

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092447 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.26

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.20

(54) ОБРАТНАЯ ПЕПТИДНАЯ ВАКЦИНА

(31) 62/673,647

(32) 2018.05.18

(33) US

(86) PCT/GB2019/051386

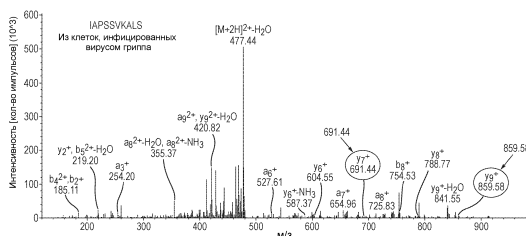
(87) WO 2019/220150 2019.11.21

(71) Заявитель:
ЭМЕРДЖЕКС ВАКСИНС ХОЛДИНГ
ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Филип Рамила (US), Перринс Др
Ричард Дэвид (GB), Хуан Сяофан
(US), Рейдмечер Томас (GB), Аптон
Кристофер (CA)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к вакцинным композициям, содержащим пептиды, кодируемые открытой рамкой считывания (ОРС), кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, и к применению таких композиций для лечения и профилактики вирусных инфекций.



202092447

A1

A1

202092447

ОБРАТНАЯ ПЕПТИДНАЯ ВАКЦИНА

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к вакцинным композициям, содержащим пептиды, кодируемые открытой рамкой считывания (ОРС), кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, и к применению таких композиций для лечения и профилактики вирусных инфекций.

Уровень техники

Грипп является значимой глобальной проблемой здравоохранения, ежегодно инфицируя до 20% населения мира и вызывая до 5 миллионов случаев тяжелых заболеваний и > 300000 смертельных случаев во всем мире. Только в США, согласно расчетам, > 30000 смертей и около 300000 случаев госпитализации в год связаны с инфекцией гриппа. С учетом недавнего появления нового, тяжелого и потенциально рецидивирующего сезонного заболевания, Всемирная организация здравоохранения стимулирует развернутые кампании вакцинации, снижающие заболеваемость пневмонией, вызванной гриппом. Для эффективного снижения заболеваемости гриппом потребуется непрерывный интенсивный надзор, возрастающее применение доступных в настоящее время вакцин против гриппа и доступность альтернативных вакцин и противовирусных лекарственных средств, которые могут обеспечить расширенную защиту от штаммов вируса гриппа, подверженным антигенному дрейфу и мутациям сдвига. Успешные кампании вакцинации от гриппа могут оказывать колоссальное влияние на общество и экономику.

Иммунный ответ на вирус гриппа регулируется как врожденным, так и адаптивным иммунитетом. Врожденный иммунный ответ на вирус гриппа ограничивает исходную репликацию вируса, но является относительно неспецифичным. Эффективное уничтожение вируса гриппа требует надежного адаптивного иммунного ответа. Обычные вакцины от гриппа направлены на стимуляцию такого адаптивного иммунного ответа и индуцируют гуморальный иммунитет против вируса гриппа. Гуморальный иммунитет, опосредованный секреторными антителами IgA и IgM, обеспечивает защиту от развития начальной инфекции, в то время как антитела IgG нейтрализуют вновь реплицируемый вирус при установившейся инфекции. CD4⁺ Т-клеточные реакции могут способствовать

развитию гуморального иммунитета и играют роль в переключении изотипа на IgG и в образовании антител с повышенным сродством и CTL-памяти. Это подтверждается результатами, показывающими, что гемагглютинин (HA)-специфичные CD4⁺ Т-клетки пролиферируют в организме человека после вакцинации от гриппа и способствуют развитию реакций на основе гетеросубтипических антител против вируса гриппа.

Несмотря на свою способность индуцировать гуморальный иммунитет, обычные вакцины против гриппа не обеспечивают полной защиты. Это по меньшей мере частично обусловлено наличием антигенных изменений. Кроме того, считается, что иммунитет, опосредованный клетками, может играть ключевую роль в защите против гриппа. CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) опосредуют уничтожение вируса; продемонстрировано, что они обеспечивают перекрестные реакции на различные подтипы вируса гриппа А. Это может помочь объяснить относительно низкую распространенность заболевания среди индивидов пожилого возраста, вакцинированных против гриппа или ранее подвергавшихся многократному воздействию вируса гриппа.

Вакцины от гриппа в настоящее время присутствуют в продаже и ежегодно обновляются. Их конструкция основана на ежегодных рекомендациях ВОЗ по штаммам, и их производят до начала сезона или пандемии гриппа. Современные вакцины от гриппа вызывают протективный гуморальный иммунный ответ против гликопротеинов HA и нейраминидазы (NA) на поверхности вириона. В то же время гликопротеины HA и NA вируса в высокой степени подвержены частому и непредсказуемому антигенному дрейфу и менее частым, но вызывающим больший эффект мутациям сдвига, что приводит к утрате распознавания антителом. Это обуславливает необходимость частой разработки новых вакцин, соответствующих текущему(им) серотипу(ам) вируса, инфицирующего население. Соответственно, существующие вакцины от гриппа дороги в производстве и с низкой вероятностью будут защищать от новых штаммов, появляющихся в середине сезона (например, свиного гриппа 2009 H1N1, H5N1, H7N9). Кроме того, эти вакцины предназначены для обеспечения защиты на основе антител, а индукции иммунитета, опосредованного клетками и важного для уничтожения клеток, инфицированных вирусом, в организме, уделяют недостаточное внимание.

FDA одобрила несколько четырехвалентных вакцин (защищающих от двух вирусов гриппа А и двух вирусов гриппа В). Хотя эти вакцины обеспечивают

расширенную защиту по сравнению с обычными вакцинами от гриппа, они все же с низкой вероятностью защищают от новых штаммов, появляющихся в середине сезона, или новых пандемических штаммов, а также дороги в производстве. Кроме того, четырехвалентные вакцины, как и обычные вакцины от гриппа, не
5 предназначены для индукции иммунитета, опосредованного клетками, который важен для уничтожения клеток, инфицированных вирусом, в организме.

Поэтому желательна разработка «универсальной» вакцины от гриппа, обеспечивающей широкую защиту от всех сезонных штаммов гриппа и пандемических штаммов в течение нескольких лет или даже всей жизни. Разработка
10 эффективной универсальной вакцины от гриппа могла бы снизить опасения по поводу будущих пандемий гриппа и могла бы обходиться дешевле, чем ежегодная разработка, производство и применение вакцин от сезонного гриппа, практикуемые в настоящее время.

15 **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к вакцинным композициям, содержащим иммуногенные пептиды, кодируемые открытой рамкой считывания (ОРС), кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса, например, вируса гриппа, в противоположном направлении к РНК положительной полярности,
20 способной к трансляции. Иммуногенный пептид содержит эпитоп, который может распознавать CD8⁺ Т-клетка.

Как ни странно, авторы настоящего изобретения выявили ряд пептидов, презентруемых молекулами МНС I класса на клетках, инфицированных вирусом гриппа, и кодируемых ОРС, кодируемой фрагментом отрицательной геномной цепи 8
25 сегмента вируса гриппа. Эта ОРС характеризуется широкой консервативностью среди вирусов гриппа человека, и поэтому считается, что она придает селективное преимущество таким вирусам. Включение одного или более пептидов, кодируемых консервативной ОРС, в вакцинную композицию может придать протективную способность против многих штаммов вируса гриппа, что позволит преодолеть
30 проблемы, вызванные их склонностью к антигенным сдвигам и дрейфу. Включение множества таких пептидов, каждый из которых способен связываться со своим супертипом HLA, в вакцинную композицию может позволить получить вакцину широкого спектра, эффективно действующую у лиц с различными типами HLA.

Авторы настоящего изобретения считают, что клетки, инфицированные другими оцРНК-содержащими вирусами, например, филовирусами или флавивирусами, также могут презентировать пептиды, кодируемые консервативной ОРС, кодируемой фрагментом генома в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, на молекулах МНС I класса. Включение одного или более из этих пептидов в вакцинную композицию может придать возможность защиты от нескольких видов, штаммов или серотипов вирусов, обеспечивая перекрестную защиту в пределах семейства вирусов.

Соответственно, в настоящем изобретении предложена вакцинная композиция, содержащая иммуногенный пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания (ОРС), кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены:

- способ профилактики или лечения вирусной инфекции, включающий введение вакцинной композиции согласно настоящему изобретению индивиду, инфицированному или подвергающемуся риску инфицирования оцРНК-содержащим вирусом;

- способ выявления иммуногенного пептида, содержащего CD8+ Т-клеточный эпитоп ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, посредством:

(a) выявления ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции;

(b) прогнозирования последовательности полипептида, кодируемого ОРС;
и

(c) оценки того, содержит ли пептид, связывающий молекулу МНС I класса, последовательность, присутствующую в прогнозируемой последовательности,

что позволяет выявить иммуногенный пептид, содержащий эпитоп, который может распознавать CD8+ Т-клетка;

- иммуногенный пептид, содержащий CD4+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего

вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции; и

- способ определения пандемического потенциала вируса гриппа А, включающий этапы: (i) выявления первой ОРС, кодируемой по меньшей мере частью 8 сегмента генома вируса гриппа А в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции; (ii) определения количества кодонов, содержащихся в первой ОРС; и (iii) сравнения количества кодонов, содержащихся в первой ОРС, с количеством кодонов, содержащихся во второй ОРС, кодируемой по меньшей мере частью 8 сегмента генома вируса гриппа А в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, причем различие в количестве кодонов в первой ОРС по сравнению со второй ОРС является показателем пандемического потенциала.

15 **Краткое описание чертежей**

Фигура 1: Сравнение масс-спектров IAPSSVKALS из клеток, инфицированных вирусом гриппа А (А), и синтетического пептида IAPSSVKALS (В). Некоторые типичные ионы в каждом спектре обведены кружком, чтобы подчеркнуть идентичность синтезированного пептида из инфицированных клеток.

- 20 Фигура 2: Сравнение масс-спектров LMQRGPSTF из клеток, инфицированных вирусом гриппа А (А), и синтетического пептида LMQRGPSTF (В). Некоторые типичные ионы в каждом спектре обведены кружком, чтобы подчеркнуть идентичность синтезированного пептида из инфицированных клеток.

- 25 Фигура 3: Сравнение масс-спектров KITLKFAFNMM из клеток, инфицированных вирусом гриппа А (А), и синтетического пептида KITLKFAFNMM (В). Некоторые типичные ионы в каждом спектре обведены кружком, чтобы подчеркнуть идентичность синтезированного пептида из инфицированных клеток.

Фигура 4: Выравнивание полипептидных последовательностей NEG8 SEQ ID NO: 1 и 3 - 15.

- 30 Фигура 5: Длина ОРС в зависимости от года. На диаграмме показано количество собранных вирусов гриппа А (по оси Y) в зависимости от года и месяца сбора (по оси X). Цветовая кодировка показывает длину ОРС, присутствующих в вирусах, собранных в каждый момент времени.

Фигура 6: Идентичность ОРС в зависимости от года. Цветовая кодировка показывает серотип каждого вируса на графике.

Фигура 7: Идентичность ОРС в зависимости от года. Цветовая кодировка показывает серотип каждого вируса на графике.

5 Фигура 8: Длина ОРС, преобладающих в различных разновидностях вируса гриппа А.

Подробное описание изобретения

10 **Вакцинные композиции**

В настоящем изобретении предложена вакцинная композиция, содержащая иммуногенный пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. У данной вакцинной композиции есть ряд преимуществ, которые станут очевидны из приведенного ниже описания. Сводная информация о ключевых преимуществах приведена в настоящем разделе.

Во-первых, вакцинная композиция согласно настоящему изобретению содержит пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, например, эпитоп, приведенный в SEQ ID NO: 5 - 41 и вновь выявленный авторами настоящего изобретения. Таким образом, вакцинная композиция может стимулировать клеточный иммунный ответ (например, CD8⁺ Т-клеточный ответ) против оцРНК-содержащего вируса. CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) опосредуют уничтожение вируса за счет своей цитотоксической активности против инфицированных клеток.

25 Стимуляция клеточного иммунитета может обеспечить эффективную защиту от вирусной инфекции, например, инфекции вируса гриппа, флавивируса или филовируса.

Во-вторых, ОРС, кодирующая эпитоп, содержащийся в иммуногенном пептиде, может быть консервативной среди нескольких вирусов. Эпитоп сам по себе может быть консервативным среди нескольких вирусов. Например, ОРС и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А человека. Таким образом, вакцинная композиция может обеспечить перекрестную защиту от множества вирусов гриппа А человека. Следовательно, вакцинная композиция согласно настоящему изобретению подходит для обеспечения профилактики широкого спектра

против вирусов гриппа А человека, помогая решить проблемы, вызванные антигенным сдвигом и антигенным дрейфом, к которым склонны вирусы гриппа А человека. Другими словами, одна вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может индуцировать протективный иммунитет против широкого спектра существующих и новых вирусов гриппа А человека, снижая или устраняя потребность в разработке новой сезонной вакцины от гриппа каждый год.

ОРС и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А человека и вирусов гриппа А свиней, лошадей и/или птиц. Следовательно, вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может предотвращать адаптацию вирусов гриппа А свиней, лошадей и/или птиц к популяциям человека. Другими словами, вакцинная композиция согласно настоящему изобретению, защищая от существующих и новых вирусов гриппа А человека, также может предотвращать преодоление межвидового барьера вирусами гриппа А свиней, лошадей и/или птиц. Это может предотвращать появление пандемических вирусов гриппа А.

В-третьих, иммуногенный пептид, содержащийся в вакцинной композиции согласно настоящему изобретению, может связываться с различными серотипами HLA. Включение нескольких пептидов, каждый из которых содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, способный связываться с различными супертипами HLA, позволяет получить вакцинную композицию, эффективно действующую у лиц с различными типами HLA. Следовательно, одну вакцинную композицию можно использовать для защиты значительной доли населения против оцРНК-содержащего вируса. Это обеспечивает дешевые средства контроля заболеваемости и распространения вирусной инфекции.

В-четвертых, полипептид, кодируемый ОРС, может усиливать устойчивость оцРНК-содержащего вируса в организме человека. Другими словами, полипептид может придавать оцРНК-содержащему вирусу, кодирующему его, селективное преимущество. Таким образом, мишенью вакцинной композиции согласно настоящему изобретению могут являться эпитопы, ассоциированные с оцРНК-содержащими вирусами, обладающими селективным преимуществом. Таким образом, вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может быть сконструирована надлежащим образом, обеспечивая эффективную профилактику против новых и/или потенциально пандемических штаммов оцРНК-содержащего вируса.

В-пятых, иммуногенный пептид, содержащийся в вакцинной композиции согласно настоящему изобретению, может быть присоединен к наночастице, например, наночастице золота. Как подробно описано ниже, присоединение к наночастице снижает или устраняет потребность во включении адьюванта в вакцинную композицию. Таким образом, вакцинная композиция согласно настоящему изобретению с меньшей вероятностью должна вызывать нежелательные клинические эффекты при введении в организм индивида.

Обратные пептидные вакцины

10 Вирусы, содержащие одноцепочечную РНК (оцРНК), подразделяются на вирусы положительной полярности или отрицательной полярности в зависимости от направления полярности их геномной РНК. В вирусе, содержащем оцРНК отрицательной полярности, геномная РНК отрицательной полярности (от 3' к 5') комплементарна мРНК и в общем случае перед трансляцией должна быть преобразована в РНК положительной полярности РНК-полимеразой. В вирусе, содержащем оцРНК положительной полярности, геномная РНК положительной полярности (от 5' к 3') может также служить в качестве мРНК и транслироваться с образованием белка в клетке-хозяине. Таким образом, репликация вируса, содержащего оцРНК отрицательной полярности, обычно происходит после транскрипции генома с образованием мРНК, комплементарной геному, и трансляции этой мРНК. Репликация вируса, содержащего оцРНК положительной полярности обычно происходит после трансляции геномной РНК, которая удваивается в виде мРНК.

Традиционно считается, что РНК отрицательной полярности оцРНК-содержащих вирусов является некодирующей. В то же время возможна неканоническая трансляция. По-видимому, геномная РНК отрицательной полярности вируса гриппа фактически может транслироваться в направлении от 5' к 3' с образованием продуктов генов в дополнение к продуктам, полученным посредством канонической трансляции (т.е. транскрипции в направлении от 3' к 5' с образованием комплементарной мРНК и трансляции этой мРНК в направлении от 5' к 3'). Аналогичным образом, РНК, комплементарная геному вирусов, содержащих оцРНК положительной полярности, фактически может транслироваться.

Авторы настоящего изобретения получили данные, демонстрирующие, что полипептиды, полученные при неканонической трансляции оцРНК-содержащих

вирусов, могут содержать пептиды, распознаваемые иммунной системой индивида, инфицированного оцРНК-содержащим вирусом. Например, полипептид, полученный при неканонической трансляции оцРНК-содержащих вирусов, может содержать пептид, способный презентироваться молекулой МНС I класса и распознаваться Т-клеточным рецептором (TCR), присутствующим на CD8+ Т-клетке. Другими словами, полипептид, полученный при неканонической трансляции оцРНК-содержащих вирусов, может содержать пептид, представляющий собой CD8+ Т-клеточный эпитоп. Такой иммуногенный пептид можно ввести индивиду, например, в вакцинной композиции, с целью индукции иммунного ответа против оцРНК-содержащего вируса. Таким образом может достигаться профилактика и/или лечение.

Соответственно, в настоящем изобретении предложена вакцинная композиция, содержащая иммуногенный пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.

Иммуногенные пептиды

Иммуногенный пептид представляет собой пептид, способный вызывать иммунный ответ. Вакцинная композиция согласно настоящему изобретению содержит иммуногенный пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Вакцинная композиция может содержать от приблизительно одного до приблизительно 50 таких иммуногенных пептидов, например, от приблизительно 2 до 40, от 3 до 30, от 4 до 25, от 5 до 20, от 6 до 15, 7, 8, 9 или 10 таких иммуногенных пептидов.

Иммуногенный пептид содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп. CD8+ Т-клеточный эпитоп представляет собой пептид, способный (i) презентироваться молекулой МНС I класса и (ii) распознаваться Т-клеточным рецептором (TCR), присутствующим на CD8+ Т-клетке. Распознавание TCR предпочтительно приводит к активации CD8+ Т-клетки. Активация CD8+ Т-клетки может привести к усиленной пролиферации, продукции цитокинов и/или цитотоксическим эффектам. Обычно длина CD8+ Т-клеточного эпитопа составляет приблизительно 9 аминокислот. CD8+ Т-клеточный эпитоп может быть короче или длиннее указанного значения. Например,

длина CD8⁺ Т-клеточного эпитопа может составлять приблизительно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. Длина CD8⁺ Т-клеточного эпитопа может составлять от приблизительно 8 до 15, от 9 до 14 или от 10 до 12 аминокислот.

CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, содержащийся в иммуногенном пептиде, получен из полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Другими словами, CD8⁺ Т-клеточный эпитоп может в естественных условиях содержаться в или образовывать часть полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Полипептид может экспрессироваться на поверхности оцРНК-содержащего вируса или внутри клетки в составе оцРНК-содержащего вируса. Экспрессия полипептида вирусом может быть временной, т.е. полипептид может экспрессироваться оцРНК-содержащим вирусом только в некоторые моменты его жизненного цикла и/или при некоторых условиях окружающей среды. В качестве альтернативы, оцРНК-содержащий вирус может характеризоваться непрерывной экспрессией полипептида. Полипептид может являться структурным пептидом или функциональным пептидом, например, пептидом, вовлеченным в метаболизм или репликацию оцРНК-содержащего вируса. Однако в некоторых случаях назначение и/или функция полипептида могут быть неизвестны.

Полипептид, дающий начало CD8⁺ Т-клеточному эпитопу, может усиливать устойчивость оцРНК-содержащего вируса в организме человека. Например, полипептид может улучшать выживаемость и/или репликацию вируса в клетке-хозяине человека. Соответственно, полипептид может придавать оцРНК-содержащему вирусу селективное преимущество. Другими словами, экспрессия полипептида может позволить оцРНК-содержащему вирусу лучше выживать и/или размножаться по сравнению с оцРНК-содержащим вирусом, не экспрессирующим полипептид. В этом случае процесс эволюционного отбора может отбирать вирусы, в которых по меньшей мере часть генома кодирует ОРС, кодирующую полипептид, в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Таким образом, ОРС (и, соответственно, полипептид) может являться консервативным среди различных оцРНК-содержащих вирусов определенного типа. Например, ОРС и/или полипептид могут быть консервативными среди различных штаммов вируса гриппа А или различаться среди флавивирусов (например, между

вирусом Зика и вирусом денге). ОРС (и, соответственно, полипептид) являются консервативными среди двух или более различных оцРНК-содержащих вирусов при наличии по меньшей мере 20% (например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичности между ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома каждого вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.

Иммуногенный пептид может содержать только один CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. В качестве альтернативы, иммуногенный пептид может содержать два или более, например, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, одиннадцать или более или двенадцать или более таких эпитопов.

Иммуногенный пептид может содержать вместе с CD8+ Т-клеточным(и) эпитопом(ами) полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, один или более из других CD8+ Т-клеточных эпитопов, один или более из CD4+ Т-клеточных эпитопов и/или один или более из В-клеточных эпитопов. Например, иммуногенный пептид может содержать один или более, например, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более CD8+ Т-клеточных эпитопов, не являющихся CD8+ Т-клеточным эпитопом полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Иммуногенный пептид может содержать один или более, например, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более CD4+ Т-клеточных эпитопов. Иммуногенный пептид может содержать один или более, например, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более В-клеточных эпитопов.

Иммуногенный пептид предпочтительно содержит одну или более из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 5 - 41.

Вакцинная композиция может содержать два или более иммуногенных пептида, например, от приблизительно одного до приблизительно 50, от 2 до 40, от 3 до 30, от 4 до 25, от 5 до 20, от 6 до 15, 7, 8, 9 или 10 иммуногенных пептидов. В этом случае каждый из двух или более иммуногенных пептидов может, например, представлять собой иммуногенный пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. В качестве альтернативы, вакцинная композиция может содержать смесь (i) иммуногенных пептидов, содержащих CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, и (ii) других иммуногенных пептидов.

Вакцинная композиция может содержать два или более иммуногенных пептида, каждый из которых содержит свой CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Другими словами, вакцинная композиция может содержать два или более иммуногенных пептида, каждый из которых содержит свой фрагмент полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Предпочтительно, указанный фрагмент является иммуногенным. Вакцинная композиция может содержать от приблизительно одного до приблизительно 50, от 2 до 40, от 3 до 30, от 4 до 25, от 5 до 20, от 6 до 15, 7, 8, 9 или 10 иммуногенных пептидов, каждый из которых содержит свой CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. В некоторых аспектах каждый из иммуногенных пептидов может взаимодействовать со своим подтипом HLA, как подробно описано ниже.

Вакцинная композиция может содержать (i) один или более (например, от приблизительно 2 до 40, от 3 до 30, от 4 до 25, от 5 до 20, от 6 до 15, 7, 8, 9 или 10) иммуногенных пептидов, каждый из которых содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-

содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, и (ii) один или более из других иммуногенных пептидов (т.е. иммуногенных пептидов, не содержащих CD8+ Т-клеточного эпитопа полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции). Таким образом, другие иммуногенные пептиды могут содержать один или более эпитопов, например, от приблизительно 2 до 40, от 3 до 30, от 4 до 25, от 5 до 20, от 6 до 15, 7, 8, 9 или 10 эпитопов. Эпитоп может представлять собой В-клеточный эпитоп, CD4+ Т-клеточный эпитоп и/или CD8+ Т-клеточный эпитоп. CD4+ Т-клеточный эпитоп может, например, представлять собой пептид, экспрессируемый одним или более из оцРНК-содержащих вирусов и способный (i) презентироваться молекулой МНС II класса и (ii) распознаваться Т-клеточным рецептором (TCR), присутствующим на CD4+ Т-клетке. В качестве альтернативы, CD4+ Т-клеточный эпитоп может представлять собой CD4+ Т-клеточный эпитоп, не экспрессируемый одним или более оцРНК-содержащими вирусами. CD8+ Т-клеточный эпитоп может, например, представлять собой пептид, экспрессируемый одним или более из оцРНК-содержащих вирусов и способный (i) презентироваться молекулой МНС I класса и (ii) распознаваться Т-клеточным рецептором (TCR), присутствующим на CD8+ Т-клетке. CD8+ Т-клеточный эпитоп предпочтительно представляет собой CD8+ Т-клеточный эпитоп, не являющийся CD8+ Т-клеточным эпитопом полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. CD8+ Т-клеточный эпитоп может представлять собой CD8+ Т-клеточный эпитоп, не экспрессируемый одним или более оцРНК-содержащими вирусами.

