двуцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, образованных одной или более чем одной парой последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

В одном воплощении вектор может включать в себя конститутивный промотор.

В одном воплощении вектор может представлять собой ко-экспрессирующий вектор,

содержащий два или более двуцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, кодирующих pre-miRNA для двух или более miRNA, имеющих разные сайты-мишени.

В одном воплощении мРНК генного сегмента второго ротавируса, соответствующего конкретному генному сегменту первого ротавируса, может быть получена посредством транскрипции *in vitro*.

В одном воплощении способ получения реассортантного ротавируса может дополнительно включать обогащение реассортантным ротавирусом посредством субкультивирования после стадии инфицирования линии клеток первым ротавирусом.

В одном воплощении линия клеток может представлять собой линию клеток MRC-5, MA-104, Vero, BHK-21, COS-7, 293 T, CV-1 или TF-104.

В одном воплощении способ получения реассортантного ротавируса может включать стадии, где: обеспечивают линию клеток, стабильно экспрессирующих miRNA против сегмента гена VP7 ротавируса крупного рогатого скота WC3; вводят в эту линию клеток мРНК сегмента гена VP7 ротавируса человека или ДНК или кДНК, кодирующую мРНК; инфицируют линию клеток ротавирусом WC3; и выделяют реассортантный ротавирус, содержащий сегмент гена VP7 ротавируса человека.

Согласно другому аспекту данного изобретения предложен ингибиторный РНК-олигонуклеотид, ингибирующий любой один или более сайтов-мишеней, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В одном воплощении ингибиторная РНК может представлять собой miRNA, siRNA или shRNA.

В другом воплощении ингибиторная РНК может представлять собой miRNA или pre-miRNA для miRNA.

Согласно другому аспекту данного изобретения предложен двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, образованный любой одной или более чем одной парой последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

В другом воплощении двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид предназначен для применения в вышеуказанном способе получения реассортантного ротавируса.

Согласно другому аспекту данного изобретения предложена композиция для получения линии клеток с подавленным продуцированием ротавируса WC3 дикого типа, содержащая вышеуказанный ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид.

Также предложена композиция для получения линии клеток с подавленным

продуцированием белка VP7 ротавируса крупного рогатого скота, содержащая вышеуказанный ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид.

Согласно другому аспекту данного изобретения предложена линия клеток с подавленным продуцированием ротавируса WC3 дикого типа, в которую введен вышеописанный ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид.

Также предложена линия клеток с подавленным продуцированием белка VP7 ротавируса крупного рогатого скота, в которую введен вышеописанный ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид.

Далее данное изобретение будет описано более подробно.

Здесь описаны предпочтительные способы и материалы, однако для осуществления или проверки данного изобретения можно применять любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют обычное значение, известное специалистам в области, к которой относится данное изобретение. Следует понимать, что термины, использованные в данном документе, и связанные с ними определения используются только в целях объяснения и не являются ограничивающими.

В данном описании формы в единственном числе относятся к одному или более (то есть к по меньшей мере одному) грамматическим понятиям. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Термин «приблизительно» в данном документе обычно означает в пределах 20%, предпочтительно, в пределах 10%, более предпочтительно, в пределах 5% от заданного значения или диапазона.

В данном описании «содержащий (определенные компоненты)» может означать, что он может включать дополнительные компоненты, отличные от перечисленных компонентов («содержащий») или может по существу включать перечисленные компоненты («по существу состоящий из»).

В одном воплощении данного изобретения предложен способ получения нужного реассортантного ротавируса методом «обратной» генетики с применением линии клеток, постоянно экспрессирующих ингибиторную РНК к конкретному гену ротавируса.

Методы «обратной» генетики включают трансфицирование клетки избыточным количеством мРНК гена, подлежащего рекомбинации, или ДНК, которая может

транскрибироваться в мРНК, и одновременное инфицирование клетки ротавирусом-помощником для индукции рекомбинации трансфицированной мРНК и генов ротавирусом-помощника. В одном воплощении данной заявки, которое будет описано позже, предложен пример, в котором в качестве вируса-помощника применяли ротавирус крупного рогатого скота штамма WC3 и в качестве гена для трансфекции для реассортации применяли сегмент РНК, кодирующий VP7, представляющий собой 9 сегмент РНК человеческого ротавируса штамма BrB9 (Bricout B 9) типа G4, и таким образом в результате реассортации вируса-помощника и трансфицированного гена получали реассортантный вирус WC3/Brb9-VP7. Однако, данный пример предназначен исключительно для иллюстрации данного изобретения, и объем данного изобретения не ограничен приведенным примером.

В данной заявке линия клеток, постоянно экспрессирующих ингибиторную РНК к конкретному гену ротавируса, обеспечивает селективное давление для отбора и выделения нужного реассортантного ротавируса. В частности, стандартный способ применения селективного давления с использованием моноклонального нейтрализующего антитела требует много времени и затрат для получения нейтрализующего антитела, и проблема состоит в том, что получение нейтрализующего антитела, специфического в отношении белка определенного штамма затруднительно, поскольку штаммы ротавируса имеют в своем составе гены со схожими последовательностями, функциями и структурами. Однако, данное изобретение имеет следующие преимущества: поскольку последовательность-мишень ингибиторной РНК является короткой (приблизительно 21 п.н.), легко найти разные части даже между генами схожих штаммов, что позволяет легко применить селективное давление. Кроме того, когда используется множество сайтов-мишеней, можно применять более сильное селективное давление. Более того, линии клеток, постоянно экспрессирующих ингибиторную РНК к конкретному гену ротавируса, можно легко получать.

В предпочтительном воплощении способ получения реассортантного ротавируса включает стадии, при которых:

обеспечивают линию клеток, стабильно экспрессирующих ингибиторную РНК против конкретного генного сегмента РНК из 11 генных сегментов первого ротавируса;

вводят эту в линию клеток мРНК генного сегмента второго ротавируса или ДНК или кДНК, кодирующую мРНК, соответствующего указанному конкретному генному сегменту первого ротавируса;

инфицируют линию клеток первым ротавирусом; и

выделяют реассортантный ротавирус, содержащий генный сегмент второго

ротавируса, соответствующий указанному конкретному генному сегменту первого ротавируса.

В одном воплощении, если определенный ген представляет собой единственный ген, полученный реассортантный ротавирус будет иметь 11 генных сегментов, при этом генный сегмент, соответствующий конкретному генному сегменту, происходит из второго ротавируса, а остальные 10 генных сегментов происходят из первого ротавируса.

В другом воплощении, если определенный ген представляет собой «n» генов, полученный реассортантный ротавирус будет иметь 11 генных сегментов, при этом «n» генных сегментов, соответствующих определенным генным сегментам, происходят из второго ротавируса, а остальные «11-n» генных сегментов происходят из первого ротавируса.

Ротавирусы обычно имеют геном, состоящий из 11 генных сегментов: 6 генных сегментов, каждый из которых кодирует структурные белки (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7) и 5 генных сегментов, каждый из которых кодирует неструктурные белки (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5). Среди них VP7 и VP4 представляют собой структурные белки, присутствующие на поверхности, и определяют серотип вируса. В частности, VP7 определяет серотип G, а VP4 определяет серотип P. Таким образом, серотип ротавируса указывается как тип G наряду с типом P. В случае типа G, поскольку серотип и генотип являются одинаковыми, серотипы обозначают числом (например, G1, G2, G3), а в случае типа P, поскольку серотип и генотип не являются одинаковыми, серотипы обозначают числом, а генотипы обозначают числом в скобках (например, P1A[8], P1B[4]), или указывается только генотип (например, P[8], P[4]).

В одном воплощении первый ротавирус может представлять собой ротавирус, не являющийся человеческим, а второй ротавирус может представлять собой ротавирус человека. В основе этого лежит идея, что ротавирусы, не являющиеся человеческими, могут демонстрировать пониженную вирулентность у человека. Однако, данное изобретение не ограничивается указанным, и как первый ротавирус, так и второй ротавирус могут быть ротавирусами, не являющимися человеческими, или оба могут быть ротавирусами человека.

В предпочтительном воплощении первый ротавирус может представлять собой ротавирус, не являющийся человеческим, например, ротавирус крупного рогатого скота, ротавирус обезьян, ротавирус свиней, ротавирус собак или ротавирус коз. Примеры ротавируса крупного рогатого скота включают ротавирус штамма NCDV, WC3 или UK и так далее. Примеры ротавируса обезьян включают ротавирус макаки резус (RRV) штамма TUCH, MMU 18006 или MMU17959, ротавирус зеленой мартышки штамма SA11 или ротавирус свинохвостого макака штамма PTRV (*Macaca nemestrina*) или YK-1 (макаки) и

так далее, без ограничения.

