

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037571**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.15

(21) Номер заявки
201792083

(22) Дата подачи заявки
2016.11.03

(51) Int. Cl. *C12N 7/01* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АТТЕНУИРОВАННЫЙ ВИРУС ГРИППА А, АТТЕНУИРОВАННЫЙ ГРИПОЗНЫЙ ВЕКТОР, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, А ТАКЖЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 2015147703; 2016111907

(32) 2015.11.06; 2016.03.30

(33) RU

(43) 2018.07.31

(86) PCT/RU2016/050066

(87) WO 2017/078577 2017.05.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ФАРМИНТЕРПРАЙС
БИОТЕХ" (RU)**

(56) US-A1-20090053264
US-B2-7037707
US-B2-6800288

FERKO Boris et al. Hyperattenuated Recombinant Influenza A Virus Nonstructural-Protein-Encoding Vectors Induce Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef-Specific Systemic and Mucosal Immune Responses in Mice, JOURNAL OF VIROLOGY, Oct. 2001, Vol.75, no.19, p. 8899-8908

(72) Изобретатель:
**Егоров Андрей Юрьевич (RU),
Ферко Борис (AT), Крохин Артем
Александрович, Романова Юлия
Романовна (RU)**

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

(57) Изобретение относится к области медицины и вирусологии. Представлен аттенуированный вирус гриппа А, индуцирующий кросс-протективный ответ против вируса гриппа А и В, содержащий химерный NS фрагмент, включающий укороченную рамку считывания гена белка NS1 и гетерологичную последовательность гена белка Nер, происходящую от подтипа вируса гриппа А, отличающегося от подтипа указанного аттенуированного вируса гриппа А, где указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 80-130 аминокислотных остатков, гриппозный вектор на их основе и содержащие их фармацевтическая композиция и вакцина, которые могут применяться для профилактики или лечения инфекционных заболеваний. Дополнительно настоящее изобретение относится к аттенуированному гриппозному вектору, обладающему онколитической активностью, и содержащей его фармацевтической композиции, которая может применяться для лечения онкологических заболеваний.

037571 B1

037571 B1

Область техники

Данное изобретение относится к области медицины и вирусологии, в частности, к аттенуированному химерному вирусу группы А, аттенуированному гриппозному вектору на основе указанного вируса и их применению для профилактики и/или лечения заболеваний инфекционной природы, а также для лечения онкологических заболеваний.

Уровень техники

На сегодняшний день важнейшей мерой защиты от вирусной инфекции и ограничения ее распространения является вакцинопрофилактика. Современные вакцины, как правило, индуцируют образование антител к поверхностным антигенам вирусов. Эффективность вакцин прямо зависит от степени соответствия антигенной структуры штаммов вируса, входящих в состав вакцины, и штаммов, циркулирующих среди популяции. Поверхностные белки большинства вирусов подвергаются постоянной антигенной вариации (антигенный дрейф), что требует регулярного обновления штаммового состава вакцин. Разработка высокоиммуногенных и безопасных вакцин, индуцирующих иммунный ответ широкого спектра действия, является на сегодняшний день одной из основных проблем эффективной профилактики вирусных заболеваний.

Из всех респираторных вирусных заболеваний гриппозная инфекция характеризуется наиболее тяжелой патологией и причиняет наибольший ущерб здоровью населения и экономике. Периодически появляющиеся новые пандемические штаммы, к которым отсутствует популяционный иммунитет, превращают грипп в особо опасную инфекцию. Известно, что испанский грипп 1918 года стал причиной смерти от 30 до 50 млн человек. В настоящее время, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), во время сезонных эпидемий ежегодно во всем мире заболевает гриппом до 20% населения, в том числе 5-10% взрослых и 20-30% детей (World Health Organization [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/biologicals/vaccines/influenza/en/> (дата обращения 28.03.2016)). Тяжелые формы отмечаются в 3-5 млн случаев, летальные исходы составляют от 250000 до 500000 случаев. Экономические потери, вызванные гриппом и другими острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ), составляют около 77% от ущерба, приходящегося на долю всех инфекционных болезней. Значительные убытки связаны как с прямыми расходами на лечение и реабилитацию, так и с косвенными потерями производственного характера, вызванными снижением производительности труда и сокращением прибыли предприятий. Из общего числа случаев временной нетрудоспособности на грипп и ОРВИ приходится 12-14%.

Существующие вакцины можно разделить на два вида: аттенуированные (живые, содержащие цельные и активные вирусы, проявляющие низкую патогенность) и инактивированные (содержащие фрагменты вирусных частиц или цельные неактивные вирусы). Живые вирусы, способные реплицироваться в инфицированном хозяине, вызывают сильный и длительный иммунный ответ против экспрессирующихся антигенов этих вирусов. Они эффективно вызывают как гуморальный, так и клеточный иммунный ответы, а также стимулируют иммунологические реакции, опосредуемые цитокинами и хемокинами. Поэтому живые аттенуированные вирусы обладают определенными преимуществами по сравнению с композициями вакцин, основанными либо на инактивированных иммуногенах, либо на отдельных субъединицах иммуногенов, которые, как правило, стимулируют лишь гуморальную часть иммунной системы.

Для вакцинации животных и людей от различных инфекционных заболеваний вирусы различных семейств могут использоваться в качестве векторов, экспрессирующих чужеродные геномные последовательности. Применение векторов возможно в тех случаях, когда традиционные убитые или живые вакцины не могут быть получены, или их эффективность не позволяет контролировать то или иное заболевание. Среди существующих систем доставки антигенов вирусные векторы занимают особое место, поскольку обладают следующими свойствами: имеют естественный механизм взаимодействия с клеткой и проникновения в нее, переносят чужеродный генетический материал в цитоплазму или ядро клетки, способны обеспечивать длительную экспрессию антигена, вирусная оболочка защищает нуклеиновую кислоту, кодирующую введенный трансген.

Не все вирусы обладают свойствами, необходимыми для создания векторов для получения эффективных аттенуированных рекомбинантных вакцин. Для создания вакцин на основе вирусных векторов в настоящее время наиболее широко используются поксвирусы (Poxviridae) [J. Gen. Virol. 2005. V. 86. № 11. P. 2925-2936], вирус болезни Ньюкасла (NDV) [Virol. 2001. V. 75. № 23. P. 11868-11873] и аденовирусы (Adenoviridae) [Биотехнология. 2007. Т.5. С. 38-44]. Среди поксвирусов, используемых в качестве вирусного вектора, наиболее популярен вирус осповакцины, к преимуществам которого относятся простота и дешевизна получения, а также высокая пакующая емкость (до 25 т.п.н.) [J. Gen. Virol. 2005. V. 86. № 11. P. 2925-2936]. Серьезный недостаток векторов на основе вируса осповакцины - предсуществующий иммунитет к этому вирусу, который присутствует в части в человеческой популяции в результате иммунизации против оспы. Поэтому целесообразно использовать векторы на основе таких поксвирусов, как вирус оспы канарейки (Сапагурох) и вирус оспы домашней птицы (Flowрох). Однако Сапагурох и Flowрох индуцируют более слабый иммунный ответ на целевые антигены, чем вирус осповакцины, и требуют многократного введения или использования адъювантов [Vaccine. 1991. V.9. № 5. P. 303-308.]. Сущест-

венным недостатком вакцинного вектора NDV является то, что последствия введения рекомбинантных NDV недостаточно изучены, и не ясно, безопасны ли вакцины на основе NDV для человека. Кроме того, NDV характеризуется низкой пакующей емкостью и сложностью получения векторов, несущих несколько целевых антигенов [Chem. Biodivers. 2010. V 7. № 3.P. 677-689]. Аденовирусы также имеют ряд недостатков ограничивающих их применение в качестве векторов для переноса генов. Основными недостатками аденовирусных векторов считаются: (1) неоднородность распределения вирусных рецепторов на поверхности клеток в организме, что делает множество клеток нечувствительными к аденовирусной инфекции (2) наличие мощного защитного популяционного иммунитета к известным аденовирусным векторам (3) теоретическая возможность интеграции ДНК-вого генома аденовирусов в хромосомы человека (Stephen SL, Montini E, Sivanandam VG, Al-Dhalimy M, Kestler HA, Finegold M, Grompe M, Kochanek S. Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):9987-94. doi: 10.1128/JVI.00751-10. Epub 2010 Aug 4.)/

Векторы, полученные на основе вируса гриппа, имеют ряд преимуществ по сравнению с другими вирусными векторами, поскольку:

вирусы гриппа не имеют ДНК-вой фазы в своем репликационном цикле и не могут встраиваться в геном человека или животного;

вирус гриппа вызывает системный и мукозальный В и Т клеточный ответ к своим антигенам при заражении клеток респираторного тракта человека.

Множество различных подтипов вируса гриппа является доступным. Поскольку антитела против разновидности указанных подтипов не обладают перекрестной реактивностью, предшествующий иммунитет к вирусному вектору у хозяина, что зачастую является проблемой в случае других живых векторов, можно обойти. Возможны также эффективные бустерные иммунизации различными подтипами вирусов гриппа, экспрессирующими одни и те же антигены.

Существует несколько типов живых гриппозных вакцин для интраназального введения (УЛЬТРА-ВАК® ВАКЦИНА ГРИППОЗНАЯ АЛЛАНТОИСНАЯ ЖИВАЯ (РФ) и Flumist® (USA)) и промышленная технология их производства с применением 10-дневных куриных эмбрионов (Guideline on Influenza Vaccines - Quality Module, European Medicines Agency, 25 April 2014 [Электронный ресурс]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/06/WC500167817.pdf (дата обращения 01.11.2015)).

Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, которое включает роды *Influenza A*, *B*, *C*. Геномы вирусов гриппа А и В имеют схожую структуру, состоящую из 8 геномных фрагментов РНК негативной полярности: PB2, PB1, PA, HA, NA, NP, M и NS (Chou YY, Vafabakhsh R, Doganay S, Gao Q, Ha T, Palese P. One influenza virus particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Jun 5;109(23):9101-6. doi: 10.1073/pnas.1206069109. Epub 2012 Apr 30). Полимерный комплекс PB2, PB1, PA транскрибирует одну матричную РНК (мРНК) с каждого геномного фрагмента, транслируемую в одноименный белок. У геномных фрагментов M и NS матричные РНК могут быть альтернативно сплайсированы, образуя мРНК, кодирующие белки M2 и NEP, соответственно. Все белки, за исключением белка NS и PB1-f2 (имеется не у всех штаммов), являются структурными компонентами вирусных частиц.

Неструктурный белок NS1 накапливается в цитоплазме зараженных клеток и имеет функцию ингибитора системы интерферона (Krug RM. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Curr Opin Virol.* 2015 Jun; 12:1-6. doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.007. Epub 2015 Jan 29. Review).

Фрагментированная природа генома вируса гриппа дает возможность образования реассортантов вируса гриппа - вирусов, имеющих фрагменты генома смешанного происхождения от разных штаммов. Это является одним из механизмов антигенного разнообразия вирусов гриппа в природе и причиной возникновения пандемий вируса гриппа.

Антигенные свойства вируса гриппа определяются поверхностными гликопротеинами, образующими шипы на поверхности вирионов - гемагглютинином (HA) и нейраминидазой (NA). Молекула HA ответственна за механизмы прикрепление вируса к сиаловым рецепторам клетки и слияния вирусной и клеточной мембран для проникновения генома в цитоплазму и ядро клетки. В процессе репродукции вируса происходит расщепление (активация) HA клеточными протеазами на две субъединицы - HA1 и HA2, которые остаются соединенными дисульфидной связью (Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 1994; 371, 37-43.). Молекула HA состоит из двух частей: глобулярной, образованной субъединицей HA1, и стволовой, которая состоит в основном из субъединицы HA2 и частично HA1. Глобулярная часть включает рецептор-связывающий сайт и пять антигенных сайтов и является основной мишенью для образования антител. Антитела, блокирующие связывание вируса с рецептором, являются нейтрализующими. Для HA1 субъединицы характерна высокая изменчивость. Стволовая часть HA расположена в непосредственной близости от вирусной мембраны и отличается слабой иммуногенностью. Субъединица HA2 играет основную роль в обеспечении слияния вирусной мембраны с эндосомальной и отличается высокой консервативностью. В соответствии с антигенной специфичностью к настоящему моменту для вируса гриппа А известно 18 подтипов HA и 11 подтипов NA. Подтипы HA H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18 относят

к первой группе, а H3, H4, H7, H10, H14 и H15 - ко второй группе. При этом только сероподтипы H1, H2 и H3 вируса гриппа А и различные антигенные варианты вируса гриппа В способны к распространению в человеческой популяции, вызывая пандемии или сезонные эпидемии гриппа.

Специфический иммунитет, вырабатываемый после перенесенного заболевания или вакцинации одним сероподтипом, слабо защищает от инфекции другим сероподтипом вируса гриппа А. Иммунитет к любому сероподтипу вируса гриппа А не защищает от вируса гриппа В и наоборот, иммунизация против гриппа В не эффективна в отношении вируса гриппа А. В связи с этим существует настоятельная необходимость создания универсальной гриппозной вакцины, эффективной по отношению ко всем известным антигенным разновидностям вируса гриппа А и В.

В основе необычайно быстрой изменчивости вируса гриппа, а значит, и его ускользания от действия нейтрализующих антител лежат два механизма: 1) накопление точечных мутаций, ведущих к изменению антигенной структуры поверхностных гликопротеинов (антигенный дрейф) и 2) реассортация геномных сегментов. Они приводят к появлению новых антигенных вариантов вируса (антигенный шифт), которые могут вызывать пандемию.

Для всех гриппозных вакцин, применяемых в настоящее время, характерен риск низкой эффективности при иммунизации пожилых людей и маленьких детей (Jefferson T, Rivetti A, Di Pietrantonj C, Demicheli V, Ferroni E. Vaccines for preventing influenza in healthy children. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 8, CD004879.; Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2011; 12, 36-44; Pfliegerer M, Trouvin JH, Brasseur D, Granstrom M, Shivji R, Mura M, Cavaleri M. Summary of knowledge gaps related to quality and efficacy of current influenza vaccines. *Vaccine* 2014; 32, 4586-91). Кроме того, эти вакцины защищают от циркулирующих штаммов только в случае совпадения эпидемического вируса с вакцинным штаммом по антигенным свойствам. Именно высокой изменчивостью поверхностных антигенов вируса гриппа, HA и NA, обусловлена необходимость проведения ежегодной вакцинации и обновления состава вакцин. Следует отметить, что сезонные вакцины, формируемые на основании рекомендаций ВОЗ, неэффективны в случае внезапного появления нового пандемического штамма, кардинально отличающегося от всех циркулирующих вариантов, как это произошло в 2009 г. при появлении пандемического вируса A/California/7/2009 (H1N1pdm09). Еще одним примером может служить низкая эффективность компонента H3N2 сезонной вакцины 2014 г., обусловленная появлением нового антигенного варианта этого сероподтипа в результате антигенного дрейфа (Skowronski DM, Chambers C, Sabaiduc S, De Serres G, Dickinson JA, Winter AL, Drews SJ, Fonseca K, Charest H, Gubbay JB, Petric M, Krajden M, Kwindt TL, Martineau C, Eshaghi A, Bastien N, Li Y. Interim estimates of 2014/15 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance Network, January 2015. *Euro Surveill* 2015; 20). За последние 60 лет разработано множество вариантов живых и инактивированных гриппозных вакцин, имеющих определенные преимущества и недостатки, однако ни один из известных препаратов не решает проблемы контроля над заболеваемостью гриппом из-за их неспособности вызывать кросс-протективный иммунитет к постоянно эволюционирующим вирусам гриппа. В связи с этим существует настоятельная необходимость в создании универсальной гриппозной вакцины, вызывающей широкий кросс-протективный длительный иммунитет, способный противостоять всем известным известным циркулирующим сероподтипам вирусам гриппа А и В.

Все известные противогриппозные вакцины - инактивированные (цельновирионные, сплит или субъединичные) или живые (аттенуированные холодоадаптированные) - в основном направлены на создание иммунитета к глобулярной части HA. В отличие от изменчивой глобулярной части, стволовая часть HA отличается консервативностью среди вирусов гриппа А (I и II группы) и В. Для антител, индуцированных к этому району HA, известно несколько механизмов как прямой, так и непрямой нейтрализации. Один из механизмов прямой нейтрализации связан с предотвращением конформационного изменения HA, которое необходимо для высвобождения пептида слияния и последующего объединения эндосомальной и вирусных мембран для доставки вирусного генома в клетку. Второй механизм прямой нейтрализации связан с предотвращением активационного расщепления HA на субъединицы HA1 и HA2 с помощью антител, взаимодействующих с участком HA в непосредственной близости от сайта расщепления. В механизмах непрямой нейтрализации задействованы антителозависимая и комплементзависимая цитотоксичность (Terajima M, Cruz J, Co MD, Lee JH, Kaur K, Wrammert J, Wilson PC, Ennis FA. Complement-dependent lysis of influenza a virus-infected cells by broadly cross-reactive human monoclonal antibodies. *J Virol* 2011; 85, 13463-7.; Jegaskanda S, Weinfurter JT, Friedrich TC, Kent SJ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. *J Virol* 2013; 87, 5512-22).

Антитела к стволу HA при вакцинации практически не образуются и выявляются в небольшом количестве только после естественной инфекции (Moody MA, Zhang R, Walter EB, Woods CW, Ginsburg GS, McClain MT, Denny TN, Chen X, Munshaw S, Marshall DJ, Whitesides JF, Drinker MS, Amos JD, Gurley TC, Eudailey JA, Foulger A, DeRosa KR, Parks R, Meyerhoff RR, Yu JS, Kozink DM, Barefoot BE, Ramsburg EA, Khurana S, Golding H, Vandergrift NA, Alam SM, Tomaras GD, Kepler TB, Kelsoe G, Liao HX, Haynes BF. H3N2 influenza infection elicits more cross-reactive and less clonally expanded anti-

hemagglutinin antibodies than influenza vaccination. PLoS ONE 2011; 6, e25797).

Большинство разрабатываемых в настоящее время подходов к получению универсальной вакцины основано на фокусировании иммунного ответа к консервативным участкам белков вируса гриппа. Антитела к консервативным внутренним белкам PB2, PB1, PA, NP и M1 не относятся к нейтрализующим, но могут играть важную роль в обеспечении элиминации вируса за счет антителозависимой цитотоксичности (ADCC).

Известно несколько примеров создания универсальной вакцины на основе субъединицы HA2. Трехкратная иммунизация мышей пептидами, представляющими эктодомен HA2 (23-185 аминокислотные остатки) или пептид слияния (1-38 аминокислотные остатки), в комбинации с адьювантами KLH (keyhole limpet hemocyanin) и Фрейнда индуцировала кросс-реактивный иммунитет, снижающий гибель животных при летальной инфекции гетерологичным штаммом (Stankova Z, Kiraly J, Stropkova A, Mikuskova T, Mucha V, Kostolansky F, Vareckova E. Heterosubtypic protective immunity against influenza A virus induced by fusion peptide of the hemagglutinin in comparison to ectodomain of M2 protein. *Acta Virol* 2011; 55, 61-7). Более эффективная защита развивалась при вакцинации химерными конструкциями HA. Krammer с соавт. показали, что гетеросубтипичный гуморальный иммунитет у мышей индуцируется при иммунизации химерными белками, содержащими глобулярные части HA от штаммов разных сероподтипов и одинаковую стволую часть HA (Krammer F, Palese P, Steel J. Advances in universal influenza virus vaccine design and antibody mediated therapies based on conserved regions of the hemagglutinin. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 386, 301-21.; Krammer F, Hai R, Yondola M, Tan GS, Leyva-Grado VH, Ryder AB, Miller MS, Rose JK, Palese P, Garcia-Sastre A, Albrecht RA. Assessment of influenza virus hemagglutinin stalk-based immunity in ferrets. *J Virol* 2014; 88, 3432-42). К недостаткам этого подхода следует отнести сложную схему иммунизации, которая включает электропорацию животных с помощью ДНК и двукратную иммунизацию белковыми конструкциями внутримышечно и интраназально с адьювантом poly (I: C).

Другим примером служит использование стабильных конструкций (мини-НА), полученных генно-инженерным способом на основе аминокислотной последовательности стволуой части HA вируса сероподтипа H1N1. Из большой коллекции отбирали только конструкции с самой высокой аффинностью к антителам, обладающим нейтрализующей активностью широкого спектра. Иммунизация мышей такими конструкциями также защищала животных от гибели при инфицировании штаммом I группы - высокопатогенным вирусом гриппа птиц сероподтипа H5N1 (Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, van Meersbergen R, Huizingh J, Wanningen P, Verspuij J, de Man M, Ding Z, Apetri A, Kukrer B, Sneekes-Vriese E, Tomkiewicz D, Laursen NS, Lee PS, Zakrzewska A, Dekking L, Tolboom J, Tettero L, van Meerten S, Yu W, Koudstaal W, Goudsmit J, Ward AB, Meijberg W, Wilson IA, Radosevic K. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science* 2015; 349, 1301-6). Стопроцентная защита мышей от гибели достигалась в результате двукратной внутримышечной иммунизации очищенным белком мини-НА в дозе 30 мкг с адьювантом Matrix-M производства компании Novavax.

Еще одно из перспективных направлений в разработке универсальной гриппозной вакцины основано на создании самособирающихся наночастиц, которые, как показано ранее, значительно повышают иммуногенные свойства HA (Kanekiyo M, Wei CJ, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JR, Rao SS, Kong WP, Wang L, Nabel GJ. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature* 2013; 499, 102-6). Животным двукратно или трехкратно внутримышечно вводили наночастицы с добавлением нового адьюванта SAS (Sigma Adjuvant System). Несмотря на отсутствие выработки нейтрализующих антител после иммунизации наночастицами, как мыши, так и хорьки оказались полностью защищены от гибели при заражении высокопатогенным вирусом гриппа птиц сероподтипа H5N1.