В данной области техники известно большое количество В-клеточных эпитопов, CD4+ Т-клеточных эпитопов и CD8+ Т-клеточных эпитопов (например, В-клеточных эпитопов, CD4+ Т-клеточных эпитопов и CD8+ Т-клеточных эпитопов оцРНК-содержащих вирусов). В данной области техники известны способы выявления В-клеточных эпитопов, CD4+ Т-клеточных эпитопов и CD8+ Т-клеточных эпитопов. Способы картирования эпитопов включают рентгеновскую совместную кристаллографию, матричное сканирование олигопептидов (иногда называемое сканированием перекрывающихся пептидов или пепскан-анализом), сайт-специфический мутагенез, высокопроизводительное картирование мутагенеза,

водород-дейтериевый обмен, масс-спектрометрию, сопряженную с перекрестным связыванием, фаговый дисплей и ограниченный протеолиз. Кроме того, можно применять методологию прогнозирования МНС-мотива. CD8+ Т-клеточные эпитопы, презентруемые клетками, инфицированными оцРНК-содержащими вирусами, можно выявлять с целью непосредственного выявления CD8+ Т-клеточных эпитопов для включения в вакцинную композицию, как описано ниже.

Любой из иммуногенных пептидов, описанных в настоящем документе, может содержать любое количество аминокислот, т.е. характеризоваться любой длиной. Обычно длина иммуногенного пептида составляет от приблизительно 8 до приблизительно 30, 35 или 40 аминокислот, например, от приблизительно 9 до приблизительно 29, от приблизительно 10 до приблизительно 28, от приблизительно 11 до приблизительно 27, от приблизительно 12 до приблизительно 26, от приблизительно 13 до приблизительно 25, от приблизительно 13 до приблизительно 24, от приблизительно 14 до приблизительно 23, от приблизительно 15 до приблизительно 22, от приблизительно 16 до приблизительно 21, от приблизительно 17 до приблизительно 20 или от приблизительно 18 до приблизительно 29 аминокислот.

Любой из иммуногенных пептидов, описанных в настоящем документе, можно получить химическими способами из полипептидного антигена, например, путем протеолитического расщепления. Более типично, иммуногенный пептид можно синтезировать с помощью общеизвестных в данной области техники способов.

Термин "пептид" включает не только молекулы, в которых аминокислотные остатки соединены пептидными (-CO-NH-) связями, но и молекулы, в которых пептидная связь обращена. Такие ретро-инверсные соединения, имитирующие пептиды, можно получить с помощью способов, известных в данной области техники, например, описанных в Meziere et al (1997) J. Immunol.159, 3230-3237. Этот подход включает получение псевдопептидов, содержащих изменения, вовлекающие каркас, а не ориентацию боковых цепей. Meziere et al (1997) продемонстрировали, что по меньшей мере для МНС II класса и реакций на основе Т-хелперов можно применять эти псевдопептиды. Ретро-инверсные пептиды, содержащие NH-CO-связи вместо CO-NH-пептидных связей, значительно более устойчивы к протеолизу.

Аналогичным образом, пептидная связь может вообще не требоваться при условии использования соответствующей линкерной группы, сохраняющей пространство между атомами углерода аминокислотных остатков, причем особенно

предпочтительна линкерная группа, характеризующаяся по существу тем же распределением заряда и по существу той же планарностью, что и пептидная связь. Кроме того, следует принимать во внимание, что пептид можно заблокировать по N- или C-концу, что помогает снизить подверженность экзопротеолитическому гидролизу.. Например, N-концевую аминогруппу пептидов можно защитить путем реакции с карбоксильной группой, а C-концевую карбоксильную группу пептида можно защитить путем реакции с амином. Другие примеры модификации включают гликозилирование и фосфорилирование. Еще одна возможная модификация состоит в том, что атомы водорода на аминогруппах боковой цепи R или K можно заменить метиленовыми группами (-NH₂ можно модифицировать до -NH(Me) или -N(Me)₂).

Термин «пептид» также включает варианты пептидов, увеличивающие или уменьшающие период полувыведения пептида *in vivo*. Примеры аналогов, способных увеличить период полувыведения пептидов, используемых в соответствии с настоящим изобретением, включают пептоидные аналоги пептидов, производные пептидов, содержащие D-аминокислоты, и пептид-пептоидные гибриды. Еще один вариант реализации варианта полипептидов, используемых в соответствии с настоящим изобретением, включает D-аминокислотные формы полипептида. Получение полипептидов с использованием D-аминокислот вместо L-аминокислот сильно снижает нежелательное разрушение такого агента в ходе обычных метаболических процессов, уменьшая количество агента, которое требуется ввести, а также частоту его введения.

Открытая рамка считывания (ОРС)

CD8+ Т-клеточный эпитоп, содержащийся в иммуногенном пептиде, получен из полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.

Рамка считывания - это группировка трех последовательных нуклеотидов в нуклеотидной последовательности, например, последовательности РНК, содержащая кодоны для аминокислот, кодируемых нуклеотидной последовательностью. ОРС представляет собой часть рамки считывания, которую можно транслировать. ОРС представляет собой непрерывную последовательность кодонов, содержащую начальный кодон и стоп-кодон. В пределах ОРС иницирующий кодон (например, ATG) может служить сайтом инициации трансляции РНК в белок.

В настоящем изобретении ОРС кодируется по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. В вирусе, содержащем оцРНК отрицательной полярности, ОРС присутствует в геномной РНК (обычно считающейся цепью отрицательной полярности) и может, например, транслироваться без промежуточной трансляции. В вирусе, содержащем оцРНК положительной полярности, геномная РНК вируса характеризуется той же полярностью, что и мРНК, и может транслироваться без промежуточной транскрипции, т.е. геномная РНК удваивается в виде мРНК. В данном случае ОРС кодируется в противоположном направлении к геномной РНК вируса и, таким образом, мРНК.

ОРС может, например, кодироваться всем геномом оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. В качестве альтернативы ОРС может кодироваться лишь некоторой частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Например, ОРС может кодироваться от приблизительно 1% до приблизительно 99%, например, от приблизительно 2% до приблизительно 98%, от приблизительно 3% до приблизительно 97%, от приблизительно 5% до приблизительно 95%, от приблизительно 10% до приблизительно 90%, от приблизительно 15% до приблизительно 85%, от приблизительно 20% до приблизительно 80%, от приблизительно 25% до приблизительно 75%, от приблизительно 30% до приблизительно 70%, от приблизительно 40% до приблизительно 60% или от приблизительно 50% генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.

Некоторые оцРНК-содержащие вирусы имеют сегментированный геном. ОРС может полностью или частично кодироваться сегментом генома в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Например, ОРС может кодироваться от приблизительно 1% до приблизительно 99%, например, от приблизительно 2% до приблизительно 98%, от приблизительно 3% до приблизительно 97%, от приблизительно 5% до приблизительно 95%, от приблизительно 10% до приблизительно 90%, от приблизительно 15% до приблизительно 85%, от приблизительно 20% до приблизительно 80%, от приблизительно 25% до приблизительно 75%, от приблизительно 30% до приблизительно 70%, от приблизительно 40% до приблизительно 60% или от

приблизительно 50% сегмента генома в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Сегмент генома может, например, представлять собой сегмент 1, сегмент 2, сегмент 3, сегмент 4, сегмент 5, сегмент 6, сегмент 7 или сегмент 8 генома вируса гриппа А. Предпочтительно сегмент
5 генома представляет собой 8 сегмент генома вируса гриппа А.

Длина ОРС может быть любой. Например, длина ОРС может составлять от приблизительно 8 до приблизительно 300, например, от приблизительно 9 до приблизительно 290, от приблизительно 10 до приблизительно 280, от приблизительно 11 до приблизительно 275, от приблизительно 12 до приблизительно
10 270, от приблизительно 13 до приблизительно 260, от приблизительно 14 до приблизительно 250, от приблизительно 15 до приблизительно 240, от приблизительно 16 до приблизительно 230, от приблизительно 17 до приблизительно 225, от приблизительно 18 до приблизительно 220, от приблизительно 19 до приблизительно 210, от приблизительно 20 до приблизительно 200, от
15 приблизительно 25 до приблизительно 190, от приблизительно 30 до приблизительно 180, от приблизительно 35 до приблизительно 175, от приблизительно 40 до приблизительно 170, от приблизительно 45 до приблизительно 160, от приблизительно 50 до приблизительно 150, от приблизительно 55 до приблизительно 140, от приблизительно 60 до приблизительно 130, от приблизительно 65 до
20 приблизительно 125, от приблизительно 70 до приблизительно 120, от приблизительно 75 до приблизительно 110, от приблизительно 80 до приблизительно 100, от приблизительно 85 до приблизительно 95, от приблизительно 167 до приблизительно 216 или от приблизительно 90 кодонов. Длина ОРС может составлять по меньшей мере 8, например, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей
25 мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250
30 или по меньшей мере 275 кодонов. Длина ОРС может составлять, например, по меньшей мере 31, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 45, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере 53, по меньшей мере 58, по меньшей мере 60, по меньшей мере 63, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по

меньшей мере 80, по меньшей мере 81, по меньшей мере 84, по меньшей мере 85, по меньшей мере 87, по меньшей мере 88, по меньшей мере 89, 92, 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 105, 1 по меньшей мере 21, по меньшей мере 135, по меньшей мере 140, по меньшей мере 167, по меньшей мере 170, по меньшей мере 178, по меньшей мере 197, по меньшей мере 216 или по меньшей мере 246 кодонов. Длина ОРС может, например, составлять по меньшей мере 85 кодонов. Длина ОРС может, например, составлять по меньшей мере 167 кодонов. Длина ОРС может, например, составлять по меньшей мере 216 кодонов.

	ОРС	может	содержать	последовательность:
10	TTAAATAAGCTGAAACGAGAAAGTTCTTATCTCTTGCTCCACTTCAAGCAATAG			
	TTGTAAGGCTTGCATAAATGTTATTTGCTCAAACTATTCTCTGTTATCTTCAGT			
	STATGTCTCACTTCTTCAATCAACCATCTTATTTCTTCAAACCTTCTGACTTAATT			
	GTTCTCGCCATTTTCCGTTTCTGTTTTGGAGGGAGTGGAGGTCTCCCATTCAT			
	TACTGCTTCTCCAAGCGAATCTCTGTAGAGTTTCAGAGACTCGAACTGTGTTAT			
15	CATTCCATTCAAGTCCTCCGATGAGGACCCCAACTGCATTTTTGACATCCTCAT			
	CAGTATGTCCTGGAAGAGAAGGCAATGGTGAAATTTGCGCAACAATTGCTCCC			
	TCTTCGGTGAAAGCCCTTAGTAGTATTAGAGTCTCCAGCCGGTCGAAAATCAC			
	ACTGAAGTTCGCTTTCAGTATGATGTTCTTATCCATGATCGCCTGGTCCATTCT			
	GATACAAAGAGAGCCTGCCACTTTCTGCTTGGGCATGAGCATGAACCAGTCCC			
20	TTGACATCTCCTCAAGAGTCATGTCAGTTAGGTAGCGCGAAGCAGGTACAGAG			
	GCAATGGTCATTTTAAGTGCCTCATCGGATTCTTCCTTCAGAATCCGCTCCACT			
	ATCTGCTTTCCAGCACGGGTGGCTGTCTCGATGTCCAGACCAAGAGTGCTGCCT			
	CTTCCTCTTAGGGACTTCTGATCTCGGCGAAGCCGATCAAGGAATGGGGCATC			
	ACCCAGTTCTTGGTCTGCAAACCGTTTGCGGACATGCCAAAGAAAGCAGTCTA			
25	CCTGAAAGCTTGACACAGTGTTGGAATCCAT (SEQ ID NO: 56).			

ОРС может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

	MLFAQNYSLLSSVYVSLQSTILFLQTSDLIVLAIFRFCFGGSGGLPFSLLLL
	QANLCRVSETRTVLSFHSSPPMRTPAFLTSSSVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSSI
	RVSSRSKITLKFASFMMFLSMIAWSILIQREPATFCLGMSMNQSLDISSRVMSVR
30	(SEQ ID NO: 1).

	ОРС	может	содержать	последовательность:
	TATCATTAATAAGCTGAAATGAGAAAGTTCTTATCTCCTGTTCCACTTCAAAC			
	AGCAGTTGTAATGCTTGCATGAATGTTATTTGTTCAAAGCTATTTTCCGTTGTTT			
	TTAGTCTGTGTCTCACTTCTTCAATCAGCCATCTTATCTCTTCAAACCTTTTGACC			

TAGCTGTTCTCGCCATTTTCCGTTTCTGTTTTGGAGTAAGTGGAGGTCCCCCATT
CTCATTACTGCTTCTCCAAGCGAATCTCTGTAGATTTTATAGAGACTCGAACTGT
GTTATCATTCCATTCAAGTCCTCCGATGAGGACCCCAATTGCATTTTTGACATC
CTCAATAGTATGTCCTGGAAAAGAAGGCAATGGTGAGATTTTCGCCAACAATTG
5 CTCCCTCTTCGGTGAAAGCCCTTAGTAATACTATGGTCTCTAGTCGGTCAAAAA
TCACACTGAAATTCGCTTTCAATATGATGTTTTTCTCCATGATTGCCTGGTCCAT
TCTGATGCAAAGAGGTCCTTCCACTTTCTGCTTGGGCATTAGCATGAACCAGTT
TCTTGACAATTCCTCAATAGTCATGTCAGTTATGTATCGCGAAGCAGGTGTGGA
GACCATGGTCATTTTAAGTGCCTCATCAGATTCTTCTTTCAGAATCTTTTCTACA
10 ATTTGCTTTCCAACATGGGTGGCTGCTTTGATGTCTAGACCGAGAGTATTGCCT
CTTCCCCTTAGGGACCTCTGATCTCGGCGAAGCCGATCAAGGAATGGGGCATC
ACTCAGTTCTTGGTCTACAACTTGTTTCCGGATATGCCAAAGAAAGCAATCTAC
CTGGAAACTTGACACAGTGTTGGAATCCATTATGT (SEQ ID NO: 57).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

15 MLFVQSYFPLFLVCVSLLQSAILSLQTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLL
QANLCRFLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNT
MVSSRSKITLKF AFNMMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVMY
REAGVETMVILSASSDSSFRI FSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO:
2).

20 OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFARNYSLLSSIIYVSLLQSTTLFLQTSIVLAIFRFCFGGSGGLLSSLLLLQ
ANLCRVSETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSSVCPGREGTGEISPTIAPSSVKALSSIR
VSNRSKIILKF AF SVMFLSMIAWSILIQREPATFCLGMSMNQSLDISSRVMSVR (SEQ
ID NO: 3).

25 OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSLLSSVCVSLLQSTILFLQTS DLIVPAISRFCFGVSCGLPFSLLLLQ
ANLCRVSETRTVLSFHSSPPMRTPTAFLTSSAVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNI
RVSSRSKITLKF AF SMMFLSMIAWSILIQRG PATFCLGMSMDQSLDISSRVMSVR
(SEQ ID NO: 4).

30 OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSLLFSICVSLLQSTILFLRTSDLIVLAIFRFCFGVSGGLPVSLLLLLQ
ANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNI
VSSRSKITLKF AF SMMLLSMIAWSILIQRG PATFCLGMSMNQSLDISSIVMSVR
(SEQ ID NO: 5).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSLLFSCASLLQSTILFLRTSDLIVLAIFRFCFGVSGGLPVSLLLQ
ANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSLVCPGREGNGEISPYIAPSSVKALSNIR
VSSRSKITLKFAFSMMLLSMIAWSILIQRGPAFCLGMSMNQSLDISSIVMSVR

5 (SEQ ID NO: 6).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSLSSICVSLQSAFLRTFDLIVLAIFRFCFGVSGGLPFSLLLLQ
ANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIR
VSSRSKITLKFAFNMMFLSMIAWSILIQRGPAFCLGISMNQSLDISSIVMSVRYREA

10 GAEAMVILSASSDSSFRILSTICFPTRVAVSMFRPRVLPLPLRDF (SEQ ID NO: 7).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSLSSICVSLQSAFLRTFDLIVLAIFRFYFGVSGGLPFSLLLLQ
ANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPASVKALSNI
RVSSRSKITLKFAFNMMFLSMIAWSILIQRGPAFCLGISMNQSLDISSIVMSBRYRE

15 AGAEAMVILSASSDSSFRILSTICFPTRVAVSMFRPRVLPLPLRDF (SEQ ID NO: 8).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSLSSICVSLQSAFLRTFDLTVLAIFRFCFGVSGGLPFSLLLLPQ
ANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIR
VSSRSKITLKFAFNMTFLSMIAWSILMQRGPAFCLGISMNQSLDNSSIVMSVRYRE

20 AGAEAMVILSASSDSSFRILSTICFPTRVAASMFRPRVLPLPLRDF (SEQ ID NO: 9).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSLSSICVSLQSAFLRTFDLIVLAIFYRFCFGVSGCLPFSLLLLQ
ANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIR
VSSRSKITLKFAFNMMFLSMIAWSILMQRGPAFCLGISMNQSLDNSSIVMSVRYR

25 EAGAEAMVILSASSDFSFRILSTICFPTRVAASMFRPRVLPLPLRDF (SEQ ID NO:
10).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSQLFSVCVSLQSAFLRTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLLP
QANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNIR
RVSSRSKITLKFAFNMMFFSMIAWSILMQRGPAFCLGISMNQFLDNSSIVMSVMY

30 REAGVEAMVILSASSDFSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO:
11).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSQLFLVCVSLLQSAILSLRTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLL
QANLCRFLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPYIAPSSVKALSNT
RVSSRSKITLKFAFNMMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVISVMYR
EAGVEAMVILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO:

5 12).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFAQNYSQLFLVCVSLLQSAILSLQTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLL
QANLCRFLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNT
MVSSRSKITLKFAFNMMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVM
YREAGVEAMVILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALISRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO:

10 13).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFVQSYFQLFLICVSLLQLAILSLQTFDLAVLAISRFCFGVSGGPPFSLLLL
QANLCRFLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNT
IVSSRSKITLKFAFNVMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVMYR
EAGVETMVILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO:

15 14).

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFVQSYFQLFLICVSPLQLAILSLQTSDLAVLAISRFCFGVSGGPPFSLLLL
QANLCRFLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTASIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNT
MVSSRPKITLKFAFNMIFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDSSIVMSVMYR
EAGVETMVILSASSDSSFRIFSICFPWVAALVSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO: 15).

20

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность:

MLFVRNYSLSLSICAAFLQLTTLFPQISVPIALATFHFCSSGGSEGLPFSSQFLQ
ANLCIFSETRTVLPFHSSPPMRTPTAFLTSS (SEQ ID NO: 58).

25

Как упоминалось выше, OPC, кодирующая эпитоп, содержащийся в
иммуногенном пептиде, может быть консервативной среди различных оцПНК-
содержащих вирусов, например, различных оцПНК-содержащих вирусов одного и
того же типа. OPC может быть консервативной среди двух или более различных
оцПНК-содержащих вирусов при наличии по меньшей мере 50% (например, по
30 меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере
80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по
меньшей мере 99%) идентичности между OPC, кодируемой по меньшей мере частью
генома каждого вируса в противоположном направлении к ПНК положительной

полярности, способной к трансляции. Например, ОРС может быть консервативной среди двух или более различных оцРНК-содержащих вирусов при наличии приблизительно 75% (например, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78% или приблизительно 79%) идентичности между ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома каждого вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Полипептид, кодируемый ОРС, может усиливать устойчивость оцРНК-содержащего вируса в организме человека, т.е. придавать селективное преимущество оцРНК-содержащему вирусу.

ОРС может быть консервативной среди двух или более (например, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 250 или более, 500 или более, 750 или более или 1000 или более) вирусов гриппа А. Вирусы гриппа А, среди которых ОРС является консервативной, могут относиться к одному и тому же серотипу. Вирусы гриппа А, среди которых ОРС является консервативной, могут относиться к различным серотипам. Например, ОРС может являться консервативной среди двух или более вирусов, каждый из которых принадлежит к одному из следующих серотипов: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7, H7N9, H6N1. ОРС может быть консервативной среди двух или более (например, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 250 или более, 500 или более, 750 или более или 1000 или более) вирусов Человек гриппа А человека. ОРС может быть консервативной среди одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 250 или более, 500 или более, 750 или более или 1000 или более) вирусов гриппа А человека и одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 250 или более, 500 или более, 750 или более или 1000 или более) вирусов гриппа А свиней. ОРС может быть консервативной среди одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или

более, девяти или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 250 или более, 500 или более, 750 или более или 1000 или более) вирусов гриппа А человека и одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 250 или более, 500 или более, 750 или более или 1000 или более) вирусов гриппа А птиц. ОРС может быть консервативной среди одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 250 или более, 500 или более, 750 или более или 1000 или более) вирусов гриппа А человека и одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 250 или более, 500 или более, 750 или более или 1000 или более) вирусов гриппа А лошадей.

ОРС может быть консервативной среди двух или более (например, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более) флавивирусов. Например, ОРС может быть консервативной среди двух или более серотипов вирусов денге, выбранных из DENV-1, DENV-2, DENV-3 и DENV-4. ОРС может быть консервативной среди двух или более штаммов вируса Зика, например, африканского вируса Зика и азиатского вируса Зика. ОРС может быть консервативной среди одного или более серотипов вирусов денге (например, одного или более из DENV-1, DENV-2, DENV-3 и DENV-4) и одного или более из штаммов вируса Зика (например, одного или обоих из африканского вируса Зика и азиатского вируса Зика).

ОРС может быть консервативной среди двух или более (например, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, 10 или более, 20 или более) филовиров. Например, ОРС может быть консервативной среди двух или более эболавирусов, выбранных из эболавируса Заир (ZEBOV), эболавируса Бундибуго (BDBV), эболавируса Рестон (RESTV), эболавируса Судан (SUDV) и эболавируса леса Тай (TAFV). ОРС может быть консервативной среди двух или более вирусов Марбург, например, вируса Марбург (MARV) и вируса Равна (RAVV). ОРС может быть консервативной среди одного или более из эболавирусов (например, одного или более из ZEBOV, BDBV,

RESTV, SUDV и TAFV) и одного или более из вирусов Марбург (например, одного или обоих из MARC и RAVV).

Полипептид, кодируемый ОРС, и/или эпитоп, который он содержит, аналогичным образом могут быть консервативными среди двух или более вирусов.

5 Таким образом, вакцинная композиция может обеспечивать перекрестную защиту от нескольких вирусов. Таким образом, одна вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может индуцировать протективный иммунитет против различных существующих и новых оцРНК-содержащих вирусов, например, вирусов гриппа А, флавивирусов или филовирусов. Например, в одном аспекте полипептид

10 и/или эпитоп могут быть консервативными среди двух или более вирусов гриппа А человека. В данном случае вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может обеспечивать защиту от двух или более вирусов гриппа А человека. В еще одном аспекте полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А человека и вирусов гриппа А свиней, лошадей и/или птиц. В этом случае

15 вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может защищать субъекта человека от инфекции вируса гриппа А свиней, лошадей и/или птиц, предотвращая преодоление межвидового барьера вирусами гриппа А свиней, лошадей и/или птиц. В любом случае два или более вируса гриппа А человека могут относиться к одному и тому же или различным серотипам. Каждый из двух или более вирусов гриппа А

20 человека может относиться к серотипу H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7, H7N9 или H6N1.

Вирусы

оцРНК-содержащий вирус, геном которого кодирует в противоположном

25 направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, ОРС, кодирующую полипептид, может представлять собой вирус, содержащий оцРНК отрицательной полярности, или вирус, содержащий оцРНК положительной полярности.

оцРНК-содержащий вирус может представлять собой любой вирус,

30 содержащий оцРНК отрицательной полярности. Вирусы, содержащие оцРНК отрицательной полярности, хорошо известны в данной области техники и включают вирусов порядков Mononegavirales и Bunyvirales. Порядок Mononegavirales включает семейства Bornaviridae, Filoviridae, Myxoviridae, Nyamiviridae, Paramyxoviridae, Pneumoviridae, Rhabdoviridae и Sunviridae, а также роды Anphevirus, Arlivirus,

Chengtivirus, Crustavirus и Wastivirus. Порядок Bunyavirales включает семейства Feraviridae, Fimoviridae, Hantavirida, Jonviridae, Nairoviridae, Peribunyaviridae, Phasmaviridae, Phenuiviridae и Tospoviridae. Другие вирусы, содержащие оцРНК отрицательной полярности, включают вирусы семейств Arenaviridae, Ophiovirida и Orthomyxoviridae, а также рода Deltavirus.

Вирус, содержащий оцРНК отрицательной полярности, может представлять собой ортомиксовирус. Например, оцРНК-содержащий вирус может представлять собой вирус гриппа. Существуют сотни штаммов вируса гриппа, которые можно подразделять на три основных категории - вирусы гриппа А, гриппа В или гриппа С на основании белков НА и NA, которые они экспрессируют. оцРНК-содержащий вирус может представлять собой любой штамм вируса гриппа А, гриппа В или гриппа С. Таким образом, ОРС, кодирующую полипептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп, может кодировать по меньшей мере часть генома вируса гриппа А, гриппа В и/или гриппа С в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. оцРНК-содержащий вирус предпочтительно является вирусом гриппа А. Вирус гриппа А может относиться к любому серотипу. Вирус гриппа А человека предпочтительно относится к серотипу H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7, H7N9 или H6N1. Вирусы гриппа и ОРС, которые они могут кодировать, подробнее рассматриваются ниже.

оцРНК-содержащий вирус может представлять собой филовирус. В двух основных родах - эболавирус и вирус Марбург - существует большое количество видов филовирусов. Виды эболавирусов включают эболавирус Заир (ZEBOV), эболавирус Бундибуго (BDBV), эболавирус Рестон (RESTV), эболавирус Судан (SUDV) и эболавирус леса Тай (TAFV). Виды вирусов Марбург включают вирус Марбург (MARV) и вирус Равна (RAVV). Третий род, Cuevavirus, включает вид вирус Лловиу. оцРНК-содержащий вирус предпочтительно является вирусом Эбола или вирусом Марбург.