В другом предпочтительном воплощении второй ротавирус может представлять собой ротавирус человека, который может иметь любой серотип P или серотип G, но предпочтительно имеет серотип P1, P2, G1, G2, G3, G4 или G9, который представляет собой серотип, преимущественно вызывающий заболевание. Примеры ротавируса человека серотипа G1 включают ротавирус штаммов WI79, Wa, D и так далее, примеры ротавируса человека серотипа G2 включают ротавирус штаммов WISC2, DS-1 и так далее, примеры ротавируса человека серотипа G3 включают ротавирус штаммов WI78, P, HCR3A и так далее, примеры ротавируса человека серотипа G4 включают ротавирус штаммов Br(Bricout) B, ST-3, и так далее, примеры ротавируса человека серотипа G9 включают ротавирус штамма WI61 и так далее, примеры ротавируса человека серотипа P1 включают ротавирус штаммов WI79, WI78, WI61, Wa и так далее, примеры ротавируса человека серотипа P2 включают ротавирус штамма DS-1, без ограничения.

В качестве альтернативы, первый ротавирус или второй ротавирус или оба могут быть ранее известными реассортантными вирусами, например, BrB-9 (идентификационный номер GenBank GU565093), WI79-9 (идентификационный номер GenBank GU565060), SC2-9 (идентификационный номер GenBank GU565071), WI78-8 (идентификационный номер GenBank GU565082) или WI79-4 (идентификационный номер GenBank GU565049), без ограничения.

В данном описании ингибиторная РНК относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может ингибировать или снижать экспрессию гена-мишени сиквенс-специфическим образом. Ингибиторная РНК может быть достаточно комплементарна гено-мишени или его мРНК, чтобы связываться (гибридизоваться) с геном-мишенью или его мРНК с ингибированием или снижением транскрипции и/или экспрессии. Ингибиторная РНК может ингибировать или снижать транскрипцию и/или экспрессию гена-мишени посредством РНК-интерференции (RNAi). В предпочтительном воплощении ингибиторная РНК может быть короткой интерферирующей РНК (siRNA), короткой шпилечной РНК (shRNA) или микроРНК (miRNA).

RNAi относится к феномену, при котором экспрессия генов ингибируется сиквенс-специфическим образом двуцепочечной РНК (dsRNA) короткой длины (обычно, 12-21-мерной). Эти dsRNA могут избирательно разрушать комплементарные им мРНК-мишени, тем самым останавливая транскрипцию и/или синтез белка гена-мишени. Таким образом, RNAi широко применяется для сайленсинга генов, представляющих интерес. siRNA и miRNA, которые являются репрезентативными малыми РНК, которые вызывают RNAi,

образуются, когда фермент *dicer*, dsRNA-специфическая эндонуклеаза, относящаяся к группе РНКаз III, расщепляет dsRNA-предшественники.

siRNA представляет собой dsRNA, имеющую в своем составе приблизительно 21 нуклеотид, состоящую из приблизительно 19 пар оснований и двухнуклеотидного липкого конца на 3' конце. Эти 3' липкие концы служат промежуточными метиаторами в процессе RNAi. siRNA образуется, когда длинная dsRNA образуется из транспозонов, вирусов или генов *in vivo*, или когда клетки искусственным образом трансфицируют dsRNA извне. Затем siRNA разделяется на отдельные цепи и включается в РНК-индуцируемый сайленсинг-комплекс (RISC), и после интеграции в RISC она образует комплементарную пару с мРНК-мишенью и расщепляет и разрушает мРНК или ингибирует трансляцию мРНК в зависимости от степени комплементарности с мРНК-мишенью. RNAi с применением siRNA может демонстрировать эффект подавления экспрессии гена специфической нуклеотидной последовательностью при непосредственном трансфицировании клеток dsRNA против целевой последовательности *in vitro*.

В случае RNAi с применением shRNA, вместо непосредственного трансфицирования клеток синтетической dsRNA используется плазмидная ДНК, которая транскрибирует одноцепочечную РНК, имеющую шпилькообразную структуру. В частности, плазида, контролируемая промотором РНК-полимеразы III транскрибируется в одноцепочечную короткую шпилечную РНК в ядре клетки-мишени, затем перемещается в цитоплазму экспортом-5 и подвергается процессингу *dicer*, и таким образом shRNA конвертируется в siRNA.

miRNA образуются в клетках естественным образом и представляют собой РНК, которые не несут генетической информации для образования белков.

miRNA представляет собой РНК, которая возникает в клетках естественным образом и не содержит генетической информации для образования белков. Процесс образования miRNA является следующим: в ядре первичная miRNA (pri-miRNA) транскрибируется из генома и затем вырезается *droscha* с образованием короткого miRNA-предшественника шпилькообразной формы (pre-miRNA), которая экспортируется из ядра в цитоплазму экспортом-5. В цитоплазме pre-miRNA расщепляется ферментом *dicer* до dsRNA приблизительно -22 нт с липким концом 2 нт на 3' конце, и затем включается в RISC с образованием одноцепочечной зрелой miRNA. Зрелая miRNA может образовывать комплементарную пару с мРНК-мишенью и, в зависимости от степени комплементарности с мРНК-мишенью, она может расщеплять и разрушать мРНК или ингибировать трансляцию мРНК.

В одном воплощении ингибиторная РНК может представлять собой miRNA, созданную методами генетической инженерии, которая полностью комплементарна сайту-мишени и может расщеплять mRNA-мишень. Созданная методами генетической инженерии miRNA может быть введена в клетки при помощи вектора, содержащего кодирующую ее ДНК, и стабильно экспрессироваться внутри клетки.

После введения в клетку вектор транскрибируется с экспрессией pre-miRNA. pre-miRNA образует структуру стебель-петля в форме шпильки, схожую со структурой эндогенной pre-miRNA, и механизм экспрессии и действия miRNA являются такими, как описано выше. Она конвертируется в зрелую форму miRNA посредством расщепления и разрушения mRNA-мишени, тем самым подавляя экспрессию гена-мишени. «Стабильная экспрессия» относится к постоянной, конститутивной, или перманентной экспрессии нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, в отличие от транзиторной экспрессии.

В предпочтительном воплощении ингибиторная РНК представляет собой miRNA, созданную методами генетической инженерии и может быть введена в клетку при помощи вектора, содержащего двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, кодирующий созданную методами генетической инженерии pre-miRNA для miRNA. После введения в клетку вектор транскрибируется с экспрессией pre-miRNA, которая образует шпилькообразную структуру стебель-петля, схожую со структурой эндогенной pre-miRNA. pre-miRNA конвертируется в зрелую форму miRNA посредством вышеописанного механизма экспрессии и действия miRNA, расщепления и разрушения mRNA-мишени, тем самым подавляя экспрессию гена-мишени.

В одном воплощении двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, кодирующий pre-miRNA, может быть сконструирован следующим образом: (i) 5' концевой липкий конец для клонирования в вектор; (ii) область, кодирующая антисмысловую последовательность (то есть последовательность зрелой miRNA), комплементарную области-мишени; (iii) спейсерная последовательность для образования концевой петлевой структуры; (iv) область, кодирующая последовательность, комплементарную области (ii) (то есть смысловую последовательность сайта-мишени), для образования стеблевой структуры; (v) 3' концевой липкий конец для клонирования в вектор. Возможно, в области (iv) может быть осуществлена делеция некоторых нуклеотидов (например, приблизительно 2 нт) для образования короткой внутренней петли для повышения эффективности подавления экспрессии гена.

Кроме того, двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид может состоять из верхней цепи, сконструированной, как описано выше, и нижней цепи, которая является комплементом

верхней цепи.

В одном воплощении вектор может включать в себя конститутивный промотор для стабильной экспрессии ингибиторной РНК. Промотор может представлять собой промотор, зависимый от РНК-полимеразы II. Кроме того, вектор может включать в себя стандартные последовательности, контролирующие экспрессию. Например, можно соответствующим образом включать адаптеры или линкеры, энхансеры, маркеры отбора (например, маркеры устойчивости к антибиотикам), единицы репликации, сигнальные последовательности полиаденилирования (полиА), метки для очистки или любые известные последовательности для регулирования экспрессии генов или индукции экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках или вирусах и различные их комбинации.

Эффективность RNAi-эффекта miRNA определяется последовательностью-мишенью. За последние несколько лет был разработан алгоритм для конструирования функциональной miRNA на основе базы данных, в которой исследованы последовательности оснований множества miRNA и результирующая эффективность RNAi, и доступ к ней предоставляют несколько веб-сайтов (например, www.ambion.com, www.oligoengine.com, www.vectorcorea.com).

Однако, miRNA, обнаруженная алгоритмом не обязательно способна эффективно разрушать mRNA-мишень, и одного только сайта-мишени может быть недостаточно для эффективного ингибирования. Таким образом, производство miRNA посредством отбора двух или более сайтов-мишеней на ген может повышать вероятность успеха в экспериментах с подавлением генов.

Соответственно, векторы в данном изобретении могут представлять собой два или более векторов, каждый из которых содержит два или более двуцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, кодирующих pre-miRNA для двух или более miRNA, имеющих разные сайты-мишени; или могут представлять собой ко-экспрессирующий вектор, содержащий два или более двуцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, кодирующих pre-miRNA для двух или более miRNA, имеющих различные сайты-мишени.

Вектор может представлять собой плазмидный вектор, известный в области техники, такой как pcDNA (Invitrogen) или вектор на основе вируса, без ограничения. Введение в клетку осуществляется способом, известным в области техники, например, кальций-фосфатным способом, или можно надлежащим образом осуществлять способ с применением различных реагентов для трансфекции (например, олигофектамина, липофектамина или липофекции и так далее).