Одна из современных технологий получения живой вакцины основана на конструировании вакцинных векторов, в котором один вирус экспрессирует антигены другого вируса. В качестве векторов, экспрессирующих гриппозные антигены, используют различные ДНК-содержащие вирусы, а именно: аденовирус, герпесвирус, бакуловир или поксвирус (Dudek T, Knipe DM. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* 2006; 344, 230-9.; He F, Madhan S, Kwang J. Baculovirus vector as a delivery vehicle for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8, 455-67.; Draper SJ, Cottingham MG, Gilbert SC. Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction-progress and prospects. *Vaccine* 2013; 31, 4223-30. Price GE, Soboleski MR, Lo CY, Misplon JA, Pappas C, Houser KV, Tumpey TM, Epstein SL. Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *Vaccine* 2009; 27, 6512-21). Так, при применении аденовирусного вектора показано, что трехкратная иммунизация плазмидой (50 мкг), содержащей последовательности консервативных белков NP и M2 вируса гриппа А, с последующим интраназальным заражением двумя аденовирусными векторами, экспрессирующими эти же белки, полностью защищала мышей и хорьков от гибели и потери веса при заражении вирулентным вирусом A/FM/1/47 (H1N1) или высокопатогенным штаммом вируса гриппа птиц сероподтипа H5N1.

Таким образом, все перечисленные подходы фокусирования иммунного ответа в отношении кон-

сервативных антигенов вируса гриппа подтверждают принципиальную возможность создания гриппозной вакцины, которая способна защищать от заражения различными вариантами вируса гриппа А. Однако, для достижения этой цели использовались сложные схемы многократной вакцинации животных с применением иммунологических адъювантов различной природы. Кроме того, ни один из известных экспериментальных препаратов универсальной гриппозной вакцины не обеспечивал защиту от вируса гриппа В. К этому следует добавить, что перечисленные выше экспериментальные препараты требуют сложных технологических процессов производства многокомпонентных вакцин, сопряженных с неприемлемо высокой стоимостью конечного препарата.

Известно, что экспрессия антигенов в клетках носовой полости приводит к индукции системного и локального респираторного мукозального В- и Т-клеточного иммунного ответа. Были осуществлены многочисленные попытки использования вирусов гриппа в качестве векторов для доставки и экспрессии чужеродных геномных последовательностей в клетках респираторного тракта животных. Среди 8 геномных фрагментов вирусов гриппа А или В только NS геномный фрагмент способен стабильно удерживать геномные вставки более 800 нуклеотидов в составе рамки считывания неструктурного белка NS1, без нарушения структуры образующихся вирионов (Kittel C, Sereinig S, Ferko B, Stasakova J, Romanova J, Wolkerstorfer A, Katinger E, Egorov A. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *Virology*. 2004 Jun 20;324 (1):67-73. PubMed PMID: 15183054). Более того, из всех белков вируса гриппа, только NS1 белок, в норме содержащий 230-237 аминокислотных остатков, может быть подвергнут 50% укорочению с карбоксильного конца без существенного нарушения репродукционной активности вируса в культуре клеток, куриных эмбрионах или в респираторном тракте животных (Egorov A, Brandt S, Sereinig S, Romanova J, Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Alexandrova G, Katinger E, Muster T. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J Virol*. 1998 Аид;72 (8) :6437-41. PubMed PMID: 9658085; PubMed Central PMCID: PMC109801). Такое укорочение NS1 белка создает пространство для имплементации продолжительных вставок чужеродных геномных последовательностей без нарушения морфологии и основных функций вируса, что позволяет конструировать генетически стабильные векторы. В связи с этим были получены гриппозные векторы на основе вируса гриппа А, которые кодировали укороченную рамку считывания от 80 до 126 аминокислотных остатков NS1 белка, которая могла быть продолжена вставками последовательностей антигенов различных патогенов бактериальной и вирусной природы, например последовательности белков микобактерии туберкулеза, бруцеллы абортус или вируса иммунодефицита человека (Tabynov K, Sansyzybay A, Kydyrbayev Z, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Assanzhanova N, Sultankulova K, Sandybayev N, Khairullin B, Kuznetsova I, Ferko B, Egorov A. Influenza viral vectors expressing the Brucella OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against B. abortus infection. *Virol J*. 2014 Apr 10/11:69. doi: 10.1186/1743-422X-11-69. PubMed PMID: 24716528/ PubMed Central PMCID: PMC3997475/ Sereinig S, Stukova M, Zabolotnyh N, Ferko B, Kittel C, Romanova J, Vinogradova T, Katinger E, Kiselev O, Egorov A. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Aug/13(8):898-904. PubMed PMID: 16893990/ PubMed Central PMCID: PMC1539114/ Ferko B, Stasakova J, Sereinig S, Romanova J, Katinger D, Niebler B, Katinger E, Egorov A. Hyper-attenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-spelidie systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol*. 2001 Oct /75 (19): 8899-908. PubMed PMID: 11533153/ PubMed Central PMCID: PMC114458). При этом оптимальными по параметрам репродукции в куриных эмбрионах и иммуногенности у животных оказались конструкции, несущие NS1 белок, укороченный до 124 аминокислотных остатков (далее векторы NS1-124)(Ferko B, Stasakova J, Romanova J, Kittel C, Sereinig S, Katinger E, Egorov A. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol*. 2004 Dec/ 78(23) :13037-45. PubMed PMID: 15542655/ PubMed Central PMCID: PMC524997).

Конструкции с большим укорочением NS1 белка обладали сниженной способностью к росту в интерферон компетентных клетках (клетки MDCK, A549), включая 10-дневные куриные эмбрионы, и были пригодны для производства только в интерферон-дефицитных клетках Vero. С другой стороны, векторы с длиной NS1 в 124-126 аминокислотных остатков варьировали по уровню аттенуации и были недостаточно безопасны у животных. Например, уровень репродукции вирусных векторов, несущих в указанной позиции микобактериальный белок ESAT-6, в легких мышей мог достигать значений, близких к показателям патогенных вирусов гриппа (10^4 и более вирусных частиц на грамм ткани легкого). Более того, векторы NS1-124 при заражающей дозе $>5.0 \log$ /мышь могли вызвать существенную репродукцию вируса в легочной ткани инфицированных мышей и образование видимой легочной патологии (Egorov A, Brandt S, Sereinig S, Romanova J, Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Alexandrova G, Katinger H, Muster T. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J Virol*. 1998 Aug; 72 (8) : 6437-41. PubMed PMID: 9658085; PubMed Central PMCID: PMC109801; Stukova MA, Sereinig S, Zabolotnyh NV, Ferko B, Kittel C, Romanova J, Vinogradova TI, Katinger H, Kiselev OI, Egorov A. Vaccine potential of influenza vectors expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006 May-Jul;86(3-4) :236-46. PubMed PMID: 16677861). Таким образом, гриппозные векторы с укороченной рамкой считывания белка NS1 до 124 аминокислотных остатков не могут использоваться

для вакцинации людей, поскольку не соответствуют параметрам безопасности, разработанным для живых гриппозных вакцин, где непременным условием является температурочувствительность вируса (сниженная способность размножаться при температуре 39°C) и отсутствие активной репродукции вируса в нижнем респираторном тракте животных (Maassab HF, Bryant ML. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev Med Virol.* 1999 Oct-Dec;9(4) :237-44. Review. PubMed PMID: 10578119; Gendon IuZ. [Live cold-adapted influenza vaccine: state-of-the-art]. *Vopr Virusol.* 2011 Jan-Feb;56(1) :4-17. Review. Russian. PubMed PMID: 21427948; Aleksandrova GI, Gushchina MI, Klimov AI, Iotov W.

[Genetic basis for construction of the live influenza type A vaccine using temperature-sensitive mutants]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 1990 Mar;(3):3-8. Review. Russian. PubMed PMID: 2194119; Kendal AP. Cold-adapted live attenuated influenza vaccines developed in Russia: can they contribute to meeting the needs for influenza control in other countries? *Eur J Epidemiol.* 1997 Jul;13(5):591-609. Review. PubMed PMID: 9258574).

В отличие от лицензированных живых гриппозных вакцин (УЛЬТРАВАК® ВАКЦИНА ГРИППОЗНАЯ АЛЛАНТОИСНАЯ ЖИВАЯ (РФ) или Flumist® (USA)), известные гриппозные векторы NS1-124 и близкие к ним конструкции не обладали фенотипическим маркером температурочувствительности (ts фенотип) и имели уровень репродукции в легких мышей, близкий к уровню вируса дикого типа с полноразмерным NS1 белком.

Попытки использования вирусов гриппа с онколитическими целями предпринимались еще в 50-60-е года 20-го века и основывались на наблюдениях практических врачей об отдельных случаях ремиссии раковых заболеваний после переболевания гриппом (Lindenmann J, Klein PA. Viral oncolysis: increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *J Exp Med.* 1967 Jul 1;126 (1):93-108).

С момента разработки генно-инженерных методов для вируса гриппа в конце 90-х годов появилась возможность создания онколитических гриппозных векторов с модифицированным NS1 белком. Было показано, что укорочение NS1 белка может приводить к усилению онколитического эффекта при введении рекомбинантного вируса в опухоль за счет стимуляции системы врожденного иммунитета, антагонистом которого является NS1 белок (Sturlan S, Stremitzer S, Bauman S, Sachet M, Wolschek M, Ruthsatz T, Egorov A, Bergmann M. Endogenous expression of proteases in colon cancer cells facilitate influenza A viruses mediated oncolysis. *Cancer Biol Ther.* 2010 Sep 15;10(6):592-9; Ogbomo H, Michaelis M, Geiler J, van Rikxoort M, Muster T, Egorov A, Doerr HW, Cinatl J Jr. Tumor cells infected with oncolytic influenza A virus prime natural killer cells for lysis of resistant tumor cells. *Med Microbiol Immunol.* 2010 May;199(2):93-101. doi: 10.1007/s00430-009-0139-0. Epub 2009 Dec 15. PubMed PMID: 20012989; Efferson CL, Tsuda N, Kawano K, Nistal-Villan E, Sellappan S, Yu D, Murray JL, Garcia-Sastre A, Ioannides CG. Prostate tumor cells infected with a recombinant influenza virus expressing a truncated NS1 protein activate cytolytic CD8+ cells to recognize noninfected tumor cells. *J Virol.* 2006 Jan;80(1):383-94).

Более того, возможность генно-инженерных манипуляций с длиной NS1 белка вируса гриппа позволила создать векторы, эффективность которых усиливалась наличием экспрессии иммунопотенцирующего агента, например, интерлейкина-15 (van Rikxoort M, Michaelis M, Wolschek M, Muster T, Egorov A, Seipelt J, Doerr HW, Cinatl J Jr. Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame. *PLoS One.* 2012;7 (5): e36506).

К сожалению, в этих работах, использовались вирусы гриппа, способные к ограниченной репродукции в некоторых культурах клеток, не обладающие необходимой генетической стабильностью трансгена для широкомасштабного производства в куриных эмбрионах субстрате, оптимальном для наработки гриппозных вакцинных препаратов.

Таким образом, сохраняется потребность в новых эффективных вирусных векторах, в частности, аттенуированных гриппозных векторах, характеризующихся отсутствием активной репродукции вируса в организмах животных и обладающих фенотипом температурочувствительности, которые могут быть использованы для профилактики и/или лечения инфекционных заболеваний, а также для лечения онкологических заболеваний.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение относится к аттенуированному вирусу гриппа А, индуцирующему кросс-протективный ответ против вируса гриппа А и В, содержащему химерный NS фрагмент, включающий укороченную рамку считывания гена белка NS1 и гетерологичную последовательность гена белка Nер, происходящую от подтипа вируса гриппа А, отличающегося от подтипа указанного аттенуированного вируса гриппа А, где указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 80-130 аминокислотных остатков.

В частности, настоящее изобретение относится к аттенуированному вирусу гриппа А, в котором указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатка.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к аттенуированному вирусу гриппа А, в котором указанная укороченная рамка считывания белка NS1 происходит от вируса гриппа подтипа H1N1, а гетерологичная последовательность гена белка Nер происходит от вируса гриппа подтипа H2N2.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к аттенуированному вирусу гриппа А, индуцирующему кросс-протективный ответ против вируса гриппа А и В, содержащему химерный NS фрагмент, включающий укороченную рамку считывания белка NS1 и гетерологичную последовательность гена белка Nер, причем указанная укороченная рамка считывания гена белка NS1 происходит от вируса гриппа А подтипа H1N1, а гетерологичная последовательность гена белка Nер происходит от вируса гриппа А подтипа H2N2, и где указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатка.

Изобретение относится также к аттенуированному гриппозному вектору, экспрессирующему белок или его фрагмент из бактерий, вирусов или простейших, представляющему собой аттенуированный вирус гриппа А по изобретению, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой по меньшей мере одного трансгена, кодирующего белок или его фрагмент бактерий, вирусов или простейших.

Один из вариантов осуществления изобретения относится к аттенуированному гриппозному вектору, экспрессирующему белок или его фрагмент, которые выбраны из белков вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса герпеса, респираторно-синцитиального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, трипаносомы, лейшмании, хламидий, возбудителя бруцеллеза или их комбинаций.

Следующим вариантом осуществления изобретения является аттенуированный гриппозный вектор, экспрессирующий белок или его фрагмент патогенных бактерий, вирусов или простейших, где размер указанного белка или его фрагмента составляет от 10 до 400 аминокислот.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является аттенуированный гриппозный вектор, в котором вставка кодирует участок белка HA вируса гриппа, предпочтительно, где участок белка HA представляет собой участок субъединицы HA2, состоящий из 1-185 а.к. из вируса гриппа А, 1-186 а.к. из вируса гриппа В, 23-185 а.к. из вируса гриппа А или 65-222 а.к. из вируса гриппа А.

Следующим вариантом осуществления изобретения является аттенуированный гриппозный вектор, в котором вставка кодирует последовательность участка субъединицы HA2 вируса гриппа А или вируса гриппа В от 1 до 21 а.к. и последовательность участка белка NP вируса гриппа А от 243 до 251 а.к.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является аттенуированный гриппозный вектор, где вставка кодирует белок микобактерии туберкулеза ESAT-6, Ag85A, Ag85B, Mpt64, HspX, Mtb8.4 или 10.4 или их фрагменты, в частности, где геномная последовательность вируса дополнительно содержит последовательность, кодирующую саморасщепляющийся 2A-пептид, между последовательностями, кодируемыми NS1-124 и ESAT6.

Изобретение также относится к аттенуированному гриппозному вектору, экспрессирующему белок или его фрагмент вируса гриппа, представляющему собой аттенуированный вирус гриппа А, содержащий химерный NS фрагмент, включающий укороченную рамку считывания белка NS1 и гетерологичную последовательность гена белка Nер, причем указанная укороченная рамка считывания белка NS1 происходит от вируса гриппа подтипа H1N1, а гетерологичная последовательность гена белка Nер происходит от вируса гриппа подтипа H2N2, и где указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатка, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой, кодирующей 1-21 а.к. белка HA2 вируса гриппа В и 243-251 а.к. белка NP вируса гриппа А.

Другим объектом изобретения является аттенуированный гриппозный вектор, обладающий онколитической активностью, представляющий собой аттенуированный вирус гриппа А по изобретению, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой, кодирующей белок микобактерии туберкулеза ESAT-6 или его фрагмент.

Следующим вариантом осуществления изобретения является аттенуированный гриппозный вектор, имеющий онколитическую активность, где размер кодируемого белка или его фрагмента составляет от 10 до 400 аминокислот, предпочтительно, где укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой, кодирующей саморасщепляющийся 2A-пептид, и последовательности, кодирующей белок микобактерии туберкулеза ESAT-6.

Объектом изобретения также является аттенуированный гриппозный вектор, индуцирующий кросс-протективный ответ против вирусов гриппа А и В, содержащий:

нуклеотидную последовательность гена белка PB2, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка PB2;

нуклеотидную последовательность гена белка PB1, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка PB1;

нуклеотидную последовательность гена белка PA, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной последовательности гена белка PA;

нуклеотидную последовательность гена белка NP, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34

(H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной последовательности белка NP;

нуклеотидную последовательность гена белка M, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной последовательности гена белка M;

нуклеотидную последовательность гена белка HA, происходящую от вируса гриппа A/California/7/09-like H1N1pdm), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка HA;

нуклеотидную последовательности гена белка NA, происходящую от вируса гриппа A/California/7/09-like H1N1pdm), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка NA; и

нуклеотидную последовательность химерного гена белка NS, включающую укороченную рамку считывания гена белка NS1, происходящую от вируса A/PR/8/34 (H1N1), где указанная рамка считывания является укороченной и кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатков, и последовательность гена белка NP, происходящую от вируса гриппа A/Singapore/1/57-like (H2N2), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной последовательности химерного гена белка NS;

где указанная укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой, кодирующей пептид слияния субъединицы HA2 от вируса гриппа B, и вставкой, кодирующей консервативный В-клеточный эпитоп нуклеопротеина (NP) вируса гриппа А. В частном варианте осуществления нуклеотидная последовательность химерного гена белка NS представлена в SEQ ID NO: 21.

Еще одним объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция для лечения или профилактики инфекционного заболевания у субъекта, содержащая в эффективном количестве аттенуированный вирус гриппа А по изобретению или аттенуированный гриппозный вектор по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, где инфекционное заболевание вызывается патогеном, выбранным из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синтициального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы, лейшмании или возбудителя бруцеллеза.

Также объектом изобретения является фармацевтическая композиция для профилактики гриппа, содержащая в эффективном количестве аттенуированный гриппозный вектор по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В частности, фармацевтическая композиция по изобретению содержит 6,5-10,5 log ЭИД 50/мл аттенуированного гриппозного вектора и буферный раствор, содержащий 0-1,5 мас.% моновалентной соли, 0-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 0-5 мас.% углеводного компонента, 0-2 мас.% белкового компонента, 0-2 мас.% аминокислотного компонента и 0-10 мас.% гидроксиэтилированного крахмала.

Предпочтительным вариантом изобретения является фармацевтическая композиция, где буферный раствор содержит 0,5-1,5 мас.% моновалентной соли, 0,01-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 1-5 мас.% углеводного компонента, 0,1-2 мас.% белкового компонента, 0,01-2 мас.% аминокислотного компонента и 1-10 мас.% гидроксиэтилированного крахмала, предпочтительно, где моновалентная соль представляет собой хлорид натрия, углеводный компонент представляет собой сахарозу, трегалозу или лактозу, белковый компонент представляет собой человеческий альбумин, казитон, гидролизат лактальбумина или желатин, аминокислотный компонент представляет собой аргинин, глицин или глутамат натрия, и имидазолсодержащее соединение представляет собой L-карнозин или N, N'-бис[2-(1H-имидазол-5-ил)этил]пропандиамид.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения субъект представляет собой млекопитающее или птицу, в частности, субъект представляет собой человека.

Изобретение также относится к вакцине против инфекционного заболевания, содержащей в эффективном количестве аттенуированный вирус гриппа А по изобретению или аттенуированный гриппозный вектор по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, где инфекционное заболевание вызывается патогеном, выбранным из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синтициального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы, лейшмании или возбудителя бруцеллеза.

Еще одним объектом настоящего изобретения является вакцина против гриппа, содержащая в эффективном количестве аттенуированный гриппозный вектор по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В частности, вакцина по изобретению содержит 6,5-10,5 log ЭИД 50/мл аттенуированного гриппозного вектора и буферный раствор, содержащий 0-1,5 мас.% моновалентной соли, 0-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 0-5 мас.% углеводного компонента, 0-2 мас.% белкового компонента, 0-2 мас.% аминокислотного компонента и 0-10 мас.% гидроксиэтилированного крахмала.

Еще одним вариантом изобретения является вакцина, в которой буферный раствор содержит 0,5-1,5 мас.% моновалентной соли, 0,01-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 1-5 мас.% углеводного

компонента, 0,1-2 мас.% белкового компонента, 0,01-2 мас.% аминокислотного компонента и 1-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала. В предпочтительном варианте осуществления в указанном буферном растворе моновалентная соль представляет собой хлорид натрия, углеводный компонент представляет собой сахарозу, трегалозу или лактозу, белковый компонент представляет собой человеческий рекомбинантный альбумин, казитон, гидролизат лактальбумина или желатин, аминокислотный компонент представляет собой аргинин, глицин или глутамат натрия, и имидазолсодержащее соединение представляет собой L-карнозин или N, N'-бис[2-(1H-имидазол-5-ил)этил]пропандиамид.

Изобретение также относится к применению аттенуированного гриппозного вектора по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для профилактики и/или лечения инфекционных заболеваний у субъекта, где инфекционное заболевание вызывается патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синцитиального вируса и вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы, лейшмании или возбудителя бруцеллеза. В предпочтительном варианте осуществления изобретения субъект представляет собой млекопитающее или птицу, в частности, субъект представляет собой человека.

Еще одним объектом настоящего изобретения является применение аттенуированного гриппозного вектора или фармацевтической композиции по изобретению для профилактики гриппа у субъекта.

Изобретение также относится к способу лечения и/или профилактики инфекционного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение в эффективном количестве аттенуированного вируса гриппа А по изобретению, аттенуированного гриппозного вектора по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению указанному субъекту, предпочтительно к способу лечения заболевания, которое вызывается патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синцитиального вируса, вируса иммунодефицита человека, малярийного плазмодия, трихомонады, трипаносомы, лейшмании или возбудителя бруцеллеза. В предпочтительном варианте осуществления изобретения субъект представляет собой млекопитающее или птицу, в частности, субъект представляет собой человека.