оцРНК-содержащий вирус может представлять собой любой вирус, содержащий оцРНК положительной полярности. Вирусы, содержащие оцРНК положительной полярности, хорошо известны в данной области техники и включают семейства Picornaviridae, Astroviridae, Caliciviridae, Hepeviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Arteriviridae и Coronaviridae.

оцРНК-содержащий вирус может представлять собой флавивирус. Существует большое количество видов флавивирусов, в том числе вирус Зика, вирус денге, вирус

Западного Нила и вирус желтой лихорадки, а также вирус энцефалита Сент-Луис, вирус японского энцефалита, вирус энцефалита долины Муррей, вирус клещевого энцефалита, вирус энцефалита кунджин, вирус энцефалита Росио, вирус весенне-летнего энцефалита, вирус Негиси, вирус Кьясанурского леса, вирус омской
5 геморрагической лихорадки, вирус Повассан, вирус энцефаломиеелита овец, вирус Рио-Браво, вирус острова Тюлений, вирус Нтайя и вирус Модок. Существует четыре серотипа вируса денге (DENV-1, DENV-2, DENV-3 и DENV-4) и два штамма вируса Зика (африканский вирус Зика и азиатский вирус Зика). оцРНК-содержащий вирус предпочтительно является вирусом денге или вирусом Зика.

10

Вирус гриппа

Как установлено выше, оцРНК-содержащий вирус может представлять собой вирус, содержащий оцРНК отрицательной полярности. Например, оцРНК-содержащий вирус может представлять собой ортомиксовирус, например, вирус
15 гриппа. Вирус гриппа может, например, представлять собой вирус гриппа А, вирус гриппа В или вирус гриппа С. оцРНК-содержащий вирус предпочтительно является вирусом гриппа А. Вирус гриппа А может, например, представлять собой вирус гриппа А человека, вирус гриппа А свиней, вирус гриппа А лошадей или вирус гриппа А птиц. Вирус гриппа А может представлять собой зоонозный вирус гриппа А.

20

Вирус гриппа может, например, представлять собой вирус испанского гриппа, например, вирус гриппа А H1N1, ответственный за пандемию гриппа 1918 года (“*вирус гриппа 1918*”). Полная кодирующая последовательность вируса гриппа 1918 известна в данной области техники. Вирус гриппа может, например, представлять собой реконструированный вирус испанского гриппа. Реконструированный вирус
25 испанского гриппа представляет собой вирус гриппа, несущий кодирующие последовательности восьми генных сегментов вируса гриппа 1918. Например, реконструированный вирус испанского гриппа содержит известную кодирующую последовательность вируса гриппа 1918 и не кодирующие области, соответствующие областям близкородственного вируса. Близкородственный вирус может, например,
30 представлять собой вирус гриппа А H1N1, например, вирус A/WSN/33 (H1N1).

Геном вирусов гриппа А является сегментированным и содержит 8 сегментов оцРНК отрицательной полярности. Хотя между вирусами гриппа А человека, свиней, лошадей и птиц существует большое структурное и генетическое сходство, межвидовые инфекции являются нечастыми и неэффективными. В то же время

совместная инфекция одного хозяина несколькими различными вирусами гриппа А может привести к рекомбинации сегментированного генома, давая начало новым штаммам, которые могут обладать пандемическим потенциалом.

При обычной трансляции (т.е. после транскрипции в комплементарную мРНК) 8 сегмент генома вируса гриппа А кодирует два белка - NS1 и NEP. В вирусах гриппа А человека 8 сегмент также кодирует ОРС в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Эта ОРС известна как NEG8, поскольку ее кодирует так называемая отрицательная цепь 8 сегмента. Почти все вирусы гриппа А человека, выделенные в первой половине 20 века, содержали ОРС NEG8 длиной 167 кодонов. Консервативность ОРС NEG8 длиной 167 кодонов в вирусах гриппа А человека в течение приблизительно 50 лет указывает на то, что ОРС NEG8 длиной 167 кодонов придает селективное преимущество вирусам гриппа А человека. Это подтверждается тем фактом, что вирусы, утрачивавшие ОРС NEG8 длиной 167 кодонов, сохранялись в популяции людей в течение не более чем нескольких лет. Приблизительно в середине 20 века в ОРС NEG8 длиной 167 кодонов произошла мутация стоп-кодона TAG на TAT (кодон, кодирующий тирозин), приведшая к появлению удлиненной ОРС NEG8 длиной 216 кодонов. Эта мутация не оказывает действия на другие белки, кодируемые 8 сегментом, из-за вырожденности аминокислотного кода. Практически все вирусы гриппа А человека, выделенные после 1947 г., содержат ОРС NEG8 длиной 216 кодонов, что указывает на то, что эта ОРС также придает селективное преимущество вирусам гриппа А человека. В последнее время у некоторых вирусов гриппа А человека также наблюдается ОРС NEG8 длиной 85 кодонов. У ряда штаммов вирусов гриппа А свиней и птиц также наблюдаются ОРС длиной 167 и 216 кодонов. В вирусах гриппа А человека, птиц, лошадей и свиней также наблюдаются ОРС другой длины (см. пример 5). Например, в вирусах гриппа А птиц, вирусах гриппа А свиней, подобных вирусам гриппа птиц, и вирусах гриппа А лошадей наблюдается ОРС длиной 93 кодона (или, реже, 135 кодонов). В вирусах гриппа А свиней наблюдаются ОРС длиной 140 кодонов и ОРС длиной 167 кодонов.

Наличие консервативной ОРС NEG8 длиной 85, 167 или 216 кодонов, придающей селективное преимущество (т.е. усиливающей устойчивость) вирусам гриппа А человека создает важные предпосылки для появления новых штаммов вируса гриппа А. В частности, совместная инфекция хозяина двумя или более вирусами гриппа А может вызвать рекомбинацию генома вируса. Фактически

возможен обмен сегментами между вирусами, что дает начало вирусам с новыми комбинациями сегментов генома. Например, совместная инфекция вирусом X и вирусом Y может привести к образованию нового вируса, содержащего, например, сегменты 1 - 7 вируса X и сегмент 8 вируса Y. Это вызывает беспокойство, поскольку

5 8 сегмент вируса гриппа A, содержащий OPC NEG8 длиной 216 кодонов, может подвергаться рекомбинации с сегментами вируса гриппа A птиц (например, H5N1), вируса гриппа A лошадей или вируса гриппа A свиней (например, H1N1). Обычно вирус гриппа A птиц не содержит OPC NEG8 и обладает ограниченной патогенностью и/или плохо передается людям. Получение OPC NEG8 за счет рекомбинации с

10 вирусом гриппа A человека может увеличить устойчивость вируса гриппа A птиц, лошадей или свиней в организме человека, что может привести к появлению нового пандемического штамма.

Кроме того, анализ 8 сегмента вирусов гриппа A свиней, лошадей или птиц показал, что некоторым штаммам требуются лишь незначительные мутации для

15 появления OPC NEG8 длиной 167 кодонов или 216 кодонов, придающих вирусу устойчивость в организме человека. Например, из 8 сегмента генома H1N1, происходящего от вируса гриппа свиней, требуется удалить лишь 2 стоп-кодона (каждый за счет замены одного нуклеотида) для получения OPC NEG8 длиной 216 кодонов, присутствующей у вируса гриппа человека. Для получения OPC NEG8

20 длиной 167 кодонов, исторически присутствовавшей в вирусах гриппа A человека, требуется замена лишь одного нуклеотида.

Таким образом, ясно, что существует потребность в эффективной вакцинной композиции от инфекции вируса гриппа A. В одном аспекте вакцинная композиция согласно настоящему изобретению представляет собой вакцинную композицию от

25 инфекции вируса гриппа A. Иммуногенный пептид, содержащийся в вакцинной композиции, предпочтительно содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого OPC, кодируемой по меньшей мере частью 8 сегмента генома вируса гриппа A в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Соответственно, OPC может представлять собой OPC NEG8.

30 OPC может полностью или частично кодироваться 8 сегментом в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Например, OPC может кодироваться от приблизительно 1% до приблизительно 99%, например, от приблизительно 2% до приблизительно 98%, от приблизительно 3% до приблизительно 97%, от приблизительно 5% до приблизительно 95%, от

приблизительно 10% до приблизительно 90%, от приблизительно 15% до приблизительно 85%, от приблизительно 20% до приблизительно 80%, от приблизительно 25% до приблизительно 75%, от приблизительно 30% до приблизительно 70%, от приблизительно 40% до приблизительно 60% или от приблизительно 50% 8 сегмента в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.

Длина ОРС может быть любой, как описано выше. Например, длина ОРС может составлять от приблизительно 8 до приблизительно 300, например, от приблизительно 9 до приблизительно 290, от приблизительно 10 до приблизительно 280, от приблизительно 11 до приблизительно 275, от приблизительно 12 до приблизительно 270, от приблизительно 13 до приблизительно 260, от приблизительно 14 до приблизительно 250, от приблизительно 15 до приблизительно 240, от приблизительно 16 до приблизительно 230, от приблизительно 17 до приблизительно 225, от приблизительно 18 до приблизительно 220, от приблизительно 19 до приблизительно 210, от приблизительно 20 до приблизительно 200, от приблизительно 25 до приблизительно 190, от приблизительно 30 до приблизительно 180, от приблизительно 35 до приблизительно 175, от приблизительно 40 до приблизительно 170, от приблизительно 45 до приблизительно 160, от приблизительно 50 до приблизительно 150, от приблизительно 55 до приблизительно 140, от приблизительно 60 до приблизительно 130, от приблизительно 65 до приблизительно 125, от приблизительно 70 до приблизительно 120, от приблизительно 75 до приблизительно 110, от приблизительно 80 до приблизительно 100, от приблизительно 85 до приблизительно 95, от приблизительно 167 до приблизительно 216 или от приблизительно 90 кодонов. Длина ОРС может составлять по меньшей мере 8, например, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250 или по меньшей мере 275 кодонов. Длина ОРС может составлять, например, по меньшей мере 31, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 45, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере 53, по меньшей мере 58, по

меньшей мере 60, по меньшей мере 63, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по меньшей мере 80, по меньшей мере 81, по меньшей мере 84, по меньшей мере 85, по меньшей мере 87, по меньшей мере 88, по меньшей мере 89, 92, 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 105, 1 по меньшей мере 21, по меньшей мере 135, по меньшей мере 140, по меньшей мере 167, по меньшей мере 170, по меньшей мере 178, по меньшей мере 197, по меньшей мере 216 или по меньшей мере 246 кодонов. Длина ОРС может, например, составлять по меньшей мере 85 кодонов. Длина ОРС предпочтительно составляет по меньшей мере 167 кодонов. Длина ОРС предпочтительно составляет по меньшей мере 216 кодонов.

10 В некоторых аспектах ОРС может содержать последовательность:
ТТАААТААГСТГАААСГААААГТТСТТАТСТСТТГСТССТТСТТААГСААТАГ
ТТГТААГГСТТГСАТАААТГТТАТТТГСТСАААСТАТТСТСТГТТАТСТТСАГТ
СТАТГТСТСАСТТСТТСААТСААССАТСТТАТТТСТТСАААСТТСТГАСТТААТТ
ГТТСТСГССАТТТТССГТТТСТГТТТТГГАГГГГАГТГГАГГТСТССАТТСТСАТ
15 ТАСТГСТТСТССТААГСГААТСТСТГТАГАГТТТСТГАГАСТСГААСТГТГТТАТ
САТТССАТТСААГТСТТССГАТГАГГАССССААСТГСАТТТТТГАСАТСТТСАТ
САГТАТГТСТТГГААГАГААГГСААТГГТГАААТТТСТССТААСААТТГСТССТ
ТСТТСТГТГАААГСССТТАГТАГТАТТАГАГТСТССТАГССГГТСГААААТСАС
АСТГААГТТСТГСТТТСТГАТАТГАТГТТСТТАТССАТГАТСТССТГГТССАТТСТ
20 ГАТАСАААГАГАГСТТГССАСТТТСТГСТТГГГСАТГАГСАТГААССАГТССС
ТТГАСАТСТССТСААГАГТСАТГТСАГТТАГГТАГСГСААГСАГГТАСАГА
ГСААТГГТСАТТТТААГТГССТСАТСГГАТТСТТСТТСТГААТССГСТССАСТ
АТСТГСТТТТСТСАГСАСГГГТГГСТГТСТСГАТГТССАГАССААГАГТГСТГССТ
СТТСТСТТАГГГАСТТСТГАТСТСГГСААГССГАТСААГГААТГГГГСАТС
25 АССАГТТСТТГГТСТГСАААССГТТТГСГГАСАТГССААГАААГСАГТСТА
ССТГАААГСТТГАСАСАГТГТТГГААТССАТ (SEQ ID NO: 56) или вариант SEQ
ID NO: 56.

В некоторых аспектах ОРС может содержать последовательность:
ТАТСАТТАААТААГСТГАААТГААААГТТСТТАТСТССТГТТССАСТТСАААС
30 АГСАГТТГТААТГСТТГСАТГААТГТТАТТТГТТСАААГСТАТТТТССГТТГТТ
ТТАГТСТГТГТСТСАСТТСТТСААТСАГССАТСТТАТСТСТТСАААСТТТТГАСС
ТАГСТГТТСТСГССАТТТТССГТТТСТГТТТТГГАГТААГТГГАГГТСССССАТТ
СТСАТТАСТГСТТСТССТААГСГААТСТСТГТАГАТТТТТАГАГАСТСГААСТГТ
ГТТАТСАТТССАТТСААГТСТТССГАТГАГГАССССААТТГСАТТТТТГАСАТС

CTCAATAGTATGTCCTGGAAAAGAAGGCAATGGTGAGATTTTCGCCAACAATTG
CTCCCTCTTCGGTGAAAGCCCTTAGTAATACTATGGTCTCTAGTCGGTCAAAAA
TCACACTGAAATTCGCTTTCAATATGATGTTTTCTCCATGATTGCCTGGTCCAT
TCTGATGCAAAGAGGTCCTTCCACTTTCTGCTTGGGCATTAGCATGAACCAGTT
5 TCTTGACAATTCCTCAATAGTCATGTCAGTTATGTATCGCGAAGCAGGTGTGGA
GACCATGGTCATTTTAAGTGCCTCATCAGATTCTTCTTTTCTTTTCTTTTCTACA
ATTTGCTTTTCCAACATGGGTGGCTGCTTTGATGTCTAGACCGAGAGTATTGCCT
CTTCCCCTTAGGGACCTCTGATCTCGGCGAAGCCGATCAAGGAATGGGGCATC
ACTCAGTTCTTGGTCTACAACCTGTTTCCGGATATGCCAAAGAAAGCAATCTAC
10 CTGGAAACTTGACACAGTGTTGGAATCCATTATGT (SEQ ID NO: 57) или вариант
SEQ ID NO: 57.

На протяжении всей длины нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 56
или SEQ ID NO: 57 вариант предпочтительно по меньшей мере на 50% идентичен
указанной последовательности на основе идентичности нуклеотидов. Более
15 предпочтительно вариант может являться на по меньшей мере 55%, по меньшей мере
60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей
мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, и более предпочтительно -
на по меньшей мере 95%, 97% или 99% идентичным нуклеотидной
последовательности SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57 на основе идентичности
20 нуклеотидов на протяжении всей последовательности. На протяжении фрагмента из
100 или более, например, 125, 150, 175 или 200 или более непрерывных нуклеотидов
может иметь место по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, 90% или
95% идентичность нуклеотидов.

Как описано выше, ОРС может быть консервативной среди двух или более
25 вирусов гриппа А человека. ОРС может быть консервативной среди одного или более
из вирусов гриппа А человека и одного или более из вирусов гриппа А птиц. ОРС
может быть консервативной среди одного или более из вирусов гриппа А человека и
одного или более из вирусов гриппа А лошадей. ОРС может быть консервативной
среди одного или более из вирусов гриппа А человека и одного или более из вирусов
30 гриппа А свиней. Для того чтобы быть консервативной среди двух или более вирусов
гриппа А, ОРС каждого из двух или более вирусов гриппа А предпочтительно
обладает по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере
70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей
мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичностью на всем

протяжении последовательности с OPC каждого из других вирусов гриппа А. Например, OPC может быть консервативной среди двух или более вирусов гриппа А при наличии приблизительно 75% (например, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, например, приблизительно 71%, приблизительно 72%,
5 приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78% или приблизительно 79%) идентичности между OPC каждого вируса.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSLLSSV

10 YVSLQSTILFLQTSDLIVLAIFRFCFGGSGGLPFSLLLLQANLCRVSETRTVLSFHSS
PPMRTPTAFLTSSSVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSSIRVSSRSKITLKFAFSMMFL
SMIAWSILIQREPATFCLGMSMNQSLDISSRVMSVR (SEQ ID NO: 1), или ее вариант.
SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность из 167 аминокислот,
кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 56.

15 OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность MLFVQ
SYFPLFLVCVSLQSAISLQTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLLQANLCRFLET
RTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTMVSSRSKITL
KFAFNMMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVMYREAGVETMV
ILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL(SEQ ID NO: 2), или ее
20 вариант. SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность из 216 аминокислот,
кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 57.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFARNYS

LLSSIYVSLQSTTLFLQTSDSIVLAIFRFCFGGSGGLSSLLLLQANLCRVSETRTVL
25 SFHSSPPMRTPIAFLTSSSVCPGREGTGEISPTIAPSSVKALSSIRVSNRSKIILKFAFS
VMFLSMIAWSILIQREPATFCLGMSMNQSLDISSRVMSVR (SEQ ID NO: 3), или ее
вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSL

30 LSSVCVSLQSTILFLQTSDLIVPAISRFCFGVSCGLPFSLLLLQANLCRVSETRTVLS
FHSSPPMRTPTAFLTSSAVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKFAFS
MMFLSMIAWSILIQRGPATFCLGMSMDQSLDISSRVMSVR (SEQ ID NO: 4), или ее
вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSL

LFSICVSLQSTILFLRTSDLIVLAIFRFCFGVSGGLPVSLLLLQANLCRVLETRTVLS
FHSSPPMRTPIAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKF AFS

5 MMLLSMIAWSILIQRGPA TFCLGMSMNQSLDISSIVMSVR (SEQ ID NO: 5), или ее
вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSL

LFSICASLLQSTILFLRTSDLIVLAIFRFCFGVSGGLPVSLLLLQANLCRVLETRTVLS
10 FHSSPPMRTPIAFLTSSLVCPGREGNGEISPYIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKF AFS

MMLLSMIAWSILIQRGPA TFCLGMSMNQSLDISSIVMSVR (SEQ ID NO: 6), или ее
вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSL

15 LSSICVSLQSAI LFLRTFDLIVLAIFRFCFGVSGGLPFSLLLQANLCRVLETRTVLS
FHSSPPMRTPIAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKF AFN

MMFLSMIAWSILIQRGPA TFCLGISMNQSLDISSIVMSVRYREAGAEAMVILSASSD
SSFRILSTICFPTRVAVSMFRPRVLPLPLRDF (SEQ ID NO: 7), или ее вариант.

20 OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSL

LSSICVSLQSAI LFLRTFDLIVLAIFRFYFGVSGGLPFSLLLQANLCRVLETRTVLS
FHSSPPMRTPIAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPASVKALSNIRVSSRSKITLKF AFN

MMFLSMIAWSILIQRGPA TFCLGISMNQSLDISSIVMSBRYREAGAEAMVILSASSD
SSFRILSTICFPTRVAVSMFRPRVLPLPLRDF (SEQ ID NO: 8), или ее вариант.

25 OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSL

LSSICVSLQSAI LSLRTFDLTVLAIFRFCFGVSGGLPFSLLLPQANLCRVLETRTVLS
FHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKF AFN

30 TFLSMIAWSILMQRG PSTFCLGISMNQSLDNSSIVMSVRYREAGAEAMVILSASSD
SFRILSTICFPTRVAASMFRPRVLPLPLRDF (SEQ ID NO: 9), или ее вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSL

LSSICVSLQSAI LSLRTFDLIVLA IYRFCFGVSGCLPFSLLLQANLCRFLETRTVLS
FHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKF AFN

MFLSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQSLDNSSIVMSVRYREAGAEAMVILSASSD
FSFRILSTICFPTRVAASMFRPRVLPLPLRDF (SEQ ID NO: 10), или ее вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYSQ

5 LFSVCVSLLQSAILSLRTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLPQANLCRVLETRTVL
SFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTRVSSRSKITLKFAN
MMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVRYREAGVEAMVILSAS
SDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO: 11), или ее вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
10 MLFAQNYS
QLFLVCVSLLQSAILSLRTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLPQANLCRFLETRTV
LSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPYIAPSSVKALSNTRVSSRSKITLKFAN
NMMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVISVRYREAGVEAMVILSAS
SDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO: 12), или ее вариант.

15 OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFAQNYS
QLFLVCVSLLQSAILSLQTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLLQANLCRFLETRTV
LSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNMTVSSRSKITLKFAN
FNMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVRYREAGVEAMVILS
20 ASSDSSFRIFSTICFPTWVAALISRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO: 13), или ее вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность
MLFVQSY
FQLFLICVSLLQLAILSLQTFDLAVLAISRFCFGVSGGPPFSLLLLQANLCRFLETRT
VLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNMTVSSRSKITLKFAN
25 FNMFFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVRYREAGVETMVILSA
SSDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO: 14), или ее вариант.

OPC может кодировать полипептид, содержащий последовательность MLFVQSYF
QLFLICVSPLQLAILSLQTSDLAVLAISRFCFGVSGGPPFSLLLLQANLCRFLETRTV
LSFHSSPPMRTPIAFLTASIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNMTVSSRPKITLKFAN
30 FNMIFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDSSIVMSVRYREAGVETMVILSAS
SDSSFRIFSIICFPAWVAALVSRPRVLPLPLRDL (SEQ ID NO: 15), или ее вариант.

На протяжении всей длины аминокислотной последовательности SEQ ID NO:
1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID
NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12,

SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15 вариант предпочтительно по меньшей мере на 50% идентичен указанной последовательности на основе идентичности аминокислот. Более предпочтительно, вариант может являться на по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, и более предпочтительно - на по меньшей мере 95%, 97% или 99% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15 на основе идентичности аминокислот на протяжении всей последовательности. На протяжении фрагмента из 100 или более, например, 125, 150, 175 или 200 или более непрерывных аминокислот может иметь место по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичность аминокислот.

Полипептид, кодируемый ОРС, может быть консервативным среди двух или более вирусов гриппа А человека. Полипептид может быть консервативным среди одного или более из вирусов гриппа А человека и одного или более из вирусов гриппа А птиц. Полипептид может быть консервативным среди одного или более из вирусов гриппа А человека и одного или более из вирусов гриппа А лошадей. Полипептид может быть консервативным среди одного или более из вирусов гриппа А человека и одного или более из вирусов гриппа А свиней. Для того чтобы быть консервативным среди двух или более вирусов гриппа А, полипептид, кодируемый ОРС каждого из двух или более вирусов гриппа А, предпочтительно обладает по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичностью на всем протяжении последовательности с полипептидом, кодируемым ОРС каждого из других вирусов гриппа А. Например, полипептид может быть консервативным среди двух или более вирусов гриппа А при наличии приблизительно 75% (например, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, например, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78% или приблизительно 79%) идентичности между полипептидами, кодируемыми ОРС каждого вируса.

CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида может быть консервативным среди двух или более вирусов гриппа А человека. Эпитоп может быть консервативным

среди одного или более из вирусов гриппа А человека и одного или более из вирусов гриппа А птиц. Эпитоп может быть консервативным среди одного или более из вирусов гриппа А человека и одного или более из вирусов гриппа А лошадей. Эпитоп может быть консервативным среди одного или более из вирусов гриппа А человека и
5 одного или более из вирусов гриппа А свиней. Для того чтобы быть консервативным среди двух или более вирусов гриппа А, эпитоп, кодируемый ОРС каждого из двух или более вирусов гриппа А, предпочтительно обладает по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере
10 98% или по меньшей мере 99%) идентичностью на всем протяжении последовательности с эпитопом, кодируемым ОРС каждого из других вирусов гриппа А. Например, эпитоп может быть консервативным среди двух или более вирусов гриппа А при наличии приблизительно 75% (например, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, например, приблизительно 71%, приблизительно 72%,
15 приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78% или приблизительно 79%) идентичности между эпитопами, кодируемыми ОРС каждого вируса.

ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А человека H1N1. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть
20 консервативными среди вирусов гриппа А человека H5N1. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А человека H3N2. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А человека H2N2. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А человека H7N7. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть
25 консервативными среди вирусов гриппа А человека H7N9. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А птиц H1N1. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А птиц H5N1. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А птиц H3N2. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными
30 среди вирусов гриппа А птиц H2N2. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А птиц H7N7. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А птиц H7N9. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А свиней H1N1. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А

свиней H5N1. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А свиней H3N2. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А свиней H2N2. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А свиней H7N7. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А свиней H7N9. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А лошадей H1N1. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А лошадей H5N1. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А лошадей H3N2. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А лошадей H2N2. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А лошадей H7N7. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа А лошадей H7N9.

