

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490024 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.29

(51) Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01)  
C12N 15/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.06.24

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕАССОРТАНТНОГО ВИРУСА REOVIRIDAE И  
БИБЛИОТЕКА ВЕКТОРОВ ДЛЯ НЕГО

(31) 10-2021-0088575

(32) 2021.07.06

(33) KR

(86) PCT/KR2022/009016

(87) WO 2023/282510 2023.01.12

(71) Заявитель:  
СК БАЙОСАЙЕНС КО., ЛТД. (KR)

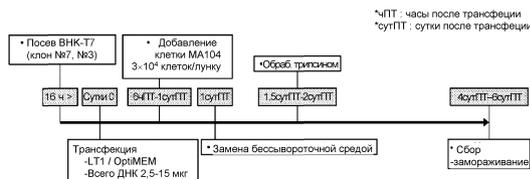
(72) Изобретатель:

Со Ки Вон, Квон Тэ Ву, Джун Со Ён,  
Парк Мин Джун, Ли Кун Се, Ли Хён  
Чжу (KR)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к способу получения реассортантного вируса Reoviridae и к библиотеке векторов для него и в ней предложены: способ получения реассортантного вируса Reoviridae посредством применения линии клеток, в которую введена РНК-полимераза, и библиотеки экспрессионных векторов согласно одному аспекту; реассортантный вирус Reoviridae, полученный данным способом; и библиотека экспрессионных векторов для получения реассортантного ротавируса.



A1

202490024

202490024

A1

## СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕАССОРТАНТНОГО ВИРУСА *REOVIRIDAE* И БИБЛИОТЕКА ВЕКТОРОВ ДЛЯ НЕГО

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способу получения реассортантного вируса *Reoviridae* и к библиотеке векторов для него. Данная заявка основана на и испрашивает приоритет корейской патентной заявки 10-2021-0088575, поданной 6 июля 2021 г. в Корейское ведомство по интеллектуальной собственности, раскрытие которой включено в данное описание изобретения посредством ссылки во всей его полноте.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирусы *Reoviridae* представляют собой семейство вирусов, имеющих геномы, состоящие из двухцепочечной РНК. Данные вирусы имеют сегменты генома, которые упакованы в многослойный капсид и имеют полиэдрическую структуру размером от примерно 70 нм до примерно 85 нм и не имеют оболочки, содержащей липиды. *Reoviridae* могут быть подразделены на два подсемейства: *Sedoreovirinae* и *Spinareovirinae*, и инфекции такими вирусами поражают, главным образом, пищеварительную или дыхательную систему. Человеческий ротавирус (HRV) представляет собой главный вирус, который вызывает диарею у младенцев, и в Корее и по всему миру 95% детей младше 5 лет были инфицированы HRV по меньшей мере один раз, и известно, что на HRV приходится примерно 40% пациентов с диареей по всему миру каждый год. Инфекция HRV представляет собой очевидную инфекцию ротавирусом, главным путем передачи инфекции HRV является фекально-оральная передача, и инкубационный период инфекции HRV составляет от примерно 24 часов до примерно 72 часов. Инфекция HRV представляет собой заболевание, которое может вызывать обезвоживание из-за рвоты, лихорадки и некровяной водянистой диареи. Она, главным образом, встречается у младенцев и детей, но время от времени массовые вспышки случаются в гериатрических отделениях.

Ротавирус имеет геномы, состоящие из 11 сегментов дцРНК (двухцепочечная РНК) и находящиеся в безоболочечном икосаэдрическом капсиде диаметром примерно 75 нм, где представляет собой трехслойный белковый капсид, состоящий из наружного капсида, внутреннего капсида и корового белка. Каждый сегмент кодирует один из 6 структурных белков (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7) и 5 неструктурных белков. Ротавирус может быть подразделен на 8 типов (группы от А до Н), где инфекция ротавирусом группы А,

ротавирусом группы В и ротавирусом группы С, особенно ротавирусом группы А, является обычной у человека. Ротавирус группы А может быть подразделен на серотипы Р или G, в зависимости от белков VP4 и VP7. Описывая подробно, чувствительный к протеазе белок VP4 определяет серотипы Р, а гликопротеин VP7 определяет серотипы G. Серотип ротавируса может определяться комбинациями данных белков. Гены для определения серотипов передаются потомству вирусов по отдельности, и, таким образом, могут встречаться различные формы комбинаций. В частности, каждый из серотипов ротавируса в разных формах комбинаций может характеризоваться тем, что он не обеспечивает перекрестной защиты.

Из-за свойства ротавируса не обеспечивать перекрестную защиту среди серотипов существует потребность в разработке эффективных вакцин против ротавируса, которые могут защищать против инфекции каждым серотипом. До настоящего времени использовали живые ослабленные пероральные вакцины и рекомбинантные вакцины животного-человеческого происхождения, но они не могли демонстрировать достаточную защитную способность против инфекций разными серотипами. Роташилд (Rotashield), разработанная Wyeth-Ayerst Laboratories в Соединенных Штатах, представляет собой четырехвалентную живую ослабленную вакцину, объединяющую самые преобладающие серотипы G (от G1 до G4), и она была одобрена FDA (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США) и использовалась в качестве основной вакцинации. Однако из-за случаев кишечной инвазии применение вакцины Роташилд было прекращено. Соответственно, увеличивается интерес к естественно/искусственно полученному/изготовленному реассортантному ротавирусу (включая вирусоподобные частицы) в качестве материала для вакцин против ротавирусной инфекции.

Реассортантный ротавирус представляет собой вирус, полученный путем комбинирования сегментов РНК разных штаммов, при одновременном инфицировании одной клетки несколькими штаммами вируса. Он может спонтанно продуцироваться в природе, но вероятность такого спонтанного появления является очень низкой. Даже если реассортация происходит, образующийся вирус будет очень сильно ослабленным по сравнению с вирусом дикого типа, и, таким образом, его будет сложно выделить. Кроме того, реассортантный ротавирус может быть получен посредством одновременного инфицирования искусственно культивируемой одиночной клетки с коровьим ротавирусом и человеческим ротавирусом. Однако недостатками этого является то, что образующийся в результате вирус продуцируется в значительно меньших количествах по сравнению с вирусом дикого типа и является ослабленным, и, таким образом, если не прилагать

селективное давление, его доля постепенно снижается по мере выполнения пассирования, делая очень сложными выделение и извлечение нужного реассортантного ротавируса. Для решения описанных выше проблем дополнительно ввели способ скрининга реассортантного ротавируса с применением нейтрализующих антител, специфичных к белкам гена, подлежащего замене, но имеются технические ограничения в том, что сперва должна быть решена проблема защиты моноклональных нейтрализующих антител с вышеупомянутой функциональностью, и для каждого из серотипов требуются дополнительные процессы скрининга.

На данном уровне техники в качестве части разработки вакцин против вирусов *Reoviridae*, включая ротавирус, проводятся разнообразные исследования для эффективного получения реассортантных вирусов (публикация корейского патента № 10-2019-0108882), но ситуация все еще является неадекватной.

### **Описание изобретения**

#### **Техническая проблема**

Согласно одному аспекту предложен способ получения реассортантного вируса *Reoviridae* посредством применения линии клеток, в которую введен ген РНК-полимеразы, и библиотеки экспрессионных векторов для ротавируса.

Согласно другому аспекту предложен реассортантный вирус *Reoviridae*, полученный данным способом, и включающая его иммуногенная композиция.

Согласно другому аспекту предложена библиотека экспрессионных векторов для получения реассортантного ротавируса.

Другие цели и преимущества настоящего раскрытия станут более очевидными со следующими подробным описанием, формулой и графическими материалами. Не описанное здесь содержание будет в достаточной степени понятно и логически выведено специалистами в области техники настоящей заявки или в аналогичной ей технической области, и, таким образом, описания такого содержания будут пропущены.

#### **Техническое решение**

Согласно одному аспекту предложен способ получения реассортантного вируса *Reoviridae*, включающий следующее: трансфицирование первой линии клеток, в которую введен ген РНК-полимеразы, библиотекой экспрессионных векторов, включающей чужеродный ген; культивирование первой культуры посредством культивирования в среде для роста, причем первая линия клеток подвергается трансфекции; культивирование второй культуры посредством добавления второй линии клеток в первую культуру, которая культивировалась; и культивирование третьей культуры посредством добавления трипсина

во вторую культуру, которая культивировалась; где библиотека экспрессионных векторов включает генный сегмент кДНК вируса *Reoviridae* и промотор, способный к связыванию с РНК-полимеразой.

«Вирус *Reoviridae*», при использовании здесь, представляет собой семейство вирусов, имеющих геномы, состоящие из двухцепочечной РНК. Этот вирус имеет сегменты генома, которые упакованы в многослойный капсид и имеют полиэдрическую форму с размером от примерно 70 нм до примерно 85 нм, и не имеет оболочки, содержащей липиды. Вирус *Reoviridae*, например, может представлять собой вирус, выбранный из группы, состоящей из родов *Rotavirus*, *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Seadornavirus*, *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Orthoreovirus* и *Oryzavirus*. Вирус *Reoviridae*, например, может представлять собой вирус рода *Rotavirus*, *Reovirus*, *Orbivirus* от *Coltivirus*, и может представлять собой, например, ротавирус.

Вирус *Reoviridae* может пролиферировать в цитозоле и может высвободиться посредством разрушения клетки, вызывая инфекцию у разных хозяев, таких как люди, рыба, насекомые, растения и т.д., и известно, что среди вышеупомянутых вирусов вирус рода *Rotavirus*, *Reovirus*, *Obivirus* или *Coltivirus* поражает человека. Соответственно, проводятся разнообразные исследования для получения вакцинных композиций, особенно живых вакцин, для предупреждения инфекции вирусами *Reoviridae*. Однако из-за генетических характеристик, согласно которым геномы на основе двухцепочечной РНК делятся на многие сегменты, и существования разных серотипов, имеются сложности в получении вакцин. Тем временем, традиционные способы изготовления вакцин посредством доставки каждого сегмента синтезированной вирусной РНК непосредственно в клетки трудно применять к получению вируса *Reoviridae*, состоящего из многих генных сегментов, из-за нестабильности самой РНК и последующих сложностей во внутриклеточной доставке. Кроме того, в способах изготовления вакцин с использованием плазмидной ДНК используют транскрипцию клетки-хозяина и механизмы модификации РНК, но они имеют проблемы пониженной эффективности доставки из-за дополнительного транспорта в ядро клетки и пониженную эффективность транскрипции из-за конкурентных реакций среди промоторов в присутствии ограниченного количества полимераз в клетке-хозяине. На данном уровне техники настоящее раскрытие предназначено для решения проблем предшествующего уровня техники и подтверждает то, что реассортантный вирус *Reoviridae* может быть получен/продуцирован посредством применения линии клеток, стабильно экспрессирующей РНК-полимеразу Т7, и библиотеки экспрессионных векторов

согласно одному аспекту, посредством этого, осуществляя настоящее раскрытие.

