

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292687 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.11

(51) Int. Cl. C07K 14/005 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.09

(54) ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ГРИППА (ВПЧ)

(31) 20169787.7

(72) Изобретатель:

(32) 2020.04.16

Хартманн Борис (АТ)

(33) EP

(74) Представитель:

(86) PCT/EP2021/055928

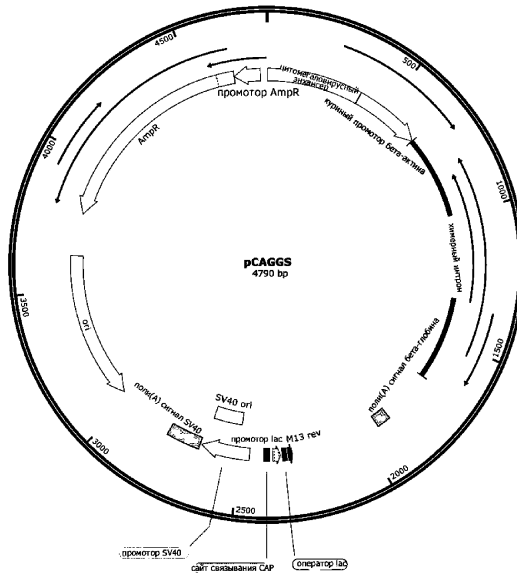
Фелицына С.Б. (RU)

(87) WO 2021/209199 2021.10.21

(71) Заявитель:

ОСТЕРАЙХИШЕ АГЕНТУР
ФИОР ГЕЗУНДХАЙТ УНД
ЭРНЭРУНГСЗИХЕРХАЙТ ГМБХ
(АТ)

(57) Раскрыты вирусоподобные частицы (ВПЧ) гриппа, содержащие гемагглютининовый (HA) белок и нейраминидазный (NA) белок на поверхности ВПЧ, нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере одного из PB1, PB2 и NS.



202292687 A1

202292687 A1

ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ГРИППА (ВПЧ)

Настоящее изобретение раскрывает вирусоподобные частицы гриппа (ВПЧ) и вакцины, содержащие такие ВПЧ.

Вирусная инфекция или вакцина сначала распознаются врожденной иммунной системой хозяина. Клетки врожденной иммунной системы идентифицируют вирус или вакцину как чужеродные, обрабатывают их, чтобы презентировать адаптивной иммунной системе и тем самым активировать ее. В зависимости от природы вакцины, защита, инициируемая адаптивной иммунной системой, основана в большей степени на антителах (гуморальный иммунный ответ) или на клетках, которые быстро и эффективно убивают вновь инфицированные клетки, делая невозможным распространение вируса (клеточный иммунный ответ).

Современные стратегии вакцинации против вируса гриппа А (IAV) основаны на введении комбинаций из 3-4 инактивированных штаммов IAV или аттенуированных живых вирусов (LAIV). Вакцинация инактивированными штаммами IAV в первую очередь вызывает гуморальный иммунный ответ, который обеспечивает защиту только в течение примерно 6 месяцев. Кроме того, эта вакцинация эффективна только против тех штаммов, которые использовались при изготовлении вакцины. Далее, существуют опасения по поводу биобезопасности аттенуированных вакцин.

Пациенты, перенесшие инфекцию IAV, имеют более широкую и постоянную защиту от новой инфекции IAV по сравнению пациентами, вакцинированными обычным способом. Эта защита обеспечивается клеточным иммунным ответом, который не вызывается вакцинацией инактивированными штаммами.

Hartmann et.al. (Nat. Commun. 8 (2017), 1916-1918) обнаружили, что заражение вирусом гриппа А (IAV) в дендритных клетках человека (DC) вызывает воспалительную гибель клеток. Сенсорный белок хозяина ZBP1/DAI распознает вирусную РНК, когда она проникает в клетку, и вызывает высвобождение сигналов повреждения в микроокружении. Этот ответ, индуцированный вирусной РНК, приводит к локальному воспалению и более эффективному и длительному иммунному ответу. Это предполагает, что клеточный иммунный ответ активируется обнаружением вирусной РНК, недавно экспрессированной в клетке-хозяине. Это, в свою очередь, означает, что вакцинация вновь экспрессирующейся вирусной РНК необходима для долгосрочной и более широкой защиты (фиг. 1).