Следующим объектом изобретения является фармацевтическая композиция для лечения онкологических заболеваний у субъекта, содержащая аттенуированный вирус гриппа А по изобретению или аттенуированный вектор по изобретению в эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель.

Одним из вариантов осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая 8,5-10,5 log ЭИД 50/мл аттенуированного вируса гриппа А по изобретению или аттенуированного гриппозного вектора по изобретению и буферный раствор, содержащий 0-1,5 мас.% моновалентной соли, 0-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 0-5 мас.% углеводного компонента, 0-2 мас.% белкового компонента, 0-2% аминокислотного компонента и 0-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала, причем в предпочтительном варианте осуществления изобретения буферный раствор содержит 0,5-1,5 мас.% раствора моновалентной соли, 0,01-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 1-5 мас.% углеводного компонента, 0,1-2 мас.% белкового компонента, 0,01-2% аминокислотного компонента и 1-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала.

Другим вариантом осуществления является фармацевтическая композиция, в которой в буферном растворе моновалентная соль представляет собой хлорид натрия, углеводный компонент представляет собой крахмал, белковый компонент представляет собой человеческий альбумин, аминокислотный компонент представляет собой аргинин, и имидазолсодержащее соединение представляет собой L-карнозин или N, N'-бис[2-(1H-имидазол-5-ил)этил]-пропандиамид.

Следующим объектом настоящего изобретения является применение аттенуированного вектора по изобретению, аттенуированного гриппозного вектора по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для лечения онкологических заболеваний у субъекта, в частности, заболеваний, выбранных из группы, состоящей из колоректального рака, кардиоэзофагеального рака, панкреатического рака, холангиоцеллюлярного рака, глиомы, глиобластомы и меланомы. В предпочтительном варианте осуществления изобретения субъект представляет собой человека.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения онкологических заболеваний у субъекта, включающему введение в эффективном количестве аттенуированного вируса гриппа А по изобретению, аттенуированного гриппозного вектора по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению, предпочтительно, к способу лечения онкологического заболевания, выбранного из группы, состоящей из колоректального рака, кардиоэзофагеального рака, панкреатического рака, холангиоцеллюлярного рака, глиомы, глиобластомы и меланомы.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанное введение представляет собой внутриопухолевое введение, введение в лауну, образовавшуюся после хирургического удаления опухоли, или внутривенное введение.

Техническим результатом настоящего изобретения является получение химерных вирусов гриппа по NS геномному фрагменту и соответствующих гриппозных векторов, обладающих высокой безопасностью.

стью для людей и животных, в частности, векторов, характеризующихся отсутствием активной репродукции вируса в организме животного и обладающих фенотипом температурочувствительности, и которые могут быть использованы для профилактики и/или лечения инфекционных заболеваний. Также техническим результатом настоящего изобретения является получение химерного по NS геномному фрагменту гриппозного вектора, обладающего свойствами универсальной гриппозной вакцины при мукозальном введении в отсутствие адьювантов. Кроме того, техническим результатом является высокий потенциал роста полученных вирусов гриппа и гриппозных векторов в 10-дневных куриных эмбрионах. Еще одним техническим результатом является получение гриппозных векторов, которые обладают свойствами универсальной гриппозной вакцины. Также техническим результатом является получение вирусов гриппа и гриппозных векторов, обладающих онколитической активностью. Еще одним техническим результатом является снижение стоимости производства вакцины против гриппа ввиду неиспользования адьювантов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан принцип конструирования гриппозного аттенуированного вектора. В А представлена схема NS геномного фрагмента вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). В Б представлена схема генетически модифицированного химерного NS геномного фрагмента, где рамка считывания белка NS1 укорочена и может продолжаться вставкой чужеродной последовательности. Последовательность, кодирующая белок Nер, заменена на гетерологичную от другого подтипа вируса гриппа А.

На фиг. 2 представлены нуклеотидные последовательности геномных NS фрагментов вируса дикого типа и примеры двух генетических конструкций химерной природы. В А представлен NS фрагмент вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). В Б представлен химерный NS фрагмент вируса гриппа А, где рамка считывания белка NS1 укорочена, а последовательность Nер, выделенная жирным шрифтом, заимствована от вируса А/Singapore/1/57 (H2N2).

В В представлен химерный NS фрагмент вируса гриппа А, где рамка считывания белка NS1 укорочена, а последовательность Nер, выделенная жирным шрифтом, заимствована от вируса А/Leningrad/134/47/57 (H2N2).

На фиг. 3 представлены аминокислотные последовательности белков, транслируемых в рамке считывания NS1 химерных гриппозных векторов, содержащих гетерологичный Nер от вируса А/Leningrad/134/47/57 (H2N2).

На фиг. 4 представлены данные, демонстрирующие патогенность и ts-фенотип вирусов с гетерологичным Nер геном. В А показаны данные репродукции вирусов при оптимальной 34°C и повышенной 39°C температуре в клетках Vero. В Б представлены данные репродукции вирусов в легких мышей на 2-е сутки после заражения.

На фиг. 5 приведены графики, демонстрирующие защитный эффект однократной иммунизации мышей векторами, экспрессирующими части субъединицы HA2 с рамки считывания белка NS1, при контрольном заражении гетерологичными патогенными штаммами вируса гриппа. В А показана летальность при контрольном заражении вирусом А/Mississippi/85/1(H3N2), в В - летальность при контрольном заражении вирусом В/ Lee/40.

На фиг. 6 представлены данные по онколитическому действию рекомбинантных вирусов гриппа в отношении меланомы мышей, индуцированной введением 1×10^6 клеток B16 в стопу задней лапы. Терапия проводилась путем внутриопухолевого введения вируса на 5 день после имплантации опухоли. В А показаны данные репродукции вирусов в легких мышей на 20 день после имплантации опухоли и 4х-кратной терапии онколитическими векторами, в Б - выживаемость мышей после проведенной 4х-кратной терапии онколитическими векторами.

На фиг. 7 показана структура гриппозного аттенуированного вектора. Обозначены 8 фрагментов генома вируса и их особенности.

Показано, что фрагменты генома PB2, PB1, PA, Np и M имеют происхождение от вируса А/PR/8/34 (H1N1); гены поверхностных гликопротеинов HA и NA имеют происхождение от вируса А/California/7/09-like (H1N1pdm); NS геномный фрагмент имеет химерную структуру, кодирующую два белка: 1) укороченный до 124 аминокислотных остатка белок NS1, продолженный вставкой последовательности N- терминальной области HA2 вируса гриппа В и вставкой консервативного В-клеточного эпитопа NP белка вируса гриппа А 2) белок Nер, имеющий последовательность от гетерологичного штамма вируса гриппа А, сероподтипа H2N2 А/Singapore/1/57 -like.

На фиг. 8 представлены нуклеотидные последовательности геномных фрагментов вакцинного вектора: PB2, PB1, PA, NP, M -имеющие происхождение от вируса А/PR/8/34 (H1N1); HA и NA, имеющие происхождение от вируса А/California/7/09-like (H1N1pdm); химерного NS (вставка в рамке считывания NS1 выделена жирным шрифтом).

На фиг. 9 представлены результаты, отражающие протективные свойства вакцинного вектора после интраназальной иммунизации мышей в отношении различных вариантов вируса гриппа А и вируса гриппа В. На графиках показан % летальности у вакцинированных мышей после контрольного заражения указанными сероподтипами вируса гриппа А или вирусом гриппа В по сравнению с контрольными

животными. Вакцина вводилась однократно - 1х или двукратно - 2х.

На фиг. 10 представлены данные, демонстрирующие протективные свойства вакцинного вектора после интраназальной иммунизации хорьков. На графике А представлена динамика среднего значения температурных колебаний после контрольного заражения вирусом A/St.Petersburg/224/2015 (H3N2) у вакцинированных и контрольных животных. На графике В представлены результаты высева контрольного вируса из носовых смывов хорьков на 2,4 и 6 день после заражения. Титры выражены в виде среднего значения концентрации вируса в носовых смывах, выраженных в виде значения 50% цитопатических доз/мл после титрования на клетках MDCK. Вакцина вводилась однократно - 1х или двукратно - 2х.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к полученным генно-инженерными методами аттенуированным вирусам гриппа А, которые могут применяться для лечения и/или профилактики инфекционных заболеваний, а также для лечения онкологических заболеваний.

В частности, настоящее изобретение относится к аттенуированному вирусу гриппа А, индуцирующему кросс-протективный ответ против вируса гриппа А и В, содержащему химерный NS фрагмент, включающий укороченную рамку считывания белка NS1 и гетерологичную последовательность гена белка Nер, происходящую от подтипа вируса гриппа А, отличающегося от подтипа указанного аттенуированного вируса гриппа А. Таким образом, подтип вируса А для последовательности, кодирующей укороченный белок NS1, отличается от подтипа вируса А, из которого получена последовательность, кодирующая белок Nер. В частности, один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к аттенуированному вирусу гриппа А, в котором указанная укороченная рамка считывания белка NS1 происходит от вируса гриппа подтипа H1N1, а гетерологичная последовательность гена белка Nер происходит от вируса гриппа подтипа от H2 до H18 человеческого или животного происхождения.

Указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 80-130 аминокислотных остатков, более предпочтительно, указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатка.

Настоящее изобретение основано в частности на том, что авторы неожиданно обнаружили, что проблема недостаточной аттенуации (отсутствие температурочувствительности и высокий уровень репродукции в легких мышей) гриппозных векторов, в частности вектора NS1-124, может быть решена с помощью модификации второго сплайсированного белкового продукта NS геномного фрагмента вируса гриппа - белка Nер (NS2). Оказалось, что замена геномной последовательности Nер вируса гриппа А, в частности, вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), на последовательности Nер, взятые от гетерологичных штаммов вируса гриппа, например, вируса A/Singapore/1/57 (H2N2) или A/Leningrad/134/47/57 (H2N2), приводит к появлению у штамма гриппа А, в частности A/PR/8/34 (H1N1), фенотипа температурочувствительности и аттенуации.

Используя этот феномен, были сконструированы химерные NS-фрагменты вируса гриппа, кодирующие укороченную рамку считывания NS1-124 от вируса A/PR/8/34 (H1N1) в комбинации с рамкой считывания белка Nер, взятой от вируса сероподтипа H2N2. Реассортантные вирусы гриппа на основе вируса A/PR/8/34, независимо от происхождения поверхностных антигенов H1N1, H5N1 или H1N1pdm, несущие химерный NS геномный фрагмент, оказались неспособными к активной репродукции при 39°C и в легких мышей (фенотип аттенуации), но при этом по-прежнему репродуцировались до высоких титров в 10-дневных куриных эмбрионах.

Настоящее изобретение относится также к аттенуированному гриппозному вектору, экспрессирующему антиген или его фрагмент, выбранный из группы, состоящей из антигенов или их фрагментов бактерий, вирусов или простейших, содержащий аттенуированный вирус гриппа А согласно настоящему изобретению, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой последовательности по меньшей мере одного трансгена, кодирующего антиген или его фрагмент бактерий, вирусов или простейших. В общем, в аттенуированный вирус согласно настоящему изобретению может быть вставлен трансген, кодирующий белок или его фрагмент из любых бактерий, вирусов или простейших, как патогенных, так и не патогенных в отношении животных и людей, в частности, белок может быть выбран из группы, состоящей из белков или их фрагментов вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, бруцеллы абортус, вируса герпеса, респираторно-синцитиального вируса, вируса иммунодефицита человека, гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, трипаномы, лейшмании, хламидий, возбудителя бруцеллеза или их комбинаций. В частности, последовательность вставки может кодировать участок белка НА вируса гриппа, белок микобактерии туберкулеза ESAT-6, Ag85A, Ag85B, Mpt64, HspX, Mtb8.4 или 10.4 или их фрагменты. При этом геномная последовательность аттенуированного вектора согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать последовательность, кодирующую саморасщепляющийся 2А-пептид, между последовательностями, кодирующими NS1-124 и ESAT6.

Размер антигена или его фрагмента, кодируемого последовательностью вставки, может иметь любой размер, который ограничен лишь способностью геномного фрагмента "принимать" нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген или его фрагмент. Предпочтительно, размер антигена составляет от 10 до 400 аминокислот. Например, вставка может кодировать участок белка НА, представляю-

щий собой участок субъединицы HA2, выбранный из группы, состоящей из 1-185 аминокислот из вируса гриппа А, 1-186 аминокислот из вируса гриппа В, 23-185 аминокислот из вируса гриппа А или 65-222 аминокислот из вируса гриппа А. Нумерация аминокислот дана в соответствии с положениями аминокислот в участке субъединицы HA2 вируса гриппа, из которого происходит трансген.

Еще одним частным случаем аттенуированного гриппозного вектора согласно настоящему изобретению является вектор, в котором вставка кодирует последовательность участка субъединицы HA2 вируса гриппа А или вируса гриппа В от 1 до 21 аминокислот и последовательность участка белка NP вируса гриппа А от 243 до 251 аминокислот. Неожиданно было обнаружено, что эти варианты векторов, несмотря на короткую продолжительность вставки, проявили наилучшую защитную эффективность в отношении вируса гриппа В и гетерологичных антигенных подтипов вируса гриппа А, после однократной иммунизации мышей, т.е. проявляли свойства универсальной гриппозной вакцины.

Авторы обнаружили, что вставки чужеродных антигенных последовательностей в рамку считывания белка NS1, например, после аминокислотной позиции 124 не оказывали существенного влияния на фенотип аттенуации химерного вируса, полученного согласно настоящему изобретению. Таким образом, были получены разнообразные гриппозные векторы, обладающие необходимыми производственными характеристиками и выраженными фенотипическими и генотипическими маркерами аттенуации в соответствии с требованиями, предъявляемыми к живым гриппозным вакцинам. Независимо от природы вставок, вирусы показали свою безвредность для лабораторных животных и схожесть проявления фенотипического маркера аттенуации - наличие ts фенотипа. Общность их генетических маркеров аттенуации определялась наличием укороченной рамки считывания белка NS1 и наличием гетерологичной последовательности гена NP, взятой от другого субтипа вируса гриппа А. В зависимости от вставки, полученные векторы проявляли свойства универсальной гриппозной вакцины, вакцины против туберкулеза т.д.

В частности, настоящее изобретение относится к полученному генно-инженерным методом вакцинному вектору на основе вируса гриппа А, который может применяться для профилактики гриппа, вызванного всеми известными штаммами, включая вирусы гриппа А и В. Более конкретно, настоящее изобретение относится к аттенуированному вирусу гриппа А, индуцирующему кросс-протективный ответ против вируса гриппа А и В, содержащему химерный NS фрагмент, включающий укороченную рамку считывания белка NS1 и гетерологичную последовательность гена белка NP, происходящую от подтипа вируса гриппа А H2N2. Таким образом, подтип вируса А для последовательности, кодирующей укороченный белок NS1, отличается от подтипа вируса А, из которого получена последовательность, кодирующая белок NP. В частности, в вакцинном векторе укороченная рамка считывания белка NS1 происходит от вируса гриппа подтипа H1N1, а гетерологичная последовательность гена белка NP происходит от вируса гриппа подтипа от H2N2.

В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение относится к аттенуированному гриппозному вектору, индуцирующему кросс-протективный ответ против вирусов гриппа А и В, содержащему:

нуклеотидную последовательность гена, кодирующую белок PB2, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или больше (например, 96, 97, 98 или 99%) идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка PB2;

нуклеотидную последовательность гена, кодирующую белок PB1, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или больше (например, 96, 97, 98 или 99%) идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка PB1;

нуклеотидную последовательность гена, кодирующую белок PA, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или больше (например, 96, 97, 98 или 99%) идентичность указанной последовательности белка PA;

нуклеотидную последовательность гена, кодирующую белок NP, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или больше (например, 96, 97, 98 или 99%) идентичность указанной последовательности белка NP;

нуклеотидную последовательность гена, кодирующую белок M, происходящую от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или больше (например, 96, 97, 98 или 99%) идентичность указанной последовательности гена белка M;

нуклеотидную последовательность гена, кодирующую белок HA, происходящую от вируса гриппа A/California/7/09-like H1N1pdm), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или больше (например, 96, 97, 98 или 99%) идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка HA;

нуклеотидную последовательность гена, кодирующую белок NA, происходящую от вируса гриппа A/California/7/09-like H1N1pdm), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или больше (например, 96, 97, 98 или 99%) идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка NA; и

нуклеотидную последовательность химерного гена белка NS, включающую рамку считывания бел-

ка NS1, происходящую от вируса A/PR/8/34 (H1N1), где указанная рамка считывания является укороченной и кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатков, и последовательность гена белка Nер, происходящую от вируса гриппа A/Singapore/1/57-like (H2N2), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% или больше (например, 96, 97, 98 или 99%) идентичность указанной последовательности химерного гена NS;

где указанная укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид слияния субъединицы HA2 от вируса гриппа В, и нуклеотидной последовательности, кодирующей консервативный В-клеточный эпитоп нуклеопротеина (NP) вируса гриппа А.

Указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатка, который продолжен двумя глицинами, вставкой N-терминальной области второй субъединицы гемагглютинаина HA2 вируса гриппа В (23 аминокислотных остатка) и вставкой последовательности консервативного В клеточного эпитопа вируса гриппа А (7 аминокислотных остатков).

Гены поверхностных гликопротеинов указанного вектора происходят от вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1pdm). Гены внутренних белков PB2, PB1, PA, NP и М происходят от вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Таким образом, гриппозный вектор по изобретению представляет собой сложную генетическую конструкцию, состоящую из геномных последовательностей различных штаммов вируса гриппа, а именно: 1) гены, кодирующие PB2, PB1, PA, NP и М, имеют происхождение от вируса A/PR/8/34 (H1N1) (PB2 (Genbank accession number: AB671295), PB1 (Genbank accession number: CY033583), PA (Genbank accession number: AF389117), NP (Genbank accession number: AF389119), М (Genbank accession number: AF389121)), 2) гены, кодирующие HA и NA, имеют происхождение от вируса A/California/7/09-like H1N1pdm)(HA (GenBank: KM408964.1) и (NA GenBank: KM408965.1), 3) ген NS имеет химерную природу, где рамка считывания белка NS1 от вируса A/PR/8/34 (H1N1) укорочена до 124 аминокислотных остатка и продолжена вставкой последовательности, кодирующей пептид слияния субъединицы HA2 от вируса гриппа В, и последовательности, кодирующей консервативный В-клеточный эпитоп нуклеопротеина (NP) вируса гриппа А, а рамка считывания белка Nер происходит от вируса гриппа подтипа H2N2.

Настоящее изобретение основано в частности на том, что авторы неожиданно обнаружили, что вектор с указанной структурой при интраназальной иммунизации мышей и хорьков без применения адьювантов вызывает защиту животных от контрольного заражения не только вирусами гриппа А (H1N1), но и вирусами гриппа А(H3N2) и гриппа В. Следовательно вакцинный вектор обладает свойствами универсальной гриппозной вакцины.

Термин "универсальная вакцина" в контексте настоящего изобретения означает вакцину, способную защищать от всех известных и неизвестных вариантов вируса гриппа. Обычные "сезонные вакцины" защищают только от вирусов, подобных тем вирусам, что входят в их состав.

Термин "мукозальная вакцина" означает, что вакцину можно вводить в полости респираторного и пищеварительного тракта и наносить на слизистые оболочки рта и носа, т.е. применять интраназально, перорально, подязычно.

Гриппозный вектор на основе вируса A/PR/8/34, несущий химерный NS геномный фрагмент, оказался неспособным к активной репродукции при 39°C и в легких мышей (фенотип аттенуации), но при этом по-прежнему репродуцировался до высоких титров в 10-дневных куриных эмбрионах.

Настоящее изобретение относится также к аттенуированному гриппозному вектору, обладающему онколитической активностью, содержащему аттенуированный вирус гриппа А согласно настоящему изобретению, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой последовательности по меньшей мере одного трансгена, кодирующего антиген или его фрагмент патогенных бактерий, вирусов или простейших. Указанный антиген может происходить из любых бактерий, вирусов или простейших, патогенных в отношении животных, в частности, антиген может быть выбран из группы, состоящей из антигенов вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса герпеса, респираторно-синтициального вируса, вируса иммунодефицита человека, гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, трипаносомы, лейшмании, хламидий или их комбинаций. В частности, вставленный трансген может кодировать белок микобактерии туберкулеза ESAT-6, Ag85A, Ag85B, Mpt64, HspX, Mtb8.4 или 10.4 или их фрагменты, дополнительно, укороченная рамка считывания гена белка NS1 может быть продолжена вставкой последовательности, кодирующей белок микобактерии туберкулеза ESAT-6.

Размер антигена или его фрагмента, кодируемого последовательностью вставки, может иметь любой размер, который ограничен лишь способностью геномного NS фрагмента "принимать" нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген или его фрагмент. Предпочтительно, размер антигена составляет от 10 до 400 аминокислот.

Авторы неожиданно обнаружили, что аттенуированные гриппозные векторы, несущие химерный NS геномный фрагмент за счет включения гетерологичного Nер гена, обладают повышенной онколитической активностью при условии экспрессии антигена патогена, в частности, бактериального антигена с рамки считывания белка NS1. Например, вирусный вектор, кодирующий белок Esat6 микобактерии ту-

беркулеза имел более высокую активность, по сравнению с известным рекомбинантным вирусом с укороченным NS1 белком, но без вставки. Не привязываясь к какой-либо теории, можно предположить, что наличие у млекопитающих напряженного противотуберкулезного иммунитета вносит вклад в иммунную атаку опухоли, зараженной вирусом, экспрессирующим туберкулезный белок.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат в эффективном количестве аттенуированный вирус гриппа А согласно настоящему изобретению или аттенуированный гриппозный вектор согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению предназначены для лечения и/или профилактики инфекционного заболевания у субъекта, в частности, инфекционного заболевания, вызываемого патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синцитиального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы или лейшмании.