Способ получения реассортантного вируса *Reoviridae* может быть подробно описан на каждой стадии следующим образом.

Во-первых, данный способ может включать трансфицирование первой линии клеток, в которую введен ген РНК-полимеразы, библиотекой экспрессионных векторов, включающей чужеродный ген.

Термин «РНК-полимераза», как он используется здесь, относится к ферменту, который синтезирует первичный транскрипт РНК с ДНК. РНК-полимераза может представлять собой, например, РНК-полимеразу Т7, РНК-полимеразу Т3, РНК-полимеразу SP6 или митохондриальную полимеразу (POLRMT), в частности РНК-полимеразу, которая действует в цитозоле и, более конкретно РНК-полимеразу Т7. РНК-полимераза Т7 представляет собой продукт гена бактериофага Т7. В отличие от других РНК-полимераз, РНК-полимераза Т7 действует в цитозоле, а не в ядре, и, таким образом, не требуется дополнительный процесс импорта в ядро клетки. Кроме того, РНК-полимераза Т7 демонстрирует превосходную эффективность транскрипции, обеспечивая одновременную транскрипцию кДНК плазмид каждого из вирусов *Reoviridae*, состоящих из множества генных сегментов.

Термин «библиотека экспрессионных векторов», как он используется здесь, относится к совокупности независимых экспрессионных векторов для множества генных сегментов вируса *Reoviridae*. Например, когда библиотека экспрессионных векторов служит для экспрессии ротавируса, данная библиотека экспрессионных векторов может служить для экспрессии генных сегментов VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5. Например, библиотека экспрессионных векторов для ротавируса может относиться к комбинации в общей сложности 11 экспрессионных векторов для VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5, каждый из которых выбран для каждого генного сегмента, и каждый экспрессионный вектор из библиотеки экспрессионных векторов может включать промотор, способный связывать РНК-полимеразу, и генный сегмент кДНК ротавируса.

Термин «трансфекция», как он используется здесь, относится к введению очищенной нуклеиновой кислоты вируса или плазмиды в эукариотическую клетку. Например, трансфекция может включать вставку/введение генов РНК-полимеразы, например РНК-полимеразы Т7, в клетку или вставку/введение генного сегмента вируса *Reoviridae* в клетку.

В одном воплощении первая линия клеток представляет собой линию клеток, в

которую были генетически введены РНК-полимераза и чужеродный ген, и может представлять собой линию клеток ВНК21 (клетки почки детеныша хомяка 21), линию клеток НЕК293 (клетки эмбриональной почки человека 293), линию клеток HeLa, линию клеток СНО (клетки яичника китайского хомяка), линию клеток LNCaP, линию клеток A549 или линию клеток hepG2, и, например, может представлять собой линию клеток ВНК21, экспрессирующую РНК-полимеразу. Здесь термин «чужеродный ген» относится к гену вируса *Reoviridae*, подлежащему реассортации, и в частности к генному сегменту кДНК вируса *Reoviridae*. Каждый генный сегмент кДНК может быть выделен/получен из того же самого субъекта или гетерогенных субъектов. Например, первая линия клеток может быть получена таким образом, что экспрессионный вектор, включающий конститутивный промотор и ген РНК-полимеразы Т7, связанный с ним функциональным образом, вводят в линию клеток ВНК21, и затем из нее осуществляют скрининг линии клеток с высокой экспрессией. Однако воплощения не ограничиваются этим.

В одном воплощении общая масса ДНК библиотеки экспрессионных векторов может составлять от 1 мкг до 20 мкг на от  $1 \times 10^4$  клеток до  $1 \times 10^6$  клеток, например от 1 мкг до 17 мкг, от 1 мкг до 14 мкг, от 1 мкг до 11 мкг, от 1 мкг до 8 мкг, от 1 мкг до 5 мкг, от 1 мкг до 2 мкг, от 5 мкг до 20 мкг, от 5 мкг до 17 мкг, от 5 мкг до 14 мкг, от 5 мкг до 11 мкг, от 5 мкг до 8 мкг, от 10 мкг до 20 мкг, от 10 мкг до 17 мкг, от 10 мкг до 14 мкг или от 10 мкг до 11 мкг. Когда общая масса ДНК является слишком низкой или высокой, за пределами приведенных выше интервалов, выход нужного реассортантного вируса может быть значительно снижен или вообще может быть не получен из-за генетических характеристик вируса *Reoviridae*.

В одном воплощении библиотека экспрессионных векторов может включать промотор, способный к связыванию с РНК-полимеразой, и примеры данного промотора могут представлять собой промотор Т7, промотор Sp6 или промотор CMV (цитомегаловирус).

В одном воплощении библиотека экспрессионных векторов может дополнительно включать экспрессионный вектор для D1R или D12L, кодирующий кэппирующий фермент. Например, поскольку РНК, транскрибированная РНК-полимеразой Т7 в цитозоле, не подвергалась кэппированию или полиаденилированию, экспрессионный вектор может быть селективно добавлен в библиотеку экспрессионных векторов для вируса *Reoviridae* для улучшения стабильности транскрибированной РНК. Однако, в случае ротавируса, из-за присутствия VP3, может быть селективно включен данный экспрессионный вектор, и, аналогично, для других вирусов *Reoviridae* могут быть селективно включены

экспрессионные векторы для D1R или D12L. Здесь мольное отношение экспрессионного вектора для D1R или D12L к экспрессионному вектору для генных сегментов вируса *Reoviridae* может составлять от 1:4 до 1:6 и, например, может составлять от 1:4 до 1:5,5, от 1:4 до 1:5,0, от 1:4 до 1:4,5, от 1:4,5 до 1:6,0, от 1:4,5 до 1:5,5, от 1:4,5 до 1:5,0, от 1:5,0 до 1:6,0 или от 1:5,0 до 1:5,5. Однако мольное отношение не ограничивается этим, при условии, что оно находится в пределах интервала, который может поддерживать стабильность транскрибированной РНК.

Затем данный способ может включать культивирование первой культуры посредством культивирования первой трансфицированной линии клеток в среде для роста.

В одном воплощении данная среда для роста может представлять собой среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), минимальную эссенциальную среду Игла (EMEM) или минимальную эссенциальную среду Глазго (GMEM), где среда для роста может быть селективно дополнена фетальной телячьей сывороткой (FBS). При использовании среды для роста с добавлением FBS, на следующей стадии, данный способ может дополнительно включать замену среды для роста средой, не содержащей FBS.

В одном воплощении замену среды для роста можно осуществлять перед последующей стадией культивирования третьей культуры и можно, например, осуществлять через 20 часов после трансфекции. Описывая подробно, ее можно осуществлять в любой момент от 20 часов до 24 часов после трансфекции, в любой момент от 24 часов до 28 часов после трансфекции; или в любой момент от 28 часов до 32 часов после трансфекции.

Культивирование первой культуры можно осуществлять в условиях от 30°C до 38°C, например от 30°C до 36°C, от 30°C до 34°C, от 30°C до 32°C, от 32°C до 38°C, от 32°C до 36°C, от 32°C до 34°C, от 34°C до 38°C, от 34°C до 36°C или от 36°C до 38°C в течение от 1 часа до 4 часов, например, от 1 часа до 3 часов, от 1 часа до 2 часов, от 2 часов до 4 часов, от 2 часов до 3 часов или от 3 часов до 4 часов.

Затем данный способ может включать культивирование второй культуры посредством добавления второй линии клеток к культивируемой первой культуре.

Термин «первая культура» в том виде, как он здесь используется, относится к продукту, полученному посредством культивирования первой трансфицированной линии клеток в среде для роста, и первая культура может включать трансфицированную линию клеток и компоненты среды для роста.

Термин «вторая культура», как он используется здесь, относится к субстанции, полученной путем добавления второй линии клеток в первую культуру, которая

представляет собой продукт, полученный посредством культивирования первой трансфицированной линии клеток в среде для роста, и вторая культура может включать трансфицированную линию клеток, компоненты среды для роста и вторую линию клеток.

В одном воплощении вторая линия клеток служит для стимулирования пролиферации/амплификации полученного реассортантного вируса *Reoviridae*, и ее примеры могут включать линию клеток MA104, линию клеток Vero, линию клеток HEK, эпителиальные клетки кишечника человека, линию клеток HT-29, линию клеток Caco2, линию клеток LLC-MK2, линию клеток FRhL-2, линию клеток CV-1, линию клеток COS-7, линию клеток BSC-1 или линию клеток BGM. Например, вторая линия клеток может представлять собой линию клеток MA104, которая представляет собой линию клеток почки обезьяны.

Культивирование второй культуры служит для индукции амплификации реассортантного вируса *Reoviridae*, продуцированного из трансфицированных клеток. При культивировании линии трансфицированных клеток в комбинации со второй линией клеток, имеющей превосходную чувствительность и способность к репликации в отношении вируса *Reoviridae*, исходно продуцируемый в малом количестве реассортантный вирус *Reoviridae* может быть амплифицирован. Здесь вторую линию клеток можно добавлять в концентрации от  $1 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^6$  клеток/лунку, например от  $1 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^5$  клеток/лунку, от  $1 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^4$  клеток/лунку, от  $1 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^3$  клеток/лунку, от  $1 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^2$  клеток/лунку, от  $3 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^6$  клеток/лунку, от  $3 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^5$  клеток/лунку, от  $3 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^4$  клеток/лунку или от  $3 \times 10^2$  клеток до  $3 \times 10^3$  клеток/лунку.

В одном воплощении при культивировании второй культуры вторую линию клеток можно добавлять в первую культуру от 6 часов до 12 часов после трансфекции и, например, можно добавлять в любой момент от 6 часов до 8 часов после трансфекции, в любой момент от 8 часов до 10 часов после трансфекции или в любой момент от 10 часов до 12 часов после трансфекции, в любой момент от 12 часов до 14 часов после трансфекции, или в любой момент от 14 часов до 18 часов после трансфекции. Когда время добавления является слишком ранним или слишком поздним, за пределами приведенных выше интервалов, выход нужного реассортантного вируса может быть значительно понижен или вообще может быть не получен из-за генетических характеристик вируса *Reoviridae*.