ОРС может быть консервативной среди (i) вирусов гриппа А человека H1N1, (ii) вирусов гриппа А человека H5N1, (iii) вирусов гриппа А человека H3N2, (iv) вирусов гриппа А человека H2N2, (v) вирусов гриппа А человека H7N7, (vi) вирусов гриппа А человека H7N9, (vii) вирусов гриппа А птиц H1N1, (viii) вирусов гриппа А птиц H5N1, (ix) вирусов гриппа А птиц H3N2, (x) вирусов гриппа А птиц H2N2, (xi) вирусов гриппа А птиц H7N7, (xii) вирусов гриппа А птиц H7N9, (xiii) вирусов гриппа А свиней H1N1, (xiv) вирусов гриппа А свиней H5N1, (xv) вирусов гриппа А свиней H3N2, (xvi) вирусов гриппа А свиней H2N2, (xvii) вирусов гриппа А свиней H7N7, (xviii) вирусов гриппа А свиней H7N9, (xix) вирусов гриппа А лошадей H1N1, (xx) вирусов гриппа А лошадей H5N1, (xxi) вирусов гриппа А лошадей H3N2, (xxii) вирусов гриппа А лошадей H2N2, (xxiii) вирусов гриппа А лошадей H7N7 и/или (xxiv) вирусов гриппа А лошадей H7N9, по отдельности или в комбинации.

Полипептид может быть консервативным среди (i) вирусов гриппа А человека H1N1, (ii) вирусов гриппа А человека H5N1, (iii) вирусов гриппа А человека H3N2, (iv) вирусов гриппа А человека H2N2, (v) вирусов гриппа А человека H7N7, (vi) вирусов гриппа А человека H7N9, (vii) вирусов гриппа А птиц H1N1, (viii) вирусов гриппа А птиц H5N1, (ix) вирусов гриппа А птиц H3N2, (x) вирусов гриппа А птиц H2N2, (xi) вирусов гриппа А птиц H7N7, (xii) вирусов гриппа А птиц H7N9, (xiii) вирусов гриппа А свиней H1N1, (xiv) вирусов гриппа А свиней H5N1, (xv) вирусов гриппа А свиней H3N2, (xvi) вирусов гриппа А свиней H2N2, (xvii) вирусов гриппа А свиней H7N7, (xviii) вирусов гриппа А свиней H7N9, (xix) вирусов гриппа А лошадей

H1N1, (xx) вирусов гриппа А лошадей H5N1, (xxi) вирусов гриппа А лошадей H3N2, (xxii) вирусов гриппа А лошадей H2N2, (xxiii) вирусов гриппа А лошадей H7N7 и/или (xxiv) вирусов гриппа А лошадей H7N9, по отдельности или в комбинации.

Эпитоп может быть консервативным среди (i) вирусов гриппа А человека H1N1, (ii) вирусов гриппа А человека H5N1, (iii) вирусов гриппа А человека H3N2, (iv) вирусов гриппа А человека H2N2, (v) вирусов гриппа А человека H7N7, (vi) вирусов гриппа А человека H7N9, (vii) вирусов гриппа А птиц H1N1, (viii) вирусов гриппа А птиц H5N1, (ix) вирусов гриппа А птиц H3N2, (x) вирусов гриппа А птиц H2N2, (xi) вирусов гриппа А птиц H7N7, (xii) вирусов гриппа А птиц H7N9, (xiii) вирусов гриппа А свиней H1N1, (xiv) вирусов гриппа А свиней H5N1, (xv) вирусов гриппа А свиней H3N2, (xvi) вирусов гриппа А свиней H2N2, (xvii) вирусов гриппа А свиней H7N7, (xviii) вирусов гриппа А свиней H7N9, (xix) вирусов гриппа А лошадей H1N1, (xx) вирусов гриппа А лошадей H5N1, (xxi) вирусов гриппа А лошадей H3N2, (xxii) вирусов гриппа А лошадей H2N2, (xxiii) вирусов гриппа А лошадей H7N7 и/или (xxiv) вирусов гриппа А лошадей H7N9, по отдельности или в комбинации.

Консервативность эпитопа среди двух или более вирусов гриппа А может позволить вакцинной композиции обеспечивать защиту от нескольких вирусов гриппа А. Например, при введении индивиду вакцинная композиция может индуцировать иммунный ответ, являющийся протективным против инфекции некоторыми или всеми из вирусов гриппа А, содержащими консервативный эпитоп. Следовательно, одну вакцинную композицию можно использовать для профилактики или лечения инфекции широким спектром вирусов гриппа А. Это может помочь преодолеть некоторые из проблем, ассоциированных с существующими вакцинами от вируса гриппа А. В частности, адресное воздействие на консервативный эпитоп может помочь избежать необходимости частой разработки новых вакцин, соответствующих текущему(им) серотипу(ам) вируса, инфицирующего население. Вакцинную композицию согласно настоящему изобретению можно применять для профилактики или лечения инфекции новыми штаммами, появляющимися в середине сезона, например, потенциально пандемическими штаммами. Вакцинную композицию согласно настоящему изобретению можно применять для профилактики или лечения инфекции штаммами, возникающими в результате рекомбинации сегментов вируса гриппа А свиней, лошадей и/или птиц с 8 сегментом вируса гриппа А человека.

В одном аспекте CD8⁺ Т-клеточный эпитоп может присутствовать в прогнозируемой ОРС длиной по меньшей мере 85, по меньшей мере 167 или по

меньшей мере 216 кодонов в вирусе гриппа А свиней, лошадей и/или птиц, например, вирусе гриппа А свиней серотипа H1N1. Например, CD8+ Т-клеточный эпитоп может присутствовать в ОРС длиной по меньшей мере 85, по меньшей мере 167 или по меньшей мере 216 кодонов, которая может возникнуть в вирусе гриппа А свиней, лошадей и/или птиц при условии мутации 8 сегмента. Например, CD8+ Т-клеточный эпитоп может присутствовать в ОРС длиной по меньшей мере 85, по меньшей мере 167 или по меньшей мере 216 кодонов, которая может возникнуть в вирусе гриппа А свиней, лошадей и/или птиц при условии замены одного или более нуклеотидов (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более или десяти или более нуклеотидов) в 8 сегменте на другой нуклеотид. Замена на другой нуклеотид может изменить стоп-кодон, кодируемый 8 сегментом в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, на кодон, кодирующий аминокислоту. Например, замена одного нуклеотида в стоп-кодоне UAG может привести к появлению кодона UAU, UAC, UUG, UCG, UGG, CAG, AAG или GAG, кодирующего аминокислоту.

За счет включения иммуногенного пептида, содержащего CD8+ Т-клеточный эпитоп, который может присутствовать в прогнозируемой ОРС длиной по меньшей мере 85, по меньшей мере 167 или по меньшей мере 216 кодонов в вирусе гриппа А свиней, лошадей и/или птиц, в вакцинную композицию можно улучшить способность вакцинной композиции защищать от потенциально пандемических штаммов вируса гриппа А. Например, это может позволить вакцинной композиции индуцировать протективный иммунный ответ против вируса гриппа А свиней, лошадей или птиц, получившего ОРС NEG8 длиной 85 кодонов, 167 кодонов или 216 кодонов, присутствующую в вирусах гриппа А человека и придающую вирусу устойчивость в организме человека.

Пептиды NEG8

Как задано в разделе «Примеры», авторы настоящего изобретения выявили ряд пептидов, которые (i) получены из полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой 8 сегментом вирусов гриппа А человека в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции (ОРС NEG8), и (ii) презентуются молекулами МНС I класса на клетках, инфицированных вирусом гриппа А человека. Соответственно, авторы настоящего изобретения выявили ряд

CD8+ Т-клеточных эпитопов, кодируемых OPC NEG8. Эпитопы приведены в таблицах 1 и 2 ниже.

SEQ ID NO:	Последовательность	Идентификатор белка	Модификации	Достоверность	XCorr	m/z [Да]
16	WSILMQRGP	NEG8		Высокая	2,14	544,29120
17	EAGVETMVIL	NEG8		Высокая	1,95	531,27979
18	IAPSSVKALS	NEG8		Высокая	1,88	486,79718
19	PMRTPIAFL	NEG8		Средняя	1,74	349,20383
20	ISMNQFLDNS	NEG8	M3 (окисление)	Средняя	1,67	592,77045
21	LMQRGPS TF	NEG8		Средняя	1,66	518,77515
22	FHSSPPMRTP	NEG8		Средняя	1,65	386,18805
23	KITLKFAFNMM	NEG8	M10 (окисление); M11 (окисление)	Средняя	1,60	688,34729
24	LVCVSLLSAILSL	NEG8		Средняя	1,48	729,93231

Таблица 1

5

SEQ ID NO:	Посл.	Белок	Мотив	XCorr	m/z
25	AFNMMFLSM	NSP	A24	1,35	554,24
26	AILSLQTFD	NSP	A24	1,10	504,26

27	DNSSIVIS V	NSP		1,40	467,24
28	IAWSILIQ	NS1		1,22	472,28
29	IVMSVMY R	NSP	A3	1,17	507,75
30	FLICVSPL QL	NSP	A2/24	1,76	566,81
31	GGLPFSLL L	NS1		1,82	458,78
32	LFLICVSL L	NSP	A24	1,74	510,81
33	SPLQLAIL SL	NSP	B7	1,90	527,82
34	IFRFCFGG SG	Полимераза PB2		1,49	545,76
35	VAASMFR P	NSP		1,45	447,74
36	LSLQTSDL A	NSP		1,11	474,25
37	SIRVSNRS	Полимераза PB2		1,08	459,76
38	FSVMFLS M	NS1		1,17	489,22
39	SVKALSSI	HA	A2/24	1,15	402,74
40	ALMSRPR V	NSP	A2	1,24	465,27
41	EGNGEISP T	NSP		1,02	452,21
42	AFNMMFF S	NSP		1,06	505,69
43	PAISRFCF	HA	A24	1,48	470,73
44	AFSVMFL SM	NSP	A24	1,36	516,74

45	LIQRGPAT FCL	Белок матрикса	A2/24	1,36	609,83
46	LIQRGPAT F	Белок матрикса			
47	AILSLQTF D	NSP	A24	1,10	504,26
48	ALSSIRVS S	Полимераза PB2	A2 B7	1,10	460,25
49	FSMMLLS MI	Полимераза PB1		1,00	560,76
50	SPPMRTPT	Белок PA-X		1,13	451,72
51	LIVLAIYR FC	NSP	A24	1,11	605,86
52	SLRTFDL A	NSP	A2	1,09	461,74
53	MLFVQSY FQ	NSP		1,05	581,79

Таблица 2

Вакцинная композиция может содержать один или более из пептидов, представленных в SEQ ID NO: 5 - 41. Например, вакцинная композиция может
5 содержать два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, 15 или более, 16 или более, 17 или более, 18 или более, 19 или более, 20 или более, 21 или более, 22 или более, 23 или более, 24 или более, 25 или более, 26 или более, 27 или более, 28 или более, 29 или более, 30
10 или более, 31 или более, 32 или более, 33 или более, 34 или более, 35 или более или 36 или более пептидов, представленных в SEQ ID NO: 5 - 41 в любой комбинации. Вакцинная композиция может содержать все пептиды, представленные в SEQ ID NO: 5 - 41.

Вакцинная композиция может, например, содержать один или более из
15 пептидов, каждый из которых состоит из одного из пептидов, представленных в SEQ ID NO: 5 - 41. Вакцинная композиция может, например, содержать один или более из

пептидов, каждый из которых содержит один из пептидов, представленных в SEQ ID NO: 5 - 41. Пептид, содержащий пептид, представленный в одной из SEQ ID NO: 5 - 41, может содержать пептид, представленный в одной из SEQ ID NO: 5 - 41, и ряд других аминокислот на N-конце и/или C-конце пептида, представленного в одной из SEQ ID NO: 5 - 41. Например, вакцинная композиция может содержать пептид, содержащий пептид, представленный в одной из SEQ ID NO: 5 - 41, и одну или более, две или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, 15 или более, 20 или более или 25 или более аминокислот на N-конце пептида, представленного в одной из SEQ ID NO: 5 - 41. Например, вакцинная композиция может содержать пептид, содержащий пептид, представленный в одной из SEQ ID NO: 5 - 41, и одну или более, две или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, 15 или более, 20 или более или 25 или более аминокислот на C-конце пептида, представленного в одной из SEQ ID NO: 5 - 41. Количество аминокислот на N-конце и C-конце пептида, представленного в одной из SEQ ID NO: 5 - 41, может быть одинаковым или различающимся.

Поскольку OPC NEG8 характеризуется высокой степенью консервативности среди вирусов гриппа А человека, SEQ ID NO: 5 - 41 также должны быть консервативными среди вирусов гриппа А человека. Таким образом, вакцинная композиция, содержащая один или более из пептидов, представленных в SEQ ID NO: 5 - 41, может обеспечивать преимущества, ассоциированные с включением консервативного эпитопа и приведенные выше.

Любая из SEQ ID NO: 5 - 41 может присутствовать в прогнозируемой OPC длиной по меньшей мере 167 или по меньшей мере 216 кодонов в вирусе гриппа А свиней, лошадей и/или птиц. Таким образом, вакцинная композиция, содержащая один или более из пептидов, представленных в SEQ ID NO: 5 - 41, может обеспечивать преимущества, приведенные выше.

30 *Вакцинные композиции, обеспечивающие перекрестную защиту*

Как задано выше, OPC NEG8 характеризуется высокой степенью консервативности среди вирусов гриппа А человека, и, кроме того, присутствует в вирусах гриппа А птиц, лошадей и/или свиней. Другие оцРНК-содержащие вирусы могут аналогичным образом содержать OPC, кодируемую по меньшей мере частью

их генома в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, которая является консервативной среди вирусов того же рода или семейства. Полипептид, кодируемый ОРС, и CD8+ Т-клеточный(е) эпитоп(ы), который(е) он содержит, также могут быть консервативными.

- 5 Например, ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа В. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов гриппа С.

- ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди флавивирусов, например, эболавирусов и/или вирусов Марбург. Например, ОРС,
10 полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди двух или более из ZEBOV, BDBV, RESTV, SUDV и TAFV. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов Марбург. Например, ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди MARV и RAVV. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди эболавирусов и вирусов Марбург. Например,
15 ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди одного или более из ZEBOV, BDBV, RESTV, SUDV и TAFV и одного или более из MARV и RAVV.

- ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди флавивирусов. Например, ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди двух или более из вируса Зика, вируса денге, вируса
20 Западного Нила и вируса желтой лихорадки, а также вируса энцефалита Сент-Луис, вируса японского энцефалита, вируса энцефалита долины Муррей, вируса клещевого энцефалита, вируса энцефалита кунджин, вируса энцефалита Росио, вируса весенне-летнего энцефалита, вируса Негиси, вируса Кьясанурского леса, вируса омской геморрагической лихорадки, вируса Повассан, вируса энцефаломиелита овец, вируса
25 Рио-Браво, вируса острова Тюлений, вируса Нтайя и вируса Модок. Например, ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вируса Зика и вируса денге, или вируса Зика, вируса денге и вируса Западного Нила. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов Зика. Например, ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди африканского вируса
30 Зика и азиатского вируса Зика. ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди вирусов денге. Например, ОРС, полипептид и/или эпитоп могут быть консервативными среди двух или более из DENV-1, DENV-2, DENV-3 и DENV-4.

Как уже упоминалось, включение консервативного эпитопа в вакцинную композицию может придать возможность защиты от нескольких видов, штаммов или серотипов вирусов, обеспечивая перекрестную защиту в пределах рода и/или семейства вирусов. Соответственно, одну вакцинную композицию можно использовать для защиты от широкого спектра оцРНК-содержащих вирусов. Это обеспечивает дешевые средства контроля распространения инфекции оцРНК-содержащего вируса. Включение консервативных пептидов в вакцинную композицию может придавать ей протективные свойства против новых штаммов оцРНК-содержащих вирусов, способствуя долгосрочному контролю инфекции. Кроме того, если оцРНК-содержащий вирус представляет собой флавивирус, включение консервативного эпитопа в вакцинную композицию может эффективно предотвращать или минимизировать развитие антителозависимого усиления инфекции вируса денге после введения вакцинной композиции.

15 *Взаимодействие с супертипами HLA*

Вакцинная композиция может содержать по меньшей мере один иммуногенный пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, который взаимодействует с по меньшей мере двумя различными супертипами HLA. Это дает возможность вакцинной композиции вызывать более выраженный CD8⁺ Т-клеточный ответ у индивидов, которым вводят вакцинную композицию. Это обусловлено тем, что вакцинная композиция должна быть способна вызывать CD8⁺ Т-клеточный ответ у индивидов с супертипом HLA, взаимодействующим с CD8⁺ Т-клеточным эпитопом. Вакцинная композиция может содержать по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере десять, по меньшей мере пятнадцать или по меньшей мере двадцать иммуногенных пептидов, каждый из которых содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной, который взаимодействует с по меньшей мере двумя различными супертипами HLA. Каждый иммуногенный пептид может взаимодействовать с по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью, по меньшей мере шестью, по меньшей мере

7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 различными супертипами HLA. Каждый иммуногенный пептид может взаимодействовать с двумя или более из HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58 или HLA-B62, или любого супертипа HLA, известного в данной области техники, в любой комбинации.

Вакцинная композиция может содержать два или более иммуногенных пептида, (i) каждый из которых содержит свой CD8⁺ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, и (ii) каждый из которых взаимодействует со своим супертипом HLA. Включение двух или более таких иммуногенных пептидов в вакцинную композицию дает вакцинной композиции возможность вызывать более выраженный CD8⁺ Т-клеточный ответ у индивидов, которым вводят вакцинную композицию. Это обусловлено тем, что вакцинная композиция должна быть способна вызывать CD8⁺ Т-клеточный ответ у индивидов с супертипом HLA, взаимодействующим с одним из CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, содержащихся в двух или более иммуногенных пептидах. Каждый CD8⁺ Т-клеточный эпитоп может взаимодействовать с HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58 или HLA-B62, или любым супертипом HLA, известным в данной области техники. Возможна любая комбинация иммуногенных пептидов, содержащих такой CD8⁺ Т-клеточный эпитоп.

CD8⁺ Т-клеточные эпитопы

CD8⁺ Т-клеточные эпитопы, презентруемые клетками, инфицированными оцРНК-содержащими вирусами, можно выявлять с целью непосредственного выявления CD8⁺ Т-клеточных эпитопов для включения в вакцинную композицию. Это эффективный и логичный способ, который можно применять отдельно или для подтверждения полезности потенциальных CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, выявленных с помощью методологии прогнозирования МНС-мотива.

Для выполнения способа клетки инфицируют оцРНК-содержащим вирусом и поддерживают в культуре в течение приблизительно 72 часов при температуре приблизительно 37°C. После культивирования клетки собирают и промывают. Затем клетки лизируют, например, посредством гомогенизации и

замораживания/размораживания в буфере, содержащем 1% NP40. Лизаты осветляют центрифугированием при 2000 об/мин в течение 30 мин для удаления остатков клеток.

Затем выделяют комплексы МНС/пептид из лизатов с помощью иммуноаффинной хроматографии с гранулами белка A/G (UltraLink
5 иммобилизованный белок A/G, Pierce, Рокфорд, штат Иллинойс, США), покрытыми W6/32 (моноклональное антитело, распознающее любую молекулу МНС I класса). Для покрытия гранул антителом гранулы промывают буфером с низким pH, а затем ополаскивают PBS, инкубируют при комнатной температуре с 0,5 мг антитела в течение 2 часов и трижды промывают для удаления несвязавшегося антитела. Для
10 иммуноаффинной хроматографии гранулы с покрытием инкубируют при комнатной температуре с лизатом в течение 2 часов при непрерывном встряхивании. Затем гранулы отделяют от лизата центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут. Связанные комплексы МНС элюируют с гранул добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУК), pH 1,5.

15 Затем элюат нагревают при 85°C в течение 15 минут для диссоциации связавшихся пептидов с молекул МНС. После охлаждения до комнатной температуры пептиды отделяют от антитела центрифугированием с использованием, например, мембранных фильтров с порогом молекулярной массы 3 кДа (Millipore). Фильтрат концентрируют с помощью вакуумного центрифугирования и разбавляют до
20 конечного объема 100 мкл. Очищенную смесь пептидов фракционируют, например, с использованием C-18 обращенно-фазной (ОФ) колонки (например, диаметром 4,6 мм x длиной 150 мм) и автономной ВЭЖХ. Для этого этапа подвижная фаза А может представлять собой 2% ацетонитрил (CAN) и 0,1% муравьиную кислоту (FA) в воде, а подвижная фаза В - 0,1% FA и 90% CAN в воде.

25 Затем пептид-содержащие фракции элюируют с колонки, высушивают в вакууме и анализируют с использованием масс-спектрометрии для выявления последовательностей во фракциях. Затем можно выполнить поиск данных полученных спектров по всем белкам, включенным в базы данных оцРНК-содержащих вирусов, для выявления пептидных последовательностей,
30 ассоциированных с оцРНК-содержащим вирусом. Затем можно получить синтетические пептиды в соответствии с выявленными последовательностями и подвергать их масс-спектрометрии с целью подтверждения их идентичности пептидам в пептидсодержащих фракциях.

В данном способе клетки любого типа можно инфицировать оцРНК-содержащим вирусом любого типа. оцРНК-содержащие вирусы подробнее описаны ниже. Клетки могут представлять собой антигенпрезентирующие клетки. Клетки могут представлять собой клетки гепатомы, например, клетки HepG2, EBV-трансформированные лимфобластоидные В-клетки, например, клетки JY, или лимфобласты, например, клетки T2.

Непосредственное выявление CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, презентруемых клетками, инфицированными оцРНК-содержащими клетками, является более выгодным по сравнению с методологией прогнозирования МНС-мотива. База данных иммунных эпитопов (IEDB; <http://www.iedb.org>) получена способами прогнозирования мотивов, а не функциональными способами, и содержит большое количество прогнозируемых HLA-специфичных Т-клеточных эпитопов оцРНК-содержащих вирусов, в том числе некоторые общие эпитопы с высокими показателями связывания с МНС и ограниченными характеристиками CTL. Поскольку клетки, инфицированные оцРНК-содержащим вирусом, могут презентировать как доминантные, так и субдоминантные эпитопы, сортировка иерархии доминантности эпитопов, презентруемых в естественных условиях, с помощью этой базы данных затруднительна. Так, на основании только базы данных иммунных эпитопов неясно, от какого из перечисленных эпитопов при его включении в вакцинную композицию можно ожидать эффективной индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа. Способ непосредственного выявления, приведенный выше, обеспечивает механизм подтверждения полезности эпитопов.

Вакцинные композиции на основе эпитопов, презентруемых клетками, инфицированными оцРНК-содержащими вирусами, превосходят вакцины на основе субъединиц белков вируса или эпитопа прогнозируемого мотива. Процессинг белка иммунной системой, вероятно, влияет на нативные вирусные эпитопы. Использование пептидов, в отношении которых продемонстрировано презентирование инфицируемыми клетками, в качестве основы вакцинной композиции устраняет источник неопределенности, поскольку эти пептиды уже подвергались процессингу белков.

CD4⁺ Т-клеточные эпитопы

Как задано выше, вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может содержать иммуногенный пептид, содержащий CD4⁺ Т-клеточный эпитоп.

Вакцинная композиция может содержать два или более, например, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более иммуногенных пептидов, содержащих CD4⁺ Т-клеточные эпитопы. CD4⁺ Т-клеточный эпитоп представляет собой пептид, способный (i) презентироваться молекулой МНС II класса и (ii) распознаваться Т-клеточным рецептором (TCR), присутствующим на CD4⁺ Т-клетке. Распознавание TCR предпочтительно приводит к активации CD4⁺ Т-клетки. Активация CD4⁺ Т-клетки может привести к усиленной пролиферации и/или продукции цитокинов.

CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может представлять собой CD4⁺ Т-клеточный эпитоп оцРНК-содержащего вируса. Таким образом, CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может представлять собой пептид, экспрессируемый одним или более из оцРНК-содержащих вирусов (например, вирусом гриппа А, вирусом денге, вирусом Зика, эболавирусом или вирусом Марбург) и способный (i) презентироваться молекулой МНС II класса и (ii) распознаваться Т-клеточным рецептором (TCR), присутствующим на CD4⁺ Т-клетке. Такие пептиды известны в данной области техники.

CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может представлять собой CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, не являющийся CD4⁺ Т-клеточным эпитопом оцРНК-содержащего вируса. Например, CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может экспрессироваться организмом, отличающимся от оцРНК-содержащего вируса. CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может, например, экспрессироваться *Clostridium tetani*. Например, CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может происходить от столбнячного токсина.

CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может представлять собой CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, реагирующий со всеми типами HLA II класса, т.е. так называемый «смешанный» эпитоп. Включение смешанного эпитопа в вакцинную композицию может улучшить способность вакцинной композиции индуцировать иммунный ответ на иммуногенный пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может, например, содержать последовательность FKLQTMVKLFNRIKNNVA (SEQ ID NO: 54) и/или последовательность LQTMVKLFNRIKNNVAGGC (SEQ ID NO: 55). SEQ ID NO 54 и 55 представляют собой смешанные эпитопы, происходящие от столбнячного токсина.