Кроме того, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению предназначены для лечения онкологических заболеваний различной этиологии, в частности, онкологическое заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из колоректального рака, кардиоэзофагеального рака, панкреатического рака, холангиоцеллюлярного рака, глиомы, глиобластомы и меланомы.

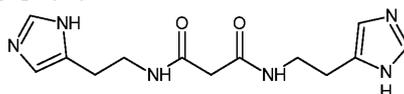
Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть составлена в виде вакцины, содержащей в эффективном количестве аттенуированный вирус гриппа А согласно настоящему изобретению или аттенуированный гриппозный вектор согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Термин "субъект" или "животное" в контексте настоящего описания означает позвоночных, которые подвержены инфекции, вызываемой патогенными бактериями, вирусами или простейшими, включая птиц (водоплавающие, куры и т.д.) и представителей различных видов млекопитающих, таких как псовые, кошачьи, волки, хорьки, грызуны (крысы, мыши и т.д.), лошади, коровы, овцы, козы, свиньи и приматы. В одном из вариантов осуществления изобретения субъект представляет собой человека.

Под "эффективным количеством" подразумевается такое количество вируса или вектора, которое при введении субъекту, в однократной дозе или в качестве части цикла лечения, является эффективным для лечения и/или профилактики с получением терапевтического результата. Это количество может варьироваться в зависимости от состояния здоровья и физического состояния пациента, возраста, таксономической группы индивида, подвергаемого лечению, препаративной формы, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других важных факторов. Полагают, что количество может варьировать в относительно широком диапазоне, который специалист в данной области может определить стандартными способами. Фармацевтическая композиция может содержать 6-10,5 log ЭИД 50/мл, более конкретно, 6,5-10,5 log ЭИД 50/мл, в частности, 6-9,5 log ЭИД 50/мл, более конкретно, 6,5-8,5 log ЭИД 50/мл химерного вируса гриппа А согласно изобретению или гриппозного вектора согласно изобретению.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" в контексте настоящего изобретения означает любой носитель, используемый в данной области, в частности, воду, физиологический раствор, буферный раствор и т.п. В одном из вариантов осуществления фармацевтически приемлемый носитель представляет собой буферный раствор, содержащий 0-1,5 мас.% моновалентной соли, 0-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 0-5 мас.% углеводного компонента, 0-2 мас.% белкового компонента, 0-2 мас.% аминокислотного компонента и 0-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала, предпочтительно, указанный буферный раствор содержит 0,5-1,5 мас.% моновалентной соли, 0,01-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 1-5 мас.% углеводного компонента, 0,1-2 мас.% белкового компонента, 0,01-2 мас.% аминокислотного компонента и 1-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала, в наиболее предпочтительном варианте, моновалентная соль представляет собой хлорид натрия, углеводный компонент представляет собой сахарозу, трегалозу или лактозу, белковый компонент представляет собой человеческий альбумин, казитон, гидролизат лактальбумина или желатин, аминокислотный компонент представляет собой аргинин, глицин или глутамат натрия.

Имидазолсодержащее соединение представляет собой L-карнозин или N, N'-бис[2-(1H-имидазол-5-ил)этил]пропандиамид, имеющий формулу:



Человеческий альбумин может представлять собой рекомбинантный альбумин или донорский альбумин.

Настоящее изобретение относится также к применению аттенуированного вируса гриппа А, аттенуированного гриппозного вектора или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для профилактики и/или лечения инфекционных заболеваний у субъекта, в частности, инфекционного заболевания, вызываемого патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса гриппа А, вируса

гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синцитиального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы или лейшмании.

Настоящее изобретение относится также к применению аттенуированного гриппозного вектора или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для профилактики гриппа.

Дополнительно, настоящее изобретение также относится к способам лечения, в которых для введения субъекту используют аттенуированный вирус гриппа А, аттенуированный гриппозный вектор или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению. Способы предназначены для лечения и/или профилактики инфекционных заболеваний, вызываемых патогенными вирусами, бактериями или простейшими, в частности, инфекционных заболеваний, вызываемых патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синцитиального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы или лейшмании. Кроме того, способы предназначены для лечения онкологических заболеваний у субъекта, в частности, онкологическое заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из колоректального рака, кардиоэзофагального рака, панкреатического рака, холангиоцеллюлярного рака, глиомы, глиобластомы и меланомы.

Введение субъекту может осуществляться любыми стандартными методами, в частности, внутримышечно, внутривенно, перорально, сублингвально, ингаляционно или интраназально. Гриппозный вектор или фармацевтическую композицию можно вводить субъекту один, два или более раз, предпочтительным является однократное введение.

Дополнительно, в случае лечения онкологических заболеваний введение может представлять собой внутриопухолевое введение, введение в лауну, образовавшуюся после хирургического удаления опухоли, или внутривенное введение.

Далее изобретение проиллюстрировано примерами осуществления, не ограничивающими объем изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение гриппозных векторов с модифицированным NS геномным фрагментом.

Сборка рекомбинантных вирусов осуществлялась в несколько этапов. На первом этапе синтетическим путем были получены комплементарные ДНК (кДНК) копии всех восьми геномных фрагментов вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), используя данные генетического банка (pHW-PR8-NA (Genbank accession number: EF467821.1), pHW-PR8-NA (Genbank accession number: AF389120.1), pHW-PR8-PB2 (Genbank accession number: AB671295), pHW-PR8-PB1 (Genbank accession number: CY033583), pHW-PR8-PA (Genbank accession number: AF389117), pHW-PR8-NP (Genbank accession number: AF389119), pHW-PR8-M (Genbank accession number: AF389121), pHW-PR8-NS (Genbank accession number: J02150.1)). На втором этапе синтезированные последовательности были клонированы в двунаправленный вектор на основе плазмиды pHW2000 (Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(11):6108-13.). Указанный плазмидный вектор благодаря наличию Pol I и Pol II промоторов обеспечивает одновременную внутриклеточную транскрипцию вирусных и соответствующих матричных РНК при трансфекции клеток млекопитающих.

Было получено 7 плазмидных клонов, кодирующих PB1, PB2, PA, NA, NA, NP, M без модификаций, и набор вариантов NS геномного фрагмента с модификациями, принцип которых представлен на фиг. 1.

На фиг. 1А представлена схема NS геномного фрагмента вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Полноразмерный геномный фрагмент вирусной РНК (вРНК) негативной полярности имеет длину 230 нуклеотидов (нт). Транскрипция NS фрагмента, полимеразным комплексом вируса гриппа, приводит к образованию 2 типов матричных РНК: 1. Прямого транскрипта - мРНК белка NS1, кодирующую белок NS1 длиной в 230 аминокислотных остатков (ак) и сплайсированную мРНК белка NSp, кодирующую белок NSp длиной в 121 ак. На фиг. 1Б представлена схема генетически модифицированного химерного NS геномного фрагмента, где рамка считывания белка NS1 до 398 нт и может продолжаться вставкой чужеродной последовательности, заканчивающаяся тройным стоп кодоном. Последовательность, кодирующая белок NSp заменена на гетерологичную от другого подтипа вируса гриппа А. В результате модификации, химерный геномный NS фрагмент имеет неопределенную длину, в зависимости от длины вставки чужеродной последовательности в рамку считывания NS1.

В качестве основы для создания химерной конструкции геномного сегмента NS была использована нуклеотидная последовательность вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), включая кодирующую, а также 5' и 3' некодирующие концевые участки (номер последовательности в базе GenBank J02150). В зависимости от цели, были сконструированы различные варианты химерных конструкций NS геномного фрагмента, где общими признаками являлись: 1) замена кодирующей белок NSp последовательности вируса А/PR/8/34 (H1N1) на последовательность, имеющую происхождение от вирусов гриппа подтипа H2N2 (штаммы: А/Singapore/1/57 и А/Leningrad/134/47/57) (Фиг. 2Б и 2В); 2) делеция последовательности из 30 нуклеотидов (позиции 499-428 нт) в участке, кодирующем NS1, до сайта сплайсирования NSp; 3) ог-

раничение рамки считывания белка NS1 до 124 аминокислотных остатков путем внедрения кассеты из трех последовательных стоп-кодонов (TGATAATAA) после нуклеотидной позиции 399 (Фиг. 2А и Фиг. 2Б); 4) наличие или отсутствие последовательности чужеродной генетической последовательности, введенной в рамку считывания NS1 после нуклеотидной позиции 398, непосредственно перед кассетой стоп-кодонов.

На фиг. 2А приведена последовательность SEQ ID NO:1 NS фрагмента вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), в которой выделена и подчеркнута последовательность из 30 нт, подлежащая делеции при конструировании Б и В. Жирным шрифтом выделена последовательность Nер гена, подлежащая замене на гетерологичный аналог от другого подтипа вируса гриппа А. На фиг. 2Б приведена последовательность SEQ ID NO:2 рекомбинантного NS фрагмента вируса гриппа А, где рамка считывания белка NS1 укорочена до 398 нт, с помощью вставки, состоящей из трех последовательных стоп-кодонов(подчеркнуто), и последовательность Nер, выделенная жирным шрифтом, заимствована от вируса A/Singapore/1/57 (H2N2). На фиг. 2В приведена последовательность SEQ ID NO: 3 рекомбинантного NS фрагмента вируса гриппа А, где рамка считывания белка NS1 укорочена до 398 нт, с помощью вставки, состоящей из трех последовательных стоп-кодонов(подчеркнуто) , и последовательность Nер, выделенная жирным шрифтом, заимствована от вируса A/Leningrad/134/47/57 (H2N2).

```
AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTA
GATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATTCC
TTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACAT
CGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAG
GCACTTAAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACATGACTCTTGAGG
AAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATAACCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCTCTTTGTATCAG
AATGGACCAGGCGATCATGGATAAAAACATCATACTGAAAGCGAACTTCAGTGTGATTTTTGAC
CGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTACCCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTT
CACCATTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCCCTCAT
CGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTGCTTGG
AGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAA
CAATTAGGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAAACTGAAGG
TAACAGAGAAATAGTTTTGAGCAAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGTGGAA
GCAAGAGATAAGAACTTTCTCATTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTTTTCTACT
(SEQ ID NO:1)
```

```
AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTA
GATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATTCC
TTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACAT
CGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAG
GCACTTAAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACATGACTCTTGAGG
AAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATAACCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCTCTTTGTATCAG
AATGGACCAGGCGATCATGTGATAATAAAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTG
CTAAGGGCTTTACCCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTTGCCTTCTCTTCCAG
GACATACTAATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGA
TAACACAGTTTCGAGTCTCTAAAACCTCTACAGAGATTGCTTGGTGAACAGTAATGAGAATGGG
AGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACGGAAATGGCGAGAACAATTAGGTCAAAAGTTCGAA
GAAATAAGATGGCTGATTGAAGAAGTGAGACACAAATTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAGC
```

AAATAACATTTATGCAAGCCTTACAGCTACTATTTGAAGTGGAAACAAGAGATAAGAACTTTCTC
GTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:2)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTA
GATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGTAGGTGATGCCCCATTCC
TTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACAT
CGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAG
GCACTTAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTTCGCTTACCTAACCGACATGACTCTTGAGG
AAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATAACCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCTCTTTGTATCAG
AATGGACCAGGCATCATGTGATAATAAAGTGTGATTTTTGACCGCTGGAGACTCTAATATTG
CTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTCACCATTGCCTTCTCTCCAG
GACATACTAATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGA
TAACACAGTTTCGAGTCTCTAAAACCTTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGG
AGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACGGAAAATGGCGAGAACAATTAGGTCAAAAAGTTCGAA
GAAATAAGATGGCTGATTGAAGAAGTGAGACACAAATGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAGC
AAATAACATTTATACAAGCCTTACAGCTACTATTTGAAGTGGAAACAAGAGATAAGAACTTTCTC
GTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:3)

Таким образом, сконструированные химерные NS геномные фрагменты, при их транскрипции полимеразным комплексом вируса гриппа, формировали два типа матричной РНК: 1) NS1 мРНК, транслируемая в форме укороченного до 124 аминокислотных остатков NS1 белка, ограниченного стоп-кодонами или продолжающегося вставкой последовательностей трансенов различного происхождения, трансляция которых ограничивается касетой из стоп-кодонов; 2) NS1 мРНК гетерологичного происхождения от вируса гриппа А другого антигенного подтипа. Варианты трансляции рекомбинантного NS1 белка со вставками представлены на фиг. 3 и в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности белков, транслируемых в рамке считывания NS1, рекомбинантных вирусов, имеющих гетерологичный Nsp от вируса A/Leningrad/134/47/57 (H2N2)

Обозначение	Аминокислотная последовательность	Описание
NS124/Nep-Len	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM (SEQ ID NO:4)	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка без вставки
		чужеродной последовательности
NS124-HA2 (A) - 185	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-GG- GLFGAIAGFIEGWTGMIDGWYGYHH QNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQ FTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAEL LVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIG NGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGKLESMGIYQ (SEQ ID NO:5)	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемой последовательностью (выделено жирным шрифтом) HA2 вируса гриппа А, с 1 по 185 ак.
NS124-HA2 (A) - 65-222	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-GG- AVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDI WTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQK NNAKEI GNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYS EESKLNREKVDGKLESMGIYQILAIYSTVASSLVL LVSLGAISEFWMCNSGSLQCRICI (SEQ ID NO:6)	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемой последовательностью (выделено жирным шрифтом) HA2 субъединицы вируса гриппа А, с 65 по 222 ак
NS124-HA2 (A) - 23-185	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-GG- GYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGI TNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKV DDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYE KVKSQKNNAKEI GNGCFEFYHKCDNECMESVRNGT YDYPKYSEESKLNREKVDGKLESMGIYQ (SEQ ID NO:7)	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемой последовательностью (выделено жирным шрифтом) HA2 вируса гриппа А, с 23 по 185 ак
NS124-HA2 (B) - 186	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-GG- GFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYT SHGANGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVK NLQRLSGAMNGLHDEILELDEKVDLDRADTISSQIE LAVLLSNEGI INSEDEHLLALERLKKMLGPSAVEI	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемой последовательностью (выделено жирным шрифтом) HA2

	GNGCFETKHKCNQTCLDRITAGTFNAGDFS LPTFD (SEQ ID NO:8)	субъединицы вируса гриппа В, с 1 по 186 ак
NS124-Fus (A) -NP	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-GG- GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGW-GG-<u>RESRNP</u>GNA (SEQ ID NO:9)	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемой последовательностью (выделено жирным шрифтом) HA2 субъединицы вируса гриппа А, с 1 по 21 ак, и последовательностью консервативного В-клеточного эпитопа NP белка вируса гриппа А. GG- глициновые вставки, разделяющие компоненты конструкции.
NS124-Fus (B) -NP	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-GG- GFFGAIAGFLEGGWEGMIAGW -GG-<u>RESRNP</u>GNA (SEQ ID NO:10)	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемой последовательностью (выделено жирным шрифтом) HA2 субъединицы вируса гриппа В, с 1 по 21 ак и последовательностью консервативного В-клеточного эпитопа NP белка вируса гриппа А. GG- глициновые вставки, разделяющие компоненты конструкции.
NS124-Esat6	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL	Вирус с укороченной

	RRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-GG- MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDEGKQSL TKLAAAWGGSGSEAYQGVQQKWDATATELNNALQNL ARTISEAGQAMASTE GNV TGMFA (SEQ ID NO: 11)	до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемой последовательностью (выделено жирным шрифтом) белка Esat6 микобактерии туберкулеза
NS124-2A-Esat6	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-GG- NFDLLKLAGDVESNPGP- MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDEGKQSL TKLAAAWGGSGSEAYQGVQQKWDATATELNNALQNL ARTISEAGQAMASTE GNV TGMFA (SEQ ID NO: 12)	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемой последовательностью (выделено жирным шрифтом) само-расщепляющегося пептида 2A (происхождения из пикорнавирусов) и последовательностью белка Esat6 микобактерии туберкулеза
NS124-HSV-2ASY	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRL RRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE SDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSREWSMLIPK QKVAGPLCIRMDQAIM-AAA- NLLTTPKFT -AAA- RMLGDVMAV-AAA-NLLTTPKFT-AAA- RMLGDVMAV (SEQ ID NO: 13)	Вирус с укороченной до 124 ак рамкой считывания NS1 белка, продолжающейся транслируемыми последовательностями (выделено жирным шрифтом) Т-клеточных эпителиев вируса простого герпеса (HSV) 1 и 2 типов. Вставки эпителиев сделаны с повтором

Сборка рекомбинантных вирусов осуществлялась путем трансфекции клеток VERO семью плазмидами, кодирующими геномные немодифицированные фрагменты вируса гриппа, и одним из вариантов NS геномного фрагмента химерной природы, используя метод электропорации плазмидной ДНК (Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza)) в соответствии с инструкцией к применению. После трансфекции клетки инкубировались в среде Optipro (Invitrogen) в течение 96 часов при 34°C с добавлением трипсина 1 мкг/мл для обеспечения пост-трансляционного расщепления предшественника гемагглютинина на субъединицы HA1 и HA2. Вирусный урожай с клеток Vero использовался для заражения 10-дневных куриных эмбрионов (SPF). Эмбрионы инкубировались в течение 48 часов при 34°C, после чего аллантоисные жидкости, имеющие положительный титр в реакции гемагглютинации, использовались для проведения второго пассажа на куриных эмбрионах. Аллантоисные жидкости второго пассажа аликвотировались и хранились при -80°C. Материал второго пассажа использовался для контроля генетической структуры химерного NS фрагмента и присутствия трансгена путем получения РТ-ПЦР продукта и его секвенирования. Кроме того, материал второго пассажа использовался для определения фенотипических маркеров рекомбинантных вирусных штаммов и векторов и определения генетической стабильности трансгена в течение 5 пассажей на куриных эмбрионах.

Пример 2. Определение фенотипа температурочувствительности и аттенуации рекомбинантных вирусов, несущих гетерологичный Nер.

Температурочувствительность вирусов определяли путем сравнительного титрования инфекционной активности вирусов на клетках Vero при оптимальной 34°C и повышенной 39°C температурах, в 96-

луночных планшетах. Титры вирусов подсчитывали методом Рида и Мюнча после инкубации в течение 96 ч с учетом развития цитопатического эффекта в лунках планшета (Reed, L.J.; Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints". The American Journal of Hygiene 27: 493-497.). На фиг. 4А представлены титры вирусов, при указанных температурах, выраженные в тканевых 50% цитопатических дозах (Log ТЦД50/мл). Неожиданно оказалось, что у обоих вирусов, несущих гетерологичный Nер, от штаммов A/Singapore/1/57 (H2N2) или A/Leningrad/134/47/57 (H2N2), наблюдается существенное > 4 log снижение инфекционных титров при температуре 39°C, по сравнению оптимальной температурой 34°C. Контрольные штаммы - вирус дикого типа A/PR/8/34 (H1N1) и рекомбинантный вирус NS124/Nep PR8 с укороченным NS1 белком и гомологичным Nер не имели признака температурочувствительности, эффективно размножаясь при высокой температуре. Таким образом, замена Nер приводила к появлению у вирусов ts фенотипа.

Более того, при интраназальном заражении мышей под легкой анестезией указанными вирусами, взятыми в дозе 6 log/мышь, у вирусов - носителей гетерологичного гена Nер, наблюдалась сниженная способность репродукции в тканях легкого ($p < 0,002$), по сравнению с вирусом дикого типа или вирусом NS124/Nep PR8, имеющим гомологичный Nер (Фиг. 4Б). Титры вирусов в легких оценивались через 2-е суток после заражения животных путем титрования в клетках Vero осветленных гомогенатов легкого. Легочные титры выражали в log ТЦД50/г ткани легкого. Таким образом, интродукция химерного NS геномного фрагмента в штамм вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) приводила к аттенуации вируса, выражающейся в снижении его способности к размножению в нижнем респираторном тракте животных.

Пример 3. Определение ts фенотипа и аттенуации векторов, несущих химерный NS геномный фрагмент и различные вставки в рамке считывания белка NS1.

Для определения влияния вставок чужеродных последовательностей в рамку считывания белка NS1 на ts фенотип вирусов, химерных по гену Nер, был получен широкий набор векторов, кодирующих вставки различной природы. Были изучены вирусы со вставками, отображенными на фиг. 3. ts-Фенотип изучался путем титрования инфекционной активности вирусов при температурах 34 и 39°C в 10-дневных куриных эмбрионах, путем определения гемагглютинирующей активности аллантоисных жидкостей, собранных через 48 часов инкубации. Титр подсчитывался методом Рида и Мюнча и выражался в log Эмбриональных 50% инфекционных доз (log ЭИД50/мл). Как видно из данных, представленных в табл. 2, все векторы, в отличие от вируса дикого типа A/PR/8/34 (H1N1), отличались существенно сниженной способностью к репродукции при высокой температуре и соответствовали по фенотипическому маркеру ts прототипным химерным штаммам, не имеющим вставки, но несущим гетерологичный Nер.