Культивирование второй культуры можно осуществлять в условиях от  $30^\circ\text{C}$  до  $38^\circ\text{C}$ , например от  $30^\circ\text{C}$  до  $36^\circ\text{C}$ , от  $30^\circ\text{C}$  до  $34^\circ\text{C}$ , от  $30^\circ\text{C}$  до  $32^\circ\text{C}$ , от  $32^\circ\text{C}$  до  $38^\circ\text{C}$ , от  $32^\circ\text{C}$  до

36°C, от 32°C до 34°C, от 34°C до 38°C, от 34°C до 36°C или от 36°C до 38°C в течение от 24 часов до 36 часов, например от 24 часов до 32 часов, от 24 часов до 28 часов, от 24 часов до 36 часов, от 28 часов до 33 часов или от 33 часов до 36 часов.

Затем данный способ может включать культивирование третьей культуры посредством добавления трипсина в культивируемую вторую культуру.

Термин «третья культура», как он здесь используется, относится к субстанции, полученной путем добавления трипсина к продукту, полученному посредством культивирования второй культуры, и третья культура может включать первую трансфицированную линию клеток, вторую линию клеток, компоненты среды, не содержащей FBS, и подходящее количество трипсина.

Культивирование третьей культуры предназначено для индуцирования повторной инфекции реассортантным вирусом *Reoviridae*. При этом, когда трипсин подлежит введению в вышеупомянутую среду с культивированием, реассортантный вирус *Reoviridae* в малом количестве может осуществлять повторную инфекцию второй линии клеток. Здесь трипсин можно добавлять в концентрации от 0,1 мкг/мл до 1 мкг/мл, например от 0,1 мкг/мл до 0,8 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до 0,6 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до 0,4 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до 0,2 мкг/мл, от 0,3 мкг/мл до 1 мкг/мл, от 0,3 мкг/мл до 0,8 мкг/мл, от 0,3 мкг/мл до 0,6 мкг/мл или от 0,3 мкг/мл до 0,4 мкг/мл.

В одном воплощении при культивировании третьей культуры трипсин можно добавлять во вторую культуру от 36 часов до 48 часов после трансфекции, например в любой момент от 36 часов до 48 часов после трансфекции, в любой момент от 36 часов до 42 часов после трансфекции, в любой момент от 42 часов до 48 часов после трансфекции или в любой момент от 48 часов до 54 часов после трансфекции. Когда время добавления является слишком ранним за пределами приведенных выше интервалов, имеется риск того, что линия клеток может быть рано выделена с чашки, а когда время добавления является слишком поздним за пределами приведенных выше интервалов, выход нужного реассортантного вируса может быть пониженным или может быть вообще не получен из-за генетических характеристик вируса *Reoviridae*.

Культивирование третьей культуры можно осуществлять в течение от 48 часов до 84 часов, например от 48 часов до 72 часов, от 48 часов до 60 часов, от 60 часов до 84 часов, от 60 часов до 72 часов или от 72 часов до 84 часов. Данный способ может дополнительно включать получение реассортантного вируса *Reoviridae* посредством известного способа из культуры, культивируемой, как описано выше.

Согласно способу по одному аспекту, реассортантный вирус *Reoviridae*, полученный

посредством ряда описанных выше способов, может избирательно иметь любой один серотип или комбинацию серотипов, в зависимости от библиотеки экспрессионных векторов, и эффективное количество реассортантного вируса *Reoviridae* может быть получено без дополнительного процесса скрининга.

Согласно другому аспекту предложен реассортантный вирус *Reoviridae*, полученный вышеупомянутым способом, и включающая его иммуногенная композиция.

Среди терминов или элементов, упомянутых для следующего ниже реассортантного вируса *Reoviridae* и иммуногенной композиции, термины или элементы, уже упомянутые выше в описании способа получения, являются такими же, как описано выше.

Термин «иммуногенность», как он используется здесь, относится к способности композиции индуцировать иммунный ответ против конкретного патогена, где иммунный ответ может представлять собой клеточный иммунный ответ, опосредованный, главным образом, цитотоксическими Т-клетками и генерирующими цитокины Т-клетками, или гуморальный иммунный ответ, опосредованный, главным образом, хелперными Т-клетками и затем активацией В-клеток с продуцированием антител.

Иммуногенная композиция может включать по меньшей мере один носитель, фармацевтически приемлемый стабилизатор и модифицированный живой вирус, приготовленный в виде композиции с адьювантом. Подходящий носитель для применения может включать физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, калия дигидрофосфат, калия гидрофосфат, однозамещенный глутамат натрия, минимальную эссенциальную среду (MEM) или буфер для MEM и HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота). Стабилизатор способствует сохранению жизнеспособности и инфекционности вирусов во время длительного хранения лиофилизированных продуктов при температурах охлаждения и комнатной температуре, особенно во время процесса лиофилизации, и в течение периода, достаточного для обеспечения кратковременной транспортировки из холодильной цепи. Например, иммуногенная композиция может дополнительно включать белковый стабилизатор, выбранный из человеческого сывороточного альбумина и/или коллагена, гидролизованного коллагена или желатина, и гидролизованного желатина, или сахарный стабилизатор, выбранный из сахарозы, маннита, сорбита, трегалозы и декстрана. Кроме того, иммуногенная композиция может включать адьювант, который усиливает иммуногенность против вирусов и индуцирует защитный иммунитет при однократном введении, и может дополнительно включать объемобразующий агент, выбранный из группы, состоящей из лактозы, сахарозы, маннита, трегалозы и тому подобных. Кроме того, данная иммуногенная

композиция может дополнительно включать известные ингредиенты, ассоциированные с приготовлением препаратов вакцин на основе живых вирусов.

Данная иммуногенная композиция может находиться в любой форме, известной в данной области, и, например, может находиться в форме жидкостей и инъекций, но воплощения не ограничиваются этим. Для жидкостей или инъекций может быть включено от 10% до 40% пропиленгликоля и хлорид натрия в количестве, достаточном для предупреждения гемолиза (например примерно 1%). Для жидкостей или инъекций может быть включен любой разбавитель или буфер, известный в данной области. Кроме того, иммуногенная композиция может быть приготовлена непосредственно перед применением посредством консервации реассортантного вируса *Reoviridae* в контейнере, таком как флакон, и добавления необходимого носителя, адъюванта, физиологического раствора и т.д. в инъекции перед применением.

Согласно другому аспекту предложена библиотека экспрессионных векторов для получения реассортантного ротавируса, включающая множество экспрессионных векторов, причем каждый включает промотор T7, способный связываться с РНК-полимеразой T7, и генные сегменты кДНК ротавируса, связанные функциональным образом с промотором T7, где каждый из множества экспрессионных векторов может включать генные сегменты кДНК любого из VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5.

Среди терминов или элементов, упомянутых в следующей библиотеке экспрессионных векторов для получения реассортантного ротавируса, термины или элементы, уже упомянутые выше в описании способа получения, являются такими же, как описано выше.

Термин «реассортантный ротавирус», как он используется здесь, относится к вирусу, образованному путем комбинирования 11 сегментов дцРНК, составляющих ротавирус, из двух или более источников, и он может использоваться взаимозаменяемо с термином реассортантный ротавирус или искусственный рекомбинантный ротавирус. Сегмент дцРНК реассортантного ротавируса состоит из шести структурных белков (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7) и пяти неструктурных белков (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5). Описывая подробно, известно, что VP1 представляет собой РНК-полимеразу, присутствующую в пределах кора вирусных частиц, и она синтезирует мРНК, используемую для репликации сегментов РНК, VP2 образует кор вирусных частиц, и VP3 представляет собой гуанилаттрансферазу, которая способствует стабилизации мРНК, катализируя добавление 5'-кэпа, образующегося при посттранскрипционной модификации

мРНК. Кроме того, VP4 в качестве белка капсида, присутствующего на поверхности вируса, участвует в инвазии клетки вирусом и играет роль в определении серотипа Р. Кроме того, VP6 в качестве главного компонента капсида, демонстрирует высокую антигенность, а VP7 в качестве белка капсида, присутствующего на поверхности вируса, имеет роль в определении серотипа G.

Термин «вектор», как он здесь используется, относится к генетической конструкции, которая обеспечивает экспрессию целевого белка в подходящей клетке-хозяине, и также относится к генетической конструкции, включающей регуляторные элементы, связанные функциональным образом для экспрессии генной вставки. Вектор согласно одному воплощению может включать факторы регуляции экспрессии, такие как промотор, оператор, иницирующий кодон, стоп-кодон, сигнал полиаденилирования и/или энхансер, и промотор вектора может быть конститутивным или индуцибельным. Кроме того, вектор может представлять собой экспрессионный вектор, способный стабильно экспрессировать целевой белок в клетке-хозяине. Для экспрессионного вектора можно использовать традиционный в данной области вектор, используемый для экспрессии чужеродного белка в растениях, животных или микроорганизмах. Рекомбинантный вектор можно конструировать различными способами, известными в данной области. Например, вектор может включать селективируемый маркер для селекции клетки-хозяина, включающей вектор, и, в случае реплицируемого вектора, он может включать точку начала репликации. Кроме того, вектор может быть самореплицируемым или введенным в ДНК хозяина, где вектор может быть выбран из группы, состоящей из плазмиды, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровируса, вируса простого герпеса и вируса осповакцины.

Вектор может включать промотор, способный связываться с РНК-полимеразой, и его примеры могут включать промотор T7, промотор Sp6 или промотор CMV. Вектор может включать промотор, работающий в животных клетках, предпочтительно клетках млекопитающих. Согласно одному воплощению, подходящие промоторы могут включать промоторы, происходящие из вирусов млекопитающих, и промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающих, и их примеры могут включать промотор цитомегаловируса (CMV), промотор U6, промотор H1, промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса мышинного лейкоза (MLV), ранний промотор аденовируса, поздний промотор аденовируса, промотор 7.5K вируса осповакцины, промотор SV40, промотор tk HSV (вирус простого герпеса), промотор RSV (вирус саркомы Рауса), промотор EF1-альфа, промотор металлотенина, промотор бета-актина, промотор человеческого гена IL-2 (интерлейкин-

2), промотор человеческого гена IFN (интерферон), промотор человеческого гена IL-4, промотор человеческого гена лимфотоксина, промотор человеческого гена GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), промотор человеческой фосфоглицераткиназы (PGK), промотор мышечной фосфоглицераткиназы (PGK) и промотор выживания. В одном воплощении вектор может представлять собой плазмидный вектор, включающий генные сегменты кДНК ротавируса или ДНК, кодирующей кодирующий фермент. Например, вектор может представлять собой плазмиду, имеющую карту расщепления, показанную на Фиг. 2 или 3.