Пептид, содержащий CD4+ Т-клеточный эпитоп, может представлять собой другой пептид иммуногенного пептида, содержащего CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. CD4+ Т-клеточный эпитоп может, например, содержаться в дополнительном пептиде в вакцинной композиции, т.е. в пептиде, не содержащем CD8+ Т-клеточного эпитопа полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Как упоминалось выше, дополнительный пептид может содержать один или более из CD8+ Т-клеточных эпитопов и/или один или более из В-клеточных эпитопов, а также CD4+ Т-клеточный эпитоп.

Пептид, содержащий CD4+ Т-клеточный эпитоп, может представлять собой тот же пептид, что и иммуногенный пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Таким образом, иммуногенный пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, может дополнительно содержать CD4+ Т-клеточный эпитоп.

Если пептид, содержащий CD4+ Т-клеточный эпитоп, также содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп (например, CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции), CD8+ эпитоп может быть вложен в CD4+ Т-клеточный эпитоп. CD4+ Т-клеточные эпитопы обычно длиннее, чем CD8+ Т-клеточные эпитопы. Таким образом, удлинение одного или обоих концов CD8+ Т-клеточного эпитопа может привести к получению более длинного CD4+ Т-клеточного эпитопа, последовательность которого по-прежнему содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп. Таким образом, CD4+ Т-клеточный эпитоп может содержать CD8+ Т-клеточный эпитоп, например, CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к

трансляции (например, эпитоп, представленный в SEQ ID NO: 5 - 41), удлиненный с N-конца или С-конца. CD8⁺ Т-клеточный эпитоп можно удлинить на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот с N-конца. CD8⁺ Т-клеточный эпитоп можно удлинить на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот с С-конца. CD8⁺ Т-клеточный эпитоп предпочтительно удлиняют на 3 аминокислоты с N-конца и на 3 аминокислоты с С-конца. В то же время CD8⁺ Т-клеточный эпитоп не требуется удлинять на одно и то же количество аминокислот с каждого конца.

CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, вложенный в CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, может генерировать надежный CTL-ответ. Удлиненный пептид (CD4⁺ Т-клеточный эпитоп) может индуцировать цитокиновые реакции, опосредованные Т-хелперами. Таким образом, включение пептида оцРНК-содержащего вируса, содержащего CD8⁺ Т-клеточный эпитоп и CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, в вакцинную композицию может дать вакцинной композиции возможность индуцировать как цитотоксический, так и Т-хелперный ответ.

15

В-клеточные эпитопы

Вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может содержать иммуногенный пептид, содержащий В-клеточный эпитоп. Вакцинная композиция может содержать два или более, например, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более пептидов, содержащих В-клеточные эпитопы. В-клеточный эпитоп представляет собой пептид, который может распознаваться В-клеточным рецептором (BCR), присутствующим на В-клетке. Распознавание BCR предпочтительно приводит к активации и/или созреванию В-клетки. Активация В-клетки может привести к усиленной пролиферации и/или продукции антитела.

В-клеточный эпитоп может представлять собой В-клеточный эпитоп оцРНК-содержащего вируса. Таким образом, В-клеточный эпитоп может представлять собой пептид, экспрессируемый одним или более из оцРНК-содержащих вирусов, который может распознаваться В-клеточным рецептором (BCR), присутствующим на В-клетке. Такие пептиды известны в данной области техники.

В-клеточный эпитоп может являться линейным эпитопом, т.е. эпитопом, определяемым первичной аминокислотной последовательностью конкретной области белка оцРНК-содержащего вируса. В качестве альтернативы, В-клеточный эпитоп может являться конформационным эпитопом, т.е. эпитопом, определяемым

конформационной структурой нативного белка оцРНК-содержащего вируса. В этом случае эпитоп может быть непрерывным (т.е. компоненты, взаимодействующие с антителом, расположены в белке последовательно друг за другом) или дискретным (т.е. компоненты, взаимодействующие с антителом, расположены на разрозненных
5 фрагментах белка, которые сближаются друг с другом в трехмерной структуре нативного белка).

Обычно длина В-клеточного эпитопа составляет от приблизительно 5 до 20 аминокислот, например, от 6 до 19, от 7 до 18, от 8 до 17, от 9 до 16, от 10 до 15, от 11 до 14 или от 12 до 13 аминокислот.

10 В данной области техники известны способы выявления В-клеточных эпитопов. Например, для выявления В-клеточных эпитопов можно использовать способы картирования эпитопов. Эти способы включают структурные подходы, где известную или смоделированную структуру белка используют в подходе на основе алгоритма для прогнозирования поверхностных эпитопов, и функциональные
15 подходы, где можно количественно оценить связывание целого белка, фрагментов белка или пептидов с антителом, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА). Кроме того, можно использовать конкурентное картирование, модификацию антигена или способы фрагментации белка.

20

Наночастицы

Любой иммуногенный пептид, содержащийся в вакцинной композиции согласно настоящему изобретению, может быть присоединен к наночастице. Присоединение к наночастице, например, наночастице золота, является
25 благоприятным.

Присоединение пептида к наночастице (например, наночастице золота) снижает или устраняет потребность во включении вируса или адьюванта в вакцинную композицию. Наночастицы могут содержать иммунные «сигналы опасности», способствующие эффективной индукции иммунного ответа на пептиды.
30 Наночастицы могут индуцировать активацию и созревание дендритных клеток (ДК), необходимое для надежного иммунного ответа. Наночастицы могут содержать чужеродные компоненты, улучшающие поглощение наночастиц и, таким образом, пептидов клетками, например, антигенпрезентирующими клетками. Таким образом, присоединение пептида к наночастице может усилить способность

антигенпрезентирующих клеток стимулировать вирус-специфичные Т- и/или В-клетки. Присоединение к наночастице также облегчает доставку вакцинной композиции подкожным, внутрикожным, трансдермальным и пероральным/буккальным путем, обеспечивая гибкость введения.

5 Наночастицы представляют собой частицы размером от 1 до 100 нанометров (нм), которые можно использовать в качестве подложки для иммобилизации лигандов. В вакцинной композиции согласно настоящему изобретению средний диаметр наночастицы может составлять от 1 до 100, от 20 до 90, от 30 до 80, от 40 до 70 или от 50 до 60 нм. Средний диаметр наночастицы предпочтительно составляет от 10 20 до 40 нм. Средний диаметр от 20 до 40 нм облегчает поглощение наночастиц цитозолем. Средний диаметр можно измерить с использованием методик, хорошо известных в данной области техники, например, трансмиссионной электронной микроскопии.

 В данной области техники известны наночастицы, подходящие для доставки 15 антигена, например, иммуногенного пептида. Кроме того, известны способы получения таких наночастиц.

 Наночастица может, например, представлять собой полимерную наночастицу, неорганическую наночастицу, липосому, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), вирусоподобную частицу (VLP) или самособирающийся белок. 20 Наночастица предпочтительно представляет собой наночастицу фосфата кальция, наночастицу кремния или наночастицу золота.

 Наночастица может являться полимерной наночастицей. Полимерная наночастица может содержать один или более из синтетических полимеров, например, сополимер d,l-лактида и гликолида (PLG), сополимер d,l-молочной и 25 гликолевой кислот (PLGA), поли(g-глутаминовую кислоту) (g-PGA) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полистирол. Полимерная наночастица может содержать один или более из природных полимеров, например, полисахарид, например, пуллулан, альгинат, инулин и хитозан. Применение полимерных наночастиц может быть выгодным из-за свойств полимеров, которые могут 30 содержаться в наночастице. Например, вышеперечисленные природные и синтетические полимеры могут обладать хорошей биосовместимостью и биоразлагаемостью, быть нетоксичными и/или поддаваться манипуляциям с приданием желательной формы и размера. Полимерная наночастица может образовывать гидрогелевую наночастицу. Гидрогелевые наночастицы представляют

собой тип наноразмерных гидрофильных трехмерных полимерных сетей. Гидрогелевые наночастицы обладают благоприятными свойствами, включая гибкий размер сетки, большую площадь поверхности для мультивалентного конъюгирования, высокое содержание воды и высокую емкость загрузки антигенами.

- 5 Такие полимеры, как поли(L-молочная кислота) (PLA), PLGA, ПЭГ и полисахариды особенно подходят для образования гидрогелевых наночастиц.

Наночастица может представлять собой неорганическую наночастицу. Обычно неорганические наночастицы обладают жесткой структурой и не являются биоразлагаемыми. В то же время неорганическая наночастица может быть биоразлагаемой. Неорганическая наночастица может содержать оболочку, в которую можно инкапсулировать антиген. Неорганическая наночастица может содержать ядро, к которому можно ковалентно присоединить антиген. Ядро может содержать металл. Например, ядро может содержать атомы золота (Au), серебра (Ag) или меди (Cu). Ядро может быть образовано атомами более чем одного типа. Например, ядро может содержать сплав, например, сплав Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd или Au/Ag/Cu/Pd. Ядро может содержать фосфат кальция (CaP). Ядро может содержать полупроводниковый материал, например, селенид кадмия.

Другие типичные неорганические наночастицы включают углеродные наночастицы и наночастицы на основе диоксида кремния. Углеродные наночастицы обладают хорошей биосовместимостью, их можно синтезировать в виде нанотрубок и мезопористых сфер. Наночастицы на основе диоксида кремния (SiNP) биосовместимы, при их получении можно настраивать структурные параметры, соответствующие их терапевтическому применению.

Наночастица может представлять собой наночастицу кремния, например, наночастицу элементарного кремния. Наночастица может быть мезопористой или обладать сотовой структурой пор. Наночастица предпочтительно может представлять собой частицу из элементарного кремния с сотовой структурой пор. Такие наночастицы известны в данной области техники и обеспечивают настраиваемую и контролируруемую доставку лекарственного средства, адресное воздействие и высвобождение, которые можно подстроить под почти любую загрузку, путь введения, мишень или профиль высвобождения. Например, такие наночастицы могут увеличивать биодоступность своей загрузки и/или увеличивать проницаемость кишечника и поглощение активных веществ при пероральном введении. Наночастицы могут обладать исключительно высокой емкостью загрузки из-за своей пористой

структуры и большой площади поверхности. Наночастицы могут высвобождать свою загрузку на протяжении нескольких суток, недель или месяцев в зависимости от своих физических свойств. Поскольку кремний является элементом, встречающимся в естественных условиях в организме человека, наночастицы могут не вызывать ответа со стороны иммунной системы. Это является выгодным с точки зрения безопасности наночастиц *in vivo*.

Любая SiNP, описанная выше, может являться или не являться биоразлагаемой. Биоразлагаемые SiNP могут растворяться до ортокремниевой кислоты - биодоступной формы кремния. Показано, что ортокремниевая кислота является выгодной с точки зрения состояния костей, соединительной ткани, волос и кожи.

Наночастица может являться липосомой. Липосомы обычно образуются из биоразлагаемых нетоксичных фосфолипидов и содержат самособирающуюся фосфолипидную двуслойную оболочку с водным ядром. Липосома может представлять собой моноламеллярную везикулу, содержащую один фосфолипидный бислой, или мультиламеллярную везикулу, содержащую несколько концентрических фосфолипидных оболочек, разделенных слоями воды. Как следствие, липосомы можно настраивать, включая гидрофильные молекулы в водный слой или гидрофобные молекулы в фосфолипидные бислои. Липосомы могут инкапсулировать антиген в ядре для доставки. Липосомы могут включать гликопротеины оболочки вируса в оболочку с образованием виросом. В данной области техники используется ряд липосомных продуктов, утвержденных для медицинского применения.

Наночастица может представлять собой иммуностимулирующий комплекс (ISCOM) ISCOM представляют собой клеткоподобные частицы, обычно образуемые из коллоидных сапонинсодержащих мицелл. ISCOM могут содержать холестерин, фосфолипид (например, фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин) и сапонин (например, Quil A из дерева *Quillaia saponaria*). ISCOM традиционно используют для захвата белков оболочки вируса, например, белков оболочки вируса простого герпеса 1 типа, гепатита В или вируса гриппа.

Наночастица может являться вирусоподобной частицей (VLP). VLP представляют собой самособирающиеся наночастицы, не содержащие инфекционной нуклеиновой кислоты и образующиеся посредством самосборки биосовместимого белка капсида. Обычно диаметр VLP составляет от приблизительно 20 до приблизительно 150 нм, например, от приблизительно 20 до приблизительно 40 нм, от приблизительно 30 до приблизительно 140 нм, от приблизительно 40 до

приблизительно 130 нм, от приблизительно 50 до приблизительно 120 нм, от приблизительно 60 до приблизительно 110 нм, от приблизительно 70 до приблизительно 100 нм или от приблизительно 80 до приблизительно 90 нм. VLP выгодно повышают эффективность развившейся структуры вируса, естественным образом оптимизированной для взаимодействия с иммунной системой. Естественным образом оптимизированный размер и повторяющаяся структурная упорядоченность наночастицы означают, что VLP индуцируют мощный иммунный ответ даже в отсутствие адъюванта.

Наночастица может представлять собой самособирающийся белок. Например, наночастица может содержать ферритин. Ферритин представляет собой белок, обладающий способностью к самосборке в почти сферические структуры размером 10 нм. Наночастица может содержать основной белок свода (MVP). Десятью шестью единицами MVP могут самоорганизовываться с образованием бочкообразной наночастицы «свод», размеры которой составляют приблизительно 40 нм в ширину и 70 нм в длину.

Наночастица может представлять собой наночастицу фосфата кальция (CaP). Наночастицы CaP могут содержать ядро, содержащее одну или более (например, две или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 200 или более или 500 или более) молекул CaP. Наночастицы CaP и способы их получения известны в данной области техники. Например, можно получить стабильную суспензию наночастиц CaP путем смешивания растворов неорганических солей кальция и фосфатов в заранее определенных соотношениях при постоянном перемешивании.

Средний размер наночастицы CaP может составлять от приблизительно 80 до приблизительно 100 нм, например, от приблизительно 82 до приблизительно 98 нм, от приблизительно 84 до приблизительно 96 нм, от приблизительно 86 до приблизительно 94 нм или от приблизительно 88 до приблизительно 92 нм. Такой размер частицы может обуславливать лучшую производительность с точки зрения поглощения иммунной клеткой и иммунного ответа по сравнению с другими, более крупными размерами частиц. Размер частиц может быть стабильным (т.е. не демонстрировать значительных изменений), например, при измерении в течение 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 36 месяцев или 48 месяцев.

Наночастицы CaP можно включать в один состав вместе с одним или несколькими антигенами, адсорбированными на поверхности наночастицы или

совместно осажденными с СаР во время синтеза частиц. Например, пептид, например, иммуногенный пептид можно присоединить к наночастице СаР путем растворения пептида в ДМСО (например, в концентрации приблизительно 10 мг/мл), добавления в суспензию наночастиц СаР вместе с N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) (например, в
5 концентрации 0,093 моль/л и сверхчистой водой, и смешивания при комнатной температуре в течение приблизительно 4 часов (например, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов или 10 часов).

Вакцинная композиция может содержать от приблизительно 0,15 до приблизительно 0,8%, например, от 0,2 до приблизительно 0,75%, от 0,25 до
10 приблизительно 0,7%, от 0,3 до приблизительно 0,6%, от 0,35 до приблизительно 0,65%, от 0,4 до приблизительно 0,6% или от 0,45 до приблизительно 0,55% наночастиц СаР. Вакцинная композиция предпочтительно содержит приблизительно 0,3% наночастиц.

Наночастицы СаР обладают высокой степенью биосовместимости из-за их
15 химического сходства с твердыми тканями организма человека, например, костью и зубами. Таким образом, наночастицы СаР преимущественно являются нетоксичными при использовании в терапевтических целях. Наночастицы СаР являются безопасными при введении внутримышечным, подкожным, пероральным или ингаляционным путем. Наночастицы СаР также просто синтезировать при
20 коммерческом производстве. Кроме того, наночастицы СаР могут быть ассоциированы с медленным высвобождением антигена, что может усилить индукцию иммунного ответа на пептид, присоединенный к наночастице. Наночастицы СаР можно использовать как в качестве адъюванта, так и в качестве носителя для доставки лекарственного вещества.

25 Наночастица может являться наночастицей золота. Наночастицы золота известны в данной области техники и описаны, в частности, в WO 2002/32404, WO 2006/037979, WO 2007/122388, WO 2007/015105 и WO 2013/034726. Наночастицы золота, присоединенные к каждому пептиду, могут представлять собой наночастицы, описанные в любом из WO 2002/32404, WO 2006/037979, WO 2007/122388, WO
30 2007/015105 и WO 2013/034726.

Наночастицы золота содержат ядро, содержащее атом золота (Au). Ядро также может содержать один или более из атомов Fe, Cu или Gd. Ядро может быть сформировано из сплава золота, например, Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd или Au/Fe/Cu/Gd. Общее количество атомов в ядре может составлять от 100 до 500

атомов, например, от 150 до 450, от 200 до 400 или от 250 до 350 атомов. Диаметр наночастицы золота может составлять от 1 до 100, от 20 до 90, от 30 до 80, от 40 до 70 или от 50 до 60 нм. Средний диаметр наночастицы золота предпочтительно составляет от 20 до 40 нм.

5 Наночастица может содержать поверхность, покрытую альфа-галактозой и/или бета-GlcNHAc. Например, наночастица может содержать поверхность, пассивированную альфа-галактозой и/или бета-GlcNHAc. В этом случае наночастица может, например, представлять собой наночастицу, содержащую ядро, содержащее атомы металла и/или полупроводника. Например, наночастица может являться
10 наночастицей золота. Бета-GlcNHAc представляет собой молекулярную структуру, ассоциированную с бактериальным патогеном (PAMP), способную активировать антигенпрезентирующие клетки. Таким образом, наночастица, содержащая поверхность, покрытую или пассивированную бета-GlcNHAc, может неспецифически стимулировать иммунный ответ. Поэтому присоединение иммуногенного пептида к
15 такой наночастице может усилить иммунный ответ, вызываемый введением вакцинной композиции согласно настоящему изобретению индивиду.

 К наночастице, которая может представлять собой наночастицу любого типа, описанную выше, можно присоединить один или более из лигандов, не являющихся пептидом. Лиганды могут образовывать «корону» - слой или покрытие, частично или
20 полностью покрывающее поверхность ядра. Корону можно считать органическим слоем, окружающим или частично окружающим ядро наночастицы. Корона может обеспечивать пассивирование ядра наночастицы или участвовать в нем. Так, в некоторых случаях корона может представлять собой слой, в достаточной степени покрывающий ядро для его стабилизации. Корона может облегчать растворимость
25 наночастиц согласно настоящему изобретению, например, растворимость в воде.

 Наночастица может содержать по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 лигандов. Лиганды могут включать один или более из пептидов, белковых доменов, молекул нуклеиновой кислоты, липидных групп, углеводных групп, анионных групп или
30 катионных групп, гликолипидов и/или гликопротеинов. Углеводная группа может представлять собой полисахаридную, олигосахаридную или моносахаридную группу (например, глюкозу). Один или более из лигандов может представлять собой чужеродный компонент, повышающий вероятность захвата наночастицы антигенпрезентирующими клетками из-за его сходства с патогенным компонентом.

Например, один или более из лигандов может содержать углеводную группу (например, бактериальную углеводную группу), поверхностно-активную группу и/или группу глутатиона. Типичные лиганды включают глюкозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), глутатион, 2'-тиоэтил- β -D-глюкопиранозид и 2'-
5 тиоэтил-D-глюкопиранозид. Предпочтительные лиганды включают гликоконъюгаты, образующие гликонаночастицы.

Присоединение лигандов к ядру может облегчить линкер. Линкер может содержать тиоловую группу, алкильную группу, гликолевую группу или пептидную группу. Например, линкер может содержать C2-C15-алкил и/или C2-C15-гликоль.
10 Линкер может содержать серусодержащую группу, аминосодержащую группу, фосфатсодержащую группу или кислород-содержащую группу, способную ковалентно присоединяться к ядру. В качестве альтернативы, лиганды могут непосредственно присоединяться к ядру, например, через серусодержащую группу, аминосодержащую группу, фосфатсодержащую группу или кислород-содержащую
15 группу, входящую в состав лиганда.

Присоединение к наночастицам

Иммуногенный пептид можно присоединить к наночастице по N-концу. Обычно иммуногенный пептид можно присоединить к ядру наночастицы, однако
20 также возможно присоединение к короне или лиганду.

Пептид может быть непосредственно присоединен к наночастице, например, посредством ковалентного связывания атома в серусодержащей группе, аминосодержащей группе, фосфатсодержащей группе или кислород-содержащей группе в составе пептида с атомом в наночастице или ее ядре.

25 Линкер можно использовать для присоединения пептида к наночастице. Линкер может содержать серусодержащую группу, аминосодержащую группу, фосфатсодержащую группу или кислород-содержащую группу, способную ковалентно присоединяться к атому в ядре. Например, линкер может содержать тиоловую группу, алкильную группу, гликолевую группу или пептидную группу.

30 Линкер может содержать пептидный фрагмент и непептидный фрагмент. Пептидный фрагмент может содержать последовательность $X_1X_2Z_1$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из A и G; X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из A и G; а Z_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Y и F. Пептидный фрагмент может содержать последовательность AA Υ

или FLAAY. Пептидный фрагмент линкера может быть присоединен к N-концу пептида. Непептидный фрагмент линкера может содержать C2-C15-алкил и C2-C15-гликоль, например, тиоэтиловую группу или тиопропиловую группу.

Линкер может представлять собой (i) HS-(CH₂)₂-CONH-AAAY; (ii) HS-(CH₂)₂-CONH-LAAAY; (iii) HS-(CH₂)₃-CONH-AAAY; (iv) HS-(CH₂)₃-CONH-FLAAY; (v) HS-(CH₂)₁₀-(CH₂OCH₂)₇-CONH-AAAY; и (vi) HS-(CH₂)₁₀-(CH₂OCH₂)₇-CONH-FLAAY. В этом случае тиоловая группа непептидного фрагмента линкера присоединяет линкер к ядру.

Другие подходящие линкеры для присоединения пептида к наночастице известны в данной области техники, и специалист может выявить и применять их.

Как объяснялось выше, вакцинная композиция может содержать несколько иммуногенных пептидов. Если вакцинная композиция содержит более одного иммуногенного пептида, два или более (например, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более) иммуногенных пептида могут быть присоединены к одной и той же наночастице. Каждый из двух или более (например, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, пятнадцати или более или двадцати или более) иммуногенных пептидов может быть присоединен к своей наночастице. Наночастицы, к которым присоединены иммуногенные пептиды, можно считать наночастицами одного и того же типа. Например, каждый иммуногенный пептид может быть присоединен к наночастице золота. Каждый иммуногенный пептид может быть присоединен к СаР наночастице. Наночастицы, к которым присоединены иммуногенные пептиды, могут представлять собой наночастицы различных типов. Например, один иммуногенный пептид может быть присоединен к наночастице золота, а еще один иммуногенный пептид может быть присоединен к СаР наночастице.

Медикаменты, способы и терапевтическое применение

В настоящем изобретении предложен способ профилактики или лечения вирусной инфекции, включающий введение вакцинной композиции согласно настоящему изобретению индивиду, инфицированному или подвергающемуся риску инфицирования оцРНК-содержащим вирусом. Кроме того, в настоящем изобретении предложена вакцинная композиция согласно настоящему изобретению для

эболавируса Судан (SUDV), эболавируса Рестон (RESTV), эболавируса леса Тай (TAFV) или эболавируса Бундибуго (BDBV). Инфекция вируса Марбург может, например, представлять собой инфекцию вируса Марбург (MARV) или вируса Равна (RAVV).

5 Вакцинная композиция может быть представлена в виде фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция предпочтительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Фармацевтическую композицию можно составить с использованием любого подходящего способа. Получение состава клеток со стандартными фармацевтически приемлемыми
10 носителями и/или вспомогательными веществами можно выполнить с использованием способов, широко применяемых в области фармацевтики. Точная природа состава зависит от нескольких факторов, включая вводимые клетки и желательный путь введения. Подходящие пути введения полностью описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company, Eastern
15 Pennsylvania, USA.

Вакцинную композицию или фармацевтическую композицию можно вводить любым путем. Подходящие пути включают внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, подкожный, внутрикожный, трансдермальный и пероральный/буккальный пути.

20 Композиции может получать вместе с физиологически приемлемым носителем или разбавителем. Обычно такие композиции получают в виде жидких суспензий пептидов и/или наночастиц, связанных с пептидом. Пептиды и/или наночастицы, связанные с пептидом, можно смешивать со вспомогательным веществом, которое являются фармацевтически приемлемым и совместимым с активным ингредиентом.
25 Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин и т.п. и их комбинации.

Кроме того, при желании фармацевтические композиции могут содержать небольшие количества вспомогательных соединений, например, увлажнителей или эмульгаторов и/или pH-буферных агентов.

30 Пептиды или наночастицы, связанные с пептидом, вводят способом, совместимым с составом лекарственной формы и в количестве, являющемся терапевтически эффективным. Вводимое количество зависит от субъекта, подвергаемого лечению, заболевания, подвергаемого лечению, и емкости иммунной системы субъекта. Точное количество наночастиц, необходимое для введения, может

зависеть от решения практикующего врача и назначается индивидуально для каждого субъекта.