Поскольку вакцины на основе аттенуированных вирусов имеют вирусную РНК-экспрессирующую полимеразу, неэффективную при температуре тела, вакцинация у

хозяина не вызывает экспрессии необходимой новой вирусной РНК, которая запускает микровоспаление, необходимое для клеточного иммунитета. По этим причинам современные стратегии вакцинации не обеспечивают длительной иммунной защиты от IAV.

Вирус гриппа ежегодно вызывает 250 000–500 000 смертей во всем мире; глобальная пандемия может убить миллионы людей. Вакцинация является наиболее экономически эффективной мерой общественного здравоохранения для предотвращения заболеваний и смертности, вызванных вирусной инфекцией гриппа.

Вирион гриппа представляет собой оболочечный вирус, липидный бислой которого происходит от плазматической мембраны клетки-хозяина. В оболочку встроены два разных типа гликопротеиновых шипов. Примерно 80 процентов шипов представляют собой гемагглютинин (HA), тримерный белок, который действует, когда вирус прикрепляется к клетке-хозяину. Оставшиеся примерно 20 процентов гликопротеиновых шипов состоят из нейраминидазы (NA), которая, как полагают, в первую очередь способствует высвобождению вновь продуцируемых вирусных частиц из клетки-хозяина. На внутренней стороне оболочки, которая окружает вирион гриппа, имеется выстилающий её матриксный белок. Внутри оболочки находится геном гриппа, который разделен на восемь сегментов одноцепочечной РНК. РНК упакована с нуклеопротеидом (NP), образуя спиральный рибонуклеопротеиновый комплекс, содержащий три полимеразных пептида для каждого сегмента РНК. Большинство сегментов кодирует один белок, но некоторые кодируют несколько белков, например, М-сегмент, который кодирует белок матрикса М1 и белок ионных каналов М2 (фиг.2).

ВПЧ гриппа являются потенциальными кандидатами для включения в иммуногенные композиции. ВПЧ близко сходны со зрелыми вирионами, но они не содержат вирусного геномного материала (см., например, самые последние: WO 2020/00101 A1 ([0017], [00254]); WO 2020/014656 A1 (p.23)). Фактически, согласно определению из предшествующего уровня техники, ВПЧ представляют собой пустые вирусные оболочки. Следовательно, ВПЧ неспособны к репликации по своей природе, что делает их безопасными для введения в качестве вакцины. Кроме того, можно сконструировать ВПЧ для экспрессии вирусных гликопротеинов на поверхности ВПЧ, что является их наиболее естественной физиологической конфигурацией. Более того, поскольку ВПЧ напоминают интактные вирионы и представляют собой поливалентные корпускулярные структуры, ВПЧ могут быть более эффективными в индукции нейтрализующих антител к гликопротеину, чем растворимые антигены белков оболочки.

В US 2017/058265 A1 описана генерация вирусов гриппа из вирусоподобных

частиц с использованием наборов изолированных клеток-хозяев с вирусными сегментами. Watanabe et al. (J. Virol. 76 (2002): 767-773) сообщают об иммуногенности и защитной эффективности неспособных к репликации ВПЧ гриппа. В US 9150620 B2 описана вакцина против нескольких типов вирусов птичьего гриппа со специфически измененным НА белком гриппа. Liu et al. (Antiviral. Res. 133 (2016): 110-118) сообщают о мультиподтипных ВПЧ гриппа, включенных с флагеллином и ГМ-КСФ для конструирования вакцины. В US 2015/0273048 A1 описана универсальная противогриппозная вакцина на основе гетерологичных множественных белков внеклеточного домена матричного белка 2 (M2e).

Целью настоящего изобретения является обеспечение эффективной и более безопасной вакцинации, особенно вакцинации против вируса гриппа.