В одном воплощении реассортантный ротавирус может иметь любой из серотипов G1, G2, G3, G4, G9 и P1, и в генных сегментах кДНК ротавируса в экспрессионном векторе для получения реассортантного ротавируса генный сегмент кДНК VP4 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или 6, и генный сегмент кДНК VP7 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 или 13. Сегменты генома VP4 и VP7 могут определять серотип реассортантного ротавируса, и посредством комбинации с VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5 может быть получен реассортантный ротавирус, имеющий нужный серотип.

В одном воплощении в генных сегментах кДНК ротавируса в экспрессионном векторе для получения реассортантного ротавируса генный сегмент кДНК VP1 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1; генный сегмент кДНК VP2 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2; генный сегмент кДНК VP3 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4; генный сегмент кДНК VP6 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7; генный сегмент кДНК NSP1 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14; генный сегмент кДНК NSP2 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; генный сегмент кДНК NSP3 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16; генный сегмент кДНК NSP4 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17; или генный сегмент кДНК NSP5 может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18.

В одном воплощении библиотека экспрессионных векторов для получения реассортантного ротавируса может состоять из экспрессионных векторов, каждый из которых включает следующие комбинации генных сегментов кДНК: (A) кДНК VP1 SEQ ID NO: 1, кДНК VP2 SEQ ID NO: 2, кДНК VP3 SEQ ID NO: 3, кДНК VP4 SEQ ID NO: 5, кДНК VP6 SEQ ID NO: 7, кДНК VP7 SEQ ID NO: 8, кДНК NSP1 SEQ ID NO: 14, кДНК NSP2 SEQ ID NO: 15, кДНК NSP3 SEQ ID NO: 16, кДНК NSP4 SEQ ID NO: 17 и кДНК NSP5 SEQ ID

NO: 18; (Б) кДНК VP1 SEQ ID NO: 1, кДНК VP2 SEQ ID NO: 2, кДНК VP3 SEQ ID NO: 3, кДНК VP4 SEQ ID NO: 5, кДНК VP6 SEQ ID NO: 7, кДНК VP7 SEQ ID NO: 9, кДНК NSP1 SEQ ID NO: 14, кДНК NSP2 SEQ ID NO: 15, кДНК NSP3 SEQ ID NO: 16, кДНК NSP4 SEQ ID NO: 17 и кДНК NSP5 SEQ ID NO: 18; (В) кДНК VP1 SEQ ID NO: 1, кДНК VP2 SEQ ID NO: 2, кДНК VP3 SEQ ID NO: 4, кДНК VP4 SEQ ID NO: 5, кДНК VP6 SEQ ID NO: 7, кДНК VP7 SEQ ID NO: 10, кДНК NSP1 SEQ ID NO: 14, кДНК NSP2 SEQ ID NO: 15, кДНК NSP3 SEQ ID NO: 16, кДНК NSP4 SEQ ID NO: 17 и кДНК NSP5 SEQ ID NO: 18; (Г) кДНК VP1 SEQ ID NO: 1, кДНК VP2 SEQ ID NO: 2, кДНК VP3 SEQ ID NO: 4, кДНК VP4 SEQ ID NO: 5, кДНК VP6 SEQ ID NO: 7, кДНК VP7 SEQ ID NO: 11, кДНК NSP1 SEQ ID NO: 14, кДНК NSP2 SEQ ID NO: 15, кДНК NSP3 SEQ ID NO: 16, кДНК NSP4 SEQ ID NO: 17 и кДНК NSP5 SEQ ID NO: 18; (Д) кДНК VP1 SEQ ID NO: 1, кДНК VP2 SEQ ID NO: 2, кДНК VP3 SEQ ID NO: 4, кДНК VP4 SEQ ID NO: 5, кДНК VP6 SEQ ID NO: 7, кДНК VP7 SEQ ID NO: 12, кДНК NSP1 SEQ ID NO: 14, кДНК NSP2 SEQ ID NO: 15, кДНК NSP3 SEQ ID NO: 16, кДНК NSP4 SEQ ID NO: 17 и кДНК NSP5 SEQ ID NO: 18; и (Е) кДНК VP1 SEQ ID NO: 1, кДНК VP2 SEQ ID NO: 2, кДНК VP3 SEQ ID NO: 4, кДНК VP4 SEQ ID NO: 6, кДНК VP6 SEQ ID NO: 7, кДНК VP7 SEQ ID NO: 13, кДНК NSP1 SEQ ID NO: 14, кДНК NSP2 SEQ ID NO: 15, кДНК NSP3 SEQ ID NO: 16, кДНК NSP4 SEQ ID NO: 17 и кДНК NSP5 SEQ ID NO: 18. Комбинации вышеупомянутых генных сегментов кДНК и серотипов приводят к устранению патогенности человеческих ротавирусов и к одновременному добавлению безопасных для человеческого организма коровьих ротавирусов, и посредством включения эпитопных частей (например VP7 и VP4), которые могут оптимально формировать иммуногенность против человеческих ротавирусов, иммуногенность данных комбинаций можно максимизировать.

В одном воплощении библиотека экспрессионных векторов может включать экспрессионную кассету, которая дополнительно включает кодирующую рибозим последовательность, фланкированную генными сегментами кДНК. Библиотека экспрессионных векторов для ротавируса может включать по меньшей мере одну плазмиду, выбранную из группы, состоящей из следующих: плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов VP1; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов VP2; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 21 или 22 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов VP3; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 23 или 24 и включающая экспрессионную кассету для

генных сегментов VP4; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 25 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов VP6; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 или 31 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов VP7; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 32 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов NSP1; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 33 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов NSP2; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 34 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов NSP3; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 35 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов NSP4, и плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 36 и включающая экспрессионную кассету для генных сегментов NSP5. Кроме того, также можно получать комбинации экспрессионных кассет, соответственно, для комбинации вышеупомянутых генных сегментов кДНК.

В одном воплощении библиотека экспрессионных векторов для ротавируса может включать по меньшей мере одну плазмиду, выбранную из группы, состоящей из следующих: плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 37 и включающая сегменты генома кДНК VP1; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 38 и включающая сегменты генома кДНК VP2; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 39 или 40 и включающая сегменты генома кДНК VP3; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 41 или 42 и включающая сегменты генома кДНК VP4; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 43 и включающая сегменты генома кДНК VP6; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 48 или 49 и включающая сегменты генома кДНК VP7; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 50 и включающая сегменты генома кДНК NSP1; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 51 и включающая сегменты генома кДНК NSP2; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 52 и включающая сегменты генома кДНК NSP3; плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 53 и включающая сегменты генома кДНК NSP4 и плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 54 и включающая геномные последовательности кДНК NSP5. Кроме того, также могут быть получены комбинации плазмид, соответственно, для комбинации вышеупомянутых генных сегментов кДНК.

В одном воплощении библиотека экспрессионных векторов для ротавируса может дополнительно включать следующее: плаزمида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 37 и включающая D1R; и плазмида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 38 и включающая D12L.

В одном воплощении в библиотеке экспрессионных векторов мольное отношение плазмиды, включающей генные сегменты кДНК NSP2 или NSP5, к плазмиде, включающей генные сегменты кДНК VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP3 или NSP4 может составлять от 4:1 до 6:1, и, например, мольное отношение данных экспрессионных векторов может составлять от 5,0:1 до 5,5:1, от 4,0:1 до 5,0:1, от 4:1 до 4,5:1, от 4,5:1 до 6,0:1, от 4,5:1 до 5,5:1, от 4,5:1 до 5,0:1, от 5,0:1 до 6,0:1 или от 5,0:1 до 5,5:1. Когда имеется различие в мольных отношениях данных экспрессионных векторов, выходящее за пределы приведенных выше интервалов, выход нужного реассортантного вируса может быть значительно пониженным или может быть вообще не получен из-за генетических характеристик вируса *Reoviridae*.

#### Полезные эффекты

Согласно способу получения реассортантного вируса *Reoviridae* данный способ является более безопасным, чем существующие способы с использованием вирусов, и без отдельного способа скрининга интересующий реассортантный вирус может быть легко получен с высокой эффективностью посредством любой комбинации библиотек векторов.

Следовательно, способ получения реассортантного вируса *Reoviridae* согласно одному аспекту и реассортантный вирус *Reoviridae*, полученный данным способом, можно использовать в патофизиологическом исследовании вирусных инфекций, таких как ротавирусные инфекции, и в областях вакцин для предупреждения ротавирусных инфекций.

#### Описание графических материалов

На Фиг. 1 показана экспрессия и активность РНК-полимеразы T7 в общей сложности трех линиях клеток (линии клеток ВНК-T7 №3, №6 и №7), которые стабильно экспрессируют РНК-полимеразу T7, подтвержденные флуоресцентной микроскопией, где на Фиг. 1(А) показан результат для линии клеток ВНК-T7 №3, на Фиг. 1(Б) показан результат для линии клеток ВНК-T7 №6, и на Фиг. 1(В) показан результат для линии клеток ВНК-T7 №7.

Фиг. 2 представляет собой карту расщепления плазмиды, способной экспрессировать генные сегменты ротавируса.

Фиг. 3 представляет собой карту расщепления хелперной плазмиды, где Фиг. 3(А)

представляет собой карту расщепления плазмиды pCMVTK-D1R, и Фиг. 3(Б) представляет собой карту расщепления плазмиды pCMVTK-D12L.

Фиг. 4 представляет собой схему, схематично показывающую способ получения реассортантного ротавируса с использованием линии клеток, в которую введена РНК-полимераза Т7, и библиотеки экспрессионных векторов для ротавируса согласно одному воплощению.

Фиг. 5 представляет собой схему, схематично показывающую способ получения реассортантного ротавируса во времени согласно одному воплощению.

Фиг. 6 представляет собой схему, схематично показывающую процессы амплификации и повторной инфекции для реассортантного ротавируса во времени согласно одному воплощению.

На Фиг. 7 показан результат подтверждения возникновения явления СРЕ (цитопатогенный эффект) посредством электронной микроскопии в клетках МА104, повторно инфицированных реассортантным ротавирусом, согласно одному воплощению.

На Фиг. 8 показаны результаты подтверждения экспрессии VP6 посредством флуоресцентной микроскопии в клетках МА104, повторно инфицированных реассортантным ротавирусом, согласно одному воплощению.