В качестве примера одного из воплощений данного изобретения, не являющегося

исчерпывающим, ингибиторная РНК может быть направлена против одного или более сайтов-мишеней, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

Указанные выше три сайта-мишени выбирали посредством скрининга областей нуклеотидных последовательностей с низкой гомологией (%) между нуклеотидными последовательностями первого ротавируса и второго ротавируса. Если применяется ингибиторная РНК, мишенью которой является другой сайт-мишень, гомология последовательностей (%) увеличивается, и таким образом, эффект подавления экспрессии сайта-мишени может быть меньше или отсутствовать.

В качестве примера одного из воплощений данного изобретения, не являющегося исчерпывающим, двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид может представлять собой один или более двуцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, образованных одной или более чем одной парой последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

Линия используемых здесь клеток, стабильно экспрессирующих ингибиторную РНК против конкретного генного сегмента из 11 генных сегментов первого ротавируса, может быть клетками с высокой чувствительностью к ротавирусу. Например, линия клеток может представлять собой линию клеток MRC-5, MA-104, Vero, ВНК-21, COS-7, 293 T, CV-1 или TF-104, без ограничения.

При этом, в способе получения реассортантного вируса здесь в линию клеток вводят мРНК, ДНК или кДНК генного сегмента второго ротавируса, соответствующего конкретному генному сегменту первого ротавируса.

Когда в клетку вводят мРНК генного сегмента второго ротавируса, соответствующего конкретному генному сегменту первого ротавируса, мРНК может быть синтезирована способами, известными в области техники, или получена посредством транскрипции *in vitro*. В этом случае, учитывая, что естественная мРНК ротавируса имеет кэп на 5' конце, который влияет на репликацию генома и трансляцию, предпочтительно кэпировать полученную мРНК.

В качестве альтернативы, когда в клетку вводят ДНК или кДНК, кодирующую РНК сегмента второго ротавируса, соответствующего конкретному генному сегменту первого ротавируса, как правило, можно использовать промотор Т7, который распознается РНК-полимеразой Т7. Однако, также можно использовать другие промоторы, распознаваемые различными РНК-полимеразами, например, РНК-полимеразой Т3 или РНК-полимеразой Spб, без ограничения. ДНК или кДНК можно вводить при помощи известного вектора.

Например, что касается промотора РНК-полимеразы Т7, можно использовать известный экспрессирующий вектор с Т7, такой как доступный для приобретения pBluescriptII SK (+/-) (Stratagene), pCRII (Invitrogen), pGEM (Promega), pET (Novagene), pcDNA (Invitrogen) и так далее, без ограничения. Кроме того, когда в клетки вводят ДНК или кДНК, как описано выше, конструкция нуклеиновой кислоты, экспрессирующая РНК-полимеразу, может быть введена до или после введения в клетку ДНК или кДНК. Предпочтительно, конструкция нуклеиновой кислоты, используемая для обеспечения РНК-полимеразы, может включать последовательность, кодирующую кодирующий фермент в экспрессируемом состоянии.

После введения в клетку генного сегмента второго ротавируса клетку инфицируют первым ротавирусом в качестве вируса-помощника. Вирус-помощник может представлять собой вирус дикого типа, существующий в природе, без ограничения, а также может представлять собой мутантный вирус, существующий в природе, или реассортантный вирус, подвергшийся искусственной генетической модификации. В предпочтительном воплощении инфекция может осуществляться в присутствии трипсина или химотрипсина для облегчения инфицирования.

После инфицирования линии клеток первым ротавирусом способ получения реассортантного ротавируса может дополнительно включать обогащение реассортантным ротавирусом посредством субкультивирования.

Поскольку в используемом здесь способе применяют линию клеток, постоянно экспрессирующую ингибиторную РНК против конкретного гена ротавируса, для выделения реассортантных ротавирусов применяется селективное давление. В частности, в используемых здесь клетках уровень мРНК конкретного генного сегмента первого ротавируса снижен при помощи ингибиторной РНК наряду с введением избыточного количества соответствующего конкретного генного сегмента второго ротавируса. Таким образом, в ходе процесса репликации и сборки вируса мРНК конкретного генного сегмента второго ротавируса используют вместо мРНК конкретного генного сегмента первого ротавируса, таким образом повышая вероятность возникновения реассортантного вируса. Затем, при дальнейших пассажах репликация вируса-помощника (например, вируса WC3 дикого типа) продолжает ингибироваться miRNA, экспрессируемой клетками, но реассортантный вирус не затрагивается, и, следовательно, может произойти обогащение реассортантными вирусами.

Выделение реассортантного вируса может осуществляться путем выделения культуральной среды и/или лизата клеток после культивирования. Как вариант, вирусом можно реинфицировать путем добавления (инокуляции) выделенной культуральной среды

и/или лизата клеток к другой клетке-хозяину (второй клетке-хозяину, третьей клетке-хозяину), субкультивировать и затем выделять. Выделение вируса можно осуществлять посредством выделения бляшек и при необходимости выделенный реассортантный вирус можно очищать. Например, вирусы можно очищать, комбинируя соответствующим образом центрифугирование, центрифугирование в градиенте плотности, колоночную хроматографию и тому подобное.

В примере согласно одному воплощению данного изобретения предложен способ получения реассортантного ротавируса, в котором: обеспечивают линию клеток, стабильно экспрессирующих miRNA против сегмента гена VP7 из ротавируса крупного рогатого скота WC3; вводят в эту линию клеток мРНК сегмента гена VP7 ротавируса человека или ДНК или кДНК, кодирующую эту мРНК; инфицируют линию клеток ротавирусом WC3; и выделяют реассортантный ротавирус, содержащий сегмент гена VP7 ротавируса человека. Подробные описания каждого этапа являются такими, как описано выше.

Данное изобретение также относится к ингибиторному РНК-олигонуклеотиду, который ингибирует любой один или более сайтов-мишеней, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5. В предпочтительном воплощении ингибиторная РНК может представлять собой miRNA, siRNA или shRNA. В другом предпочтительном воплощении ингибиторная РНК может представлять собой miRNA или pre-miRNA для miRNA.

В данном изобретении также предложен двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, образованный любой одной или более парой последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; композиция для получения линии клеток с подавленным продуцированием ротавируса крупного рогатого скота WC3 дикого типа, композиция, содержащая ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид; композиция для получения линии клеток с подавленным продуцированием белка VP7 ротавируса крупного рогатого скота, содержащая ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид; линия клеток с подавленным продуцированием ротавируса WC3 дикого типа, в которую введен ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид; и линия клеток с подавленным продуцированием белка VP7 ротавируса крупного рогатого скота, в которую введен вышеописанный ингибиторный РНК-олигонуклеотид или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид. Их можно применять в способе получения реассортантного ротавируса, как описано выше.

ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее данное изобретение будет описано более подробно с отсылкой к приведенным ниже примерам. Однако, данные примеры предназначены исключительно для иллюстрации данного изобретения, и эти примеры не ограничивают объем данного изобретения. Специалисту в области техники очевидно, что примеры, описанные ниже, могут быть модифицированы без изменения сути данного изобретения.

Пример 1. Выбор сайтов-мишеней для ингибирования транскрипции и экспрессии гена VP7 в ротавирусе WC3 дикого типа

Для получения реассортантного вируса WC3/Brb9-VP7 клетки с высокой чувствительностью к ротавирусу трансформировали для создания стабильной линии клеток, способных подавлять продуцирование неперестроенного вируса крупного скота WC3 дикого типа. При трансформации использовали технологию РНК-интерференции (RNAi), направленной на ген VP7 вируса WC3.

В частности, в составе гена VP7 ротавируса WC3 выбирали три сайта-мишени miRNA, специфичных для WC3, но неспецифичных для VP7 ротавируса человека BrB9. Стабильные линии клеток, созданные в данной работе, предназначены для конститутивной экспрессии miRNA к этим сайтам-мишеням. miRNA (зрелая форма) представляет собой тип короткой интерферирующей РНК из 21 пн, которая соответствует антисмысловой последовательности, полностью комплементарной сайту-мишени RNAi, и ингибирует транскрипцию и экспрессию гена VP7 WC3. Для выбора miRNA использовали приложение Invitrogen's Stealth RNAi™ Pre-Designed siRNAs (www.invitrogen.com/rnaiexpress), предоставленное производителем векторной системы, использованной для экспрессии RNAi. GenBank AY050272 (SEQ ID NO: 1) была референсной для гена VP7 WC3 и GenBank GU565090 (SEQ ID NO: 2) была референсной для гена VP7 Brb9. На Фиг. 1 показаны результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей гена VP7 WC3 (SEQ ID NO: 1) и гена VP7 Brb9 (SEQ ID NO: 2). Как показано на Фиг. 1, гомология между нуклеотидными последовательностями гена VP7 WC3 (SEQ ID NO: 1) и гена VP7 Brb9 (SEQ ID NO: 2) составляет 74,3% (789 пн из 1062 пн идентичны), и сайт-мишень выбирали из области, демонстрирующей меньшую гомологию. В частности, на Фиг. 1 три выбранных сайта-мишени подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. В направлении от 5' к 3': сайт-мишень 1 (SEQ ID NO: 3) обладает гомологией последовательности 71,4% (15/21), сайт-мишень 2 (SEQ ID NO: 4) обладает гомологией последовательности 66,7% (14/21), и сайт-мишень 3 (SEQ ID NO: 5) обладает гомологией последовательности 61,9% (13/21).