Субъекту можно вводить любое подходящее количество пептидов или наночастиц, связанных с пептидом. Например, можно вводить по меньшей мере или
5 приблизительно $0,2 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$ или $5,0 \times 10^6$ пептидов или наночастиц, связанных с пептидом, на кг массы тела пациента. Например, можно вводить по меньшей мере или приблизительно 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 пептидов или наночастиц, связанных с пептидом. В качестве рекомендации, вводимое количество пептидов или наночастиц, связанных с пептидом, может составлять от 10^5 до 10^9 ,
10 предпочтительно от 10^6 до 10^8 .

Способы

В настоящем изобретении предложен способ выявления иммуногенного пептида, содержащего CD8+ Т-клеточный эпитоп, полученный с открытой рамки считывания ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего
15 вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, посредством: (а) выявления ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции; (b) прогнозирования
20 последовательности полипептида, кодируемого ОРС; и (с) оценки того, содержит ли пептид, связывающий молекулу МНС I класса, последовательность, присутствующую в прогнозируемой последовательности, что обеспечивает выявление иммуногенного пептида, содержащего CD8+ Т-клеточный эпитоп.

Иммуногенный пептид может представлять собой любой из иммуногенных
25 пептидов, описанных выше. CD8+ Т-клеточный эпитоп может представлять собой любой из CD8+ Т-клеточных эпитопов, описанных выше. оцРНК-содержащий вирус может представлять собой любой из оцРНК-содержащих вирусов, описанных выше. оцРНК-содержащий вирус предпочтительно является вирусом гриппа А.

ОРС может представлять собой любую из ОРС, описанных выше. ОРС может,
30 например, представлять собой ОРС NEG8. В некоторых аспектах ОРС содержит стоп-кодон. В этом случае прогнозируемую последовательность прогнозируют на основе того, что ОРС мутирована в кодон, кодирующий аминокислоту, и пептид содержит последовательность, присутствующую в части прогнозируемой последовательности в направлении С-конца от мутированного кодона.

В данной области техники хорошо известны способы выявления ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Например, ОРС можно выявить путем анализа последовательности генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Как указано выше, ОРС представляет собой непрерывную последовательность кодонов, содержащую начальный кодон и стоп-кодон. Если последовательность генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, содержит такую последовательность кодонов, она может содержать ОРС.

В данной области техники широко используют способы прогнозирования последовательности полипептида, кодируемого ОРС. Например, зная генетический код, специалист легко может определить аминокислотную последовательность полипептида на основе кодонов, содержащихся в ОРС.

Кроме того, известны способы оценки того, содержит ли пептид, связывающий молекулу МНС I класса, последовательность, присутствующую в прогнозируемой последовательности. Например, пептиды, связывающиеся с молекулой МНС I класса, можно определять, как указано выше в разделе “*CD8+ T-клеточные эпитопы*”. Вкратце, клетки инфицируют оцРНК-содержащим вирусом, культивируют, собирают и промывают. Затем клетки лизируют и выделяют из лизатов комплексы МНС/пептид иммуноаффинной хроматографией. Комплексы МНС, выделенные иммуноаффинной хроматографией, нагревают для диссоциации связавшихся пептидов с молекул МНС. Смесь пептидов очищают и анализируют масс-спектрометрией для идентификации последовательностей пептидов. Затем последовательность пептида можно сравнить с прогнозируемой последовательностью для определения того, содержит ли пептид последовательность, присутствующую в прогнозируемой последовательности. Другими словами, прогнозируемую последовательность можно сравнить с последовательностью, в отношении которой известна или вновь продемонстрирована способность связывать молекулу МНС I класса. Например, при наличии идентичности между прогнозируемой последовательностью и пептидом на некотором (например, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) или всем протяжении пептида, пептид может содержать последовательность, присутствующую в прогнозируемой последовательности. Возможно наличие по

меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичности между пептидом и прогнозируемой последовательностью на некотором или всем протяжении пептида на основании идентичности аминокислот.

Поскольку иммуногенный пептид содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, ожидается, что он может индуцировать или CD8+ Т-клеточный ответ. Способ согласно настоящему изобретению может дополнительно включать один или более из этапов, помогающих подтвердить или опровергнуть это. Например, способ может дополнительно включать (d) приведение CD8+ Т-клеток, полученных от индивида, инфицированного или ранее инфицированного оцРНК-содержащим вирусом, в контакт с пептидом; и (e) измерение иммунного ответа на пептид *in vitro*. Другими словами, CD8+ Т-клетки, полученные от индивида, инфицированного или ранее инфицированного оцРНК-содержащим вирусом, стимулируют иммуногенным пептидом для определения того, содержит ли популяция CD8+ Т-клеток CD8+ Т-клетки, специфичные по отношению к эпитопу, содержащемуся в иммуногенном пептиде. В данной области техники широко известны способы измерения иммунного ответа *in vitro*. Например, можно измерить пролиферацию CD8+ Т-клеток. Можно измерить продукцию ИФН γ , например, путем анализа ИФН γ в супернатанте культуры или исследования внутриклеточного ИФН γ с проточной цитометрии. Экспрессию CD107a, маркера дегрануляции, можно измерить с помощью проточной цитометрии.

Иммуногенные пептиды

В настоящем изобретении предложен иммуногенный пептид, содержащий CD4+ Т-клеточный эпитоп или В-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания (ОРС), кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.

CD4+ Т-клеточный эпитоп представляет собой пептид, способный (i) презентироваться молекулой МНС II класса и (ii) распознаваться Т-клеточным рецептором (TCR), присутствующим на CD4+ Т-клетке. Распознавание TCR предпочтительно приводит к активации CD4+ Т-клетки. Активация CD4+ Т-клетки может привести к усиленной пролиферации и/или продукции цитокинов.

В-клеточный эпитоп представляет собой пептид, который может распознаваться В-клеточным рецептором (BCR), присутствующим на В-клетке. Распознавание BCR предпочтительно приводит к активации и/или созреванию В-клетки. Активация В-клетки может привести к усиленной пролиферации и/или
5 продукции антитела.

Иммуногенный пептид можно использовать в вакцинной композиции. Любой из аспектов, описанных выше в отношении вакцинной композиции, содержащей иммуногенный пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп или В-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома
10 оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, может равным образом относиться к вакцинной композиции, содержащей иммуногенный пептид, содержащий CD4⁺ Т-клеточный эпитоп или В-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном
15 направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции. Введение вакцинной композиции, содержащей иммуногенный пептид, может индуцировать протективный иммунный ответ против оцРНК-содержащего вируса. Например, введение вакцинной композиции может индуцировать CD4⁺ Т-клеточный ответ против оцРНК-содержащего вируса. Введение вакцинной композиции может
20 индуцировать В-клеточный ответ против оцРНК-содержащего вируса. Таким образом, можно индуцировать гуморальный иммунитет против оцРНК-содержащего вируса.

Иммуногенный пептид можно использовать при анализе для диагностики инфекции оцРНК-содержащего вируса. Например, иммуногенный пептид можно
25 использовать для обнаружения антител против оцРНК-содержащего вируса, например, антител, специфичных по отношению к В-клеточному эпитопу, содержащемуся в иммуногенном пептиде. Иммуногенный пептид можно использовать для обнаружения В-клеток, специфичных против оцРНК-содержащего вируса, например, В-клеток с В-клеточным рецептором, специфичным по отношению
30 к В-клеточному эпитопу, содержащемуся в иммуногенном пептиде. Иммуногенный пептид можно использовать для обнаружения CD4⁺ Т-клеток, специфичных по отношению к оцРНК-содержащему вирусу, например, CD4⁺ Т-клеток, специфичных по отношению к CD4⁺ Т-клеточному эпитопу, содержащемуся в иммуногенном

пептиде.

Выявление пандемического потенциала

Пандемии вируса гриппа А традиционно ассоциированы с глобальным
5 измерением серотипа НА вируса. В то же время авторы настоящего изобретения отметили, что некоторые вспышки вируса гриппа А ассоциированы не с изменением серотипа НА, а с изменением количества кодонов в ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома вируса гриппа А в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.

10 Соответственно, в настоящем изобретении предложен способ определения пандемического потенциала вируса гриппа А, включающий этапы: (i) выявления первой ОРС, кодируемой по меньшей мере частью 8 сегмента генома вируса гриппа А в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции; (ii) определения количества кодонов, содержащихся в первой ОРС; и (iii)
15 сравнения количества кодонов, содержащихся в первой ОРС, с количеством кодонов, содержащихся во второй ОРС, кодируемой по меньшей мере частью 8 сегмента генома вируса гриппа А в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, причем различие в количестве кодонов в первой ОРС по сравнению со второй ОРС является показателем пандемического потенциала.

20 В контексте настоящего изобретения пандемический потенциал означает способность вируса гриппа А вызывать пандемию гриппа. Пандемия гриппа происходит при появлении нового вируса гриппа и его распространении в мире.

Первая ОРС может содержать любую нуклеотидную последовательность. Первая ОРС может кодировать любую полипептидную последовательность. Вторая
25 ОРС может содержать любую нуклеотидную последовательность. Вторая ОРС может кодировать любую полипептидную последовательность.

Первая ОРС может иметь любую длину, т.е. содержать любое количество кодонов. Вторая ОРС может иметь любую длину, т.е. содержать любое количество кодонов. Типичные длины ОРС описаны выше.

30 Длина первой и второй ОРС могут различаться на любое количество кодонов. Например, различие на один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, 15 или более, 20 или более, 25 или более, 30 или более, 35 или более, 40 или более, 45 или

более, 50 или более, 60 или более, 70 или более, 75 или более, 80 или более, 90 или более или 100 или более кодонов может являться показателем пандемического потенциала.

5

Следует понимать, что для конкретных потребностей в данной области техники можно организовать различное применение описанных продуктов и способов. Кроме того, следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, приведена исключительно с целью описания конкретных вариантов реализации настоящего изобретения и не предназначена для ограничения.

Кроме того, в настоящем изобретении и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если смысл описания не указывает на иное явным образом. Так, например, упоминание «пептида» включает «пептиды», упоминание слова «наночастица» включает две или более таких наночастиц, и т.д.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем документе выше или ниже, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

20 Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

Пример 1 - выявление CD8+ Т-клеточных эпитопов

Линии клеток

25 Клетки гепатомы HepG2 получили из ATCC и поддерживали в DMEM:F12 (Mediatech, Манассас, штат Виргиния, США). В культуральную среду добавляли 10% эмбриональную телячью сыворотку, L-глутамин (300 мг/мл), неосновные аминокислоты (в концентрации 1×), 0,5 мМ пируват натрия, пенициллин и стрептомицин (в концентрации 1×, добавки получали из Mediatech) [полная среда].

30 Клетки поддерживали при 37 °C в инкубаторе с увлажнением и 5% CO₂.

Получение образцов для анализа МНС-пептидов

Клетки HepG2 выращивали до количества приблизительно 1Е9 клеток. Эти клетки инфицировали штаммом PR8 вируса гриппа А. После 1-ч импульса вирус

отмывали, а клетки инкубировали в течение 72 ч при 37°C. В данный момент клетки собирали и обрабатывали для анализа МНС-пептидов.

Выделение, очистка и фракционирование пептидов, связанных с МНС I класса

5 Инфицированные клетки лизировали путем гомогенизирования и замораживания/размораживания в буфере, содержащем 1,0% NP40. Лизаты осветляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 30 мин для удаления остатков клеток. Комплексы МНС/пептид выделяли иммуноаффинной хроматографией с использованием гранул белка A/G, покрытых антителом W6/32 (моноклональным
10 антителом, распознающим любую молекулу МНС I класса) (UltraLink иммобилизованный белок A/G, Pierce, Рокфорд, штат Иллинойс, США). 400 мкл гранул белка A/G промывали буфером с низким рН с последующим ополаскиванием PBS. Затем гранулы инкубировали с 0,5мг антитела при комнатной температуре в течение 2 часов. Меченые гранулы трижды промывали для удаления несвязанных
15 антител, и гранулы, покрытые антителом, добавляли к полученному лизату клеток. После двухчасового инкубирования при комнатной температуре и непрерывном встряхивании гранулы отделяли от лизата центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут. Связанные комплексы МНС элюировали с гранул добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУК), рН 1,5. Затем элюат нагревали при 85° С в течение
20 15 мин для диссоциации связавшихся пептидов с молекул МНС. После охлаждения раствора до комнатной температуры пептиды отделяли от антитела центрифугированием с использованием мембранных фильтров AMICON Ultra с порогом молекулярной массы 3 кДа (Millipore). Фильтрат концентрировали с помощью вакуумного центрифугирования и разбавляли до конечного объема 100 мкл.
25 Очищенную смесь пептидов фракционировали с использованием C-18 обращенно-фазной (ОФ) колонки, (диаметром 4,6 мм × длиной 150 мм) с использованием автономной ВЭЖХ 3000 (Dionex, Саннивейл, штат Калифорния, США). Подвижная фаза А представляла собой 2% ацетонитрил (ACN) и 0,1% муравьиную кислоту (FA) в воде, а подвижная фаза В - 0,1% FA и 90% ACN в воде. Затем пептиды элюировали
30 с колонки 80-мин линейным градиентом от 5 до 80% буфера В при скорости потока 200 мкл/мин. В общей сложности собрали 35 фракций и высушивали их в вакууме до объема 6 мкл для ЖХ/МС/МС-анализа.

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрические эксперименты выполняли с использованием приборов LTQ (Thermo) и Orbitrap, сопряженных с нано-ВЭЖХ Ultimate (Dionex). Пептидные фракции, очищенные на ОФ-ВЭЖХ, по отдельности вводили в систему ЖХ-МС/МС для идентификации последовательностей пептидов. В рамках

5 встроенного этапа очистки образцов пептиды вначале концентрировали с использованием ОФ-предколонки C18 с 300 мкм ВД × 5 мм (Dionex, Саннивейл, штат Калифорния, США), а затем разделяли с использованием аналитической ОФ-колонки C18 с 75 мкм ВД × 15 см (Dionex, Саннивейл, штат Калифорния, США), уравновешенной в 4% ACN/0,1% FA при скорости потока 250 нл/мин. Подвижная

10 фаза А представляла собой 2% ACN и 0,1% FA в воде, а подвижная фаза В - 0,1% FA и 90% ACN в воде. Пептиды разделяли градиентом от 4% до 50% В в течение 60 мин и от 50% до 80% в течение 90 мин и элюировали непосредственно в масс-спектрометр. Диапазон масс в режиме МС составлял от 350 Да до 1500 Да, а в режиме МС/МС его задали от 100 Да до 1500 Да. Пептиды анализировали с использованием способа,

15 зависящего от данных. Данные полученных спектров искали в базе данных белков вируса гриппа А с использованием Proteome Discoverer (Thermo) для интерпретации данных и получения последовательностей пептидов. Последовательности пептидов, связанных с МНС I класса в клетках, инфицированных PR8, вносили в базу данных.

20 *Выявление пептидов МНС в OPC NEG8*

В базе данных пептидов, для которых обнаружена способность связываться с МНС I класса в клетках, инфицированных PR8, искали последовательность полипептида (SEQ ID NO: 2; MLFVQSYFPLFLV

CVSLLQSAILSLQTFDLAVLAIFRFCFGVSGGPPFSLLLLQANLCRFLETRTVLSFHSS

25 SPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTMVSSRSKITLKFAFNMM

FFSMIAWSILMQRGPSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVMYREAGVETMVILSASSDSS

FRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL), кодируемую OPC NEG8. Обнаружено, что полипептид NEG8 содержал ряд пептидов, связывающихся с МНС I класса в клетках, инфицированных вирусом гриппа А. Ниже в таблице 3 показаны пептиды,

30 кодируемые OPC NEG8 и связывающиеся с МНС I класса в клетках, инфицированных вирусом гриппа А.

SEQ ID NO:	Последовательность	Идентификатор белка	Модификации	Достоверность	XCorr	m/z [Да]
5	WSILMQRGP	NEG8		Высокая	2,14	544,29120
6	EAGVETMVIL	NEG8		Высокая	1,95	531,27979
7	IAPSSVKALS	NEG8		Высокая	1,88	486,79718
8	PMRTPIAFL	NEG8		Средний	1,74	349,20383
9	ISMNQFLDNS	NEG8	M3 (окисление)	Средний	1,67	592,77045
10	LMQRGPS TF	NEG8		Средний	1,66	518,77515
11	FHSSPPMRTP	NEG8		Средний	1,65	386,18805
12	KITLKFANMM	NEG8	M10 (окисление); M11 (окисление)	Средний	1,60	688,34729
13	LVCVSL QSAILSL	NEG8		Средний	1,48	729,93231

Таблица 3

Пример 2

5 Идентичность пяти пептидов, кодируемых ОРС NEG8, для которых обнаружена способность связывать МНС I класса в клетках, инфицированных вирусом гриппа А, подтверждали с использованием масс-спектрометрического анализа синтетических пептидов. Пять пептидов, показанных в таблице 3, синтезировали и подвергали ЖХ-МС-МС-анализу в условиях эксперимента,

10 идентичных описанным выше. Спектры, полученные для каждого пептида, выделенного из клеток, инфицированных вирусом гриппа А, сравнивали со спектром,

полученным для его синтетического аналога, с целью подтверждения последовательности каждого пептида. Результаты показаны в таблице 4 и на фигурах 1-3.

Посл.	Происхождение	Мотив	Происхождение вируса	Тип клеток	Подтверждение
EAGVE TMVIL	Полипептид	A2	NEG8, NSP [вирус гриппа A (A/Moscow/343 /2003(H3N2))], NSP [вирус гриппа A (A/Moscow/328/2003 (H3N2))]	Клетки, инфицированные вирусом гриппа	Нет
IAPSSV KALS	Клетки, инфицированные вирусом гриппа	Нет	NEG8, NSP [вирус гриппа A (A/Moscow/343/2003 (H3N2))], NSP [вирус гриппа A (A/Moscow/328/2003 (H3N2))]	Клетки, инфицированные вирусом гриппа	Да
IAPSSV KALS	Трансмембранный белок	A2	NEG8, NSP [вирус гриппа A (A/Moscow/343 /2003(H3N2))], NSP [вирус гриппа A (A/Moscow/328/2003 (H3N2))]	Клетки, инфицированные вирусом гриппа	Да
PMRTPI AFL	Трансмембранный белок	A2/2 4	NEG8, NSP [вирус гриппа A (A/Moscow/343 /2003(H3N2))], NSP [вирус гриппа A (A/Moscow/328/2003 (H3N2))]	Клетки, инфицированные вирусом гриппа	Нет

LMQRG PSTF	Трансмембранный белок	A24	NEG8, NSP [вирус гриппа А (A/Moscow/343 /2003(H3N2))], NSP [вирус гриппа А (A/Moscow/328/2003 (H3N2))]	Клетки, инфицированные вирусом гриппа	Да
---------------	-----------------------	-----	--	--	----

Таблица 4

На фигурах 1 - 3 показано сравнение масс-спектров, полученных для синтетических пептидов, со спектрами, полученными для пептидов, выделенных из инфицированных клеток. Некоторые типичные ионы в каждом спектре обведены кружком, чтобы проиллюстрировать идентичность пептидов, выделенных из инфицированных клеток, их синтетическим аналогам. Данные подтвердили, что пептиды IAPSSVKALS, LMQRG PSTF и KITLKFAFNMM, кодируемые OPC NEG8Ю действительно находятся в клетках, инфицированных вирусом гриппа А.

10

Пример 3

Последовательность полипептида, кодируемого OPC NEG8 (SEQ ID NO: 2; MLFVQSYFPLFLVCVSLQLSAILSLQTFDLAVLAIFRFCFVGSGGPPFSLLLLQANLC RFLLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTMVSSR SKITLKFAFNMMFFSMIAWSILMQRG PSTFCLGISMNQFLDNSSIVMSVMYREAGV ETMVILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPLPLRDL) использовали для поиска по наборам данных Т-клеточных эпитопов, полученных из клеток, инфицированных вирусом гриппа. Пептиды NEG8, описанные в примерах 1 и 2, также идентифицировали с использованием этого поиска. Цель выполнения поиска заключалась в том, чтобы установить, являются ли любые пептиды или последовательности NEG8 в полипептиде, кодируемом OPC NEG8, общими для любых других белков вируса гриппа А. В таблице 5 приведены Т-клеточные эпитопы, полученные из белков вируса гриппа А, не являющихся NEG8, которые также содержатся в одном или более из пептидов NEG8, выявленных в примерах 1 и 2, или полипептиде, кодируемом OPC NEG8. Среди них можно было выявить многочисленные пептиды NEG8, которые, как считается, связываются с МНС в

25

клетках, инфицированных вирусом гриппа А, на основании уровня достоверности, XCorr, и характеристик масс-спектров фрагмента.

Посл.	Белок	Мотив	Штамм вируса гриппа	XCorr	m/z	Связыва ние HLA	Примеча ния
AFNM MFLSM	NSP	A24	H2N2 H3N2 (человек а)	1,35	554,24	A2:10 A24:7	Несколько наборов данных
AILSLQ TFD	NSP	A24	H3N2 (человек а)	1,10	504,26		Несколько наборов данных
DNSSIV ISV	NSP		H3N2 (человек а)	1,40	467,24		Несколько наборов данных
IAWSIL IQ	NS1		H1N1 (человек а) H7N7 (птиц) H2N2 (человек а)	1,22	472,28		Несколько наборов данных
IVMSV MYR	NSP	A3	H3N2 (человек а)	1,17	507,75		Несколько наборов данных
FLICVS PLQL	NSP	A2/24	H3N2 (человек а)	1,76	566,81	A2:24 A24:13	VLS0670
GGLPF SLLL	NS1		H1N1 (человек а)	1,82	458,78		VLS0670
LFLICV SLL	NSP	A24	H3N2 (человек а)	1,74	510,81	A2:18 A24:21	VLS0670

SPLQL AILSL	NSP	B7	H3N2 (человек а)	1,90	527,82	B7:22	VLS0670
WSILM QRGP	NSP		H3N2 (человек а)	2,14	544,29		VLS0670
IFRFCF GGSG	Полимераз а PB2		H7N7 (птиц) H1N1 (человек а)	1,49	545,76		VLS3056
VAASM FRP	NSP		H3N2 (человек а)	1,45	447,74		VLS3056
LSLQTS DLA	NSP		H3N2 (человек а)	1,11	474,25		VLS3056
SIRVSN RS	Полимераз а PB2		H7N7 (птиц)	1,08	459,76		VLS3056
FSVMF LSM	NS1		H7N7 (птиц)	1,17	489,22		VLS3056 VLS3063
SVKAL SSI	HA	A2/24	H7N7 (птиц) H1N1 (человек а)	1,15	402,74		VLS3056 VLS3063
ALMSR PRV	NSP	A2	H3N2 (человек а)	1,24	465,27		VLS3056
EGNGE ISPT	NSP		H3N2 H2N2 H1N1 (человек а)	1,02	452,21		VLS3056
AFNM MFFS	NSP		H3N2 (человек а)	1,06	505,69		VLS3056

PAISRF CF	HA	A24	H1N1 (человек а)	1,48	470,73		VLS3056
AFSVM FLSM	NSP	A24	H7N7 (птиц)	1,36	516,74	A24:7	VLS3056
LIQRGP ATFCL	Белок матрикса	A2/24	H2N2 H1N1 (человек а)	1,36	609,83		VLS3063
AILSQ TFD	NSP	A24	H3N2 (человек а)	1,10	504,26	A24:2	VLS3063
ALSSIR VSS	Полимераз а PB2	A2 B7	H1N1 (человек а)	1,10	460,25	A2:16 B7:7	VLS3063
FSMML LSMI	Полимераз а PB1		H1N1 (человек а)	1,00	560,76		VLS3063
SPPMR TPT	Белок PA- X		H1N1 (человек а)	1,13	451,72		VLS3063
LIVLAI YRFC	NSP	A24	H3N2 (человек а)	1,11	605,86		VLS3063
SLRTF DLA	NSP	A2	H3N2 (человек а)	1,09	461,74		VLS3063
MLFVQ SYFQ	NSP		H3N2 (человек а)	1,05	581,79		VLS3063

Таблица 5: Пептиды NEG8, общие для других белков вируса гриппа

Пример 4

5 *Стимуляция CTL-реакций in vitro*

Мононуклеары периферической крови (МПК) здорового (наивного) донора-человека стимулировали пептидами, кодируемыми OPC NEG8, для которых показана

способность связывать МНС I класса в клетках, инфицированных вирусом гриппа А, в смеси цитокинов для индукции антиген-специфичной CTL-реакции. МРК стимулировали объединенными свободными пептидами (FP) в течение в общей сложности четырех стимуляций при различной пептидной загрузке.

5 Затем эти стимулированные МРК анализировали посредством совместного культивирования с неинфицированными, инфицированными или нагруженными пептидом мишенями для антиген-специфичного ответа. Клетки с недостаточностью ТАР (T2) использовали для загрузки пептидов, а холостые клетки T2 использовали в качестве контроля. Активированные МРК анализировали на предмет как
10 интерферона-гамма (ИФН γ), так и маркера дегрануляции CD107 посредством проточной цитометрии.

Исследования декстрамеров

Декстрамерные реагенты метили флуоресцентной меткой и использовали для
15 обнаружения антиген-специфичных Т-клеток в суспензиях клеток и образцами плотных тканей. МНС-декстрамеры добавляли к МПК или спленоцитам. Затем добавляли оптимальное количество антитела против CD8, конъюгированных с соответствующим флуорохромом. На этом этапе также можно было добавлять дополнительные антитела (например, антитела против CD3 или CD4),
20 конъюгированные с другими соответствующими флуорохромами. Затем клетки анализировали с помощью проточного цитометра.