## НАИЛУЧШИЙ СПОСОБ

### Способ осуществления изобретения

Ниже представлены предпочтительные Примеры для того, чтобы облегчить понимание настоящего изобретения. Однако приведенные ниже Примеры представлены только для более легкого понимания настоящего изобретения, и содержание настоящего изобретения не ограничено следующими ниже примерами.

#### **Пример 1. Получение линии клеток, стабильно экспрессирующей РНК-полимеразу Т7**

В данном примере гены РНК-полимеразы Т7 вводили в линии клеток ВНК21 и отбирали из них линии клеток, устойчивые к бластицидину, с получением линий клеток, стабильно экспрессирующих РНК-полимеразу Т7. Описывая подробно, синтезированные гены РНК-полимеразы Т7 встраивали выше промотора CMV в экспрессионный вектор для генов клетки, устойчивой к бластицидину, с получением экспрессионного вектора для генов РНК-полимеразы Т7. Затем линии клеток ВНК21 высевали в 6-луночный планшет в концентрации  $6,5 \times 10^5$  клеток/луночку. Здесь в качестве культуральной среды использовали DMEM (среда Игла в модификации Дульбекко) с добавлением 10% FBS (фетальная телячья сыворотка). Затем, совместно с TransIT-LT1 в концентрации 6 мкл/луночку, добавляли

экспрессионный вектор в концентрации 2 мкг/лунку, и клетки культивировали. Затем культуральную среду заменяли 10%-ной средой DMEM с добавлением бластицидина, добавленного в концентрации 10 мкг/лунку, и клетки T7-BHK21, выжившие при тестировании резистентность к бластицидину, подвергали скринингу. Посредством процесса скрининга получали линии клеток, в которых гены полимеразы T7 были встроены в геном и стабильно поддерживались в нем, и посредством выделения одиночных клеток также получали одиночные клоны линий клеток (линии клеток BHK-T7 №3, №6 и №7).

Тем временем, для оценки экспрессии и активности РНК-полимеразы T7 в полученных линиях клеток получали репортерную плазмиду посредством осуществления синтеза и встраивания конструкции промотор T7-EMCV IRES-ген GFP в клонирующий вектор pUC57, и репортерную плазмиду затем трансфицировали в линию клеток BHK-T7 №3, №6 или №7. Через 2 суток после трансфекции уровень экспрессии GFP согласно экспрессии РНК-полимеразы T7 подтверждали при помощи флуоресцентного микроскопа.

В результате, как показано на Фиг. 1, было подтверждено, что РНК-полимераза T7 экспрессировалась на высоком уровне в линии клеток BHK-T7 №3, №6 и №7 согласно одному воплощению.

## **Пример 2. Получение библиотеки экспрессионных векторов для получения реассортантного ротавируса**

В данном примере следовало получить реассортантный ротавирус, в котором в общей сложности 11 генных сегментов коровьего ротавируса и человеческого ротавируса были подвергнуты реассортации, посредством системы обратной генетики на основе плазмид, где реассортантный ротавирус конкретно представляет собой ротавирус для получения шестивалентного вакцинного штамма для предупреждения инфекции человеческим ротавирусом с серотипом G1, G2, G3, G4, G9 или P1. С этой целью в данном примере получали плазмиду, содержащую генные сегменты кДНК ротавируса, и хелперную плазмиду, экспрессирующую кэппирующий фермент вируса осповакцины.

### **2-1. Получение плазмиды, содержащей генные сегменты ротавируса**

В Таблице 1 показана генетическая информация по каждому генному сегменту ротавируса для каждого серотипа и комбинация генетической информации. В Таблице 1 генетическая информация для каждого генного сегмента указана посредством номера GenBank, ген, происходящий от коровьего ротавируса WC3, указан как (В), и ген, происходящий от человеческого ротавируса, указан как (Н).

Таблица 1

Серотип	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
<b>G1</b>	GU565052 (B)	GU565053 (B)	GU565054 (H)	GU565066 (B)	GU565056 (B)	GU565057 (H)	GU565058 (B)	GU565059 (B)	GU565071 (B)	GU565061 (B)	GU565062 (B)
<b>G2</b>	GU565052 (B)	GU565053 (B)	GU565054 (H)	GU565066 (B)	GU565056 (B)	GU565068 (H)	GU565058 (B)	GU565059 (B)	GU565071 (B)	GU565061 (B)	GU565062 (B)
<b>G3</b>	GU565052 (B)	GU565053 (B)	GU565076 (B)	GU565066 (B)	GU565056 (B)	GU565079 (H)	GU565058 (B)	GU565059 (B)	GU565071 (B)	GU565061 (B)	GU565062 (B)
<b>G4</b>	GU565052 (B)	GU565053 (B)	GU565076 (B)	GU565066 (B)	GU565056 (B)	GU565090 (H)	GU565058 (B)	GU565059 (B)	GU565071 (B)	GU565061 (B)	GU565062 (B)
<b>G9</b>	GU565052 (B)	GU565053 (B)	GU565076 (B)	GU565066 (B)	GU565056 (B)	AB180969 (H)	GU565058 (B)	GU565059 (B)	GU565071 (B)	GU565061 (B)	GU565062 (B)
<b>P1</b>	GU565052 (B)	GU565053 (B)	GU565076 (B)	GU565044 (H)	GU565056 (B)	GU565046 (B)	GU565058 (B)	GU565059 (B)	GU565071 (B)	GU565061 (B)	GU565062 (B)

Для экспрессии генных сегментов ротавируса в Таблице 1, как показано на Фиг. 2, конструировали экспрессионную кассету, в которой кДНК генных сегментов располагается непосредственно выше последовательности промотора T7, и после данной кДНК следует последовательность антигеномного рибозима HDV (вирус гепатита D) и последовательность терминатора T7. Затем данную экспрессионную кассету встраивали в клонирующий вектор pUC57 для получения плазмиды, содержащей кДНК генных сегментов ротавируса.

Тем временем, в Таблице 2 показана информация по плазмиде, содержащей кДНК генных сегментов ротавируса, полученных в одном примере.

Таблица 2

Название плазмиды	кДНК ротавируса	Ген ротавируса	Вектор	Сайты клонирования	Длина (п.н.)	SEQ ID NO:
pTK-VP1B	GU565052	VP1 (B)	pUC57	KpnI/SalI	6203	19
pTK-VP2B	GU565053	VP2 (B)	pUC57	KpnI/SalI	5588	20
pTK-VP3H	GU565054	VP3 (H)	pUC57	KpnI/SalI	5492	21
pTK-VP3B	GU565076	VP3 (B)	pUC57	KpnI/SalI	5492	22
pTK-VP4B	GU565066	VP4 (B)	pUC57	EcoRI/KpnI	5291	23
pTK-VP4P1	GU565044	VP4 (H; P1)	pUC57	KpnI/SalI	5260	24
pTK-VP6B	GU565056	VP6 (B)	pUC57	KpnI/SalI	4257	25
pTK-VP7G1	GU565057	VP7 (H; G1)	pCC1	KpnI/SalI	9352	26
pTK-VP7G2	GU565068	VP7 (H; G2)	pUC57	KpnI/SalI	3963	27

pTK-VP7G3	GU565079	VP7 (H; G3)	pUC57	KpnI/SalI	3963	28
pTK-VP7G4	GU565090	VP7 (H; G4)	pUC57	KpnI/SalI	3963	29
pTK-VP7G9	AB180969	VP7 (H; G9)	pUC57	KpnI/SalI	3962	30
pTK-VP7B	GU565046	VP7 (B)	pUC57	KpnI/SalI	3963	31
pTK-NSP1B	GU565058	NSP1 (B)	pUC57	KpnI/SalI	4479	32
pTK-NSP2B	GU565059	NSP2 (B)	pUC57	KpnI/SalI	3960	33
pTK-NSP3B	GU565071	NSP3 (B)	pUC57	EcoRI/SalI	3963	34
pTK-NSP4B	GU565061	NSP4 (B)	pUC57	EcoRI/KpnI	3680	35
pTK-NSP5B	GU565062	NSP5 (B)	pUC57	KpnI/SalI	3568	36

## 2-2. Получение хелперной плазмиды

Для получения хелперной плазмиды конструировали экспрессионный вектор (pCMVTK), для которого были синтезированы и в который были встроены немедленный ранний промотор CMV, сайт множественного клонирования (MCS) и полиА сигнальная последовательность кроличьего глобина. Затем, как показано на Фиг. 4, получали два типа хелперных плазмид - pCMVTK-D1R и pCMVTK-D12L – путем встраивания генов D1R или генов D12L в вектор pCMVTK.

### Пример 3. Получение реассортантного ротавируса

В данном примере, как показано на Фиг. 4, следовало получить ротавирус, в котором в общей сложности 11 генных сегментов было подвергнуто реассортации, путем трансфицирования линий клеток, стабильно экспрессирующих РНК-полимеразу T7 из Примера 1, в смеси ДНК, выбранной из библиотеки экспрессионных векторов из Примера 2.

Фиг. 5 представляет собой схему, схематично показывающую способ получения реассортантного ротавируса во времени согласно одному воплощению. Описывая подробно, линию клеток ВНК-Т7 высевали в 6-луночный планшет примерно за 16 часов до трансфекции таким образом, что во время трансфекции (сутки 0) получали линию клеток ВНК-Т7 в монослое с конfluence от 80% до 90%. Здесь в качестве среды использовали DMEM с добавлением от 5% до 10% FBS. Тем временем, клетки МА104 высевали в 6-луночный планшет таким образом, что, для применения в последующем процессе добавления клеток МА104, получали клетки МА104 с конfluence от 80% до 90%. Здесь в качестве среды использовали DMEM с добавлением 5% FBS.

Через примерно по меньшей мере через 16 часов после посева клеток ВНК-Т7, при

достижении клетками конфлюентности от 80% до 90%, проводили трансфекцию смесью ДНК, выбранной из библиотеки векторов. Смесь ДНК состояла из 11 плазмид, экспрессирующих каждый генный сегмент ротавируса, и 2 хелперных плазмид, и состав смеси ДНК, используемой для получения реассортантного ротавируса с серотипом G1, G2, G3, G4, G9 или P1, показан в Таблицах 3-8. Уровень Opti-MEM (Gibco) корректировали пропорционально общему уровню ДНК, т.е. уровню плазмид, и, соответственно, добавляли 250 мкл Opti-MEM на 2,5 мкг ДНК. Затем в качестве трансфекционного реактива добавляли трансфекционный реактив TransIT-LT1 (Mirus Bio) в количестве 3 мкл на 1 мкг общей ДНК, легко и тщательно перемешивали посредством пипетирования, и инкубировали данную смесь при комнатной температуре в течение от 15 минут до 30 минут.