Пример 2. Конструирование векторов, экспрессирующих miRNA

Для экспрессии miRNAs против трех сайтов-мишеней miRNA, выбранных в Примере 1, последовательности, кодирующие их pre-miRNA, клонировали в каждый из векторов для экспрессии miRNA, pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen), согласно инструкциям производителя. Для этого вначале конструировали последовательность ДНК, с которой может транскрибироваться pre-miRNA для каждой miRNA, способной связываться с каждым сайтом-мишенью, а также комплементарную ей последовательность и синтезировали с липким концом из 4 нт и затем отжигали с получением dsDNA олигонуклеотида (Таблица 1 и Фиг. 2).

Таблица 1

Сайт-мишень miRNA	Тип олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида (5'→3')	SEQ ID NO:
1 сайт-мишень (SEQ ID NO:3)	Верхняя цепь	TGCTGATGTCAAGAAGATTAGAATTGGT TTTGGCCACTGACTGACCAATTCTACTT CTTGACAT	6
	Нижняя цепь	CCTGATGTCAAGAAGTAGAATTGGTCA GTCAGTGGCCAAAACCAATTCTAATCTT CTTGACATC	7
2 сайт-мишень (SEQ ID NO:4)	Верхняя цепь	TGCTGTCAACAGGATAATACAAACAAG TTTTGGCCACTGACTGACTTGTTTGTTAT CCTGTTGA	8
	Нижняя цепь	CCTGTCAACAGGATAACAAACAAGTCA GTCAGTGGCCAAAACCTTGTTTGTATTAT CCTGTTGAC	9
3 сайт-мишень (SEQ ID NO:5)	Верхняя цепь	TGCTGTTTAATTTGTGGTTGACACCAGT TTTGGCCACTGACTGACTGGTGTACAC AAATTAAA	10
	Нижняя цепь	CCTGTTTAATTTGTGTGACACCAGTCAG TCAGTGGCCAAAACCTGGTGTCAACCAC AAATTAAAC	11

Затем согласно инструкциям производителя лигировали dsDNA олигонуклеотид с липким концом из 4 нт и линейаризованный вектор pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen), трансформировали *E.coli* и затем отбирали колонии и секвенировали последовательность с получением полноценных плазмид для экспрессии miRNA, которые обозначали pcDNA-GFP/mr1, pcDNA-GFP/mr2 и pcDNA-GFP/mr3, соответственно.

Пример 3. Конструирование векторов, экспрессирующих три miRNA

Конструировали экспрессирующий вектор, способный одновременно обеспечивать транскрипцию трех miRNA в одном векторе, и клонировали в соответствии с инструкциями производителя. Вначале расщепляли pcDNA-GFP/mr1 рестрикционными ферментами BamHI и XhoI и очищали встраиваемый фрагмент приблизительно 151 пн. pcDNA-GFP/mr2

расщепляли рестрикционными ферментами BglII и XhoI и очищали фрагмент вектора приблизительно 5,6 тпн. Встраиваемый фрагмент и фрагмент вектора лигировали и трансформировали *E. coli*, а затем отбирали колонии и секвенировали с получением полного вектора, экспрессирующего две miRNA. Затем вектор, экспрессирующий две miRNA, расщепляли рестрикционными ферментами BamHI и XhoI и очищали встраиваемый фрагмент 2 приблизительно 250 пн, а pcDNA-GFP/mr3 расщепляли рестрикционными ферментами BglII и XhoI и очищали фрагмент вектора 2 приблизительно 5,6 тпн. Встраиваемый фрагмент 2 и фрагмент вектора 2 лигировали и трансформировали *E. coli*, а затем отбирали колонии и секвенировали с получением полного вектора, экспрессирующего три miRNA. Полученный вектор, экспрессирующий три miRNA, расщепляли рестрикционным ферментом DraI, фрагмент EmGFP удаляли и затем вновь лигировали с конструированием вектора, экспрессирующего три miRNA, без гена GFP, который обозначали pcDNA-Tri-miRNA (Фиг. 3).

Пример 4. Конструирование линий клеток, стабильно экспрессирующих три miRNA, и тест с подавлением инфекции WC3

Для получения линии клеток, в которых стабильно экспрессируются три miRNA, линию клеток TF-104 (линия клеток эпителия африканской зеленой мартышки) трансфицировали плазмидой pcDNA-Tri-miRNA и отбирали одиночные клетки, экспрессирующие miRNA, используя ген устойчивости к бластицидину, который содержался в векторе. Трансфицированные клетки обрабатывали антибиотиком бластицидином S в концентрации 10-20 мкг/мл и повторяли процесс ингибирования роста нетрансфицированных клеток и отбор трансфицированных клеток несколько раз. В результате среди одноклеточных колоний, устойчивых к бластицидину, осуществляли размножение и пассажи 44 колоний с получением 44 клонов.

Каждый из указанных выше клонов и клетки TF-104 дикого типа (WT) высаживали в конфлюентности 90% в 24-луночный планшет и инфицировали вирусом WC3 по 100 БОЕ (бляшкообразующие единицы) и 1 БОЕ на лунку. Сравнивали цитопатический эффект (CPE) через 3 дня и 5 дней после инфицирования и отбирали клоны с подавленной инфекцией по сравнению с WT TF-104. В результате, как показано в Таблице 2, клоны 6, 13, 14, 19, 31 и 44 эффективно подавляли инфекцию WC3 и, в частности, клон 44 демонстрировал наибольший ингибиторный эффект.

Таблица 2.

Тест с подавлением инфекции WC3 клонами, экспрессирующими три miRNA

Дни после инокуляции (ДПИ)	БОЕ/лунку II	WT	Клон №																			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3 ДПИ	100	++	+	++	++	++	+	N	++	++	N	+	N	++	N	N	+	+	++	+	N	N
	1	+	N	+	+	+	N	N	+	+	N	N	N	+	N	N	N	N	+	N	N	N
5 ДПИ	100	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+	++	++
	1	++	+	++	++	+	+	N	+	+	N	++	++	++	N	N	++	++	++	++	N	+
ДПИ	БОЕ/лунку II	WT	Клон №																			
			21	23	24	25	26	27	29	31	32	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
3 ДПИ	100	++	++	+	++	++	N	++	+	N	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	N	
	1	+	+	N	+	+	N	+	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
5 ДПИ	100	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	N	
	1	++	++	++	++	+	++	++	N	N	++	++	++	++	+	+	++	++	+	N		

* ++: полный CPE, +: частичный CPE, N: Отсутствие CPE

Среду от клонов 6, 13, 14, 19, 31 и 44, инфицированных вирусом WC3, удаляли, заменяли средой EMEM, содержащей 10% FBS (эмбриональная бычья сыворотка) и 10 мкг/мл бластицидина, и осуществляли длительное субкультивирование для сохранения клеток, которые не были инфицированы вирусом. Клетки обозначали ТК6г, ТК13г, ТК14г, ТК19г, ТК31г и ТК44г, соответственно.

Пример 5. Конструирование мРНК VP7 Vrb9 G4

Ген VP7 ротавируса человека Vrb9 G4, который предстояло использовать для реассортации, транскрибировали в мРНК путем осуществления процессов транскрипции *in vitro* и кэпирования, и затем выполняли трансдукцию мРНК. Трансдукцию можно осуществлять непосредственно в форме плазмидной ДНК, но в данном случае для эффективной транскрипции обычно используют промотор T7. Поскольку промотор T7 является специфическим и сильным и может транскрибироваться даже в цитозоле, его преимуществом является обеспечение транскрипции даже если плазида остается в цитоплазме, а не поступает в ядро. Однако, недостатком является то, что экспрессирующий вектор, способный экспрессировать полимеразу T7, необходимо вначале трансдуцировать в клетки, и что РНК, транскрибированная в цитоплазме, является нестабильной, поскольку она не прошла кэпирование. Для увеличения эффективности реассортации гена VP7 Vrb9 целесообразно использовать кэпированную форму, которая является такой же, как вирусная мРНК. Таким образом, в данном примере вместо трансдуцирования плазмидной ДНК осуществляли транскрипцию *in vitro*, чтобы иметь такую же форму, как вирусная мРНК, и осуществляли трансдукцию этой мРНК.

Конструировали ДНК-матрицу для транскрипции гена VP7 Brb9 G4 в мРНК *in vitro*. Поскольку нетранслируемая 3'UTR последовательность ротавируса имеет важное значение для процесса трансляции, транскрипция должна начинаться и заканчиваться в правильном положении. Хотя точка старта транскрипции промотора T7 является очень строгой, точка окончания в некоторой степени гетерогенна даже при наличии терминатора T7. Таким образом, конструировали ДНК-матрицу, чтобы она разрезалась точно в положении, где заканчивается ген VP7, за счет введения последовательности рибозима вируса гепатита дельта (HDV) перед терминатором T7 (см. SEQ ID NO: 12 и Фиг. 4). Синтезировали ДНК-матрицу, расщепляли рестрикционными ферментами EcoRI/BamHI, клонировали в вектор pUC57 и обозначали pUC57-T7-Brb9-VP7.