Исследования CTL in vivo

Трансгенных мышей (5-6 мышей на группу) три раза с 2-недельным
25 интервалом иммунизировали свободными синтетическими пептидами или конъюгатами наночастица-пептид, смешанными или не смешанными с адьювантом монтанид-51, с использованием подкожного и внутрикожного путей введения. Селезенку и дренирующие лимфатические узлы извлекали через 7 дней после конечной повторной стимуляции для CTL-анализа. Из лимфоидных органов получали
30 суспензии одиночных клеток, и клетки стимулировали пептидными антигенами в культуре в течение 7 дней. Повторно активированные Т-клетки анализировали на предмет эпитоп-специфичных CTL-реакций с использованием клеток T2, нагруженных пептидом NEG8, и клеток HerG2, инфицированных вирусом гриппа А, в качестве мишеней в следующих анализах: продукции ИФН γ и гранзима В

посредством ELISpot; секретиции цитокинов посредством анализа MAGPIX; совместной экспрессии CD107a посредством проточной цитометрии.

Эксперименты по адаптивному переносу

- 5 Эксперименты по адаптивному переносу выполняли с целью исследования наличия у пептид-специфичных CTL, полученных у трансгенных мышей, цитотоксического эффекта против клеток, инфицированных вирусом гриппа А, *in vivo* у мышей ТКИН-Beige. Суспензию инфицированной опухоли печени вводили п/к или в/в ТКИН-мышам Beige с последующим одно- или многократным адаптивным
- 10 переносом пептид-специфичных CTL, полученных у трансгенных мышей A2 против пептида или конструкторов пептид-наночастица. Использовали соответствующие контроли. Отслеживали выживаемость мышей.

Пример 5

15

Изменения длины преобладающей ОРС со временем

- Для получения последовательности 8 сегмента различных вирусов гриппа А использовали международную базу данных гриппа. Геномную последовательность отрицательной полярности анализировали с целью определения длины ОРС NEG8 у
- 20 каждого вируса. Длину ОРС рассчитывали путем определения положения первого стоп-кодона в последовательности отрицательной полярности. Например, вирус, последовательность NEG8 которого содержит стоп-кодон в положении 94, содержит ОРС длиной 93 кодона.

- На фигуре 5 показано количество проанализированных вирусов гриппа А (по
- 25 оси Y) в зависимости от года и месяца сбора (по оси X). Цветовая кодировка показывает длину ОРС, присутствующих в вирусах, собранных в каждый момент времени. Данные показали, что с 1918 по 1947 гг. длина ОРС, преобладающей в вирусах гриппа А человека, составляла 167 кодонов. С 1947 по 2009 г. преобладала ОРС длиной 216 кодонов. После пандемии гриппа 2009 г. длина преобладающей ОРС
- 30 составляла 85 кодонов.

Длина ОРС в зависимости от серотипа

Кроме того, рассмотрели зависимость между серотипом и длиной ОРС. На фигуре 6 показана идентичность ОРС в зависимости от года. Цветовая кодировка показывает

серотип каждого вируса на графике. С 1918 (испанский грипп -зеленый цвет) по 1957 гг. (азиатский грипп - синий цвет) преобладающая ОРС длиной 167 кодонов присутствовала в вирусах серотипа H1N1. Затем преобладающая ОРС длиной 167 кодонов присутствовала в вирусах серотипа H2N2 до 1968 г. (грипп НК - желтый цвет), когда преобладающая ОРС длиной 167 кодонов стала присутствовать в вирусах серотипа H3N2. ОРС длиной 167 кодонов снова наблюдали в вирусах серотипа H1N1 в 1976 г. при гриппе в России (зеленый цвет). Результаты подтверждены на фигуре 7, содержащей график идентичности ОРС длиной 167 кодонов в зависимости от года, причем серотип показан цветовой кодировкой. Эти данные продемонстрировали, что длина ОРС может поддерживаться в популяции вируса гриппа А несмотря на изменения серотипа и ассоциированные групповые эффекты.

Длина ОРС в зависимости от разновидности

На фигуре 8 показана длина ОРС, преобладающих в различных разновидностях вируса гриппа А. В вирусах гриппа А птиц, вирусах гриппа А свиней, подобных вирусам гриппа птиц, и вирусах гриппа А лошадей наблюдали ОРС длиной 93 кодона (или, реже, 135 кодонов). В вирусах гриппа А свиней наблюдали ОРС длиной 140 кодонов и ОРС длиной 167 кодонов. В вирусах гриппа А лошадей длина ОРС NEG8 в течение почти 100% времени составляла 93 кодона. Вирусы гриппа А лошадей никогда не содержали ОРС длиной 85, 167 или 216 кодонов, характерных для вируса гриппа человека.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинная композиция, содержащая иммуногенный пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания (ОРС), кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.
5
2. Вакцинная композиция по п. 1, содержащая два или более иммуногенных пептида.
10
3. Вакцинная композиция п. 2, содержащая два или более иммуногенных пептида, каждый из которых содержит различный CD8+ Т-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания (ОРС), кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.
15
4. Вакцинная композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере один иммуногенный пептид, взаимодействующий с по меньшей мере двумя различными супертипами HLA.
20
5. Вакцинная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанный полипептид усиливает устойчивость оцРНК-содержащего вируса в организме человека.
25
6. Вакцинная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанный оцРНК-содержащий вирус представляет собой вирус, содержащий оцРНК отрицательной полярности, и ОРС характеризуется отрицательной полярностью.
30
7. Вакцинная композиция по п. 6, отличающаяся тем, что вирус, содержащий оцРНК отрицательной полярности, представляет собой ортомиксовирус.
8. Вакцинная композиция по п. 7, отличающаяся тем, что ортомиксовирус
35 представляет собой вирус гриппа.

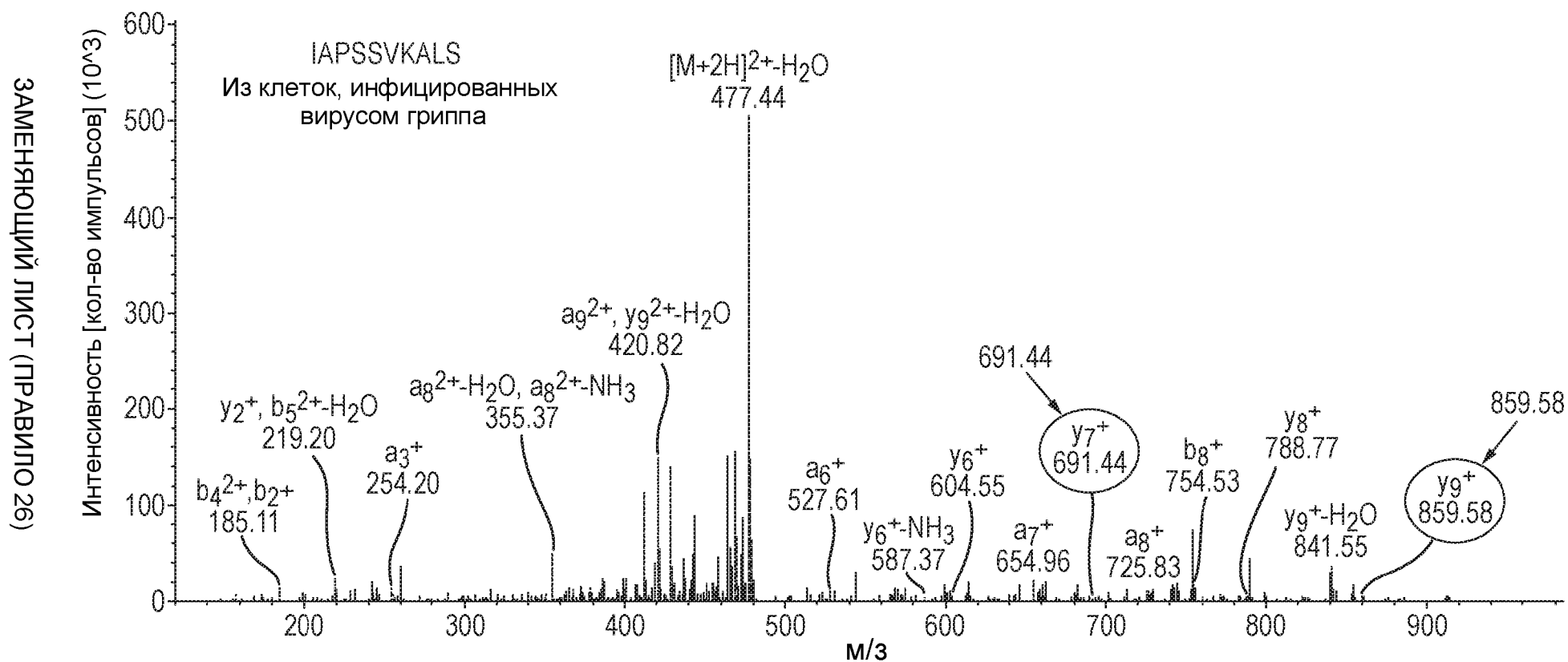
9. Вакцинная композиция по п. 8, отличающаяся тем, что вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А.
- 5 10. Вакцинная композиция по п. 9, отличающаяся тем, что ОРС кодируется по меньшей мере частью 8 сегмента генома вируса гриппа А.
11. Вакцинная композиция по п. 10, отличающаяся тем, что длина ОРС составляет по меньшей мере 85 кодонов.
- 10 12. Вакцинная композиция по п. 10 или 11, отличающаяся тем, что длина ОРС составляет по меньшей мере 167 кодонов.
13. Вакцинная композиция по любому из пп. 10-12, отличающаяся тем, что длина ОРС составляет по меньшей мере 216 кодонов.
- 15 14. Вакцинная композиция по п. 12 или 13, отличающаяся тем, что вирус гриппа А представляет собой вирус испанского гриппа или реконструированный вирус испанского гриппа.
- 20 15. Вакцинная композиция по п. 14, отличающаяся тем, что ОРС содержит последовательность SEQ ID NO. 56 или ее вариант, или последовательность SEQ ID NO: 57 или ее вариант.
- 25 16. Вакцинная композиция по любому из пп. 9-15, отличающаяся тем, что CD8+ Т-клеточный эпитоп является консервативным среди вирусов гриппа А человека.
17. Вакцинная композиция по любому из пп. 9-16, отличающаяся тем, что CD8+ Т-клеточный эпитоп является консервативным среди вирусов гриппа А человека и
- 30 вирусов гриппа А свиней, лошадей и/или птиц.
18. Вакцинная композиция по любому из пп. 9-17, отличающаяся тем, что CD8+ Т-клеточный эпитоп присутствует в прогнозируемой ОРС длиной по меньшей мере 85, по меньшей мере 167 или по меньшей мере 216 кодонов в вирусе гриппа А свиней,
- 35 лошадей и/или птиц.

19. Вакцинная композиция по п. 17 или 18, отличающаяся тем, что вирус гриппа А свиней относится к серотипу H1N1.
20. Вакцинная композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая
5 один или более из пептидов, представленных в SEQ ID NO: 16 - 53.
21. Вакцинная композиция по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что оцРНК-содержащий вирус представляет собой филовирус.
- 10 22. Вакцинная композиция по п. 21, отличающаяся тем, что филовирус представляет собой эболавирус или вирус Марбург.
23. Вакцинная композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что указанный оцРНК-содержащий вирус представляет собой вирус, содержащий оцРНК
15 положительной полярности, а ОРС характеризуется отрицательной полярностью.
24. Вакцинная композиция по п. 23, отличающаяся тем, что оцРНК-содержащий вирус представляет собой флавивирус.
- 20 25. Вакцинная композиция по п. 24, отличающаяся тем, что флавивирус представляет собой вирус денге или вирус Зика.
26. Способ профилактики или лечения вирусной инфекции, включающий введение вакцинной композиции по любому из предшествующих пунктов индивиду,
25 инфицированному или подвергающемуся риску инфицирования оцРНК-содержащим вирусом.
27. Вакцинная композиция по любому из пп. 1-25 для применения в способе профилактики или лечения вирусной инфекции у индивида.
30
28. Способ по п. 26 или вакцинная композиция для применения по п. 27, отличающиеся тем, что вирусная инфекция вызвана зоонозным вирусом.
29. Способ по п. 26 или 28 или вакцинная композиция для применения по п. 27 или
35 28, отличающиеся тем, что индивид является человеком.

30. Способ по п. 26 или вакцинная композиция для применения по п. 27, отличающиеся тем, что вирусная инфекция является инфекцией пандемического вируса.
- 5 31. Способ выявления иммуногенного пептида, содержащего CD8+ Т-клеточный эпитоп ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции, посредством:
- 10 (а) выявления ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции;
- (b) прогнозирования последовательности полипептида, кодируемого ОРС; и
- (с) оценки того, содержит ли пептид, связывающий молекулу МНС I класса, последовательность, присутствующую в прогнозируемой последовательности, что позволяет выявить иммуногенный пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп.
- 15 32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что ОРС содержит стоп-кодон, прогнозируемую последовательность прогнозируют на основе того, что стоп-кодон мутирован в кодон, кодирующий аминокислоту, и пептид содержит последовательность, присутствующую в части прогнозируемой последовательности, которая является С-концевой для мутированного кодона.
- 20 33. Способ по п. 31 или 32, дополнительно включающий:
- (d) приведение CD8+ Т-клеток, полученных от индивида, инфицированного или ранее инфицированного оцРНК-содержащим вирусом, в контакт с пептидом; и
- (е) измерение иммунного ответа на пептид *in vitro*.
- 25 34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что иммунный ответ измеряют, определяя продукцию интерферона гамма (ИФНγ) *in vitro*.
- 30

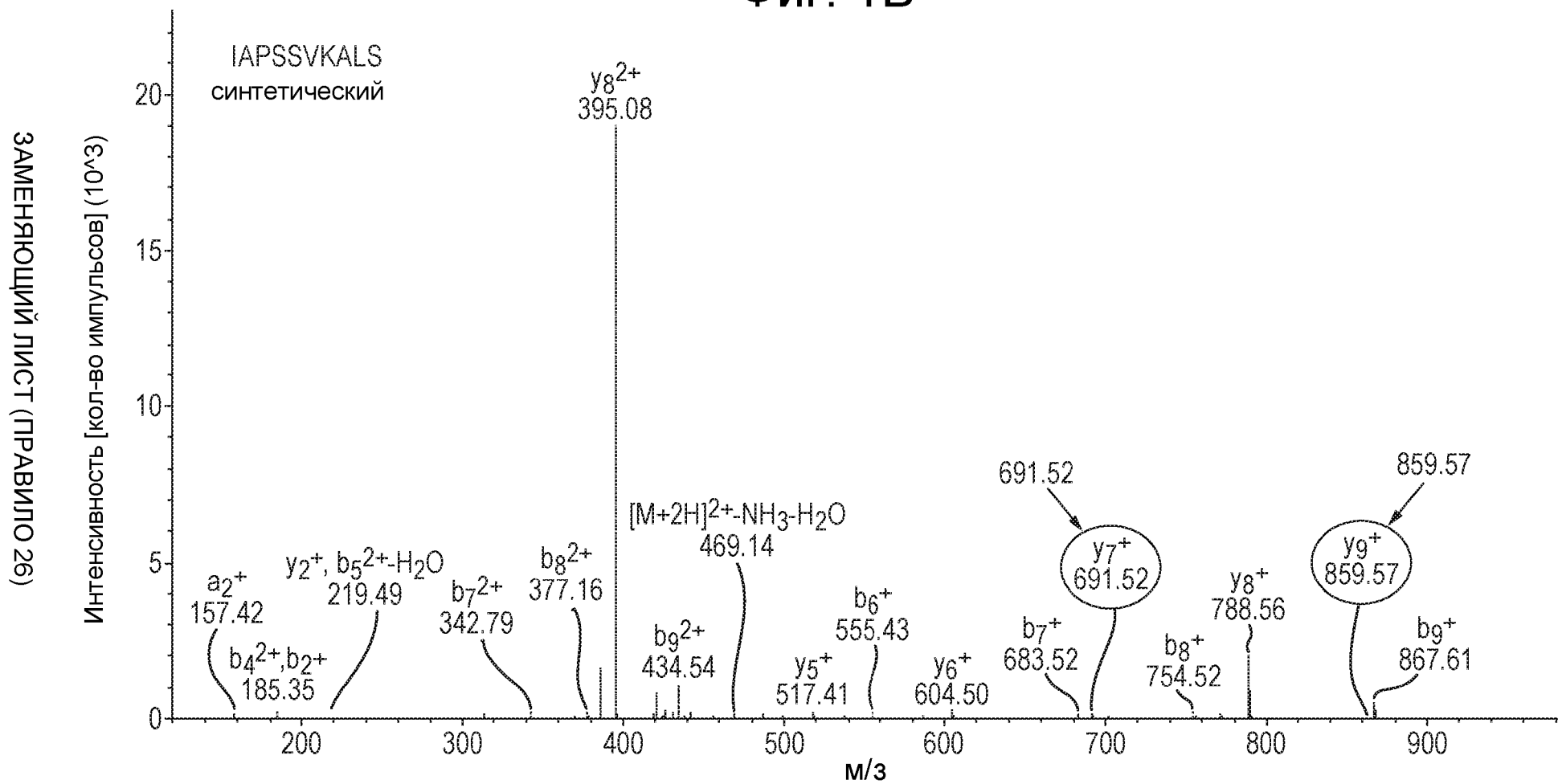
35. Иммуногенный пептид, содержащий CD4+ Т-клеточный эпитоп или В-клеточный эпитоп полипептида, кодируемого ОРС, кодируемой по меньшей мере частью генома оцРНК-содержащего вируса в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции.
- 5
36. Способ определения пандемического потенциала вируса гриппа А, включающий этапы:
- 10 (i) выявления первой ОРС, кодируемой по меньшей мере частью 8 сегмента генома гриппа А в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции;
- (ii) определения количества кодонов в первой ОРС; и
- (iii) сравнения количества кодонов в первой ОРС с количеством кодонов во второй ОРС, кодируемой по меньшей мере частью 8 сегмента генома известного пандемического вируса гриппа А в противоположном направлении к РНК положительной полярности, способной к трансляции,
- 15
- причем различие в количестве кодонов в первой ОРС по сравнению со второй ОРС является показателем пандемического потенциала.