В Таблицах 3-8 приведена информация по комбинациям плазмид и содержанию плазмид для получения реассортантного ротавируса с серотипом G1, G2, G3, G4, G9 или P1.

Таблица 3

G1	Название плазмиды	Ген ротавируса	Длина (п.н.)	Мольное отношение	Интервал применения ДНК (мкг)	
Смесь ДНК	pTK-VP1B	VP1 (B)	6203	1	0,16	0,96
	pTK-VP2B	VP2 (B)	5588	1	0,14	0,86
	pTK-VP3H	VP3 (H)	5492	1	0,14	0,85
	pTK-VP4B	VP4 (B)	5291	1	0,14	0,82
	pTK-VP6B	VP6 (B)	4257	1	0,11	0,66
	pTK-VP7G1	VP7 (H; G1)	9352	1	0,24	1,45
	pTK-NSP1B	NSP1 (B)	4479	1	0,12	0,69
	pTK-NSP2B	NSP2 (B)	3960	5	0,51	3,06
	pTK-NSP3B	NSP3 (B)	3963	1	0,10	0,61
	pTK-NSP4B	NSP4 (B)	3680	1	0,09	0,57
	pTK-NSP5B	NSP5 (B)	3568	5	0,46	2,76
	pCMVTK-D1R	хелпер	6364	1	0,16	0,98
pCMVTK-D12L	хелпер	4693	1	0,12	0,73	
<b>Общая ДНК (мкг)</b>					2,5	15
<b>OptiMEM</b>					250	1500
<b>LT1</b>					7,5	45

Таблица 4

G2	Название плазмиды	Ген ротавируса	Длина (п.н.)	Мольное отношение	Интервал применения ДНК (мкг)	
Смесь ДНК	pTK-VP1B	VP1 (B)	6203	1	0,17	1,02
	pTK-VP2B	VP2 (B)	5588	1	0,15	0,91
	pTK-VP3H	VP3 (H)	5492	1	0,15	0,90

pTK-VP4B	VP4 (B)	5291	1	0,14	0,87
pTK-VP6B	VP6 (B)	4257	1	0,12	0,70
pTK-VP7G2	VP7 (H; G2)	3963	1	0,11	0,65
pTK-NSP1B	NSP1 (B)	4479	1	0,12	0,73
pTK-NSP2B	NSP2 (B)	3960	5	0,54	3,24
pTK-NSP3B	NSP3 (B)	3963	1	0,11	0,65
pTK-NSP4B	NSP4 (B)	3680	1	0,10	0,60
pTK-NSP5B	NSP5 (B)	3568	5	0,49	2,92
pCMVTK-D1R	хелпер	6364	1	0,17	1,04
pCMVTK-D12L	хелпер	4693	1	0,13	0,77
<b>Общая ДНК (мкг)</b>				2,5	15
<b>OptiMEM</b>				250	1500
<b>LT1</b>				7,5	45

Таблица 5

G3	Название плазмиды	Ген ротавируса	Длина (п.н.)	Мольное отношение	Интервал применения ДНК (мкг)	
<b>Смесь ДНК</b>	pTK-VP1B	VP1 (B)	6203	1	0,17	1,02
	pTK-VP2B	VP2 (B)	5588	1	0,15	0,91
	pTK-VP3B	VP3 (B)	5492	1	0,15	0,90
	pTK-VP4B	VP4 (B)	5291	1	0,14	0,87
	pTK-VP6B	VP6 (B)	4257	1	0,12	0,70
	pTK-VP7G3	VP7 (H; G3)	3963	1	0,11	0,65
	pTK-NSP1B	NSP1 (B)	4479	1	0,12	0,73
	pTK-NSP2B	NSP2 (B)	3960	5	0,54	3,24
	pTK-NSP3B	NSP3 (B)	3963	1	0,11	0,65
	pTK-NSP4B	NSP4 (B)	3680	1	0,10	0,60
	pTK-NSP5B	NSP5 (B)	3568	5	0,49	2,92
	pCMVTK-D1R	хелпер	6364	1	0,17	1,04
pCMVTK-D12L	хелпер	4693	1	0,13	0,77	
<b>Общая ДНК (мкг)</b>				2,5	15	
<b>OptiMEM</b>				250	1500	
<b>LT1</b>				7,5	45	

Таблица 6

G4	Название плазмиды	Ген ротавируса	Длина (п.н.)	Мольное отношение	Интервал применения ДНК (мкг)	
<b>Смесь ДНК</b>	pTK-VP1B	VP1 (B)	6203	1	0,17	1,02
	pTK-VP2B	VP2 (B)	5588	1	0,15	0,91
	pTK-VP3B	VP3 (B)	5492	1	0,15	0,90
	pTK-VP4B	VP4 (B)	5291	1	0,14	0,87
	pTK-VP6B	VP6 (B)	4257	1	0,12	0,70
	pTK-VP7G4	VP7 (H; G4)	3963	1	0,11	0,65

pTK-NSP1B	NSP1 (B)	4479	1	0,12	0,73
pTK-NSP2B	NSP2 (B)	3960	5	0,54	3,24
pTK-NSP3B	NSP3 (B)	3963	1	0,11	0,65
pTK-NSP4B	NSP4 (B)	3680	1	0,10	0,60
pTK-NSP5B	NSP5 (B)	3568	5	0,49	2,92
pCMVTK-D1R	хелпер	6364	1	0,17	1,04
pCMVTK-D12L	хелпер	4693	1	0,13	0,77
<b>Общая ДНК (мкг)</b>				2,5	15
<b>OptiMEM</b>				250	1500
<b>LT1</b>				7,5	45

Таблица 7

G9	Название плазмиды	Ген ротавируса	Длина (п.н.)	Мольное отношение	Интервал применения ДНК (мкг)	
Смесь ДНК	pTK-VP1B	VP1 (B)	6203	1	0,17	1,02
	pTK-VP2B	VP2 (B)	5588	1	0,15	0,91
	pTK-VP3B	VP3 (B)	5492	1	0,15	0,90
	pTK-VP4B	VP4 (B)	5291	1	0,14	0,87
	pTK-VP6B	VP6 (B)	4257	1	0,12	0,70
	pTK-VP7G9	VP7 (H; G9)	3962	1	0,11	0,65
	pTK-NSP1B	NSP1 (B)	4479	1	0,12	0,73
	pTK-NSP2B	NSP2 (B)	3960	5	0,54	3,24
	pTK-NSP3B	NSP3 (B)	3963	1	0,11	0,65
	pTK-NSP4B	NSP4 (B)	3680	1	0,10	0,60
	pTK-NSP5B	NSP5 (B)	3568	5	0,49	2,92
	pCMVTK-D1R	хелпер	6364	1	0,17	1,04
pCMVTK-D12L	хелпер	4693	1	0,13	0,77	
<b>Общая ДНК (мкг)</b>				2,5	15	
<b>OptiMEM</b>				250	1500	
<b>LT1</b>				7,5	45	

Таблица 8

P1	Название плазмиды	Ген ротавируса	Длина (п.н.)	Мольное отношение	Интервал применения ДНК (мкг)	
Смесь ДНК	pTK-VP1B	VP1 (B)	6203	1	0,17	1,02
	pTK-VP2B	VP2 (B)	5588	1	0,15	0,92
	pTK-VP3B	VP3 (B)	5492	1	0,15	0,90
	pTK-VP4P1	VP4 (H; P1)	5260	1	0,14	0,86
	pTK-VP6B	VP6 (B)	4257	1	0,12	0,70
	pTK-VP7B	VP7 (B)	3963	1	0,11	0,65
	pTK-NSP1B	NSP1 (B)	4479	1	0,12	0,73
	pTK-NSP2B	NSP2 (B)	3960	5	0,54	3,24
	pTK-NSP3B	NSP3 (B)	3963	1	0,11	0,65

pTK-NSP4B	NSP4 (B)	3680	1	0,10	0,60
pTK-NSP5B	NSP5 (B)	3568	5	0,49	2,92
pCMVTK-D1R	хелпер	6364	1	0,17	1,04
pCMVTK-D12L	хелпер	4693	1	0,13	0,77
<b>Общая ДНК (мкг)</b>				2,5	15
<b>OptiMEM</b>				250	1500
<b>LT1</b>				7,5	45

Между тем, во время инкубации, среду линии клеток ВНК-Т7 удаляли, и добавляли подходящее количество свежей среды для роста (с добавлением 2,5 мл/мл смеси ДНК), которую предварительно нагревали при 37°C. После завершения инкубации смесь ДНК равномерно добавляли в среду капля за каплей, и линию клеток культивировали в инкубаторе с CO<sub>2</sub> при 37°C. Затем клетки MA104, распределенные в монослое с конфлюентностью от 80% до 90%, обрабатывали трипсином и отделяли из 6-луночного планшета. Затем клетки MA104 осаждали при 500×g в течение 5 минут, и образующийся супернатант удаляли. Затем к клеточным осадкам добавляли 3 мл среды GMEM с добавлением 5% FBS, и клетки ресуспендировали, число клеток рассчитывали соответственно. Затем ресуспендированные клетки MA104 добавляли в среду, содержащую трансфицированную линию клеток ВНК-Т7 в концентрации 3×10<sup>4</sup> клеток/лунку.

Примерно через 22 часа – 24 часа после трансфекции существующую среду удаляли, один или два раза промывали 2,5 мл бессывороточной DMEM и затем заменяли ее бессывороточной DMEM. Через примерно от 36 часов до 48 часов после трансфекции проводили обработку трипсином (Sigma, кат. № T0303) для того, чтобы получить концентрацию 0,3 мкг/мл для создания благоприятных условий для повторной инфекции малым количеством полученного реассортантного вируса. Затем через от 4 суток до 6 суток после трансфекции, при наблюдении апоптоза клеток, планшет, содержащий трансфицированные клетки, замораживали и хранили при -80°C.

#### **Пример 4. Идентификация реассортантного ротавируса**

В данном примере следовало идентифицировать реассортантный ротавирус, полученный посредством способов из Примера 3. С этой целью, после повторной амплификации реассортантного ротавируса путем инфицирования клеток MA104, подтверждали цитопатический эффект (CPE) на клетки, и оценивали уровень экспрессии VP6, используемого в выявлении ротавирусной инфекции, из-за высокой антигенности.