С применением набора mMACHINE (Ambion) и ДНК-матрицы pUC57-T7-Brb9-VP7 получали мРНК VP7 Brb9 путем осуществления транскрипции *in vitro* и 5' кэпирования согласно инструкциям производителя.

Пример 6. Трансфекция мРНК VP7 Brb9 G4 и инфицирование вирусом WC3

Клетки линии TK14r, полученные в Примере 4, трансфицировали транскрибированной *in vitro* мРНК VP7 Brb9 G4 с применением липосом (Lipofectamine 2000; Thermo Fisher). Процесс трансфекции осуществляли согласно стандартному способу, представленному в инструкциях производителя. После трансфекции клетки культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение 4 часов и затем среду заменяли полной питательной средой (EMEM, содержащей 10% FBS).

Через 24 часа после трансфекции среду заменяли средой для инфицирования (бессывороточная EMEM, содержащая 0,5 мкг/мл трипсина) и инфицировали клетки вирусом WC3 (ATCC VR-2102), активированным с применением трипсина (Sigma, T0303, 10 мкг/мл при 37°C в течение 30 минут при множественности заражения (MOI) 1,0. После инфицирования клетки инкубировали в течение 48 часов в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и подтверждали цитопатический эффект (CPE).

В клетках TK14r уровень мРНК VP7 WC3 снижен в результате подавления транскрипции и экспрессии гена VP7 WC3 при помощи miRNA, при этом введено избыточное количество мРНК VP7 Brb9. Таким образом, в ходе процесса репликации и сборки вируса мРНК VP7 Brb9 используется вместо мРНК VP7 WC3, тем самым повышая вероятность возникновения реассортантного вируса. Затем, при дальнейших пассажах репликация вируса WC3 WT продолжает ингибироваться miRNA, экспрессируемой клетками, но реассортантный вирус не затрагивается, и, следовательно, может произойти обогащение реассортантными вирусами.

Пример 7. Обнаружение реассортантного вируса WC3/Brb9 VP7

После осуществления описанного выше процесса клетки, в которых имел место СРЕ, замораживали и оттаивали 3 раза, удаляли клеточный дебрис и получали надосадочную жидкость, которую обозначали как Пассаж 0 (P0). Через 48 часов клетки линии ТК14г или клетки линии МА-104 повторно инфицировали P0, клетки замораживали и оттаивали 3 раза, удаляли клеточный дебрис и получали надосадочную жидкость, которую обозначали как Пассаж 1 (P1).

Для подтверждения реассортации в химерном образце готовили наборы праймеров, которые могли специфически определять VP7 WC3, VP7 BrB9 и VP4 WC3. Перекрестной активности или ложноположительных и ложноотрицательных результатов не наблюдалось (Таблица 3).

Таблица 3.

Комбинации олигонуклеотидов RT-PCR для определения VP7 WC3, VP7 BrB9 и VP4 WC3

WC3-специфический праймер	Последовательность олигонуклеотида	Положение	Длина	ТМ (°С)	Продукт ПЦР
WC3V7_F	TCTTGACATCGATTACATTATTA (SEQ ID NO :13)	83	25-мер	53,75	422 пн
WC3V7_R	CATATCTAGTTTTTGTGTAGAGTCA TATT (SEQ ID NO :14)	476	29-мер	54,01	
Brb-специфический праймер	Последовательность олигонуклеотида	Положение	Длина	ТМ (°С)	Продукт ПЦР
Brb9V7_F	TTCGTTCTTGTGAGTTATATTCTG (SEQ ID NO :15)	120	240-мер	54,15	406 пн
Brb9V7_R	GTCCAACCTCCTCACCAGAAG (SEQ ID NO :16)	508	20-мер	55,65	
WC3-специфический праймер	Последовательность олигонуклеотида	Положение	Длина	ТМ (°С)	Продукт ПЦР
WC3V4_F	GTCGTTTCGATCTACCAGTAGGA (SEQ ID NO :17)	216	22-мер	56,9	394 пн
WC3V4_R	GTCACATATATGGCCTTACCTCAACT (SEQ ID NO :18)	609	25-мер	57,8	

Проводили реакцию RT-PCR для подтверждения реассортации в образце с использованием праймеров, указанных выше. VP7 WC3, VP7 BrB9 и VP4 WC3 амплифицировались как продукты RT-PCR размером 422 пн, 406 пн и 394 пн, соответственно, и использованные условия RT-PCR были следующими (Таблица 4).

Таблица 4.

Условия RT-PCR для определения генов VP7 и VP4

Условия RT-PCR VP7			Условия RT-PCR VP4		
1) синтез кДНК и пре-денатурация			1) синтез кДНК и пре-денатурация		
Цикл	Температура	Время	Цикл	Температура	Время
1	50°C	45 мин	1	54°C	45 мин
	95°C	2 мин		95°C	2 мин
2) ПЦР-амплификация			2) ПЦР-амплификация		
Цикл	Температура	Время	Цикл	Температура	Время
40	94°C	30 сек	40	94°C	30 сек
	54°C	40 сек		57.5°C	40 сек
	68°C	40 сек		68°C	40 сек
1	68°C	7 мин	1	68°C	7 мин
1	4°C	∞	1	4°C	∞

RT-PCR проводили путем выделения РНК вируса из двух образцов P1, полученных после инфицирования клеток линии ТК14г или клеток линии МА-104 образцом P0. Из пяти попыток дважды получали P1 с использованием клеток линии ТК14г (Фиг. 5, дорожки 1 и 4) и трижды получали P1 с использованием клеток линии МА-104 (Фиг. 5, дорожки 2, 3 и 5). В результате полоса размером приблизительно 400 пн, специфичная для VP7 BrB9, подтверждалась в P1, полученном в 4-й и 5-й попытках (Фиг. 5, дорожка 4 и дорожка 5)

VP4, типичный для каркаса вируса WC3, использовали в качестве внутреннего контроля при проведении RT-PCR. Если VP7 BrB9 реассортировался в вирус WC3, в образце должно было одновременно подтверждаться присутствие VP7 BrB9 и VP4 WC3, а VP7 WC не должен был определяться. Таким образом, для №4 и №5 успешно подтверждали, что VP7 BrB9 реассортировался в вирус WC3.

Пример 8. Выделение реассортантного вируса

Поскольку вирусы на стадиях P0 и P1 существуют скорее в виде смешанных клонов, а не отдельных клонов, для выделения реассортантного моноклонального вируса осуществляли выделение бляшек, используя образец P1, соответствующий дорожке 4 на Фиг. 5. Для визуального наблюдения за образующимися бляшками монослой клеток окрашивали нейтральным красным для подтверждения пролиферации вируса.

Для нахождения реассортантных бляшек выбирали и анализировали от 60 до 100 бляшек и серию процессов непрерывно повторяли три и более раз. Процесс выбора бляшек был следующим: 1) Просматривая под микроскопом или невооруженным глазом, отмечали

кандидатов в реассортантные бляшки; 2) разливали по 300 мкл ЕМЕМ (бессывороточной) в каждую из экспериментальных пробирок, в соответствии с выбранными номерами; 3) брали стерильным наконечником и помещали в (2); 4) хранили при -70°C или использовали для инфицирования путем добавления трипсина (Т0303, 1 мкг/мл). После анализа бляшкообразования осуществляли выделение из 10 обнаруженных бляшек. После инфицирования клеток линии ТК14г (24 лунок, 1×10^5 /лунку) собирали одиночные клоны, выделенные из бляшек, и культивировали в течение 3 дней или до подтверждения СРЕ. Для определения, являлся ли вирус реассортантным, из собранного образца выделяли РНК вируса и проводили анализ методом RT-PCR, используя ее в качестве матрицы. В результате подтверждали, что клоны №6 и №8 были реассортантными клонами (Фиг. 6). Клоны №6 и №8, идентифицированные как бляшки реассортанта G4, культивировали в клетках линии МА-104 для наработки реассортантного вирусного материала (Фиг. 7 и 8).