Таблица 2

Вирус/вектор	Композиция NS фрагмента*		Урожайность в КЭ (Log ЭИД50/мл) при T:		ts фенотип ***
	Длина NS1 (ак)	Происхождение Nер от штамма**	34°C	39°C	
A/PR/8/34	230	A/PR/8/34 (H1N1)	9,8	9,5	нет
NS124/Nep-Len	124	Len	8,8	2,8	да
NS124/Nep-Sing	124	Sing	8,8	3,3	да
NS124-HA2 (A) - 185	124	Len	8,3	2,8	да
NS124-HA2 (A) - 65-222	124	Len	8,5	3,0	да
NS124-HA2 (A) - 23-185	124	Len	8,3	3,5	да
NS124-HA2 (B) - 186	124	Len	8,8	3,5	да
NS124-Fus (A) - NP	124	Len	8,0	2,8	да
NS124-Fus (B) - NP	124	Len	8,5	2,5	да
NS124-Esat6	124	Len	9,5	3,8	да
NS124-2A-Esat6	124	Len	9,8	4,0	да
NS124-HSV-2ASY	124	Len	8,0	2,5	да

Обозначения: *Длина (в аминокислотных остатках) натуральной последовательности белка NS1 до вставки; **Происхождение гена Nер от штамма: A/PR/8/34 (H1N1) или A/Singapore/1/57(H2N2) или A/Leningrad/134/47/57 (H2N2); ***ts-(фенотип считается положительным, если разница в росте вируса при 34 и 39°C превышает 2 log.

Для определения влияния вставок на аттенуацию (att) векторных штаммов для животных мышей заражали интраназально, под легкой анестезией, вирусосодержащими аллантоисными жидкостями куриных эмбрионов, зараженных вирусами или векторами представленными на фиг. 3. Аллантоисные жидкости были предварительно охарактеризованы по содержанию в них инфекционных титров вирусов. Титры выражали в \log ЭИД50/мл. Мышам вводили по 0,05 мл каждой вирусной пробы. Каждая группа мышей содержала 8 животных. В течение 12 дней оценивалась летальная активность вирусов. Оказалось, что в отличие от вируса дикого типа A/PR/8/34 (H1N1), который вызывал 50% летальный эффект при использовании материала с титром $3,2 \log$ ЭИД50/мл, ни один из векторов не демонстрировал 50% летальной активности у мышей при использовании доз заражения $>7,5 \log$. Таким образом, все векторы, с химерной природой NS геномного фрагмента, независимо от вставки, были высоко аттенуированными для мышей (табл. 3).

Таблица 3. Значение летальной дозы для мышей вирусов

Вирус/вектор	50% летальная доза вируса (ЛД50/мл)	Att-фенотип*
A/PR/8/34	3,2	Нет
NS124/Nep-Len	> 7,5	Да
NS124/Nep-Sing	> 7,5	Да
NS124-HA2 (A)-185	> 7,5	Да
NS124-HA2 (A)-65-222	> 7,5	Да
NS124-HA2 (A)-23-185	> 7,5	Да
NS124-HA2 (B)-186	> 8,0	Да
NS124-Fus (A)-NP	> 8,0	Да
NS124-Fus (B)-NP	> 8,0	Да
NS124-Esat6	> 7,5	Да
NS124-2A-Esat6	> 7,5	Да
NS124-HSV-2ASY	> 7,5	Да

*фенотип аттенуации определяется отсутствием летальной активности при заражающей дозе превышающей значение $7,0 \log$ ЭИД50/мышь.

Пример 4. Протективный ответ в отношении гетерологичных штаммов вируса гриппа А и В при контрольном заражении мышей.

С целью определения протективной активности в отношении гетерологичных антигенных вариантов вируса гриппа для иммунизации мышей были использованы вирусы с поверхностными антигенами от вируса A/PR/8/34 (H1N1), несущие химерный NS геномный фрагмент с последовательностью Nep от вируса A/Leningrad/134/47/57 (H2N2). Были использованы следующие рекомбинантные вирусы, кодирующие, в рамках считывания NS1, участки субъединицы гемагглютинина HA2: 1) вектор NS124-HA2(A)-185 экспрессирующий полный эктодомен HA2 вируса гриппа А, длиной в 185 аминокислотных остатков (Фиг. 3, SEQ ID NO:5), 2) вектор NS124-HA2(A)-185 экспрессирующий полный эктодомен HA2 вируса гриппа В, длиной в 186 аминокислотных остатков (Фиг. 3, SEQ ID NO:8) 3) вектор NS124-Fus(A)-NP, экспрессирующий последовательность, состоящую из N - терминальных 21 аминокислотных остатков HA2 (фьюжн-домен) в комбинации с последовательностью консервативного В-клеточного эпитопа NP белка вируса гриппа А (Фиг. 3, SEQ ID NO:9), и 4) вирус NS124/Nep-Len, имеющий кассету из стопкодонов в позиции 399 нуклеотидой последовательности NS геномного фрагмента, ограничивающую трансляцию NS1 белка 124 аминокислотными остатками (Фиг. 3, SEQ ID NO:4). Для формирования контрольных групп использовался вирус дикого типа A/PR/8/34 (H1N1), не имеющий генетических модификаций, или мыши получали фосфатный буферный раствор, не содержащий активный ингредиент. Мыши были иммунизированы интраназально, под легкой анестезией, дозой вирусов $6,5 \log$ /мышь, однократно. Через 28 дней животные были подвергнуты контрольному заражению патогенными для мышей гетерологичными штаммами вируса гриппа: A/Mississippi/85/1(H3N2) или B/Lee/40, взятыми в дозе соответствующей 3-5 ЛД50, соответственно.

Как видно из фиг. 5А, контрольное заражение не иммунных мышей вирусом (H3N2) приводило к их гибели в 80% случаев. В тоже время, мыши, иммунизированные вирусными препаратами, были полностью защищены от гибели, вызываемой инфекцией гетерологичным штаммом вируса гриппа А (H3N2). Иммунизация вирусом дикого типа также приводила к статистически достоверному уровню защиты от инфекции гетерологичным штаммом. При использовании для контрольного заражения вируса гриппа B/Lee/40, иммунизация мышей вирусом дикого типа A/PR/8/34 (H1N1) не приводила к защите животных от гибели наряду с мышами, получившими при иммунизации фосфатный буферный раствор (Фиг. 5Б). Неожиданно, рекомбинантные вирусы, несущие вставки в рамках считывания белка NS1, ока-

зались протективными по отношению к вирусу гриппа В. При этом наилучшим показателем протективности отличался вектор NS124-Fus(A)-NP. Таким образом, векторные штаммы, несущие химерный NS геномный фрагмент, при однократной интраназальной иммунизации мышей, проявили признаки универсальной гриппозной вакцины, эффективной в отношении как гетерологичных антигенных подтипов вируса гриппа А, так и в отношении вируса гриппа В.

Пример 5. Получение гриппозного вектора с модифицированным NS геномным фрагментом кодирующим последовательность HA2 вируса гриппа В и поверхностные гликопротеины вируса H1N1pdm.

Сборка рекомбинантного вируса осуществлялась в несколько этапов. На первом этапе синтетическим путем были получены комплиментарные ДНК (кДНК) копии 5 геномных фрагментов (PB2, PB1, PA, NP, M) вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) (PB2 (Genbank accession number: AB671295), PB1 (Genbank accession number: CY033583), PA (Genbank accession number: AF389117), NP (Genbank accession number: AF389119), M (Genbank accession number: AF389121)) и 2 геномных фрагмента (HA, NA) вируса A/California/7/09-like (HA (GenBank: KM408964.1) и (NA GenBank: KM408965.1)), а также синтезирован химерный геномный фрагмент NS, составленный из последовательностей, относящихся к вирусу H1N1 (ген NS1), вирусу H2N2 (ген Np) и последовательностей двух пептидов от HA2 вируса гриппа В и NP вируса гриппа А.

На втором этапе синтезированные последовательности были клонированы в двунаправленный вектор на основе плазмиды pHW2000 (Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97 (11): 6108-13.). Указанный плазмидный вектор благодаря наличию Pol I и Pol II промоторов обеспечивает одновременную внутриклеточную транскрипцию вирусных и соответствующих матричных РНК при трансфекции клеток млекопитающих. На фиг. 7 представлена генетическая схема гриппозного вектора. На фиг. 8 представлены нуклеотидные последовательности всех 8 геномных фрагментов гриппозного вектора.

Нуклеотидная последовательность геномного PB2

```

1  agcgaaagca  gggtcaattat  attcaatatg  gaaagaataa  aagaactacg
   aatcctaagc
61  tcgcagtctc  gcaccgcgca  gatactcaca  aaaaccaccg  tggaccatat
   gcccataatc
121 aagaagtaca  catcaggaag  acaggagaag  aaccagcac  ttaggatgaa
   atggatgatg
181 gcaatgaaat  atccaattac  agcagacaag  aggataacgg  aatgattcc
   tgagagaaat
241 gagcaaggac  aaactttatg  gagtaaatg  aatgatgccg  gatcagaccg
   agtgatggta
301 tcacctctgg  ctgtgacatg  gtggaatagg  aatggaccaa  taacaatac
   agttcattat
361 ccaaaaatct  acaaaactta  ttttgaaga  gtcgaaaggc  taaagcatgg
  aacctttggc
421 cctgtccatt  ttagaacca  agtcaaaata  cgtcggagag  ttgacataaa
   tcctggtcat
481 gcagatctca  gtgccaagga  ggcacaggat  gtaatcatgg  aagttgtttt
   ccctaacgaa
541 gtgggagcca  ggatactaac  atcggaatcg  caactaacga  taaccaaaaga
   gaagaaagaa
601 gaactccagg  attgcaaaat  ttctcctttg  atggttgcac  acatgttggg
   gagagaactg
661 gtccgcaaaa  cgagattcct  cccagtggtc  ggtggaacaa  gcagtgtgta
   cattgaagtg
721 ttgcatttga  ctcaaggaac  atgctgggaa  cagatgtata  ctccaggagg
   ggaagtggag
781 aatgatgatg  ttgatcaaag  cttgattatt  gctgctagga  acatagtgag
   aagagctgca
841 gtatcagcag  atccactagc  atctttattg  gagatgtgcc  acagcacaca
   gattggtgga

```

037571

901 attaggatgg tagacatcct taggcagaac ccaacagaag agcaagccgt
ggatatatgc
961 aaggctgcaa tgggactgag aattagctca tccttcagtt ttggtggatt
cacatttaag
1021 agaacaagcg gatcatcagt caagagagag gaagagggtgc ttacgggcaa
tcttcaaaca
1081 ttgaagataa gagtgcatga gggatatgaa gagttcaciaa tggttgggag
aagagcaaca
1141 gccatactca gaaaagcaac caggagattg attcagctga tagtgagtgg
gagagacgaa
1201 cagtcgattg ccgaagcaat aattgtggcc atggtatfff cacaagagga
ttgtatgata
1261 aaagcagtca gaggtgatct gaatttcgtc aatagggcga atcaacgatt
gaatcctatg
1321 catcaacttt taagacattt tcagaaggat gcgaaagtgc tttttcaaaa
ttggggagtt
1381 gaacctatcg acaatgtgat gggaatgatt gggatattgc ccgacatgac
tccaagcatc
1441 gagatgtcaa tgagaggagt gagaatcagc aaaatgggtg tagatgagta
ctccagcacg
1501 gagagggtag tggtagcat tgaccgtfff ttgagaatcc gggaccaacg
aggaaatgta
1561 ctactgtctc ccgaggaggt cagtgaaca cagggaacag agaaactgac
aataacttac
1621 tcatcgtcaa tgatgtggga gattaatggt cctgaatcag tgttggtcaa
tacctatcaa
1681 tggatcatca gaaactggga aactgttaaa attcagtggt cccagaaccc
tacaatgcta
1741 tacaataaaa tggaaattga accatttcag tctttagtac ctaaggccat
tagaggccaa
1801 tacagtgggt ttgtaagaac tctgttccaa caaatgaggg atgtgcttgg
gacatttgat
1861 accgcacaga taataaaact tcttccttc gcagccgctc caccaaagca
aagtagaatg
1921 cagttctcct catttactgt gaatgtgagg ggatcaggaa tgagaatact
tgtaaggggc
1981 aattctcctg tattcaacta taacaaggcc acgaagagac tcacagttct
cgaaaggat
2041 gctggcactt taactgaaga cccagatgaa ggcacagctg gagtggagtc
cgctgttctg
2101 aggggattcc tcattctggg caaagaagac aagagatatg gcccagcact
aagcatcaat
2161 gaactgagca accttgcgaa aggagagaag gctaattgtgc taattgggca
aggagacgtg
2221 gtgttggtaa tgaaacggaa acgggactct agcatactta ctgacagcca
gacagcgacc
2281 aaaagaattc ggatggccat caattagtgt cgaatagttt aaaaacgacc
ttgtttctac
2341 t (SEQ ID NO:14)

Нуклеотидная последовательность геномного РВ1

1 atggatgtca atccgacctt acttttotta aaagtgccag cacaaaatgc
tataagcaca
61 actttccctt atactggaga ccctccttac agccatggga caggaacagg
atacaccatg
121 gatactgtca acaggacaca tcagtactca gaaaagggaa gatggacaac
aaacaccgaa
181 actggagcac cgcaactcaa cccgattgat gggccactgc cagaagacaa
tgaaccaagt
241 ggttatgccc aaacagattg tgtattggag gcgatggctt tccttgagga
atcccacct
301 ggtatTTTTG aaaactcgtg tattgaaacg atggaggttg ttcagcaaac
acgagtagac
361 aagctgacac aaggccgaca gacctatgac tggactctaa atagaaacca
acctgctgca
421 acagcattgg ccaacacaat agaagtgttc agatcaaatg gcctcacggc
caatgagtct
481 ggaaggctca tagacttctt taaggatgta atggagtcaa tgaacaaaga
agaaatgggg
541 atcacaactc attttcagag aaagagacgg gtgagagaca atatgactaa
gaaaatgata
601 acacagagaa caatgggtaa aaagaagcag agattgaaca aaaggagtta
tctaattaga

037571

661 gcattgaccc tgaacacaat gaccaaagat gctgagagag ggaagctaaa
acggagagca
721 attgcaacc cagggatgca aataaggggg tttgtatact ttgttgagac
actggcaagg
781 agtatatgtg agaaacttga acaatcaggg ttgccagttg gaggcaatga
gaagaaagca
841 aagttggcaa atgttgtaag gaagatgatg accaattctc aggacaccga
actttctttc
901 accatcactg gagataacac caaatggaac gaaaatcaga atcctcggat
gtttttggcc
961 atgatcacat atatgaccag aatcagccc gaatggttca gaaatgttct
aagtattgct
1021 ccaataatgt tctcaaaca aatggcgaga ctgggaaaag ggtatatggt
tgagagcaag
1081 agtatgaaac ttagaactca aatacctgca gaaatgctag caagcatcga
tttgaatat
1141 ttcaatgatt caacaagaaa gaagattgaa aaaatccgac cgctcttaat
agaggggact
1201 gcatcattga gccctggaat gatgatgggc atgttcaata tgттаagcac
tgtattaggc
1261 gtctccatcc tgaatcttgg acaaaagaga tacaccaaga ctacttactg
gtgggatggt
1321 cttcaatcct ctgacgattt tgctctgatt gtgaatgcac ccaatcatga
agggattcaa
1381 gccggagtcg acaggtttta tcgaacctgt aagctacttg gaatcaatat
gagcaagaaa
1441 aagtcttaca taaacagaac aggtacattt gaattcacia gttttttcta
tcgttatggg
1501 tttgttgcca atttcagcat ggagcttccc agttttgggg tgtctgggat
caacgagtca
1561 gcggacatga gtattggagt tactgtcatc aaaaacaata tgataaacia
tgatcttggg
1621 ccagcaacag ctcaaattggc ccttcagttg ttcatacaag attacaggta
cacgtaccga
1681 tgccatagag gtgacacaca aatacaaac cgaagatcat ttgaaataaa
gaaactgtgg

037571

1741 gagcaaacc gttccaaagc tggactgctg gtctccgacg gaggcccaa
tttatacaac
1801 attagaaatc tccacattcc tgaagtctgc ctaaaatggg aattgatgga
tgaggattac
1861 cagggcggtt tatgcaacc actgaacca tttgtcagcc ataaagaaat
tgaatcaatg
1921 aacaatgcag tgatgatgcc agcacatggt ccagccaaaa acatggagta
tgatgctggt
1981 gcaacaacac actcctggat ccccaaaaga aatcgatcca tcttgaatac
aagtcaaaga
2041 ggagtacttg aggatgaaca aatgtaccaa aggtgctgca atttatttga
aaaattcttc
2101 cccagcagtt catacagaag accagtcggg atatccagta tggaggaggc
tatggtttcc
2161 agagcccgaa ttgatgcacg gattgatttc gaatctggaa ggataaagaa
agaagagttc
2221 actgagatca tgaagatctg ttccaccatt gaagagctca gacggcaaaa
atagtgaatt
2281 tagcttgt (SEQ ID NO:15)

Нуклеотидная последовательность геномного РА

1 agcгааagca ggtactgatc caaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt
caatccgatg
61 attgtcgagc ttgcggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa
aatcgaaaca
121 aacaaatttg cagcaatatg cactcacttg gaagtatgct tcatgtattc
agattttcac
181 ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgatccaaa
tgcacttttg
241 aagcacagat ttgaaataat cgagggaaga gatcgacaaa tggcctggac
agtagtaaac
301 agtatattgca aactacagc ggctgagaaa ccaaagtttc taccagattt
gtatgattac
361 aaggagaata gattcatcga aattggagta acaaggagag aagttcacat
atactatctg
421 gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaaa acacacatcc acattttctc
gttcactggg

037571

481 gaagaaatgg ccacaaaggc agactacact ctcgatgaag aaagcagggc
taggatcaaa

541 accagactat tcaccataag acaagaaatg gccagcagag gcctctggga
ttcctttcgt

601 cagtccgaga gaggagaaga gacaattgaa gaaaggtttg aatcacagg
aacaatgcgc

661 aagcttgccg accaaagtct cccgccgaac ttctccagcc ttgaaaattt
tagagcctat

721 gtggatggat tcgaaccgaa cggctacatt gagggcaagc tgtctcaaat
gtccaaagaa

781 gtaaattgcta gaattgaacc ttttttgaaa acaacaccac gaccacttag
acttccgaat

841 gggcctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgatgg atgccttaa
attaagcatt

901 gaggacccaa gtcatgaagg agaggggaata ccgctatatg atgcaatcaa
atgcatgaga

961 acattctttg gatggaagga acccaatggt gttaaaccac acgaaaaggg
aataaatcca

1021 aattatcttc tgtcatggaa gcaagtactg gcagaactgc aggacattga
gaatgaggag

1081 aaaattccaa agactaaaaa tatgaagaaa acaagtcagc taaagtgggc
acttggtgag

1141 aacatggcac cagaaaaggt agactttgac gactgtaaag atgtaggtga
ttgaagcaa

1201 tatgatagtg atgaaccaga attgaggtcg ctagcaagtt ggattcagaa
tgagttaac

1261 aaggcatgcg aactgacaga ttcaagctgg atagagctcg atgagattgg
agaagatgtg

1321 gctccaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcacatcaga
ggtgtctcac

1381 tgcagagcca cagaatacat aatgaagggg gtgtacatca atactgcctt
gcttaatgca

1441 tcttgtgcag caatggatga tttccaatta attccaatga taagcaagtg
tagaactaag

1501 gaggggaaggc gaaagaccaa cttgtatggt ttcatcataa aaggaagatc
ccacttaagg

037571

1561 aatgacaccg acgtggtaaa ctttgtgagc atggagtttt ctctcactga
cccaagactt
1621 gaaccacata aatgggagaa gtactgtggtt cttgagatag gagatatgct
tataagaagt
1681 gccataggcc aggtttcaag gcccatgttc ttgtatgtga gaacaaatgg
aacctcaaaa
1741 attaaaatga aatggggaat ggagatgagg cgttgcctcc tccagtcact
tcaacaaatt
1801 gagagtatga ttgaagctga gtcctctgtc aaagagaaag acatgaccaa
agagttcttt
1861 gagaacaaat cagaaacatg gccattgga gagtcccca aaggagtgga
ggaaagtcc
1921 attgggaagg tctgcaggac tttattagca aagtcggtat tcaacagctt
gtatgcatct
1981 ccacaactag aaggattttc agctgaatca agaaaactgc ttcttatcgt
tcaggctctt
2041 agggacaacc ttgaacctgg gacctttgat cttggggggc tatatgaagc
aattgaggag
2101 tgcctgatta atgatccctg ggttttgctt aatgcttctt gtttcaactc
cttcttaca
2161 catgcattga gttagtgtg gcagtgctac tatttgctat ccatactgtc
caaaaaagta
2221 ccttgtttct act (SEQ ID NO:16)

Нуклеотидная последовательность геномного NP

1 agcgaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa
cgtacgtact
61 ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg
aagatgtctt
121 tgcaggggaag aacactgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa
gaccaatcct
181 gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc
ccagtgagcg
241 aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tggccttaat gggaacgggg
atccaaataa
301 catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat
tccatggggc

037571

361 caaagaaatc tcaactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg
gcctcatata
421 caacaggatg ggggctgtga ccaactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg
caacctgtga
481 acagattgct gactcccagc atcggctctca taggcaaagt gtgacaacaa
ccaatccact
541 aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta
tggagcaaat
601 ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg
ctagacaaat
661 ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc
tgaaaaatga
721 tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc
aacggttcaa
781 gtgatcctct cgctattgcc gcaaataca ttgggatctt gcaacttgaca
ttgtggattc
841 ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg
aaaggagggc
901 cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggagaata tcgaaaggaa
cagcagatg
961 ctgtggatgc tgacgatggc cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa
actaccttgt
1021 ttctact (SEQ ID NO:17)

Нуклеотидная последовательность геномного М

1 agcgaaagca gtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa
cgtacgtact
61 ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg
aagatgtctt
121 tgcaggaag aacctgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa
gaccaatcct
181 gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc
ccagtgagcg
241 aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg
atccaaataa
301 catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat
tccatggggc