Фиг. 6 представляет собой схему, схематично демонстрирующую процессы амплификации и повторной инфекции для реассортантного ротавируса во времени

согласно одному воплощению. Описывая подробно, клетки МА104 высевали в 6-луночный планшет примерно за 16 часов до инфицирования так, чтобы получить ко времени инфицирования (сутки 0) клетки МА104 с конфлюентностью от 80% до 90%. Здесь в качестве культуральной среды использовали DMEM. Тем временем, планшет, содержащий трансфицированные клетки, которые были заморожены и хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$  в Примере 3, оттаивали при комнатной температуре, и дважды повторяли процесс повторного замораживания. Затем лунки, содержащие трансфицированные клетки, обрабатывали трипсином в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа. Инфицирующий раствор готовили путем добавления равного количества DMEM с добавлением 10% FBS для инактивации трипсина. Затем культуральную среду клеток МА104 удаляли, и добавляли к ним от 2,5 мл до 5 мл инфицирующего раствора. Затем полученные клетки культивировали в инкубаторе с  $\text{CO}_2$  при  $37^{\circ}\text{C}$ . Через от 7 суток до 8 суток подтверждали СРЕ культивируемых клеток, и подтверждали уровень экспрессии GFP по экспрессии VP6 при помощи флуоресцентного микроскопа.

В результате, как показано на Фиг. 7 и 8, было подтверждено, что клетки МА104, повторно инфицированные реассортантным ротавирусом, демонстрировали значительное явление СРЕ, и что VP6 также экспрессировался на высоком уровне.

Приведенные выше описания предназначены только для иллюстрации данного раскрытия, и специалисту, имеющему обычную квалификацию в области, к которой относится настоящее изобретение, очевидно, что раскрытые здесь воплощения могут быть легко модифицированы в другие конкретные формы без изменения технической сущности или существенных признаков изобретения. Следовательно, следует понимать то, что описанные здесь Примеры являются во всех отношениях иллюстративными и не ограничивающими.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения реассортантного вируса *Reoviridae*, включающий:
  - трансфекцию первой линии клеток, в которую введен ген РНК-полимеразы, библиотекой экспрессионных векторов, содержащих чужеродный ген;
  - культивирование первой культуры посредством культивирования первой линии клеток, подвергнутой трансфекции, в среде для роста;
  - культивирование второй культуры посредством добавления второй линии клеток в первую культивированную культуру; и
  - культивирование третьей культуры посредством добавления трипсина во вторую культивированную культуру,где библиотека экспрессионных векторов содержит генный сегмент кДНК вируса *Reoviridae* и промотор, способный связываться с РНК-полимеразой.
2. Способ по п. 1, где вирус *Reoviridae* представляет собой вирус, выбранный из группы, состоящей из родов *Rotavirus*, *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Seadornavirus*, *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Orthoreovirus* и *Oryzavirus*.
3. Способ по п. 1, где РНК-полимераза представляет собой РНК-полимеразу Т7, РНК-полимеразу Т3, РНК-полимеразу Sp6 или митохондриальную полимеразу (POLRMT).
4. Способ по п. 1, где первая линия клеток представляет собой линию клеток ВНК21, линию клеток НЕК293, линию клеток HeLa, линию клеток CHO, линию клеток LNCaP, линию клеток A549 или линию клеток hepG2.
5. Способ по п. 1, где вторая линия клеток представляет собой линию клеток MA104, линию клеток Vero, линию клеток НЕК, эпителиальные клетки кишечника человека, линию клеток HT-29, линию клеток Caco2, линию клеток LLC-MK2, линию клеток FRhL-2, линию клеток CV-1, линию клеток COS-7, линию клеток BSC-1 или линию клеток BGM.
6. Способ по п. 1, где при культивировании второй культуры вторую линию клеток добавляют в первую культуру через 6 часов – 12 часов после трансфекции.
7. Способ по п. 1, где при культивировании третьей культуры трипсин добавляют во вторую культуру через 36 часов – 48 часов после трансфекции.
8. Способ по п. 1, где трипсин добавляют в концентрации от 0,1 мкг/мл до 1 мкг/мл.
9. Способ по п. 1, где промотор представляет собой промотор Т7, промотор Sp6 или промотор CMV (цитомегаловирус).
10. Способ по п. 1, где общая масса ДНК в библиотеке экспрессионных векторов

составляет от 1 мкг до 20 мкг на от  $1 \times 10^4$  клеток до  $1 \times 10^6$  клеток.

11. Способ по п. 1, где библиотека экспрессионных векторов дополнительно содержит экспрессионный вектор для D1R или D12L, кодирующего кэппирующий фермент.

12. Способ по п. 1, который, когда среда для роста представляет собой среду с добавленной фетальной телячьей сывороткой, дополнительно включает замену среды для роста культуральной средой без добавленной фетальной телячьей сыворотки перед культивированием третьей культуры.

13. Способ по п. 1, где среда для роста представляет собой среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную эссенциальную среду Игла (EMEM) или минимальную эссенциальную среду Глазго (GMEM).

14. Способ по п. 12, где замену среды для роста культуральной средой без добавленной фетальной телячьей сыворотки проводят через 20 часов после трансфекции.

15. Реассортантный вирус *Reoviridae*, полученный способом по любому из пп. 1-14.

16. Библиотека экспрессионных векторов для получения реассортантного ротавируса, содержащая промотор T7, способный связываться с РНК-полимеразой T7, и множество экспрессионных векторов, каждый из которых содержит генный сегмент ротавирусной кДНК, функциональным образом связанный с промотором T7,

где множество экспрессионных векторов содержит генный сегмент кДНК одного из VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 и NSP5.

17. Библиотека экспрессионных векторов по п. 16, где реассортантный ротавирус имеет один из серотипов G1, G2, G3, G4, G9 и P1, и

в генном сегменте ротавирусной кДНК генный сегмент кДНК VP4 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или 6, и генный сегмент кДНК VP7 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 или 13.

18. Библиотека экспрессионных векторов по п. 17, где в генном сегменте ротавирусной кДНК генный сегмент кДНК VP1 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1;

генный сегмент кДНК VP2 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2;

генный сегмент кДНК VP3 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4;

генный сегмент кДНК VP6 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7;

генный сегмент кДНК NSP1 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14;

генный сегмент кДНК NSP2 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15;

генный сегмент кДНК NSP3 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16;

генный сегмент кДНК NSP4 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17; и

генный сегмент кДНК NSP5 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18.

19. Библиотека экспрессионных векторов по п. 16, содержащая экспрессионную кассету, дополнительно содержащую последовательность, кодирующую рибозим, фланкированную генным сегментом кДНК.

20. Библиотека экспрессионных векторов по п. 19, где каждый из множества экспрессионных векторов представляет собой плазмиду.

21. Библиотека экспрессионных векторов по п. 19, содержащая по меньшей мере одну плазмиду, выбранную из группы, состоящей из следующих:

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента VP2;

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 21 или 22 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента VP3;

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 23 или 24 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента VP4;

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 25 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента VP6;

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 или 31 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента VP7;

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 32 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента NSP1;

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 33 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента NSP2;

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 34 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента NSP3;

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 35 и содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента NSP4; и

плазида, состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 36 и

содержащая экспрессионную кассету для генного сегмента NSP5.

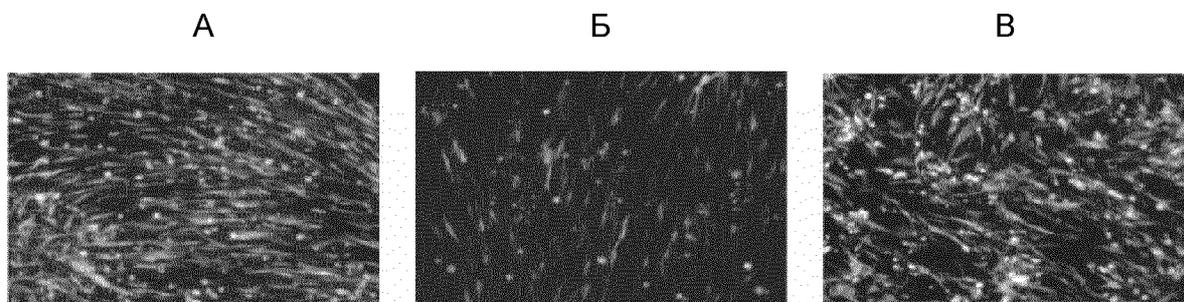
22. Библиотека экспрессионных векторов по п. 21, дополнительно содержащая: плазмиду для экспрессии D1R, состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 55; и

плазмиду для экспрессии D12L, состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 56.

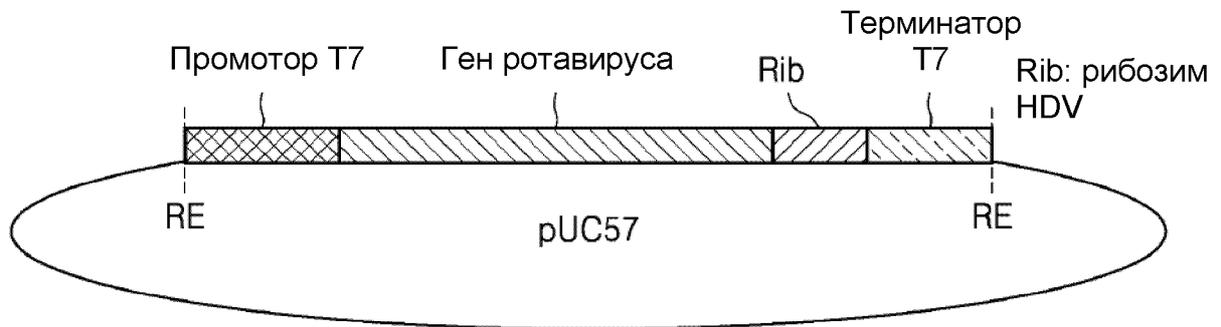
23. Библиотека экспрессионных векторов по п. 21, где общая масса ДНК в библиотеке экспрессионных векторов для ротавируса составляет от 1 мкг до 20 мкг на от  $1 \times 10^4$  клеток до  $1 \times 10^6$  клеток.

24. Библиотека экспрессионных векторов по п. 21, где мольное отношение плазмиды, содержащей генный сегмент кДНК NSP2 или NSP5, к плазмиде, содержащей генный сегмент кДНК VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP3 или NSP4 составляет от 4:1 до 6:1.