На основании приведенного выше описания специалист в области техники поймет, что возможны и другие частные воплощения изобретения, не изменяющие сути изобретения или его существенных признаков. В этой связи, следует понимать, что приведенное выше воплощение не ограничивает объем изобретения, а является иллюстративным во всех аспектах. Объем данного изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и таким образом, все изменения и модификации, подпадающие под рамки формулы изобретения, или их эквиваленты, считаются входящими в объем формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения реассортантного ротавируса, в котором:
обеспечивают линию клеток, стабильно экспрессирующих ингибиторную РНК против конкретного генного сегмента из 11 генных сегментов первого ротавируса;
вводят в эту линию клеток мРНК генного сегмента второго ротавируса, соответствующего указанному конкретному генному сегменту первого ротавируса, или ДНК или кДНК, кодирующую эту мРНК;
инфицируют линию клеток первым ротавирусом; и
выделяют реассортантный ротавирус, содержащий генный сегмент второго ротавируса, соответствующий указанному конкретному генному сегменту первого ротавируса.
2. Способ по п. 1, где первый ротавирус представляет собой ротавирус, не являющийся человеческим, ротавирус крупного рогатого скота, ротавирус обезьян, ротавирус свиней, ротавирус собак или ротавирус коз.
3. Способ по п. 2, где первый ротавирус представляет собой штамм WC3 (Wistar Calf 3) ротавируса или его потомство.
4. Способ по п. 1, где второй ротавирус представляет собой ротавирус человека.
5. Способ по п. 4, где второй ротавирус представляет собой ротавирус человека серотипа P1, P2, G1, G2, G3, G4 или G9.
6. Способ по п. 1, где второй ротавирус представляет собой штамм ротавируса WI79, Wa, D, WISC2, DS-1, WI78, P, HCR3A, Br (Bricout) B, ST-3, BrB-9, WI79-9, SC2-9 или WI78-8 или его потомство.
7. Способ по п. 1, где конкретный генный сегмент представляет собой генный сегмент, кодирующий белок, выбранный из VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5.
8. Способ по п. 1, где конкретный генный сегмент представляет собой генный сегмент, кодирующий VP7 или VP4.
9. Способ по п. 1, где ингибиторная РНК представляет собой miRNA (микроРНК), siRNA (малая интерферирующая РНК) или shRNA (короткая шпилечная РНК).
10. Способ по п. 1, где мишенью ингибиторной РНК является по меньшей мере один сайт, выбранный из группы, состоящей из сайтов-мишеней с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.
11. Способ по п. 10, где ингибиторная РНК представляет собой miRNA, и в линию

клеток введен вектор, содержащий двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, кодирующий pre-miRNA (предшественник микроРНК) для miRNA.

12. Способ по п. 11, где двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид представляет собой один или более двуцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, образованных одной или более чем одной парой последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

13. Способ по п. 11, где вектор представляет собой ко-экспрессирующий вектор, содержащий два или более двуцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, кодирующих pre-miRNA для двух или более miRNA, имеющих разные сайты-мишени.

14. Способ по п. 1, где мРНК генного сегмента второго ротавируса, соответствующего конкретному генному сегменту первого ротавируса, получают посредством транскрипции *in vitro*.

15. Способ по п. 1, который, после инфицирования линии клеток первым ротавирусом, дополнительно включает обогащение по реассортантному ротавирусу посредством субкультивирования.

16. Способ по п. 1, где линия клеток представляет собой линию клеток MRC-5, MA-104, Vero, ВНК-21, COS-7, 293 T, CV-1 или TF-104.

17. Способ по п. 1, в котором:

обеспечивают линию клеток, стабильно экспрессирующих miRNA против генного сегмента VP7 ротавируса крупного рогатого скота WC3;

вводят в эту линию клеток мРНК генного сегмента VP7 ротавируса человека или ДНК или кДНК, кодирующую эту мРНК;

инфицируют линию клеток ротавирусом WC3; и

выделяют реассортантный ротавирус, содержащий генный сегмент VP7 ротавируса человека.

18. Олигонуклеотид ингибиторной РНК, который ингибирует один или более сайтов-мишеней, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, для применения в способе получения реассортантного ротавируса по п. 1.

19. Двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, образованный одной или более чем одной парой последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, для применения в способе получения реассортантного ротавируса по п. 1.

Фиг. 1а

Выравнивание нуклеотидных последовательностей. Выравнивание 2 последовательностей: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2
Индекс = 789,0, идентичность = 789/1062 (74,3%)
Положительные = 789/1062 (74,3%), Гэпы = 0/1062 (0%)

```

SEQ ID NO:1  1  GGCTTTAAAAAGAGAGAATTTCCGTTGGCTAGCGGTAGCTCCTTTTAATGTATGGTATT  60
SEQ ID NO:2  1  GGCTTTAAAAAGAGAGAATTTCCGTTGGCTAGCGGTAGCTCCTTTTAATGTATGGTATT  60

SEQ ID NO:1  61  GAATATACCACAATTCDAATCTTTGACATCGATTACATTATTAAATTATATCTTAAAA  120
SEQ ID NO:2  61  GAATATACCACAGTTCTATTTTATTTGATATCGTTGGTCTTTGAGTTATATCTTAAAA  120

SEQ ID NO:1  121  TCAATTAADTAAATAAATGGACTATAAATTTATAGATTTTGGCTTAGGTTGATCTTTG  180
SEQ ID NO:2  121  ACTATGATAAAGATAAATGGACTATTAAATTTATAGAAATACATTTTGAATGTAGTATTA  180

SEQ ID NO:1  181  GCCACATAATAAATGDCAAAACTATGGAGTAAATTTGCCAATTACAGGTTCAATGGAT  240
SEQ ID NO:2  181  TCAGTATTATGAAATGDCAAAACTATGGAAATAATTTGCCAATTACTGGATCTATGGAT  240

SEQ ID NO:1  241  ACTGGTATGCAAACTCTACACAAAGTGGCCATTTTTCACATCAACCTTTGGTTGTTAT  300
SEQ ID NO:2  241  ACAGCATATGCTAACTCTACACAAAGCAATAATTTTTATCTTCAACTTTTGTCTATAT  300

SEQ ID NO:1  301  TATCTGTTGAGGCATCAAACGAAATAGGTGATACTGAATGGAAAGATACCTTATCAAA  360
SEQ ID NO:2  301  TATCCATCAGAACTCAACTCAAATAGTGAACACTGAATGGAAAGATACACTATCTCAA  360

SEQ ID NO:1  361  CTGTTCTTAAACAAAAGGATGGCCACAGGTCAGTGTACTTTAAAGAATATGCTGATATA  420
SEQ ID NO:2  361  CTGTTCTTAAACAAAAGGATGGCCACAGGTCAGTTTATTTTAAAGAATATCAAACGTT  420