037571

361 caaagaaatc tcaactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg
gcctcatata
421 caacaggatg ggggctgtga ccaactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg
caacctgtga
481 acagattgct gactcccagc atcggctctca taggcaaagtg gtgacaacaa
ccaatccact
541 aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc cagcaactaca gctaaggcta
tggagcaaat
601 ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggtt gctagtcagg
ctagacaaat
661 ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc
tgaaaaatga
721 tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc
aacggttcaa
781 gtgatcctct cgctattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca
ttgtggattc
841 ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg
aaaggagggc
901 cttctacgga aggagtgcc aagtctatga ggaagaata tcgaaaggaa
cagcagagtg
961 ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa
actaccttgt
1021 ttctact (SEQ ID NO:18)

Нуклеотидная последовательность геномного НА

1 atgaaggcaa tactagtagt tctgctatat acatttgcaa ccgcaaagtc
agacacatta
61 tgtatagggt atcatgcaaa caattcaaca gacactgtag acacagtact
agaaaagaat
121 gtaacagtaa cacactctgt taaccttcta gaagacaagc ataacgggaa
actatgcaaa
181 ctaagagggg tagccccatt gcatttgggt aatgtaaca ttgctggctg
gatcctggga
241 aatccagagt gtgaatcact ctccacagca agttcatggt cctacattgt
ggaaacatct
301 agttcagaca atggaacgtg ttaccagga gatttcatca attatgagga
gctaagagag

037571

361 caattgagct cagtgtcatc atttgaaag tttgagatat tccccaaaac
 aagttcatgg
 421 cccaatcatg actcgaacaa aggtgtaacg gcagcatgtc ctcacgctgg
 agcaaaaagc
 481 ttctacaaaa atttaatatg gctagttaaa aaaggaaatt catacccaaa
 gctcagccaa
 541 tcctacatta atgataaag gaaagaagtc ctcgtgctgt ggggcattca
 ccatccatct
 601 actactgctg accaacaag tctctatcag aatgcagatg catatgtttt
 tgtggggaca
 661 tcaagataca gcaagaagtt caagccggaa atagcaataa gacccaaagt
 gagggatcaa
 721 gaaggagaa tgaactatta ctggacacta gtagagccgg gagacaaaat
 aacattcgaa
 781 gcaactggaa atctagtgt accgagatat gcattcaciaa tggaaagaaa
 tgctggatct
 841 ggtattatca tttcagatac accagtccac gattgcaata caacttgtca
 gacacccgag
 901 ggtgctataa acaccagcct cccatttcag aatatacatc cgatcacaat
 tggaaaatgt
 961 ccaaagtatg taaaagcac aaaattgaga ctggccacag gattgaggaa
 tgtcccgtct
 1021 attcaatcta gaggcctatt cggggccatt gccggcttca ttgaagggg
 gtggacaggg
 1081 atggtagatg gatggtacgg ttatcacat caaaatgagc aggggtcagg
 atatgcagcc
 1141 gacctgaaga gcacacaaaa tgccattgac aagattacta acaaagtaaa
 ctctgttatt
 1201 gaaaagatga atacacagtt cacagcagtg ggtaaagagt tcaaccacct
 ggaaaaaaga
 1261 atagagaatt taataaaaa agttgatgat ggtttcctgg acatttggac
 ttacaatgcc
 1321 gaactgttgg ttctattgga aatgaaaga actttggact accatgattc
 aatgtgaag
 1381 aacttgatg aaaaggtaag aaaccagtta aaaaacaatg ccaaggaaat
 tggaacggc

1441 tgctttgaat tttaccacaa atgcgataac acgtgcatgg aaagtgtcaa
 aaatgggact

1501 tatgactacc caaaatactc agaggaagca aaattaaaca gagaaaaaat
 agatggggta

1561 aagctggaat caacaaggat ttaccagatt ttggcgatct attcaactgt
 cgccagttca

1621 ttgggtgctgg tagtctccct gggggcaatc agcttctgga tgtgctctaa
 tgggtctcta

1681 cagtgtagaa tatgtattta a (SEQ ID NO: 19)

Нуклеотидная последовательность геномного NA

1 atgaatccaa accaaaagat aataaccatt ggttcggtct gtatgacaat
 tggaatggct

61 aacttaatat tacaattgg aacataatc tcaatatgga ttagccactc
 aattcaagtt

121 gggaatcaaa gtcagatcga aacatgcaat caaagcgtca ttacttatga
 aaacaacact

181 tgggtaaadc agacatatgt taacatcagc aacaccaact ttgctgctgg
 gcagccagtg

241 gtttccgtga aattagcggg caattcctct ctctgccctg ttagtggatg
 ggctatatac

301 agtaaagaca acagtgtaag agtcggttcc aagggggatg tgtttgtcat
 aagggaaacca

361 ttcatatcat gctccccctt ggaatgcaga accttcttct tgactcaagg
 ggccttgcta

421 aatgacaaac attccaatgg aaccattaa gacaggagcc catatcgaac
 cttaatgagc

481 tgtcctattg gtgaagttcc ctctccatac aactcaagat ttgagtcagt
 cgcttggtca

541 gcaagtgctt gtcgatgag catcaattgg ctaacaattg gaatttctgg
 cccagacagt

601 ggggcagtgg ctgtgttaaa gtacaacggc ataataacag aactatcaa
 gagttggaga

661 aacgatatat tgagaacaca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggttc
 ttgctttacc

721 ataatgaccg atggaccaag tgatggacag gcctcataca agatcttcag
 aatagaaaag

781 ggaaagatag tcaaatcagt cgaaatgaat gcccctaatt atcactatga
ggaatgctcc

841 tgttatcctg attctagtga aatcacatgt gtgtgcaggg ataactggca
tggtcgaat

901 cgaccgtggg tgtctttcaa ccagaatctg gaataticaga taggatacat
atgcagtggg

961 attttcggag acaatccacg ccctaataatg aagacaggca gttgtggtcc
agtatcgtct

1021 aatggagcaa atggagtaaa aggattttca ttcaaatacg gcaatgggtg
ttggataggg

1081 agaactaaaa gcattagtcc aagaaaaggt tttgagatga tttgggatcc
aatggatgg

1141 actgggacag acaataactt ctcaataaag caagatatcg taggaataaa
tgagtgggtca

1201 ggatatagcg ggagttttgt tcagcatcca gaactaacag ggctggattg
tataagacct

1261 tgcttctggg ttgaactaat cagagggcga cccaaagaga acacaatctg
gactagtggg

1321 agcagcatat cttttgtgg tgtaaacagt gacactgtgg gttggtcttg
gccagacggt

1381 gctgagttgc cattacat tgacaagtaa (SEQ ID NO: 20)

Нуклеотидная последовательность гена химерного NS фрагмента (вставка выделена жирным шрифтом)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTA
GATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATTCC
TTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCSTAAGAGGAAGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACAT
CGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAG
GCACTTAAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACATGACTCTTGAGG
AAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATAACCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCTCTTTGTATCAG
AATGGACCAGGCGATCATGG**GAGGAGGTTTCTTCCGAGCTATTGCTGGTTTCTTGGAAAGGAGGA**
TGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGGGAGGAAGAGAGAGCCGGAACCCAGGGAATGCTTGATAAT
AAGCGCCCGCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAA
GAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTCGCTTCTCTTCCAGGACATACTAATGAGGATG
TCAAAAAATGCAATTGGGGTCCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTC
TAAAACTCTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCA
AAACAGAAAACGGAAAATGGCGAGAACAATTAGGTCAAAAGTTCGAAGAAAATAAGATGGCTGATT
GAAGAAGTGAGACACAAATGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAGCAAAATAACATTTATAACAAG
CCTTACAGCTACTATTTGAAGTGAACAAGAGATAAGAACCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATA
ATAAAAAACACCCTTGTCTTCTACT (SEQ ID NO: 21)

Сборка рекомбинантных вирусов осуществлялась путем трансфекции клеток VERO восемью плазмидами, кодирующими геномные немодифицированные фрагменты вируса гриппа, и химерный NS геномный фрагмент, используя метод электропорации плазмидной ДНК (Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza)) в соответствии с инструкцией к применению. После трансфекции клетки инкубировались в среде Optipro (Invitrogen) в течение 96 ч при 34°C с добавлением трипсина 1 мкг/мл для обеспечения по-

страницей расщепления предшественника гемагглютинина на субъединицы HA1 и HA2. Вирусный урожай с клеток Vero использовался для заражения 10-дневных куриных эмбрионов (SPF). Эмбрионы инкубировались в течение 48 ч при 34°C, после чего аллантаисные жидкости, имеющие положительный титр в реакции гемагглютинации, использовались для проведения последующих пассажей на куриных эмбрионах. Аллантаисные жидкости 7 пассажа очищались с помощью тангенциальной фильтрации и лиофилизировались для хранения. Иммунизация животных проводилась после растворения лиофилизата дистиллированной водой в эквивалентном объеме.

Пример 6. Протективный ответ в отношении гетерологичных штаммов вируса гриппа А и В при контрольном заражении мышей.

С целью определения протективной активности в отношении гетерологичных антигенных вариантов вируса гриппа для иммунизации мышей был использован гриппозный вектор в дозе 6,8 log ЭИД₅₀/мышь, который вводился интраназально в объеме 50 мкл под легкой анестезией, однократно или двукратно с периодом в 3 недели. Через 21 день после последней иммунизации животные были подвергнуты контрольному заражению патогенными для мышей штаммами вируса гриппа: гомологичным A/California/7/09 (H1N1pdm) или гетерологичными A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Mississippi/85/1 (H3N2) или вирусом гриппа В/Lee/40, взятыми в дозе соответствующей 3-5 ЛД₅₀, соответственно.

Как видно из фиг. 9А, контрольное заражение не иммунных мышей вирусом H1N1pdm приводило к их гибели в 90% случаев. В то же время, мыши, иммунизированные вирусным препаратом однократно или двукратно, были достоверно защищены от гибели.

Как видно из фиг. 5В9В, контрольное заражение не иммунных мышей вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2) приводило к их гибели в 100% случаев. В то же время, мыши, иммунизированные вирусным препаратом однократно или двукратно, были достоверно защищены от гибели.

Как видно из фиг. 9С, контрольное заражение не иммунных мышей вирусом A/Mississippi/85/1 (H3N2) приводило к их гибели в 100% случаев. В то же время, мыши, иммунизированные вирусным препаратом двукратно имели 100% защиту.

Как видно из фиг. 9Б, контрольное заражение не иммунных мышей вирусом гриппа В/Lee/40 приводило к гибели животных в 100% случаев. В то же время, мыши, иммунизированные вирусным препаратом двукратно имели достоверно отличающуюся от контроля 60% защиту.

Таким образом, гриппозный вектор, несущий химерный NS геномный фрагмент, проявлял признаки универсальной гриппозной вакцины, эффективной в отношении как гетерологичных антигенных подтипов вируса гриппа А, так и в отношении вируса гриппа В.

Пример 7. Протективный ответ в отношении гетерологичного штамма вируса гриппа А (H3N2) при контрольном заражении хорьков.

Хорьки являются оптимальной, рекомендованной ВОЗ моделью для изучения эффективности противогриппозных вакцин и препаратов. С целью определения протективной активности в отношении гетерологичного антигенного варианта вируса гриппа для иммунизации хорьков (9 на группу) был использован гриппозный вектор, полученный в Примере 5, в дозе 7,5 log ЭИД₅₀/хорька, который вводился интраназально в объеме 500 мкл под легкой анестезией, однократно или двукратно с периодом в 3 недели. Через 21 день после последней иммунизации животные были подвергнуты контрольному заражению патогенным для хорьков вирусом гриппа A/St.Petersburg/224/2015 (H3N2). Как видно из фиг. 10А, контрольное заражение не иммунных животных приводило к подъему температуры тела на 2 сутки после заражения, в то время как вакцинированные животные не имели температурной реакции.

С целью изучения эффекта вакцинации на репродукцию контрольного вируса в респираторном тракте хорьков у животных были взяты носовые смывы на 2, 4 и 6 день с целью определения в них концентрации инфекционного вируса путем титрования 50% цитопатической дозы в культуре клеток MDCK. Как видно из фиг. 10В, контрольное заражение не иммунных хорьков приводило к активной репродукции вируса без существенного снижения титров к 6 дню. При однократной иммунизации хорьков достоверное снижение вирусного титра наблюдалось на 4 и 6 день после контрольного заражения. После двукратной иммунизации достоверное, более чем 100-кратное, снижение вирусного титра регистрировалось уже на 2 день после заражения животных.

Таким образом, даже однократная вакцинация хорьков гриппозным вектором приводила к защите животных от клинических проявлений в виде температурной реакции и способствовала ускоренной элиминации контрольного гетерологичного штамма из респираторного тракта. Повторная иммунизация способствовала ускорению процесса вирусной элиминации.

Пример 8. Онколитический эффект гриппозного вектора, кодирующего микобактериальный белок Esat6.

С целью определения онколитического потенциала аттенуированных гриппозных векторов, несущих химерный NS геномный фрагмент с гетерологичным геном *Ner*, вирусы были использованы для терапии меланомы мышей, индуцированной путем введением 10⁶ клеток В16 в объеме 30 мкл в подкожное пространство правой задней стопы. Использовалось 10 животных на группу. Терапия проводилась на 5 день после введения опухолевых клеток путем инъекции 30 мкл вирусного препарата или фосфатного буферного раствора непосредственно в зону опухолевого роста. Инъекции проводились 4 раза каждый

третий день, после чего оценивались скорость увеличения объема пораженной стопы и выживаемость животных на протяжении 85 дней. Животные с опухолями, достигшими 2000 мм³, усыплялись по этическим соображениям и считались погибшими.

Для лечения меланомы был использован вектор, экспрессирующий микобактериальный антиген Esat6 в дизайне, предусматривающим, 2А опосредованное посттрансляционное отщепление белка Esat-6 от С- терминальной части укороченного NS1 белка вируса гриппа NS124-2А-Esat6 (Фиг. 3, SEQ ID NO:12). В качестве контрольного терапевтического агента использовался вирус NS124/Nep-Len, не имеющий вставки микобактериального белка.

На фиг. 6А представлены результаты измерения объема стопы на 19 день после введения опухолевых клеток. Неожиданно оказалось, что наименьшим средним объемом обладали стопы мышей, получавших терапию вектором, экспрессирующим белок Esat6. Этот результат оказался в корреляции с выживаемостью мышей на протяжении длительного срока наблюдения 85 дней (Фиг. 6Б). 3 из 10 животных группы NS124-2А-Esat6 оказались в стадии ремиссии опухолевого роста, в то время как животные в других группах погибли к 60 дню. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о преимуществе онколитического вектора, кодирующего бактериальный антиген.

Пример 10. Состав вакцины на основе гриппозного вектора для интраназальной иммунизации.

Вакцина, содержащая гриппозный вектор, полученный в Примере 1 или Примере 5, в количестве от 6,5 до 8,5 log эмбриональных 50% инфекционных доз (ЭИД50)/мл, и буферный стабилизирующий раствор, содержащий 0,9 мас.% раствора хлорида натрия, 0,5 мас.% L-карнозина, 2,5 мас.% сахарозы, 1 мас.% рекомбинантного альбумина, 1 мас.% L-аргинина и 3 мас.% гидроксиэтилированного крахмала 130/0,4 (молекулярная масса 130 кДа, степень молярного замещения 0,4).

Пример 11. Состав вакцины на основе гриппозного вектора для интраназальной иммунизации.

Вакцина, содержащая гриппозный вектор, полученный в Примере 1 или Примере 5, в количестве от 6,5 до 8,5 log эмбриональных 50% инфекционных доз (ЭИД50)/мл, и буферный стабилизирующий раствор, содержащий 0,9 мас.% раствора хлорида натрия, 0,1 мас.% L-карнозина, 2,5 мас.% сахарозы, 1 мас.% рекомбинантного альбумина, 1 мас.% L-аргинина и 3 мас.% гидроксиэтилированного крахмала 130/0,4 (молекулярная масса 130 кДа, степень молярного замещения 0,4).

Пример 12. Состав вакцины на основе гриппозного вектора для онколитических целей.

Вакцина, содержащая гриппозный вектор, полученный в Примере 1, в количестве от 6,5 до 10,5 log эмбриональных 50% инфекционных доз (ЭИД50)/мл, и буферный стабилизирующий раствор, содержащий 1,35 масс.% раствора хлорида натрия, 0,5 масс.% L-карнозина, 1 масс.% рекомбинантного альбумина, 1 масс.% L-аргинина и 3 масс.% гидроксиэтилированного крахмала 130/0,4 (молекулярная масса - 130 кДа, степень молярного замещения 0,4).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Аттенуированный вирус гриппа А, индуцирующий кросс-протективный ответ против вируса гриппа А и В, содержащий химерный NS фрагмент, включающий укороченную рамку считывания гена белка NS1 и гетерологичную последовательность гена белка Nep, происходящую от подтипа вируса гриппа А, отличающегося от подтипа указанного аттенуированного вируса гриппа А, где указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 80-130 аминокислотных остатков.

2. Аттенуированный вирус гриппа А по п.1, где указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатков.

3. Аттенуированный вирус гриппа А по п.1, в котором указанная укороченная рамка считывания белка NS1 происходит от вируса гриппа А подтипа H1N1, а гетерологичная последовательность гена белка Nep происходит от вируса гриппа А подтипа H2N2.

4. Аттенуированный вирус гриппа А, индуцирующий кросс-протективный ответ против вируса гриппа А и В, содержащий химерный NS фрагмент, включающий укороченную рамку считывания гена белка NS1 и гетерологичную последовательность гена белка Nep, причем указанная укороченная рамка считывания белка NS1 происходит от вируса гриппа А подтипа H1N1, а гетерологичная последовательность гена белка Nep происходит от вируса гриппа А подтипа H2N2, и где указанная укороченная рамка считывания кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатка.

5. Аттенуированный гриппозный вектор, экспрессирующий белок или его фрагмент из бактерий, вирусов или простейших, представляющий собой аттенуированный вирус гриппа А по любому из пп.1-4, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой по меньшей мере одного трансгена, кодирующего белок или его фрагмент бактерий, вирусов или простейших.

6. Аттенуированный гриппозный вектор по п.5, где белок или его фрагмент выбран из белков вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса герпеса, респираторно-синтициального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, трипаносомы, лейшмании, хламидии, возбудителя бруцеллеза или их комбинаций.

7. Аттенуированный гриппозный вектор по п.5 или 6, где размер белка или его фрагмента составляет от 10 до 400 а.к.

8. Аттенуированный гриппозный вектор по п.5 или 6, где вставка кодирует участок белка НА вируса гриппа.

9. Аттенуированный гриппозный вектор по п.8, где участок белка НА представляет собой участок субъединицы HA2, состоящий из 1-185 а.к. из вируса гриппа А, 1-186 а.к. из вируса гриппа В, 23-185 а.к. из вируса гриппа А или 65-222 а.к. из вируса гриппа А.

10. Аттенуированный гриппозный вектор по п.5 или 6, где вставка кодирует последовательность участка субъединицы HA2 вируса гриппа А или вируса гриппа В от 1 до 21 а.к. и последовательность участка белка NP вируса гриппа А от 243 до 251 а.к.

11. Аттенуированный гриппозный вектор по п.5 или 6, где вставка кодирует белок микобактерии туберкулеза ESAT-6, Ад85А, Ад85В, Mpt64, HspX, Mtb8.4 или 10.4 или их фрагменты.

12. Аттенуированный гриппозный вектор по п.11, где геномная последовательность вируса дополнительно содержит последовательность, кодирующую саморасщепляющийся 2А-пептид, между последовательностями, кодирующими NS1-124 и ESAT6.

13. Аттенуированный гриппозный вектор, экспрессирующий белок или его фрагмент из вируса гриппа, представляющий собой аттенуированный вирус гриппа А по п.4, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой, кодирующей 1-21 а.к. субъединицы HA2 белка НА вируса гриппа В и 243-251 а.к. белка NP вируса гриппа А.

14. Аттенуированный гриппозный вектор, обладающий онколитической активностью, представляющий собой аттенуированный вирус гриппа А по любому из пп. 1-4, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой, кодирующей белок микобактерии туберкулеза ESAT-6 или его фрагмент.

15. Аттенуированный гриппозный вектор по п.14, где размер белка или его фрагмента составляет от 10 до 400 а.к.

16. Аттенуированный гриппозный вектор по п.15, в котором укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой, кодирующей саморасщепляющийся 2А-пептид.

17. Аттенуированный гриппозный вектор, индуцирующий кросс-протективный ответ против вирусов гриппа А и В, содержащий: нуклеотидную последовательность гена белка PB2, происходящую от вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка PB2; нуклеотидную последовательность гена белка PB1, происходящую от вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка PB1; нуклеотидную последовательность гена белка PA, происходящую от вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной последовательности гена белка PA; нуклеотидную последовательность гена белка NP, происходящую от вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной последовательности гена белка NP; нуклеотидную последовательность гена белка М, происходящую от вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной последовательности гена белка М; нуклеотидную последовательность гена белка НА, происходящую от вируса гриппа А/California/7/09-like H1N1pdm), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка НА; нуклеотидную последовательность гена белка NA, происходящую от вируса гриппа А/California/7/09-like H1N1pdm), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной нуклеотидной последовательности гена белка NA; и нуклеотидную последовательность химерного гена белка NS, включающую укороченную рамку считывания гена белка NS1, происходящую от вируса А/PR/8/34 (H1N1), где указанная рамка считывания является укороченной и кодирует белок NS1 размером 124 аминокислотных остатков, и последовательность гена белка Nер, происходящую от вируса гриппа А/Singapore/1/57-like (H2N2), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность указанной последовательности химерного гена белка NS; где указанная укороченная рамка считывания гена белка NS1 продолжена вставкой, кодирующей пептид слияния субъединицы HA2 от вируса гриппа В, и вставкой, кодирующей консервативный В-клеточный эпитоп нуклеопротеина (NP) вируса гриппа А.