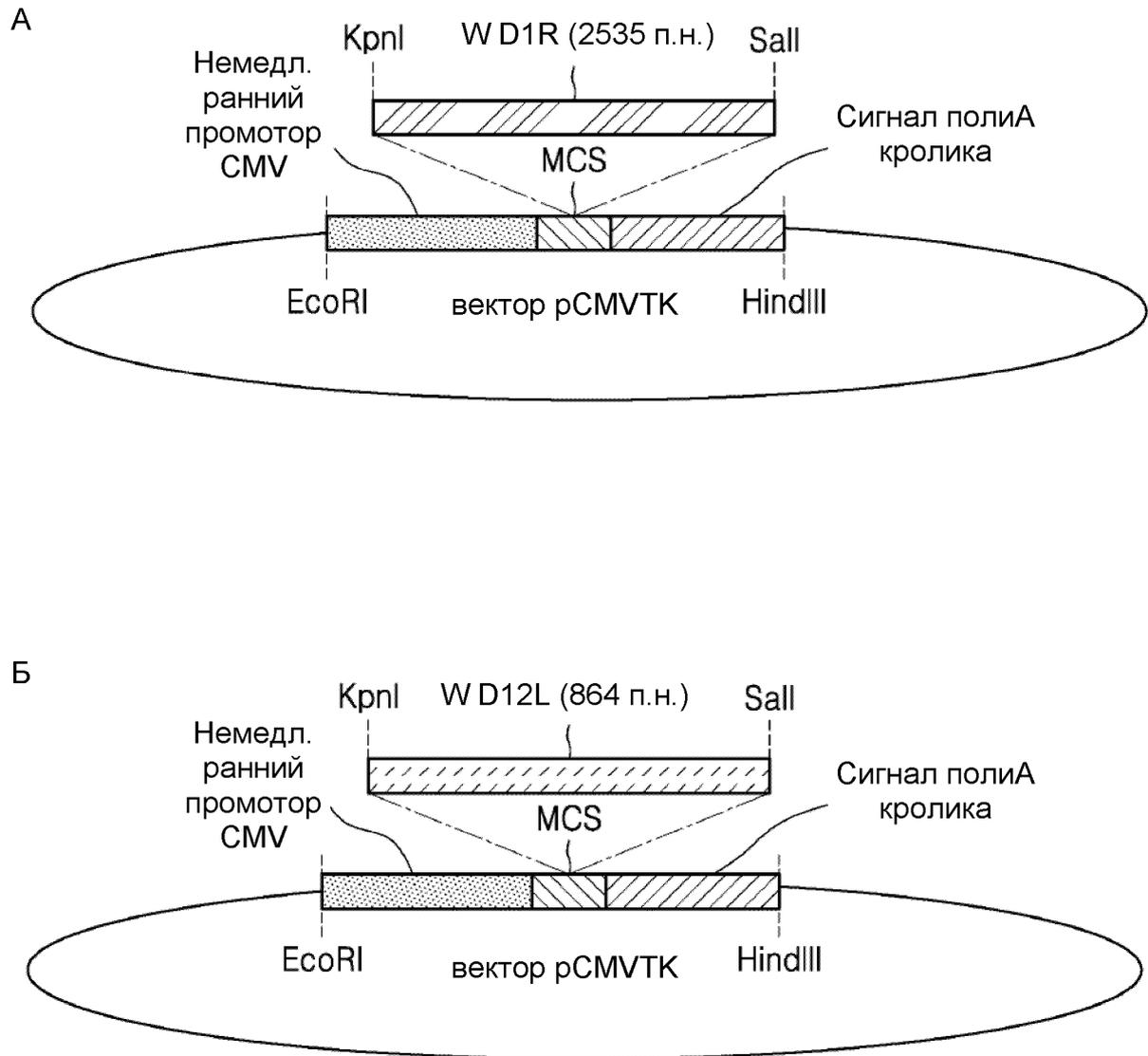
ФИГ. 1

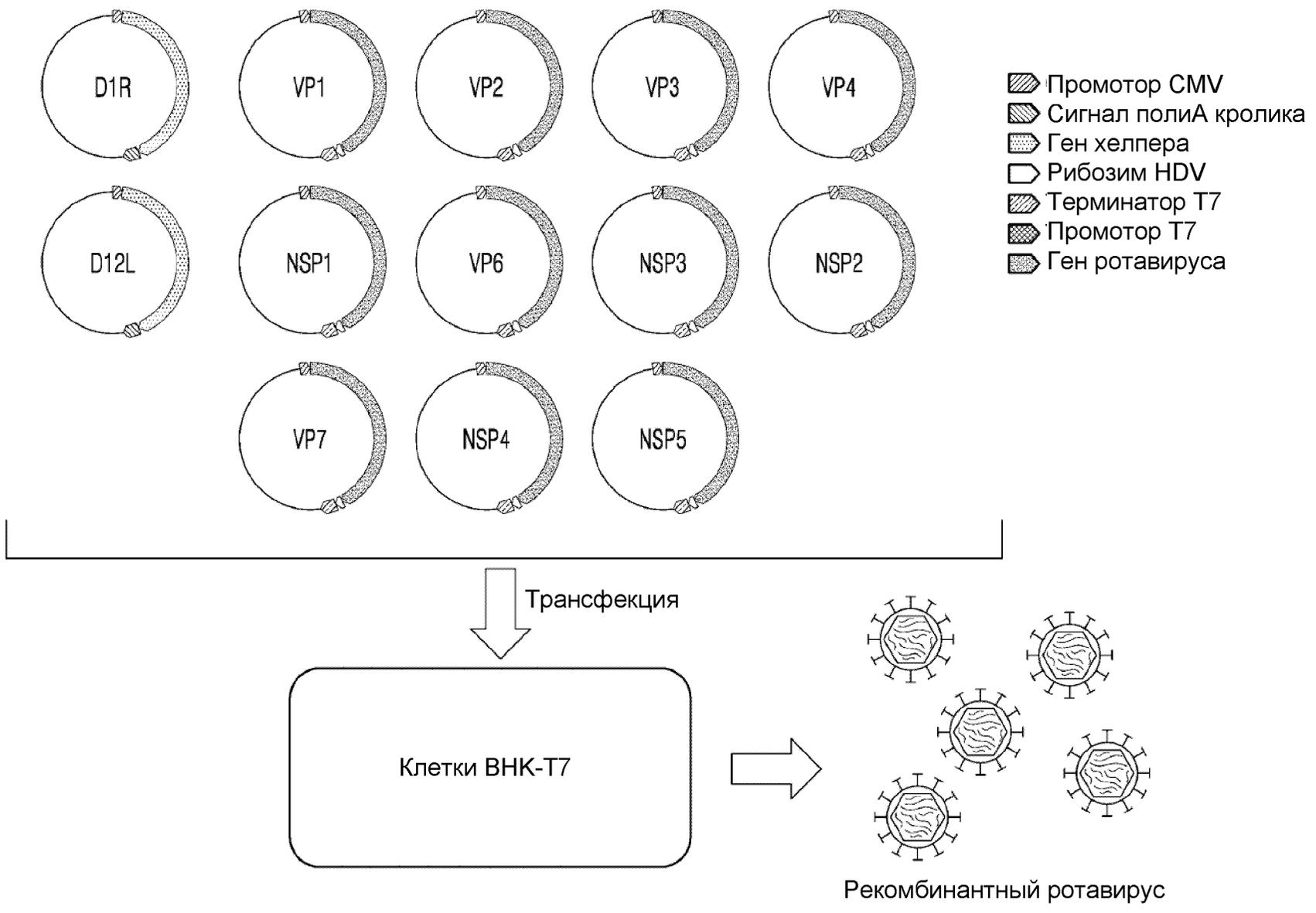


ФИГ. 2

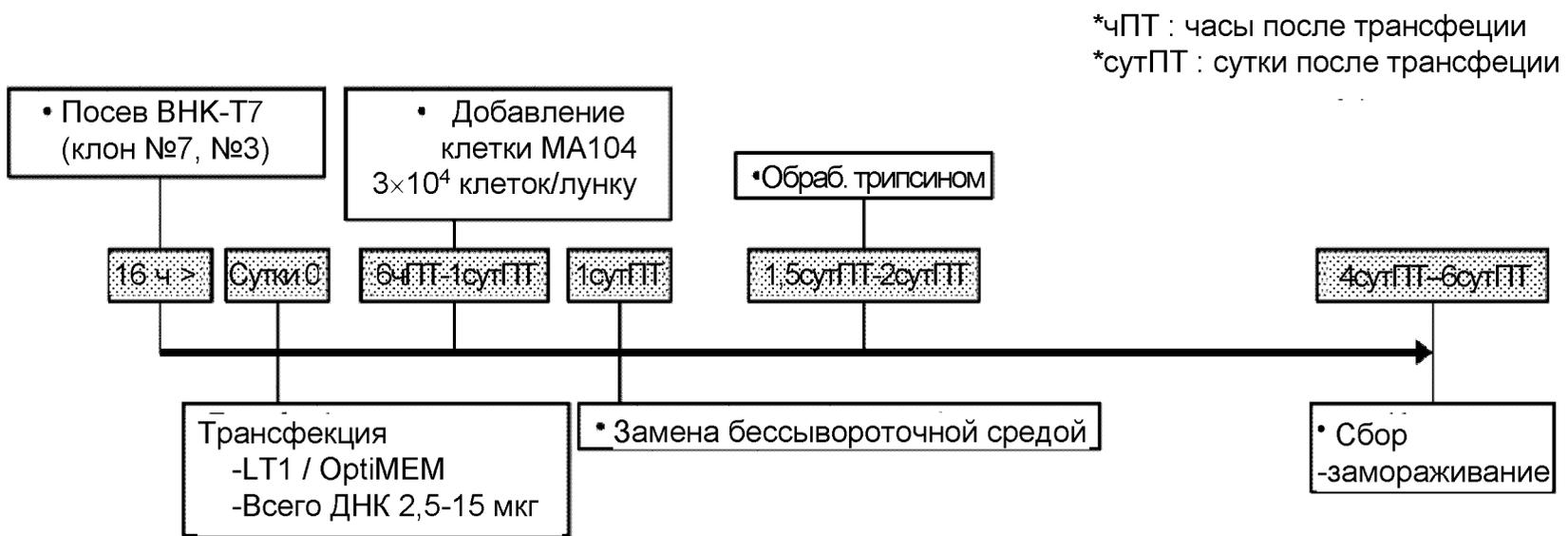


ФИГ. 3





4  
 Способ получения реассортантного  
 вируса *Reoviridae* и библиотечка векторов для него  
 ФИГ. 4



ФИГ. 5



6  
 Способ получения reassortантного  
 вируса *Reoviridae* и библиотека векторов для него  
 ФИГ. 6



ФИГ. 8