Фиг. 1А

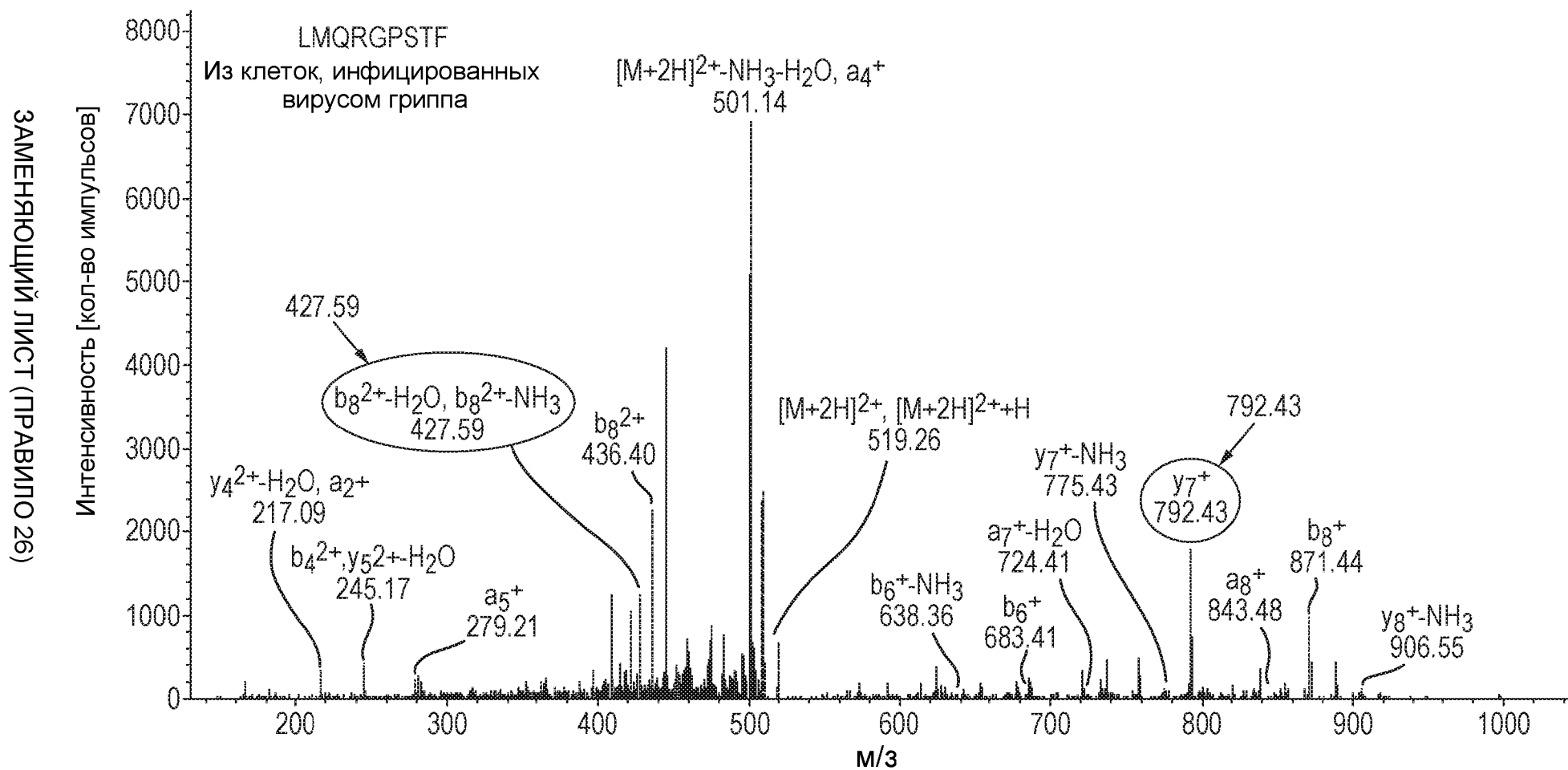


2/14

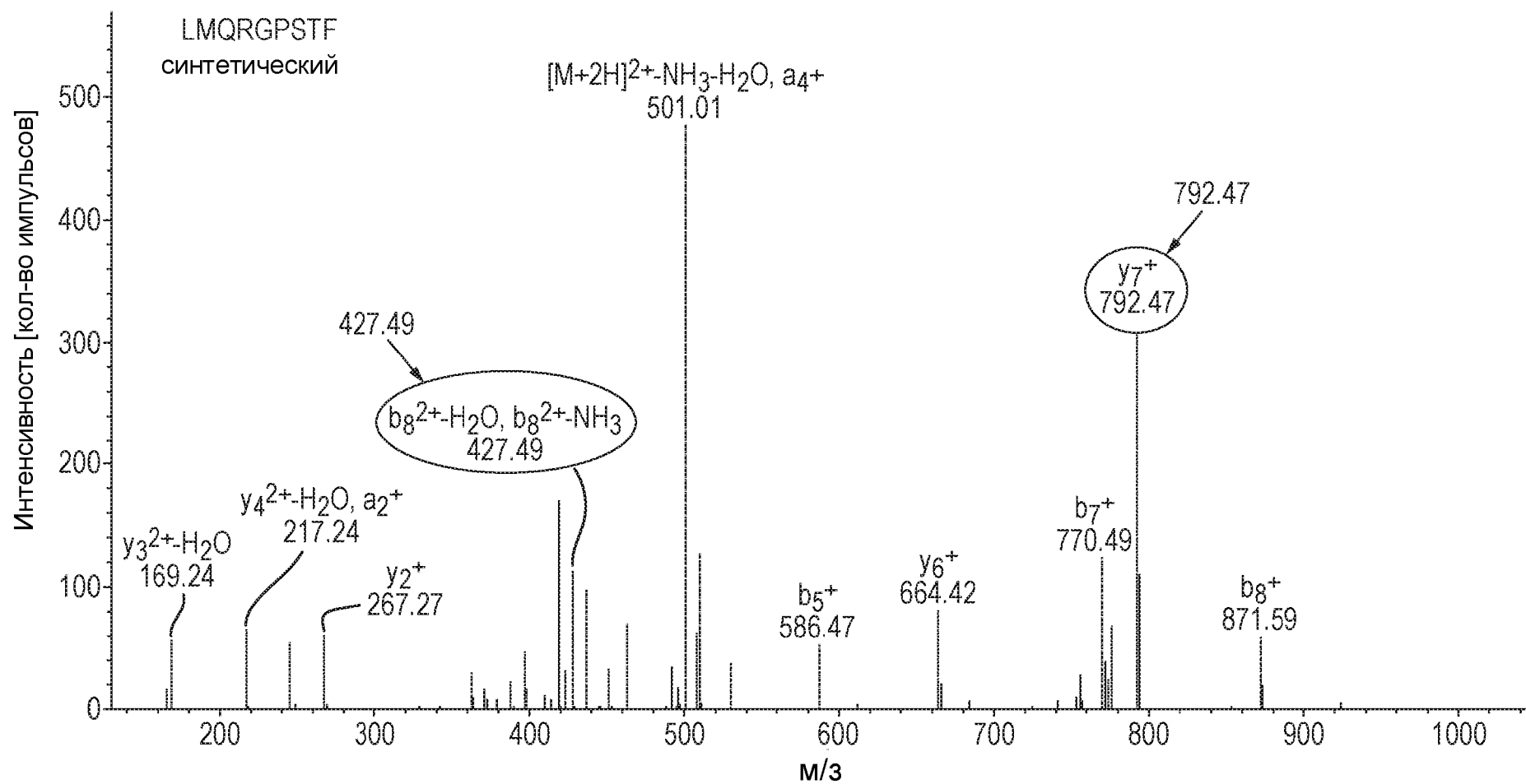
Фиг. 1В



Фиг. 2А

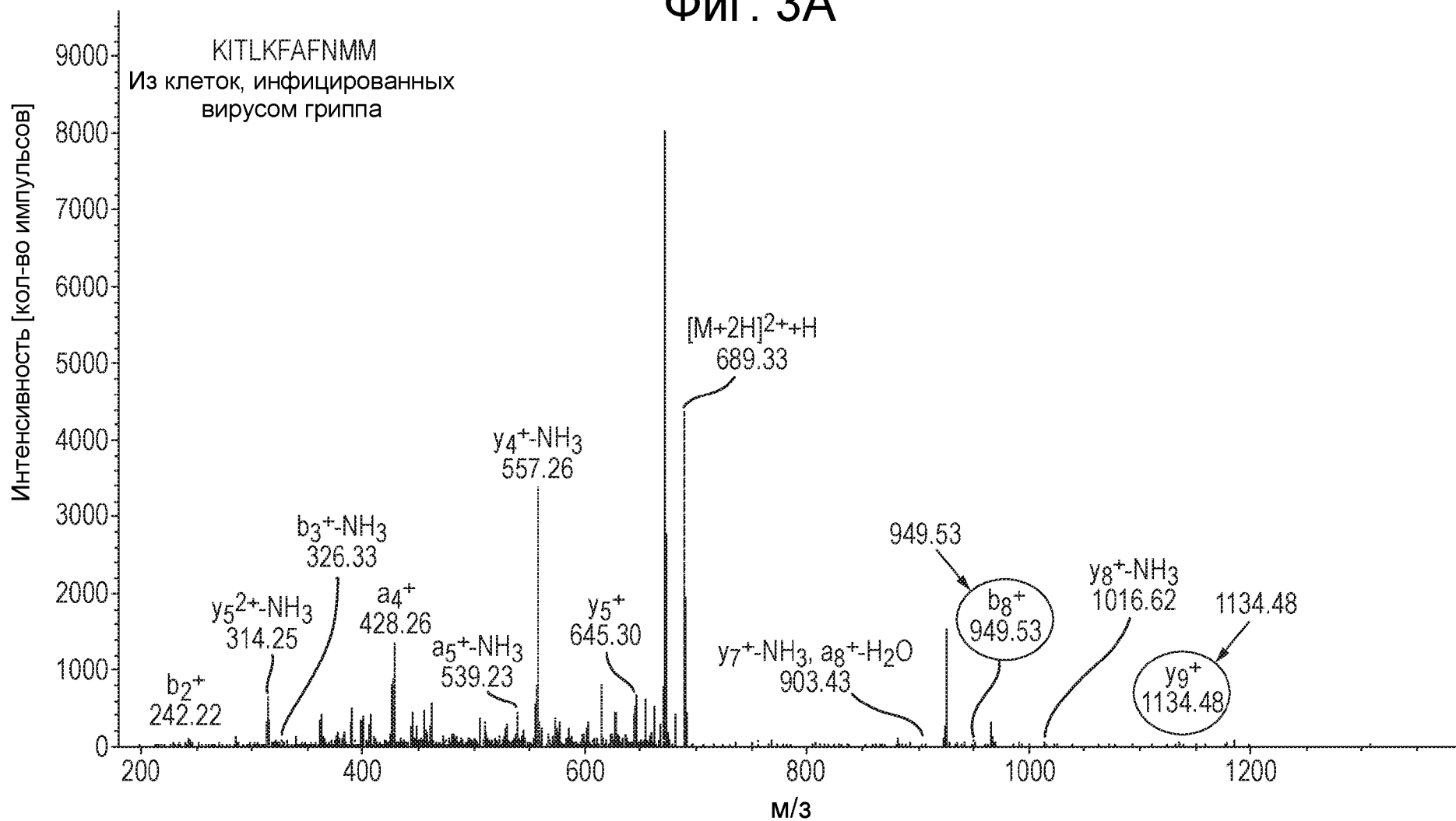


Фиг. 2В

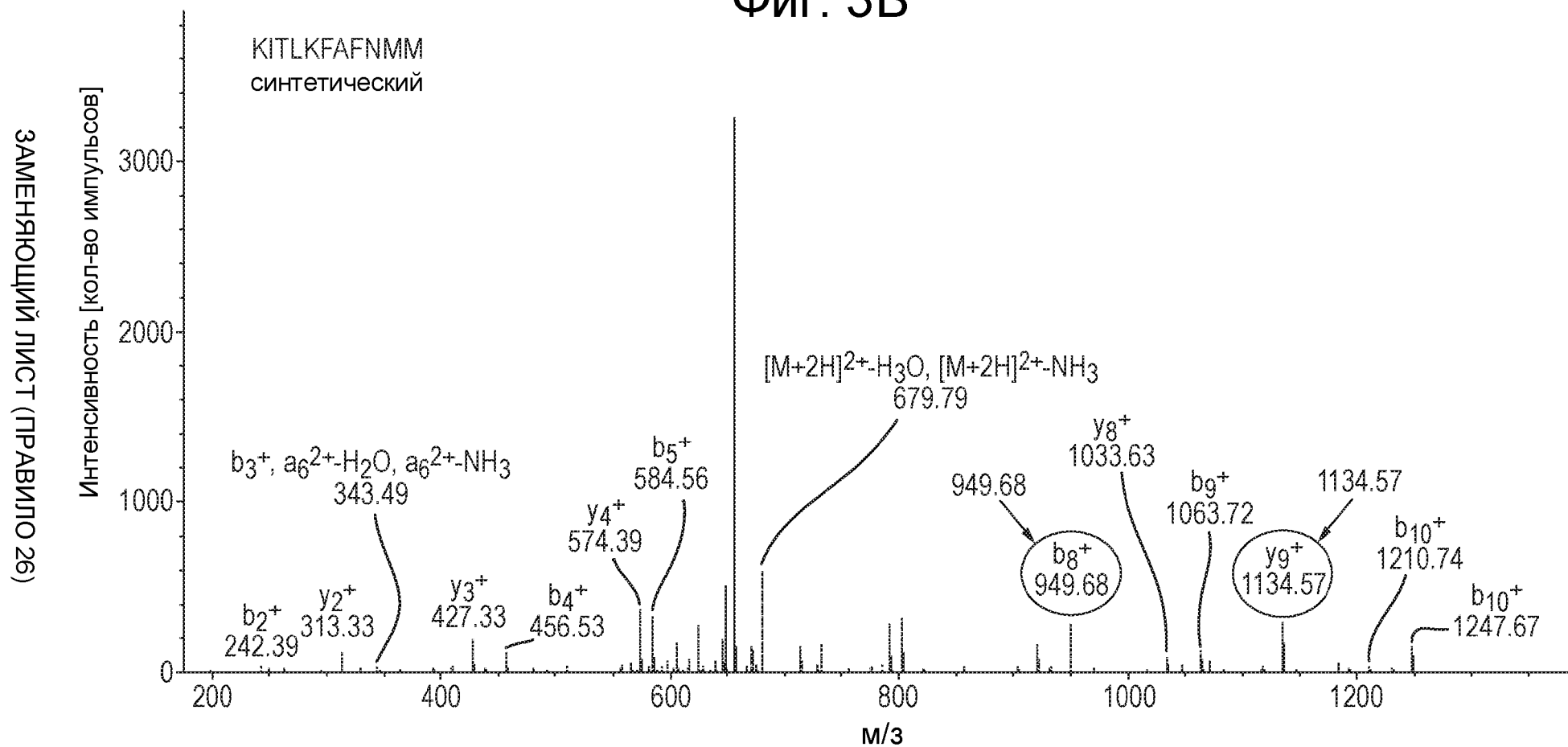


5/14

Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

Шкала	1	20	40	60	80
Положение в посл.	1	20	40	60	80
AF333238 A/Brevig Mission/1/1918 1918// 8 (NS) H1N1 Human	MLFAQNYSLSSVYVSLLOSTILFLQTS DLIVLAIFRF CF GSGGLPFS LLLLQANLCRVSETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTS				
Различия					
Положение в посл.	1	20	40	60	80
GU186781 A/Chicken/Brescia/1902 1902// 8 (NS) H7N7 Avian 50	MLFARNYSLSSIYVSLLOSTILFLQTS DSIVLAIFRF CF GSGGLSS LLLLQANLCRVSETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTS				
Различия					
Положение в посл.	1	20	40	60	80
CY045768 A/Puerto Rico/8-1/1934 1934// 8 (NS) H1N1 Human	MLFAQNYSLSSVCVSLLOSTILFLQTS DLIVPAISR FCFGVSGGLPFS LLLLQANLCRVSETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTS				
Различия					
Положение в посл.	1	20	40	60	80
CY009616 A/Fort Monmouth/1/1947 1947// 8 (NS) H1N1 Human	MLFAQNYSLFSICVSLLOSTILFLRTSD LIVLAIFRF CF GSGGLPVSL LLLLQANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTS				
Различия					
Положение в посл.	1	20	40	60	80
CY077721 A/Netherlands/001G1/1950 1950// 8 (NS) H1N1 Hum	MLFAQNYSLFSICVSLLOSTILFLRTSD LIVLAIFRF CF GSGGLPVSL LLLLQANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTS				
Различия					
Положение в посл.	1	20	40	60	80
CY045808 A/Japan/305/1957 1957// NEG8-216	MLFAQNYSLSSICVSLLOSAILFLRTFD LIVLAIFRF CF GSGGLPFS LLLLQANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTS				
Различия					
Положение в посл.	1	20	40	60	80
CY125906 A/Ann Arbor/6/1960 1960// 8 (NS) H2N2 Human 651	MLFAQNYSLSSICVSLLOSAILFLRTFD LIVLAIFRF YFGVSGGLPFS S LLLLQANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTS				
Различия					
Положение в посл.	1	20	40	60	80
M34829 A/Aichi/21968(H2N2) NEG8-216	MLFAQNYSLSSICVSLLOSAILSLRTFD LTVLAIFRF CF GSGGLPFS LLLPOANLCRVLETRTVLSFHSSPPMRTPIAFLTS				
Различия					

7/14

Фиг. 4 (Продолж. I)

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



8/14

Фиг. 4 (Продолж. II)

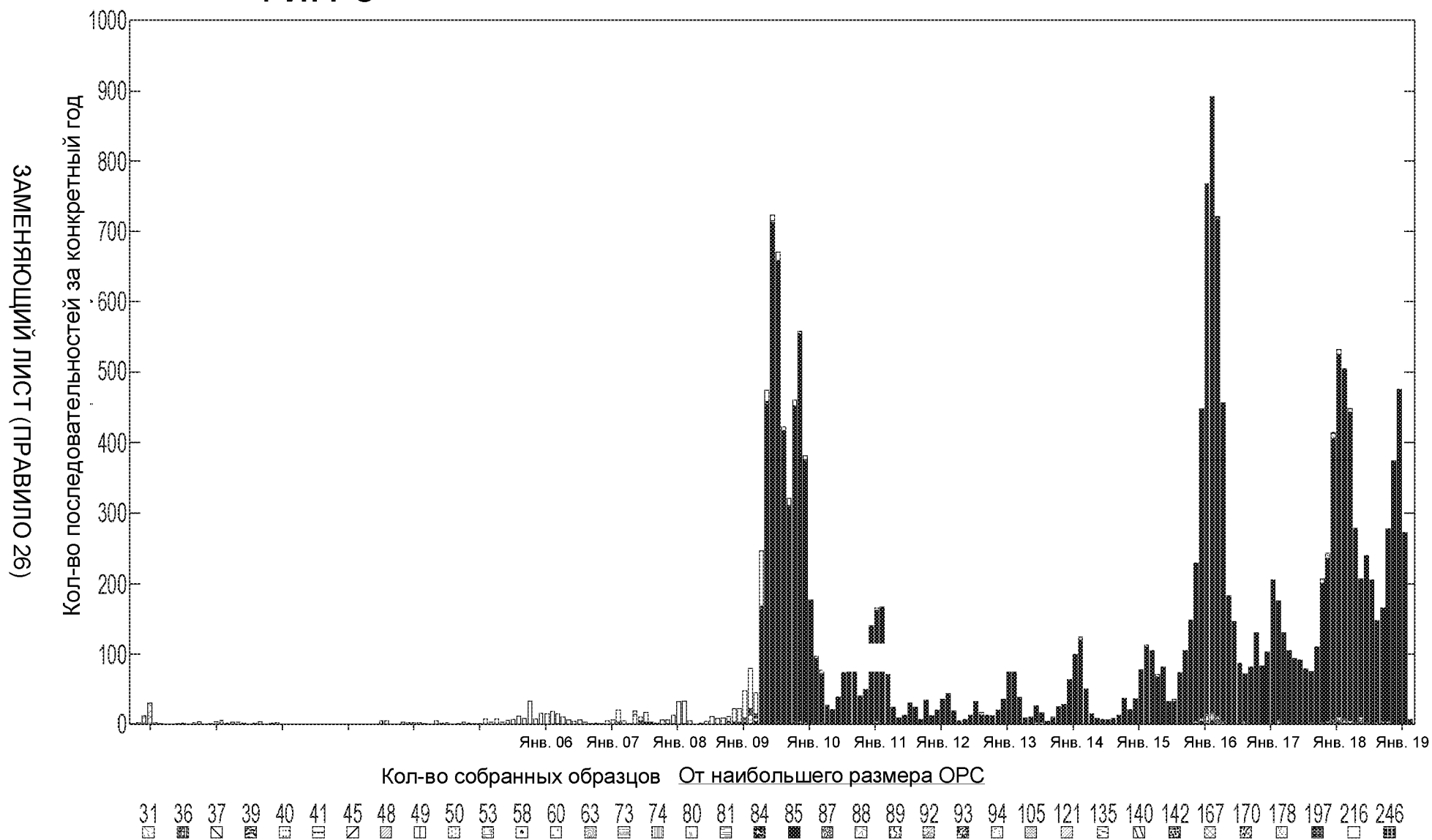
80	100	120	140	160	180	200
80	100	120	140	160		
TAFLTSSSVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSSIRVSSRSKITLKFAFSMFLSMIAWSILIOREPATFCLGMSMNQSLDISSRVMSVR-----						
80	100	120	140	160		
IAFLTSSSVCPGREGTGEISPTIAPSSVKALSSIRVSNRSKITLKFAFSVMFLSMIAWSILIOREPATFCLGMSMNQSLDISSRVMSVR-----						
80	100	120	140	160		
TAFLTSSAVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKFAFSMFLSMIAWSILIOGPAATFCLGMSMDQSLDISSRVMSVR-----						
80	100	120	140	160		
IAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKFAFSMFLSMIAWSILIOGPAATFCLGMSMNQSLDISSRVMSVR-----						
80	100	120	140	160		
IAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKFAFSMFLSMIAWSILIOGPAATFCLGMSMNQSLDISSRVMSVR-----						
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKFAFNMFLSMIAWSILIOGPAATFCLGISMNQSLDISSIVMSVRYREACAEAMVILSASSDSSFRILSTICFPTRVAVSMFRPRVLPPLRDF						
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSLVCPGREGNGEISPTIAPASVKALSNIRVSSRSKITLKFAFNMFLSMIAWSILIOGPAATFCLGISMNQSLDISSIVMSVRYREACAEAMVILSASSDSSFRILSTICFPTRVAVSMFRPRVLPPLRDF						
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSIVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKFAFNMFLSMIAWSILMORGPSTFCLGISMNQSLDNSSIVMSVRYREACAEAMVILSASSDSSFRILSTICFPTRVAASMFRPRVLPPLRDF						

Фиг. 4 (Продолж. III)

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

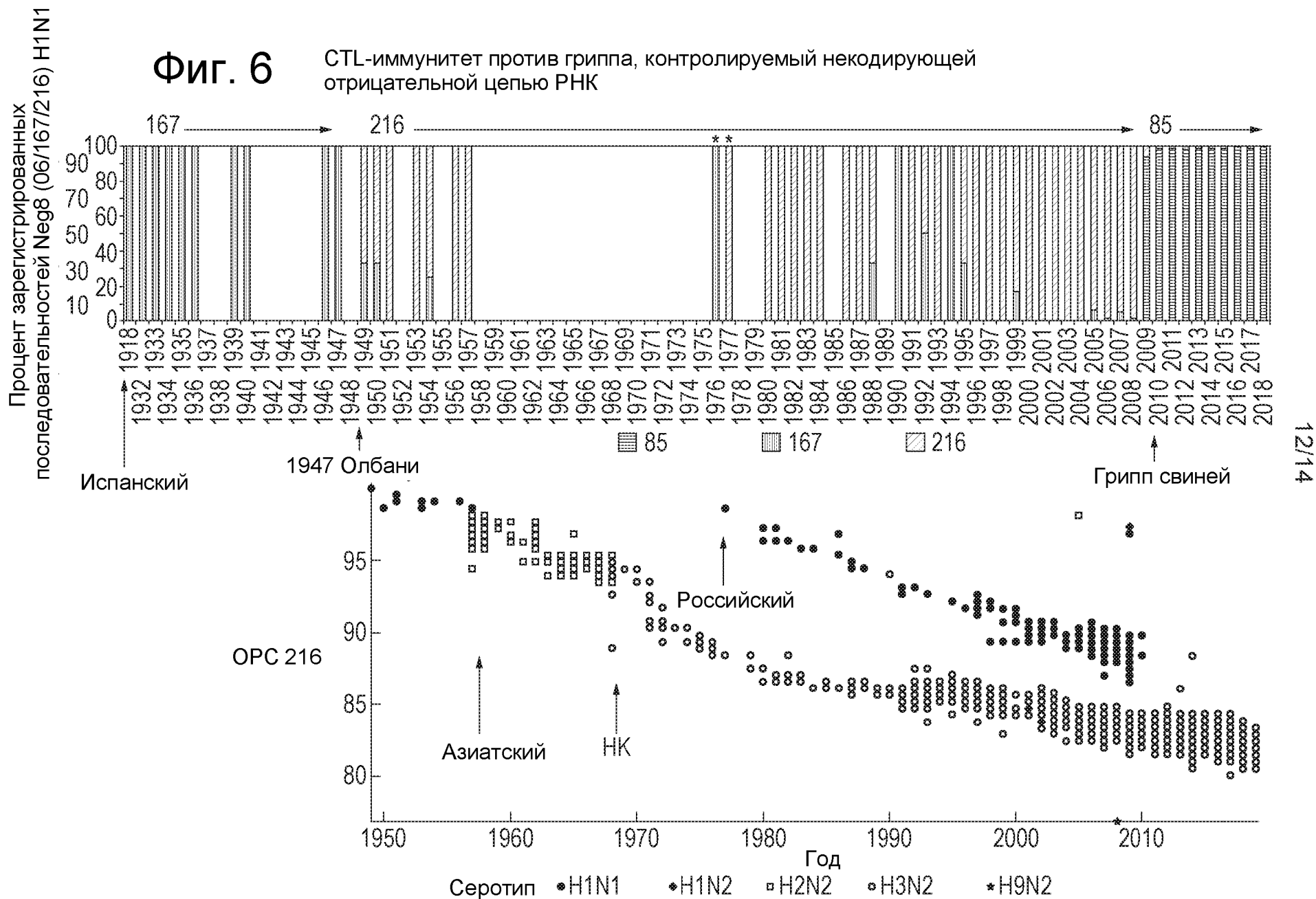
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSIVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALSNIRVSSRSKITLKFANMFLSMIAWSILMORGPSTFCLGISMNOSLDNSSIVMSVRYREAGAEAMVILSASSDFSFRILSTICFPTRVAASMRPRVLPPLPLRDF						
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTRVSSRSKITLKFANMFFSMIAWSILMORGPSTFCLGISMNOFLDNSSIVMSVMYREAGVEAMVILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPPLPLRDL						
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTRVSSRSKITLKFANMFFSMIAWSILMORGPSTFCLGISMNOFLDNSSIVISVMYREAGVEAMVILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPPLPLRDL						
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTRVSSRSKITLKFANMFFSMIAWSILMORGPSTFCLGISMNOFLDNSSIVMSVMYREAGVEAMVILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALISRPRVLPPLPLRDL						
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTRVSSRSKITLKFANMFFSMIAWSILMORGPSTFCLGISMNOFLDNSSIVMSVMYREAGVETMVILSASSDSSFRIFSTICFPTWVAALMSRPRVLPPLPLRDL						
80	100	120	140	160	180	200
IAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSNTRVSSRPKITLKFANMIFFSMIAWSILMORGPSTFCLGISMNOFLDNSSIVMSVMYREAGVETMVILSASSDSSFRIFSTIICFPWVAALVSRPRVLPPLPLRDL						
80	100	120	140	160	180	200

Фиг. 5

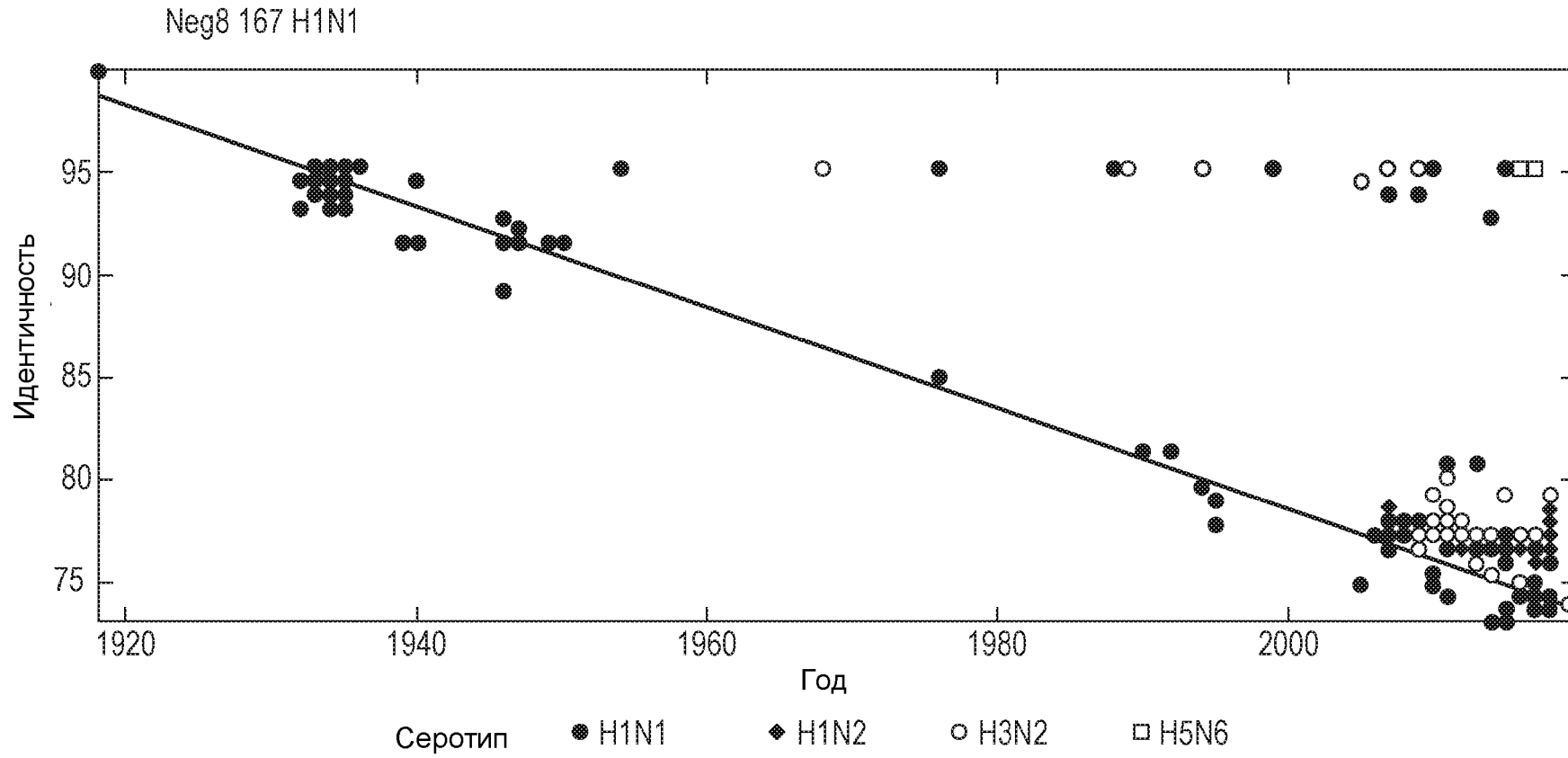


Фиг. 6

CTL-иммунитет против гриппа, контролируемый некодирующей отрицательной цепью РНК



Фиг. 7



Фиг. 8

Грипп человека 216, 167, 85 OPC NRG8
 Грипп птиц/грипп свиней, подобный гриппу
 птиц/грипп лошадей 93 (редко 135)
 Грипп свиней 93/135/140/167?