18. Аттенуированный гриппозный вектор по п.17, где нуклеотидная последовательность химерного гена белка NS представлена в SEQ ID NO: 21.

19. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики инфекционного заболевания у субъекта, содержащая в эффективном количестве аттенуированный вирус гриппа А по любому из пп. 1-4 или аттенуированный гриппозный вектор по любому из пп.5-13 и фармацевтически приемлемый носитель, где инфекционное заболевание вызывается патогеном, выбранным из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синтициального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы, лейшмании или возбудителя бруцеллеза.

20. Фармацевтическая композиция для профилактики гриппа, содержащая в эффективном количе-

стве аттенуированный гриппозный вектор по п.17 или 18 и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Фармацевтическая композиция по п.19 или 20, содержащая 6,5-10,5 log ЭИД 50/мл аттенуированного гриппозного вектора и буферный раствор, содержащий 0-1,5 мас.% моновалентной соли, 0-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 0-5 мас.% углеводного компонента, 0-2 мас.% белкового компонента, 0-2 мас.% аминокислотного компонента и 0-10 масс.% гидроксипропилированного крахмала.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-21, где буферный раствор содержит 0,5-1,5 мас.% моновалентной соли, 0,01-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 1-5 мас.% углеводного компонента, 0,1-2 мас.% белкового компонента, 0,01-2 мас.% аминокислотного компонента и 1-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, где моновалентная соль представляет собой хлорид натрия, углеводный компонент представляет собой сахарозу, трегалозу или лактозу, белковый компонент представляет собой человеческий альбумин, казитон, гидролизат лактальбумина или желатин, аминокислотный компонент представляет собой аргинин, глицин или глутамат натрия, и имидазолсодержащее соединение представляет собой L-карнозин или N, N'-бис[2-(1H-имидазол-5-ил)этил]пропандиамид.

24. Фармацевтическая композиция по любому из пп.19-23, где субъект представляет собой млекопитающее или птицу.

25. Фармацевтическая композиция по п.24, где субъект представляет собой человека.

26. Вакцина против инфекционного заболевания, содержащая в эффективном количестве аттенуированный вирус гриппа А по любому из пп.1-4 или аттенуированный гриппозный вектор по любому из пп.5-13 и фармацевтически приемлемый носитель, где инфекционное заболевание вызывается патогеном, выбранным из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синтициального вируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы, лейшмании или возбудителя бруцеллеза.

27. Вакцина против гриппа, содержащая в эффективном количестве аттенуированный гриппозный вектор по п.17 или 18 и фармацевтически приемлемый носитель.

28. Вакцина по п.26 или 27, содержащая 6,5-10,5 log ЭИД 50/мл аттенуированного гриппозного вектора и буферный раствор, содержащий 0-1,5 мас.% моновалентной соли, 0-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 0-5 мас.% углеводного компонента, 0-2 мас.% белкового компонента, 0-2 мас.% аминокислотного компонента и 0-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала.

29. Вакцина по любому из пп.26-28, где буферный раствор содержит 0,5-1,5 мас.% моновалентной соли, 0,01-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 1-5 мас.% углеводного компонента, 0,1-2 мас.% белкового компонента, 0,01-2 мас.% аминокислотного компонента и 1-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала.

30. Вакцина по п.29, где моновалентная соль представляет собой хлорид натрия, углеводный компонент представляет собой сахарозу, трегалозу или лактозу, белковый компонент представляет собой человеческий альбумин, казитон, гидролизат лактальбумина или желатин, аминокислотный компонент представляет собой аргинин, глицин или глутамат натрия, и имидазолсодержащее соединение представляет собой L-карнозин или N, N'-бис[2-(1H-имидазол-5-ил)этил]пропандиамид.

31. Применение аттенуированного гриппозного вектора по любому из пп.5-13 или фармацевтической композиции по п.19 или 20 для профилактики и/или лечения инфекционных заболеваний у субъекта, где инфекционное заболевание вызывается патогеном, выбранным из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синтициального вируса и вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С, малярийного плазмодия, трихомонады, хламидии, трипаносомы, лейшмании или возбудителя бруцеллеза.

32. Применение аттенуированного гриппозного вектора по п.17 или 18 или фармацевтической композиции по любому из пп.20-23 для профилактики гриппа у субъекта.

33. Применение по любому из п.31 или 32, где субъект представляет собой млекопитающее или птицу.

34. Применение по п.33, где субъект представляет собой человека.

35. Способ лечения и/или профилактики инфекционного заболевания у субъекта, включающий введение в эффективном количестве аттенуированного вируса гриппа А по любому из пп.1-4, аттенуированного гриппозного вектора по любому из пп.5-13 или фармацевтической композиции по п.19 или 20.

36. Способ по п.35, где инфекционное заболевание вызывается патогеном, выбранным из вируса гриппа А, вируса гриппа В, микобактерии туберкулеза, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, респираторно-синтициального вируса, вируса иммунодефицита человека, малярийного плазмодия, трихомонады, трипаносомы, лейшмании или возбудителя бруцеллеза.

37. Способ по п.36, где субъект представляет собой млекопитающее или птицу.

38. Способ по п.37, где субъект представляет собой человека.

39. Фармацевтическая композиция для лечения онкологических заболеваний у субъекта, содержащая аттенуированный вирус гриппа А по любому из пп.1-4 или аттенуированный вектор по любому из пп.14-16 в эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель.

40. Фармацевтическая композиция по п.39, содержащая 8,5-10,5 log ЭИД 50/мл аттенуированного вируса гриппа А по любому из пп.1-5 или аттенуированного гриппозного вектора по любому из пп. 6-14 и буферный раствор, содержащий 0-1,5 мас.% моновалентной соли, 0-5 мас.% имидазолсодержащего соединения, 0-5 мас.% углеводного компонента, 0-2 мас.% белкового компонента, 0-2% аминокислотного компонента и 0-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала.

41. Фармацевтическая композиция по п.40, где буферный раствор содержит 0,5-1,5 мас.% раствора моновалентной соли, 0,01-5 мас.% имидазолсодержащего, 1-5 мас.% углеводного компонента, 0,1-2 мас.% белкового компонента, 0,01-2% аминокислотного компонента и 1-10 мас.% гидроксипропилированного крахмала.

42. Фармацевтическая композиция по п.41, где моновалентная соль представляет собой хлорид натрия, углеводный компонент представляет собой крахмал, белковый компонент представляет собой человеческий альбумин, аминокислотный компонент представляет собой аргинин, и имидазолсодержащее соединение представляет собой L-карнозин или N, N'-бис[2-(1H-имидазол-5-ил)этил]пропандиамид.

43. Применение аттенуированного аттенуированного гриппозного вектора по любому из пп.14-16 или фармацевтической композиции по любому из пп.39-42 для лечения онкологических заболеваний у субъекта.

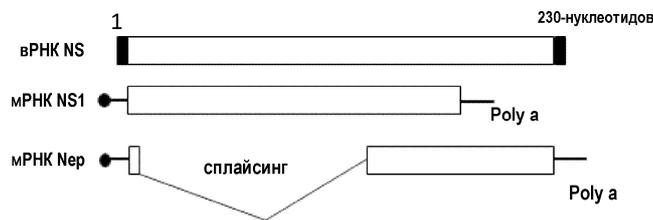
44. Применение по п.43, где онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из колоректального рака, кардиоэзофагеального рака, панкреатического рака, холангиоцеллюлярного рака, глиомы, глиобластомы и меланомы.

45. Способ лечения онкологических заболеваний у субъекта, включающий введение в эффективном количестве аттенуированного вируса гриппа А по любому из пп.1-4, аттенуированного гриппозного вектора по пп.14-16 или фармацевтической композиции по любому из пп.39-42.

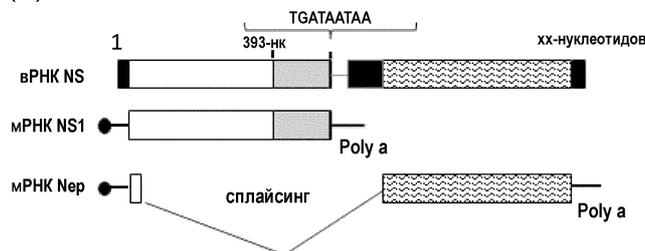
46. Способ лечения по п.45, где введение представляет собой внутриопухолевое введение, введение в лауну, образовавшуюся после хирургического удаления опухоли, или внутривенное введение.

47. Способ по п.45 или 46, где онкологическое заболевание выбрано из колоректального рака, кардиоэзофагеального рака, панкреатического рака, холангиоцеллюлярного рака, глиомы, глиобластомы и меланомы.

(A)



(Б)



- Кэп структура мРНК
- Нетранслируемая область
- ▒ Варибельная последовательность вставки
- ▨ Гетерологичная последовательность NSp
- Poly a Сайт полиаденилирования
- TGATAATAA Кассета тройного стоп кодона

Фиг. 1

(A)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGA
 TTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGTAGGTGATGCCCCATTC
 CTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTG
 GACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAA
 TCCGATGAGGCACCTAAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACA
 TGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAG
 GCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGGATAAAAACATCATACTGAAAGCGA
ACTTCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGA
 GGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTGCTGAGGAT
 GTCAAAAATGCAGTTGGAGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCG
 AGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTCGCTTGAGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTC
 CACTCACTCCAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGTCAGAAGTTTGAAGA
 AATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAACTGAAGGTAACAGAGAATAGTTTTG
 AGCAAAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAA
 CTTTCTCATTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTCTTACT (SEQ ID NO:1)

(Б)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGA
 TTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGTAGGTGATGCCCCATTC
 CTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTG
 GACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAA
 TCCGATGAGGCACCTAAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACA
 TGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAG
 GCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGTGATAATAAAGTGTGATTTTTGACCG
 GCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGGAGCAATTGTTGGCGAAATT
 TCACCATTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTAATGAGGATGTCAAAAAATGCAATTGGGGTC
CTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTAAAACTCTACAGAGA
TTCGCTTGGTGAACAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACG
GAAAAATGGCGAGAACAAATTAGGTCAAAAAGTTTCAAGAAATAAGATGGCTGATTGAAGAA
GTGAGACACAAATTTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAGCAATAACATTTATGCAAGCC
TTACAGCTACTATTTGAAGTGAACAAGAGATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAAT
 AATAAAAAACACCCTTGTCTTACT (SEQ ID NO:2)

(B)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGA
 TTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGTAGGTGATGCCCCATTC
 CTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTG
 GACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAA
 TCCGATGAGGCACCTAAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACA
 TGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAG
 GCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGTGATAATAAAGTGTGATTTTTGACCG
 GCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGGAGCAATTGTTGGCGAAATT
 TCACCATTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTAATGAGGATGTCAAAAAATGCAATTGGGGTC
CTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTAAAACTCTACAGAGA
TTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACG
GAAAAATGGCGAGAACAAATTAGGTCAAAAAGTTTCAAGAAATAAGATGGCTGATTGAAGAA
GTGAGACACAAATTTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAGCAATAACATTTATACAAGCC
TTACAGCTACTATTTGAAGTGAACAAGAGATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAAT
 AATAAAAAACACCCTTGTCTTACT (SEQ ID NO:3)

Фиг. 2

NS124/Nep-Len

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM (SEQ ID NO:4)

NS124-HA2(A)-185

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-**GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHH**
QNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
HDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQ (SEQ ID
 NO:5)

NS124-HA2(A)-65-222

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-**AVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDI**
WTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDG
VKLESMGIYQLAIYSTVASSLVLLVSLGAISSFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO:6)

NS124-HA2(A)-23-185

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-**GYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGI**
TNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEI
GNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQ (SEQ ID NO:7)

NS124-HA2(B)-186

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG- **GFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYT**
SHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMNGLHDEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDE
HLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGDFSLPTFD (SEQ ID NO:8)

NS124-Fus(A)-NP

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-**GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGW**-GG-**RESRNPNGNA** (SEQ ID
 NO:9)

NS124-Fus(B)-NP

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG- **GFFGAIAGFLEGGWEGMIAGW** -GG-**RESRNPNGNA** (SEQ ID
 NO:10)

NS124-Esat6

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-**MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNV**
TSIHSLLEDGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQAMASTEAGVTGMFA (SEQ ID
 NO:11)

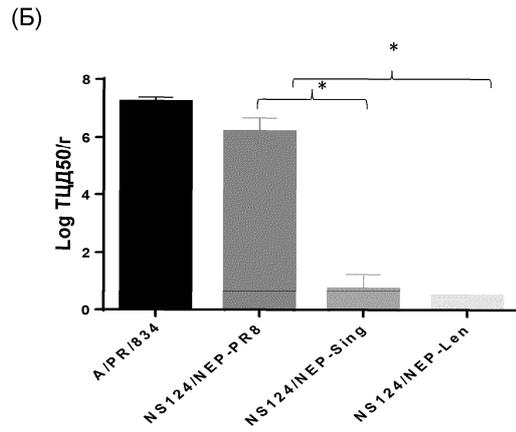
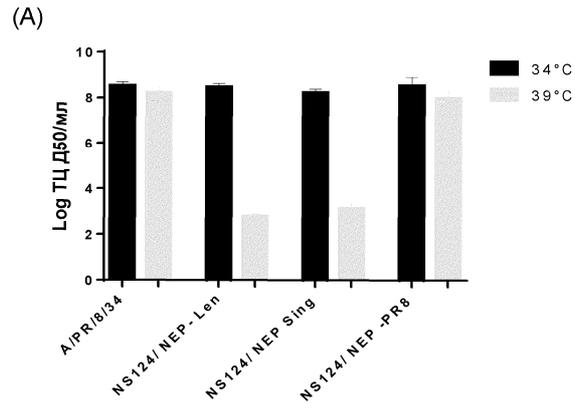
NS124-2A-Esat6

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-**NFDLLKLAGDVESNPGP-**
MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQA
MASTEAGVTGMFA (SEQ ID NO:12)

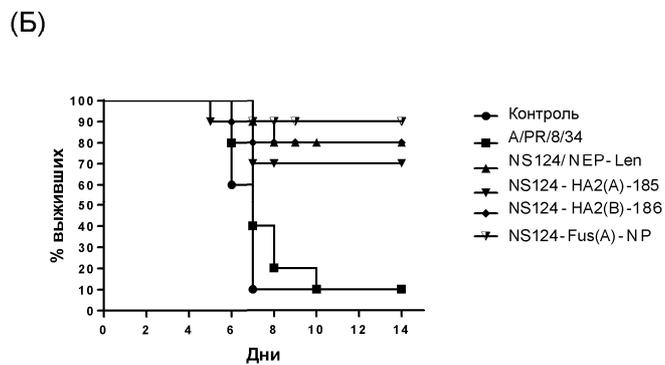
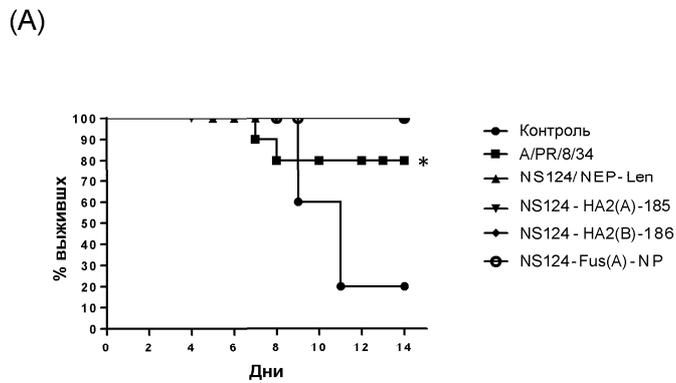
NS124-HSV-2ASY

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLTDMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-AAA-**NLLTTPKFT**-AAA-**RMLGDVMAV**-AAA-**NLLTTPKFT**-AAA-
RMLGDVMAV (SEQ ID NO:13)

Фиг. 3

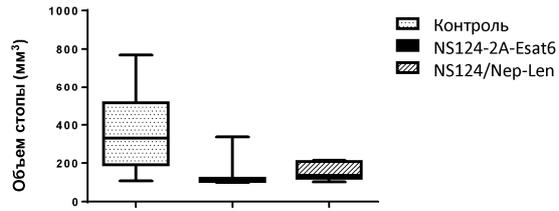


Фиг. 4

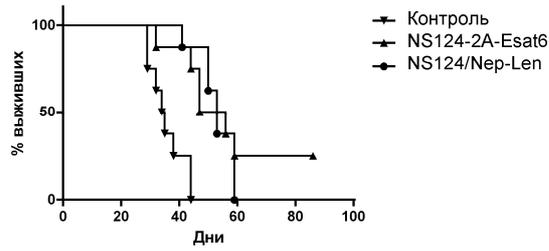


Фиг. 5

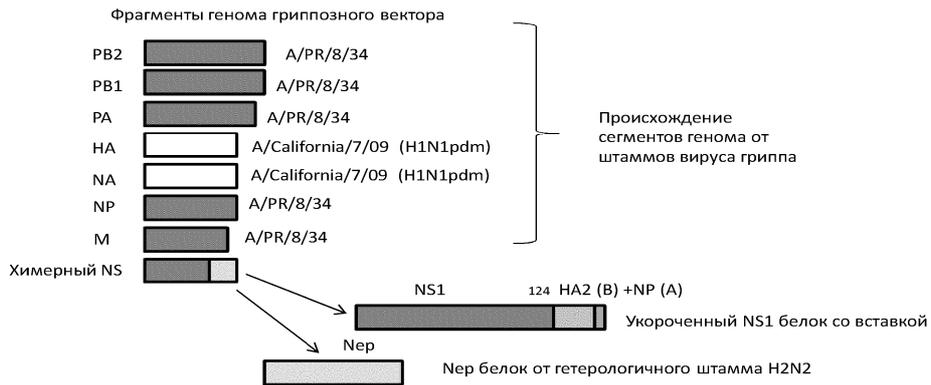
(А)



(Б)



Фиг. 6



Фиг. 7

PB2

agcgaaagcaggcgaattatattcaatatggaaagaataaaagaactacgaaatctaattgtcgcagctcgcaccgccgagatact
cacaaccaccctggaccatattggccataatcaagaagtcacatcaggaagcagggagaagaccgacattggatga
aatggatgatggcaatgaaatccaattacagcagacaagaggataacggaaatgattcctgagagaatgagcaaggacaaa
ctttatggagtaaaatgaatgatccggatcagaccgagtgatggatcacctctggctgtgacatgggaataggaaatggacca
atacaaatacagttcattatcaaaaatctcaaaaacttattttaaagagtcgaaaggctaaagcattggaacctttggccctgtc
cattttagaaccaagtcaaaatcgtcggagagttgacataaatcctggctatgagatctcagtgccaaggaggcacaggatgt
aatcatggaagtgttttccctaacgaagtgaggaccagataactaacatcggaaatcgcaactaacgataaccaagagaagaaa
gaagaactccaggattgcaaaatttctcttggatggtgcatatcattggtgagagagaactggccgcaaaacgagattcctcca
gtggctggggaacaagcagtgatgacattgaagtgtgactcaaggaacatgctgggaacagatgtatactccaggagg
ggaaatgaggaaatgatgatggtgatcaaaagcttgattattgctgtaggaacatagtgagaagagctgagatcagcagatccact
agcatcttattggagatgtccacagcacacagattggtggaataggatggtgagatccttaggcagaaccaacagaagagc
aagcctggatataatcaaggctcaatgggactgagaattagctatcctcagtttggggattcacattaaagagaacaagcg
gatcatcagtcgaagagaggaagaaggtcttaaggcaatctcaaacattgaaagataagagtgatgagggatgaaagatt
cacaatggtgggagaaggaacaagccatactcagaaaagcaaccaggagattgatcagctgatagtgagtgaggagacga
acagtcgattgccgaagcaataatgtggcattgattttcaagaggattgtatgataaaagcagtcagagggtgatctgaattc
ctcaataggcgaatcaacgatgaatcctatgcatcaactttaaagacatttcagaaggatgcaaaagcttttcaaaatggg
gagttgaacctatgcaaatgtgatgggaatgattgggataatggccgacatgactccaagcatgagatgcaatgagagagtg
agaatcagcaaaatgggtgtagatgagtaactccagcacggagaggtagtggtgagcattgacgctttttgagaatccgggacca
acgaggaatgtactactgtctccaggaggctcagtgaaaacaggggaacagagaactgacaataacttactactcgtcaatg
atgtgggagattaatgctgaatcagttggtcaatcaatcaatgatcatcagaactgggaaactgttaaattcagttggt
ccgaaaccctacaatgctatacaataaaatggaaatgaaactttagctcttagtacctaaagccattagagcccaatcaagtg
ggtttgaagaactgttccaacaatgaggatggtgctgggacattgataccgacagataaaaacttctccttcgacg
cgctccaaaagcaaatgagaatcagttctctcatttactgtgaatgtgaggggacaggaatgagaactgttaaggggca
attctcctgtattcaactatacaagccacgaagagactcagttctcggaaaggatgctggcatttaactgaagaccagatg
aaggcagcagctggagtgagctcgtcttctgaggggattctcattctggcaaaagagaagatagggccagcactaag
catcaatgaactgagcaactctgcaaaaggagagaaggtaattgtgctaattgggcaaggagacgtggtgttggtaataaacgg
aaacgggacttagcatacttagcagccagacagcaccaaaagaattcggatggccatcaattagctgcaatagtttaaaa
acgacctgttctact