```

Фиг. 1b

SEQ ID NO:1 421 GCGGCTTTTCAGTGGAA CCA CAGTATACTGTGATTATAAATTTAGTTTAAATGA AATAT 480

SEQ ID NO:2 421 TTAGAAATTTTCEATCGACCCA AAGTATACTGTGATTATAAATGTTGTGTTAATTAGATTG 480

SEQ ID NO:1 481 GAETCTACACAAA AACTAGATATGTCTGAATGGCGATCTTATATTGAATGAATGGGTG 540

SEQ ID NO:2 481 GCTTCTGGTGAGGAGTTGGACGTATCTGAATTAGCTGATCTAATACTCAATGAGTGGTTA 540

SEQ ID NO:1 541 TGAATCCAATGGACATAACGCTATATTATTATCAGCAGACTGATGAGGCAAAATAAATGG 600

SEQ ID NO:2 541 TGAATCCAATGGATATAACATTATATTATTATCAACAAACTGGAGAGGCAAAATAAATGG 600

SEQ ID NO:1 601 ATATCGATGGGTCTTCTTGC AACGTTAAAGTGTGTCCATTAAATACACAAACACTGGT 660

SEQ ID NO:2 601 ATATCGATGGGATCATCATGTAACGTTAAAGTGTGTCCATTAAATACTCAGACATTAGGA 660

SEQ ID NO:1 661 ATTGGATGTCTAATAACTAATCCAGACAGCTTTGAAACAGTTGCGACAAAGGAGAAATTA 720

SEQ ID NO:2 661 ATTGGATGTCAACGACAGATACTGCTACTTTTGAACAGTTGCTGACAGCGAAAAATTA 720

SEQ ID NO:1 721 GTGATTACAGATGTTGTAGATGGTGTCAACCTCAAAATTAADGTACACCGGCAACGTGC 780

SEQ ID NO:2 721 GCATTAAATGATGTTGTTGACAAAGTAAATCATAAATTAGATGTTACATCTACTACGTGT 780

SEQ ID NO:1 781 ACCATACGAACTGTAA AAGTTAGGACCAAGGAGAAAGTAGCAGTEATACAGGTAGGC 840

SEQ ID NO:2 781 ACCATACGGAATGTAATAA AACTAGGACCTAGAGAAATGTGGCTATAATACAGGTAGGC 840

SEQ ID NO:1 841 GCGGCAACATTTAGACATACAGCTGATCCACAACTACCCACAGACAGAGAGAATG 900

SEQ ID NO:2 841 GGTTCTAATATATTAGATATAACAGCTGATCCACAACTTCTCCACAAACAGAAAGGAATG 900

Фиг. 1с

SEQ ID NO:1 901 ATGCGAATAAATGGAAAAAATGGTGGCAATGTTTTACACG TAGTGGATTACGTTAAAT 960

SEQ ID NO:2 901 ATGCGGTAACCTGGAAAAAATGGTGGCAAGTATTCATACCTGTAGTGGATTACGTTAAAT 960

SEQ ID NO:1 961 CAAATAATTCAGACAGTATCCAAAAAGATCTAGATGGTTAATTOGTOGGGTTCTACTAT 1020

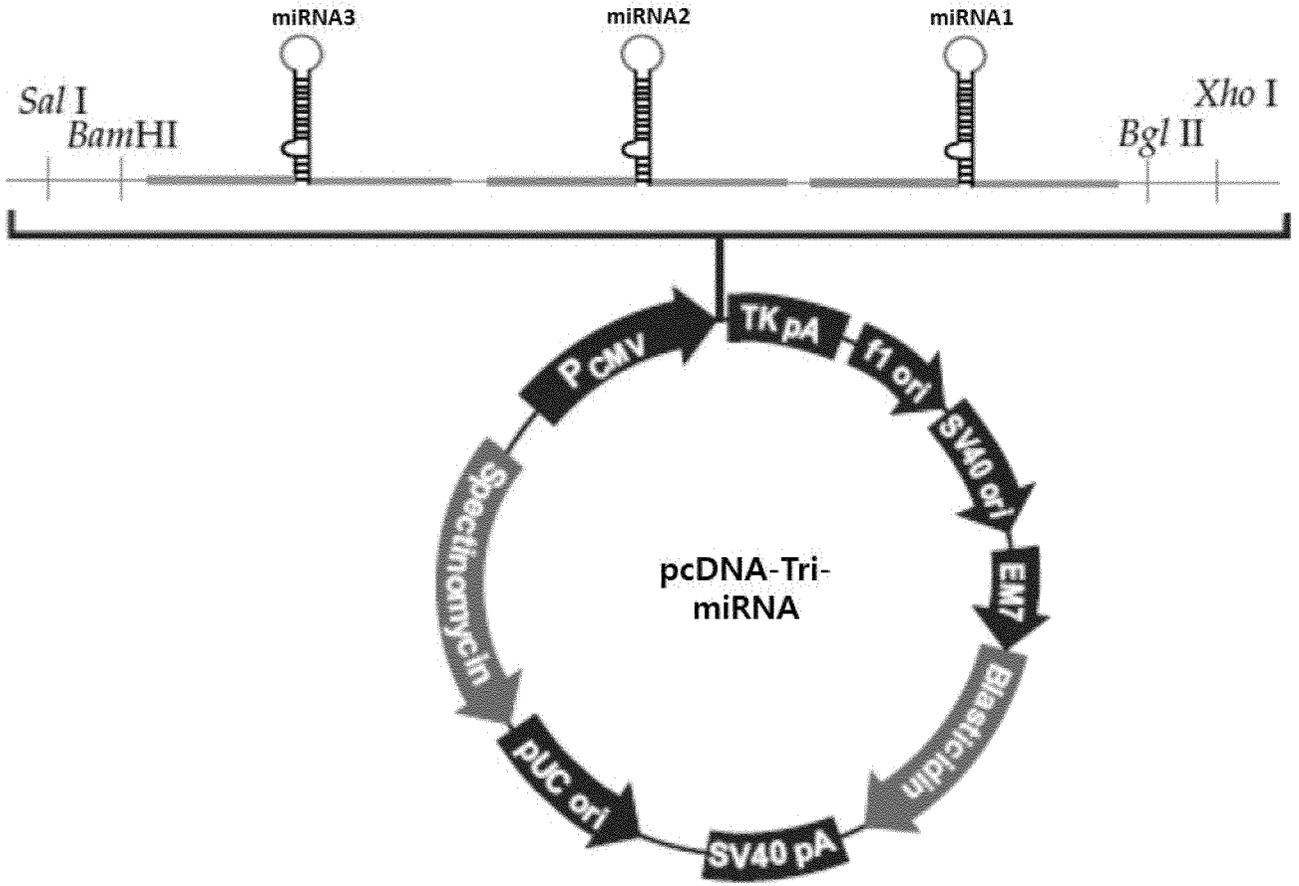
SEQ ID NO:2 961 CAAATAGTAAAGTAATGTCAAAAAGATCTAGATGGTTAGATTOGTCATCTTTCTATATAT 1020

SEQ ID NO:1 1021 AGAGTGTAGGTGCATCTTAGATTAGAATTGTATGATGTGACC 1062

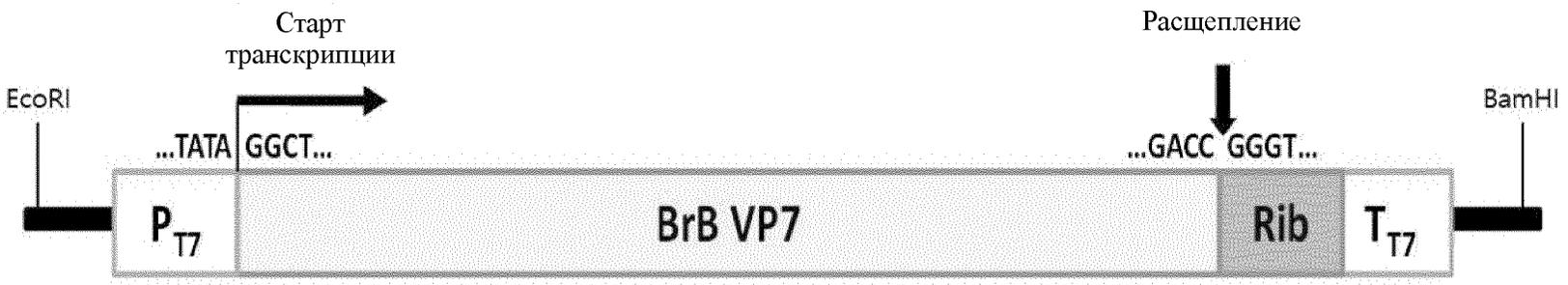
SEQ ID NO:2 1021 AGAGTGTAGATATATCCTAAAATAGAACTGTTTGTATGTGACC 1062

Последовательность-мишень для miRNA	Тип олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида
СААТТСТААТСТТСТТГАСАТ (SEQ ID NO:3)	Верхняя цепь	5' - TGCTGATGTCААGАAGАТТАGААТТGGТТТGGCCАСТGАСТGАССААТТСТАСТТСТТGАСАТ -3' (SEQ ID NO:6)
	Нижняя цепь	5' - CCTGATGTCААGАAGАТТАGААТТGGТCAGТCAGТGGCCААААССААТТСТААТСТТСТТGАСАТC -3' (SEQ ID NO:7)
	Двцепочечный олигонуклеотид	5' - TGCTGATGTCААGАAGАТТАGААТТGGТТТGGCCАСТGАСТGАССААТТСТАСТТСТТGАСАТ -3' 3' - CTACAGTTCТТСТААТСТТТААССААААССGGТGАСТGАСТGGТТАAGАТGАAGААСТGТАGТCC -5'
ТТGТТТGТАТТАТСТСТGТТGA (SEQ ID NO:4)	Верхняя цепь	5' - TGCTGTCAACAGGATAАТАСАААСАAGТТТТGGCCАСТGАСТGАСТТGТТТGТТАТСТСТGТТGA -3' (SEQ ID NO:8)
	Нижняя цепь	5' - CCTGTCAACAGGATAАСАААСАAGТCAGТCAGТGGCCААААСТТGТТТGТАТТАТСТСТGТТGAC -3' (SEQ ID NO:9)
	Двцепочечный олигонуклеотид	5' - TGCTGTCAACAGGATAАТАСАААСАAGТТТТGGCCАСТGАСТGАСТТGТТТGТТАТСТСТGТТGA -3' 3' - CAGTTGTCCСТАТТАТGТТТGТТТСААААССGGТGАСТGАСТGААСАААСААТAGGАСААСТGТCC -5'
TGCTGTCAACCACAAATTAАА (SEQ ID NO:5)	Верхняя цепь	5' - TGCTGТТТААТТТGТGGТТGACACCAGТТТТGGCCАСТGАСТGАСТGGТGТCACACAAATTAАА -3' (SEQ ID NO:10)
	Нижняя цепь	5' - CCTGТТТААТТТGТGТGACACCAGТCAGТCAGТGGCCААААСТGGТGТCAACCACAAATTAААC -3' (SEQ ID NO:11)
	Двцепочечный олигонуклеотид	5' - TGCTGТТТААТТТGТGGТТGACACCAGТТТТGGCCАСТGАСТGАСТGGТGТCACACAAATTAАА -3' 3' - CAAATTAААСАССААСТGТGGТCААААССGGТGАСТGАСТGАССАCAGТGТGТТТААТТТGТCC -5'