SEQ ID NO: 14

PB1

agcgaaagcaggcaaacattggaatggaatgcaatccgacctacttcttctaaaagtcaggcacaataatgctataagcacaacttcccttatact
ggagaccctcttacgcatgggacaggaacaggatacacatgagatactgtcaacaggaacacatcagtaactcagaagaaggagatgacaac
aaacaccgaaactggagaccgcaactcaaccgatgtagggccactgccaagaagacaatgaaacaaagtggtatgccaacaagattgtgtatt
ggaggcgatggcttcttgaggaaatccatcctgtattttgaaactcgtgtattgaaacagtgagggtgttcagcaaacagagtagacaagct
gacacaaggccgacagacctatgactggactcaaatagaacccaactgctgcaacagcattggccaacacaatagaagtttcagatcaaatgg
cctcacggccaatgagctggaaggctcatagacttcttaaggatgtaaggagtaagaacaaagaagaatggggatcacaactcatttcag
agaaagagacgggtgagagaacaatgactaagaaatgataaacacagagaacaatgggttaaaagaagcagagattgaaacaaaggagttat
ctaattagagcattgacctgaacacatgaccaagatgctgagagagggaagctaaaacggagagcaattgcaacccagggatgcaaaata
gggggtttgtatactttgttagacaactggcaaggagataatgtagaacaactgaaacatcagggttccagttggaggcaatgagaagaagcaaa
gttgcaaatgttgaaggaagatgaccatctcaggacaccgaaacttcttccatcactgagataaaccaaatggaacgaaaatcag
aatcctcggatgttttggccatgacatataatgaccagaatcagcccgaatggttcgaaatgttctaagtattgctccaataatgttctcaaca
aaatggcgagactgggaaaagggtatattgttggagcaagagatgaaactagaactcaatacctgcaaaaatgctagcaagcatcgaattga
aatatttcaatgattcaacaagaaagagattgaaaaatccgaccgcttataagaggggactgcatcattgagccctggaaatgtagtgggcat
gtcaatattgaaagcactgtattaggcgtctcctcctgaatcttggaacaaagagataaccaagcactactggtgggagtgcttcaatcctc
gacgatttctcctgattgtgaatgacccaatcatgaaggatcagccggatcgacaggtttatcgaacctgtaagctacttggaaatcaatag
agcaagaaaagtcttaacaacagaaacaggtacatttgaattcaaaatgtttctatcgttatgggttggccaatcagcagtgaggctccca
gtttgggtgtctggatcaacgagtcagcggaatgagttattgggttactgtatcaaaaacaataatgataaaatgattggtccagcaaca
gctcaaatggccctcagttgtcatcaagattacaggtacacgtaccgatagtgacacacaatacaaaacccgagatcattgaaat
aaagaactgtgggagcaaacccgtccaagctggaactgctggtctccgacggaggcccaatttatacaaatagaaatctccacattcctgaa
gtctcctcaaaatgggaattgagtgatgaggattaccagggcgctttatgcaaccactgaaacatttgcagccataaaagaatgaaatcaatgaa
caatgagtgatgagccagcagatggtccgcaaaaacatggagtagtgctgttgcacaacacactcctggatcccaaaagaatcgatc
catcttgaatacaagtaaaaggagtagttaggagtaacaatgtaacaaaggctgctcaattttgaaaaattctccccagcttcataca
gaagaccagctgggataatcagatggtggagctatggttccagagcccgaattgatgacaggtgatttgcgaatcggaaagataaagaaga
agattcactgagatcatgaagatctgtccaccattgaaagctcagacggcaaaaatgtaatttagcttctctatgaaaaatgcttctgtt
ctact

SEQ ID NO: 15

Фиг. 8

PA

agcgaaagcaggctactgatccaaaatggaagatttggcgcacaatgcttcaatccgatgattgtcgagcttgcggaaaaacaatgaaagatg
 gggaggacctgaaaatcgaaacaacaaatctgagcaaatgactcacttggagatgcttcatgtattcagatcttccatcacaatgagc
 aaggcgatcaataatcgtagaactggatgccaatgactttgaaacagattgaaataatcgagggaagagatcgcaaatggcctgga
 cagtagtaaacagatatttcaacactacagggctgagaaaccaaagtttctaccagatttgatgattacaaggagaatgattcatcgaaattgg
 agtaacaaggagagaagtccacatactctggaaaaggccaataaaatctgagaaaacacatccacattttctgcttcaatgggga
 agaaatggccacaaggcagactacactctcgatgaagaagcagggttaggatcaaacagactattcaccataagacaagaatggccag
 cagaggcctctgggattccttctcagtcagtcgagagagagagaacaattgaaagggttgaaatcaggaacaatgagcaagcttgcg
 accaaagtctcccgcgaacttctcagccttgaatatttagagcctatggtgattggaaccggaacggcctacattgaggcgaagctgtca
 aatgtccaagaagtaaatgctagaattgaaccttttggaaaacaacaccagcacttagacttccgaatgggctccctgtctcagcggctcc
 aaattctgctgatggatgcttaaaattaagcattgaggacccaagtcaggaaggagagggaataccgctaataatgcaatgcaatgaga
 acattcttggatggaaggaacccaatgttgttaaacacacgaaaagggaataaaatcaaaatctctgtcatggaagcaagtactggcaga
 ctgaggacattgagaatgaggagaaaatccaagaactaaaataagaaaaaaagtcagctaaagtgaggcacttggatgagaacatggcagc
 cagaaaaggtagactttagcactgtaagatgtaggtgattgaaagcaatgatagtgatgacaggaattgaggtcctagcaagttgattc
 agaatgatttaacaaggcatgcgaactgacagattcaagctggatagagctcgatgagaatggagaagatggctccaattgaacacattgca
 gcatgagaaggaaatttccatcagaggtgtctcactgagagccacagaatacataatgaagggggtgacatcaatgcttgccttaatgc
 atctgtgacgaatggatgatttcaatattccaatgataagcaagtgtagaactaggagggaaggcgaagaccaactgtatggttcatc
 ataaaaggaaagatccacttaaggaatgacaccgactggtaaatttggagcatggattttctcactgacccaagactgaaccacataaat
 gggagaagtagctgttcttgatagatagagatgcttataagaagtcctataggccaggtttcaaggccatgttctgtatgtagaacaatgg
 aacctcaaaaataaaatgaaatggggaatggagatgaggcgttgcctcctcagctcaacaatgagagatgattgaaagctgagctct
 gtcaagaagaacatgaccaaaagattcttggagaacaatcagaaacatggccattggagagtcaccaaaaggagtgaggaaagttcca
 ttgggaaggctcaggaacttattagcaagtcggtattcaacagcttgatgcatctccaactagaaggattttcagctgaaatcaagaaaact
 ctcttatctgctcaggctctagggaacaactgaacctgggacttcttgggggctatatgaagcaatgaggagtcctgattatgatccc
 tgggttttgcctaatgcttctgttcaactccttctacacatgattgagtagttgtggcagtgctactattgctatcactgtccaaaaagta
 cttgtttctact

SEQ ID NO: 16

NP

agcaaaagcagggtagataatcactcagtgatgacataaaatcatggcgtcccaaggcaccacacggcttcaagaacagatggagactgatg
 gagaacccagaatgccactgaaatcagagcatccgtcggaataatgattgggaattggacgatttccatcacaatgtgcaaccgaactcaaa
 ctcagtgattatgaggacggttgaatccaaaacagcttaacaatagagagaatggctctctgctttgacgaaaggagaaataaacctggaa
 gaactccagtgccgggaaagatcctaagaaaactggaggactatatacaggagagtaaacggaagtgatgagagaactcatcctttatg
 acaagaagaaataaggcgaatctggcgaagctaataatggtgacgatgcaacggctggtctgactcacatgatgctggcattccaattga
 atgatcaacttatcagaggacaagactctgttcgacccggaatggatccaggatgtgctctctgatgcaaggttcaactctccataggaggtc
 ggagccgaggtgctcagtcacaaggagttggaacaatggtgatggaatggtcaggatgatcaaacctgggatcaatgatcggaactctggag
 gggtagaatggacgaaaaacaagaattgcttatgaaagaatgtgcaacattctcaagggaatattcaaaactgctgcaaaaaagcaatgatg
 gatcaagtgagagagagccggaacccagggaatgctgagtcgaagatctcatttctagcaggtctgcaactcatattgagaggtcgggtgctc
 acaagtctgcctgctgctgtgtatggacctgcccagtgaggtaagattgaaagagaggatactctctgctggaatagacctttc
 agactctcaaaaagcgaagtgtacagcctaatacagacaaatgagaatcagacacaagagtcactggtggtgagatgcaatctctgc
 cgcatttgaaatctaagatattaagcttcaaaaggacgaagggtctccaaagggaagcttccactagaggatgcaaatgcttccaat
 gaaaataggagactatggaatcaagtacactgaaagcaggtactggccataaggaccagaagtgaggaaacaacaaatcaacag
 agggcatctgcccgaatcagcacaactcactctcagtagagaaatctccctttgacagaacaacattatggcagctcaatggg
 aatacagagggaagaaatctgacatgaggaccgaatcataaggatgatggaagtgcaagaccagaagatgcttcttccagggcgggga
 gtcttcagctctcgacgaaaaggcagcagccgatgctgcttcttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgc
 agtacgacaataaagaaaataccctgtttctact

SEQ ID NO: 17

Фиг. 8 (Продолжение)

M

agcgaagcaggtagatattgaaagatgagcttctaaccgaggtcgaacgtactctctatcatcccgtcagggccccctcaaagccgagat
cgcacagagacttgaaagatgctttgcagggaagaacactgatcttgagggttctcatggaatggcctaaagacaagcaaatcctgtcacctctgact
aaggggattttaggattgtgttcacgctcaccgtgccagtgagcaggactgacgctagacgctttgtccaaaatggccttaatgggaacgggg
atccaaataacatggacaagcaggttaaactgtataggaagctcaagaggagataacattccatggggccaaagaatctcactcagttattctg
ctgggtgactgcccagttgatgggctcatatacaacaggtggggctgtgaccactgaagtggttggcctggtatgtgcaacctgtgaaca
gattgctgactcccagctcgggtctcataggcaaatgggtgacaacaaccaatccactaatcagacatgagaacagaatgggttttagccagcactac
agctaaggctatggagcaaatggctggatcagtgagcaagcagcagaggccatggagggtgctagtcaggctagacaaaagggtcaagcagtg
agaaccttgggactcatctagctccagtgctggctgaaaaatgatcttcttgaataatggcagcctatcagaacgaatgggggtgcagatgc
aacggtcaagtgatcctctcgtattgccgcaaatatcattgggatctgacttgatattgtggattcttgatcgtctttttcaaatgcattaccgt
cgcttaaacacggactgaaaggaggccttctacggaaggagtccaagctctatgagggaagaatatcgaaggcaacagcagagtgctgtgg
atgctgacgatggtcattttgtcagcatagagctggagtaaaaaactcctgttttact

SEQ ID NO: 18

HA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACCAAAatgaaggcaatactagtagttctgctatatacattgcaaccg
caaatgcagacacattatgtataggttatcgtcaacaattcaacagacactgtagacacagtagaaaagaatgtaacagt
aacacactctgttaacctctagaagacaagcataacgggaaactatgcaactaaggggtagccccattgcatgggtaa
atgtaaacattgctggctggatcctgggaaatccagagtgtgaatcactctccacagcaagttcatggtcctacattgtggaacat
ctagttcagacaatggaactgttaccaggagatttcatcaattatgaggagctaagagagcaattgagctcagtgctcatttg
aaagtttgagatattcccaaaaacagttcatggccaatcatgactcgaacaaagggttaacggcagctgctcacgctgg
agcaaaaagctctacaaaaatataatggctagttaaaaaaggaaattacacccaagctcagccaatctacattaatgat
aaagggaagaagctcctcgtgctgtgggctcaccatcctactactgctgaccaacaaagctctatcagaatgcagatg
catatgttttggggacatcaagatacagcaagaagttcaagccggaatagcaataagacccaaatgagggatcaagaag
ggagaatgacttactggacatagtagcgggagacaaaataacattcgaagcaactggaaatctagtggtaccgagat
atgattcacaatggaaagaatgctggatctggtattatcatttcagatacaccagctccagattgcaatacaactgtcagaca
cccagggtgctataaacaccagcctccattcagaataatcatccgatcacaattggaaaatgtccaaagatgtaaaaagca
caaaatggactggccacaggattgaggaatgtccgtctattcaatctagaggcctattcggggcattgcccgttcattgaa
gggggtggacagggatggtagatggatggatcggttatccatcaaatgagcaggggtcaggatgacagccgacctgaa
gagcacacaaaatgccattgacaagattactaacaagtaaaactctgttattgaaaagatgaatcacagttcacagcagtggtg
aaagagttcaaccacctggaaaaagaatagagaatataaaaaaagttgatggtttctggacattggacttacaatg
ccgaactgttggttctattggaaaatgaagaactttggactaccatgattcaaatgtgaagaactgtatgaaaaggtaagaaa
ccagttaaaaacaatccaaggaaatggaaacggctgttgaatttaccacaaatcgataaacctgctggaagtgc
aaaaatgggacttatgactacccaaaatactcagaggaagcaaaatataacagagaaaaatagatggggtaaaagtggaat
caacaaggattaccagattttggcgtatcactgtcggcagttcattgtgctggttagtctcctgggggcaatcagcttctg
gatgtgctctaaggtctctacagtgtagaatatgtattaaGATTAGAATTCAGAGATATGAGGAAAAACCCC
TTGTTTCTACT

SEQ ID NO: 19

Фиг. 8 (Продолжение)

NA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAAACAACCAAAAtgaaggcaatactagtagttctgctatatacattgcaaccgcaaa
 tgacagacattatgtataggttatcatgcaaaacattcaacagacactgtagacacagtagtagaaagaatgtaacagtaacacact
 ctgttaacctctagaagacaagcacaacgggaaactatgcaaaactaagagggttagccccattgctgggtaaatgtaacattgctg
 gctggatcctgggaaatccagagtgtgaatcactctccacagcaagttcatggtcctacattgtggaaacatctagttcagacaatggaa
 cgtgttaccaggagatttcatcaattatgaggagctaagagagcaattgagctcagtgatcatttgaagggttgagatattcccaa
 acaagttcatggccaatcatgactcgaacaaagggtgtaacggcagcatgtcctcacgctggagcaaaaagcttcaaaaaattaa
 tatggctagttaaaaaggaaattcataccaaagctcagccaatcctacattaatgataaagggaagaagtcctctgctgtggggc
 attcaccatcctactactgctgccaacaaagctctatcagaatgcagatgcatatgttttggggacatcaagatacagcaaga
 agttcaagccggaaatagcaataagaccaagtgagggatcaagaaggagaatgaactattactggacactagtagagccgggag
 acaaaaatacattcgaagcaactggaatctagtggtaccgagatgattcattcaatggaaagaatgctggatcgggtattatcattt
 cagatacaccagtcacgattgcaatacaactgtcagacacccagggtgctataaacaccagcctccattcagaatatacatccga
 tcacaattggaaatgtcaaaagatgtaaaagcacaattgagactggccacaggattgaggaatgtcccgtctattcaatctaga
 ggccattcggggccattgccggcttattgaaggggggtggacaggatggtagatggatggtacggttaccatcaaaatgagca
 ggggtcaggatgtagccgacctgaagagcacaacaaatgccattgacaagattactaacaagaactctgttattgaaagatg
 aatacagttcacagcagtggtgaaagagtcaaccacctggaaaaagaatagaatataaaagttgatgatggttctt
 ggacattggacttacaatgccgaactgtggttctattgaaaatgaaagaacttggactaccatgattcaaatgtgaagaactgtat
 gaaaaggttaagaaccagttaaaaacaatgccaaggaaatggaaaaggctgttgaatttaccacaatgcgataacacgtgca
 tggaaagtgtcaaaaatggacttactgactcccaaaatcagaggaagcaaaatataacagagaaaaaatagatggggtaagc
 tggaaatcaacaagattaccagatttggcgatcttcaactgtccagttcattggtgctgtagtctccctgggggcaatcagctt
 tggatgtgctcaatgggtctcactagtgagaatgtatttaaGATTAGAATTTAGAGATATGAGGAAAAACACCCCTT
 GTTTCTACT

SEQ ID NO: 20

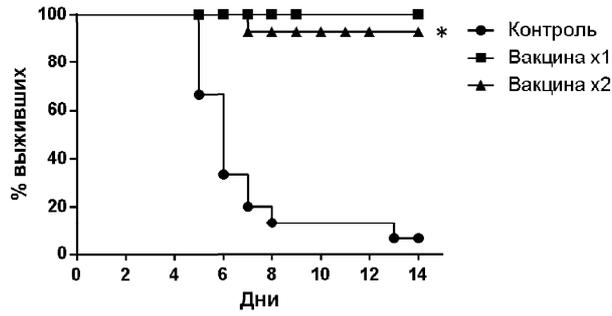
NS

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGATTGCTTCTTTGG
 CATGTCCGCAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAA
 ATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGAAAGCAGATAGTG
 GAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGCACTTAAAATGACCATGCGCTCTGTACCTGCGTCCGTTACCTA
 ACCGACATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCTT
 TTGATCAGAATGGACCAGGCGATCATGggaggaggttcttcggagctattgctggttcttgggaaggaggatgggaaggaaatgatt
gcaggttggggaggaagagagagccggaaccagggaatgcttgataataagcggccgcAGTGTGATTTTTGACCGCTGGAGAC
 TCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTGCTTCTTCCAGG
 ACATACTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTC
 GAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTCGCTTGAGAAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCAAAA
 CAGAAACGAGAAATGGCGGAAACAATTAGGTCAGAAAGTTGAAGAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAG
 ACACAACTGAAGGTAACAGAGAATAGTTTTGAGCAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGT
 GGAGCAAGAGATAAGAACTTCTCATTTACGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCCTTGTCTACT

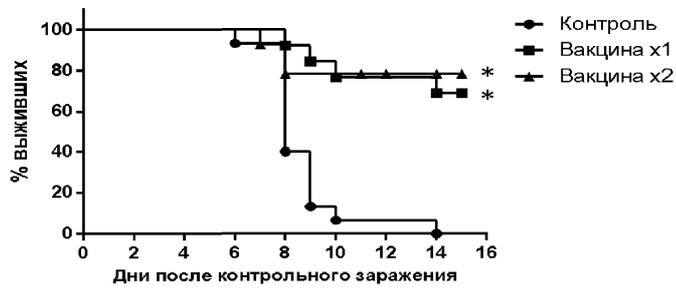
SEQ ID NO: 21

Фиг. 8 (Продолжение)

(A) A/California/07/09pdm

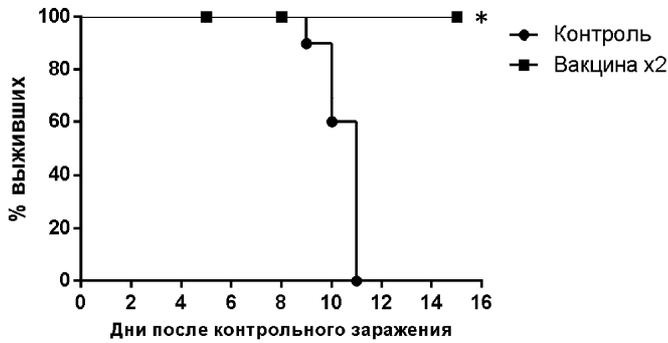


(B) A/Aichi/2/68 (H3N2)

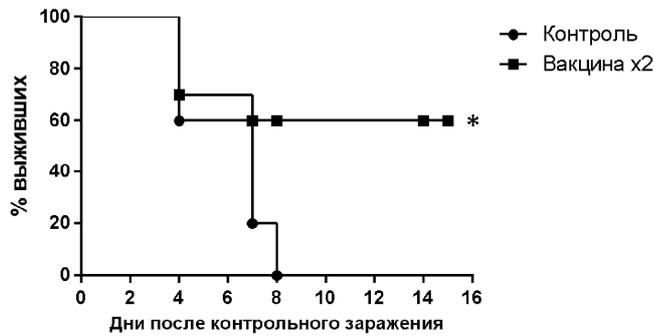


Фиг. 9

(C) A/Mississippi/85/1 (H3N2)

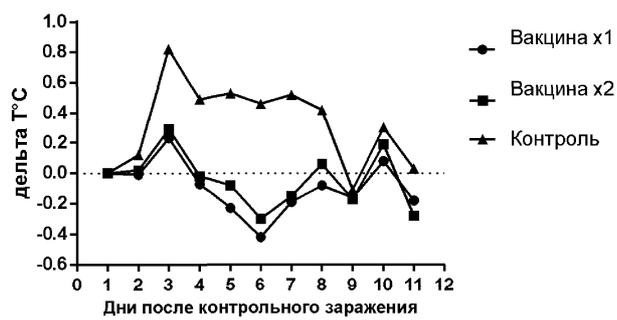


(D) B/Lee/40

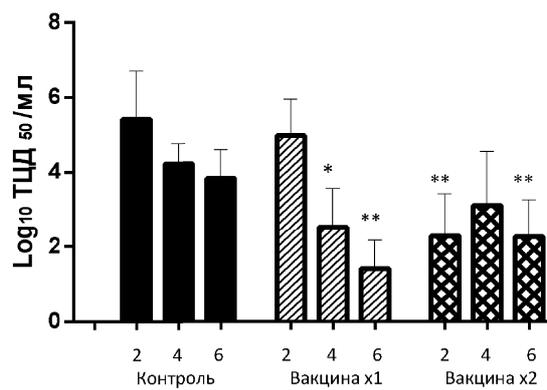


Фиг. 9 (Продолжение)

(A)



(B)



Фиг. 10