Фиг. 2

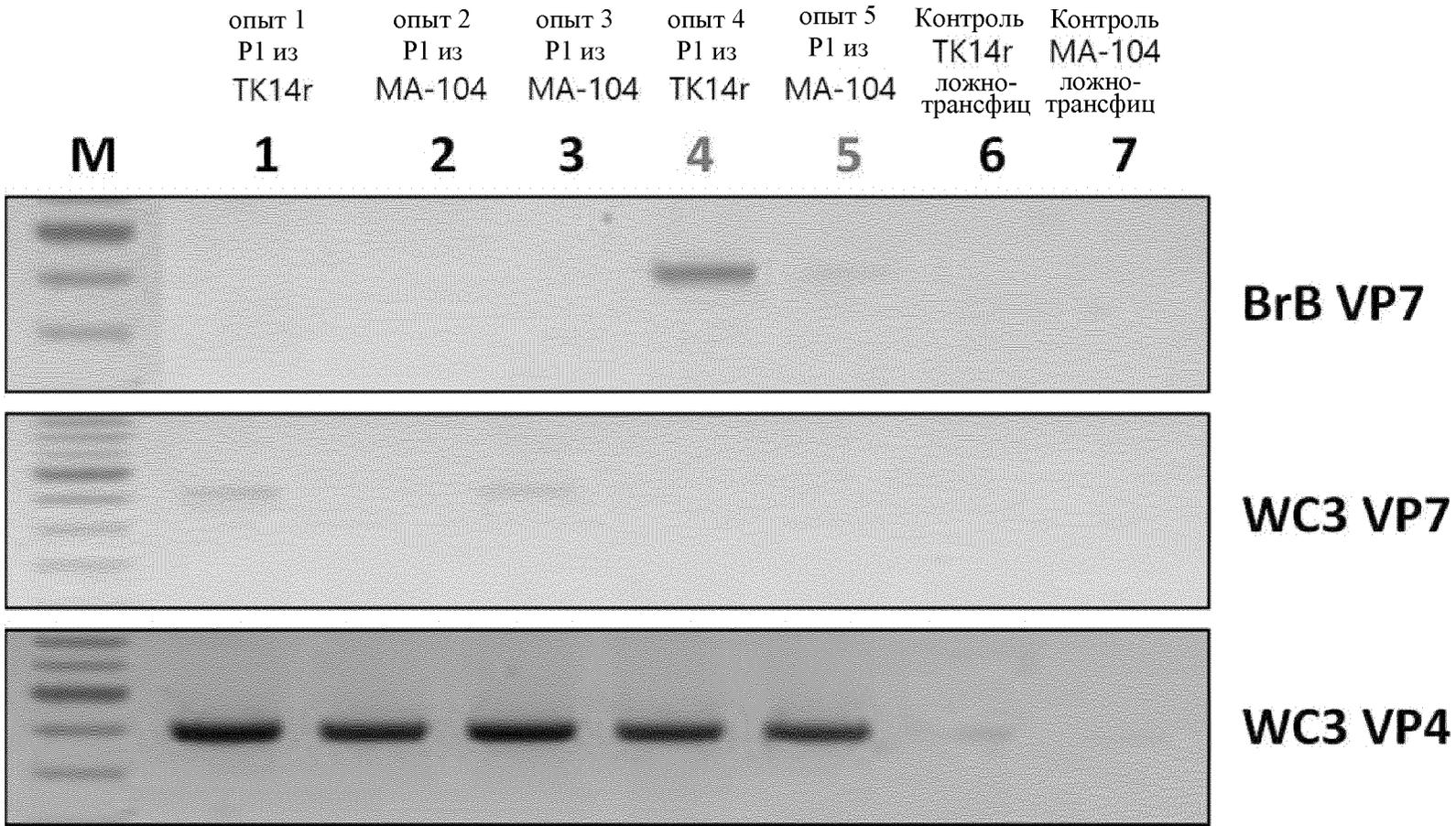


Фиг. 3



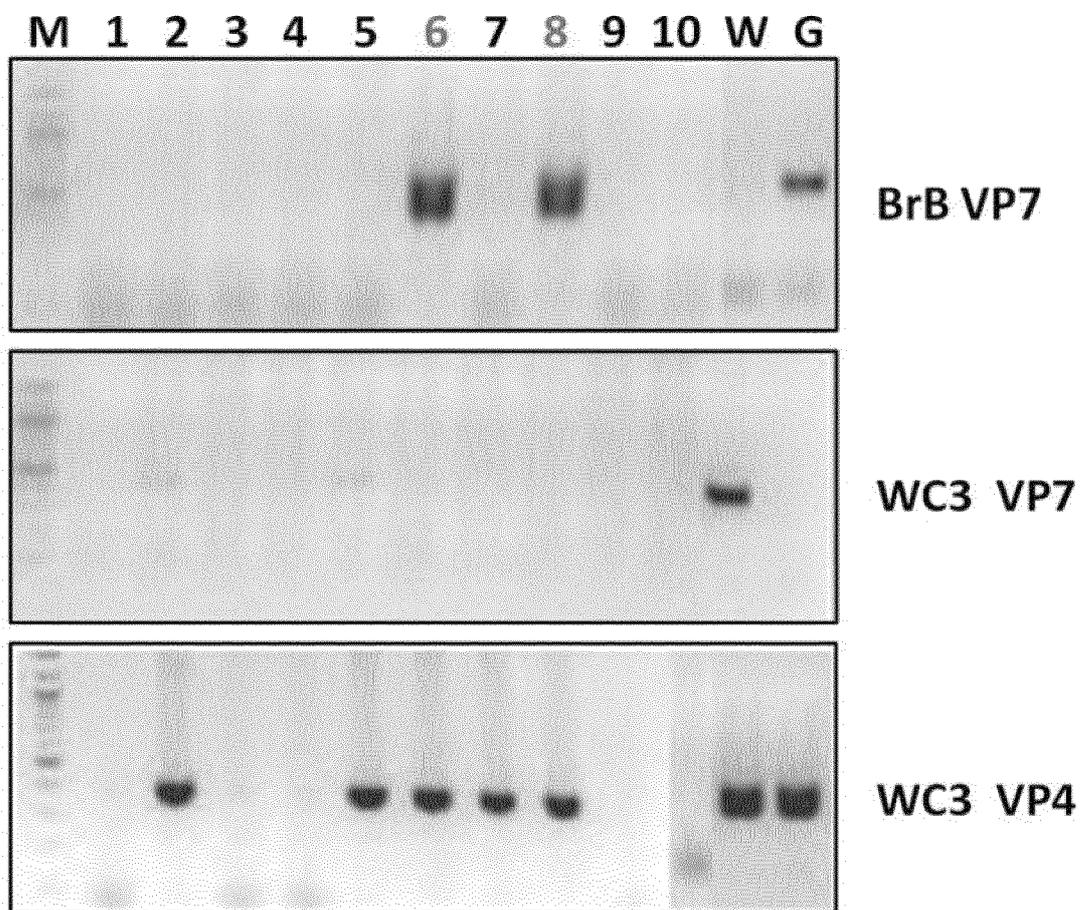
P_{T7}: Промотор T7
 T_{T7}: Терминатор T7
 Rib: Рибозим вируса
 гепатита дельта

Фиг. 4

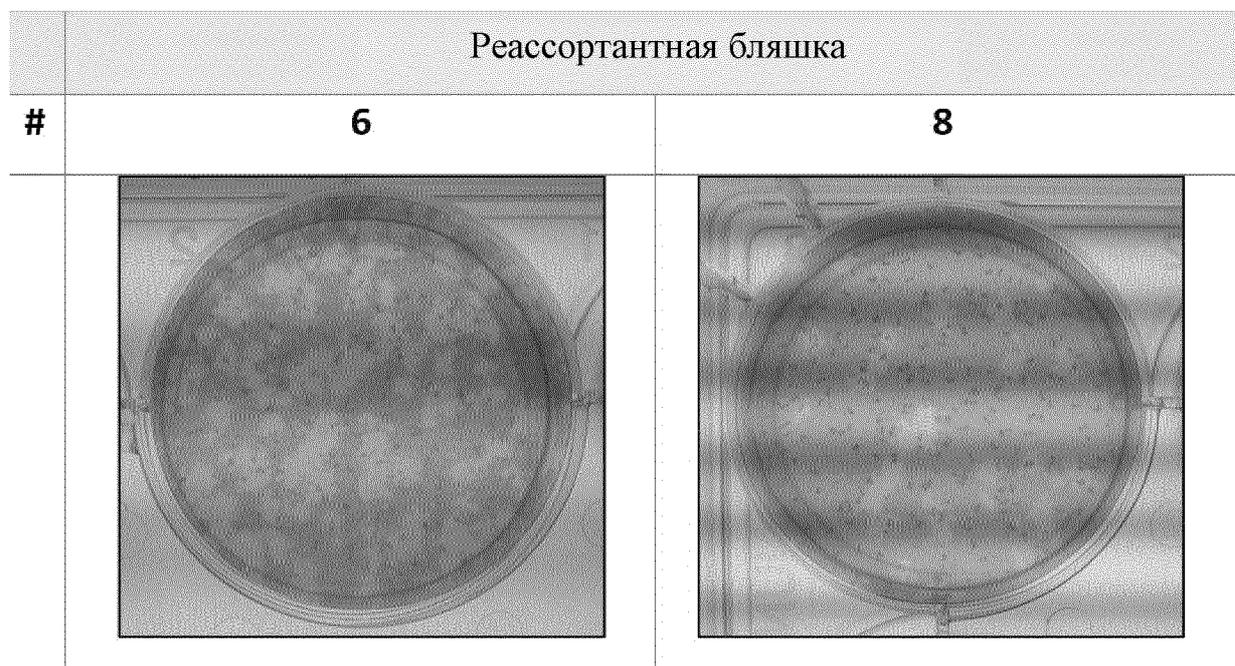


Фиг. 5

Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