Эта задача настоящего изобретения решается с помощью ВПЧ, экспрессирующих РНК (РНК-ВПЧ) по настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к вирусоподобным частицам гриппа (ВПЧ), которые содержат:

- гемагглютининовый (НА) белок и нейраминидазный (NA) белок на поверхности ВПЧ,

- нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс,

где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере одного из PB1, PB2, NS1 и NS2.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает вакцину, содержащую вирусоподобные частицы гриппа (ВПЧ), и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где ВПЧ включают:

- гемагглютининовый (НА) белок и нейраминидазный (NA) белок на поверхности ВПЧ,

- нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс,

где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере одного из PB1, PB2 и NS2.

Настоящее изобретение относится к РНК-ВПЧ, которые используются в вакцине, которая для иммунной системы выглядит как реальная вирусная инфекция, но не может размножаться. Для этого использовали вирусоподобные частицы (ВПЧ), внешне идентичные функциональным вирионам. Внутри ВПЧ встроены по меньшей мере один (т.е. NP), предпочтительно два (т.е. NP и M) функциональных комплекса IAV-рибонуклеопротеина (RNP), которые вызывают воспалительную гибель клеток-хозяев, подобно тому, как настоящий вирус вызывает гибель клетки-хозяина путем экспрессии

вирусной РНК. Вкратце: после вакцинации пациента эти РНК-ВПЧ из-за их сходства проникают в клетку тем же путем, что и функциональный вирион IAV, и выгружают свои два RNP в ядро клетки. После проникновения вирусные полимеразы, входящие в состав RNP, начинают копировать вирусную РНК, что является пусковым механизмом для описанной выше воспалительной гибели клеток (некроптоза). Некроптоз вызывает разрушение клетки-хозяина, что имеет несколько преимуществ для иммунной системы: внутренние ингредиенты, такие как ядерная ДНК и белки, являются сигналом повреждения, который привлекает и активирует незадействованные клетки врожденной иммунной системы; вирусные белки и РНК становятся нефункциональными из-за гибели инфицированных клеток; эти нефункциональные вирусные части теперь служат патогенассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), которые поглощаются уже активированными клетками врожденной иммунной системы и после процессинга презентуются клеткам адаптивной иммунной системы. Активация врожденной иммунной системы путем некроптоза инфицированных клеток, индуцированного РНК-ВПЧ, сходна с иммунным ответом при заражении реальным опасным вирусом IAV и отвечает за активацию клеточно-опосредованного иммунного ответа. Вакцинация классическими вакцинами не активирует некроптоз из-за отсутствия экспрессии РНК и, следовательно, вызывает в основном гуморальный иммунный ответ. Кроме того, РНК-ВПЧ биологически безопаснее, чем псевдотипированные вакцины, которые представляют собой короткие вирусы IAV с нефункциональным белком NA (Powell et al., *J. Virol.* 86 (2012), 13397-13406), поскольку они не реплицируют сегменты, экспрессирующие вирусные РНК-полимеразы.

Соответственно, ВПЧ по настоящему изобретению запускают воспалительную гибель клеток (некроптоз) при проникновении в клетку, но не запускают апоптоз клетки.

Роль запрограммированной гибели клеток в размножении вируса гриппа посредством каспазависимого апоптоза была наиболее подробно исследована (см., например, Harold et al., *J. Leukoc. Biol.* 92 (2012), 75-82 для обзора). С другой стороны, запрограммированный некроз (или некроптоз) представляет собой более иммуногенный механизм гибели клеток-хозяев (см., например, Sridharan et al., *Trends Microbiol.* 22 (2014), 199–207 для обзора). В отличие от апоптоза, некроптоз приводит к высвобождению молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP), и, таким образом, связан с воспалением и активацией иммунных клеток. Некроптоз является зависимым от рецепторвзаимодействующей протеинкиназы (RIPK) и псевдокиназы, подобной домену киназы смешанной линии (MLKL). В зависимости от контекста хозяина/патогена некроптоз может быть либо вовлечен в реакцию хозяина на инфекцию, либо

использоваться патогеном для дальнейшего распространения.

РНК-ВПЧ по настоящему изобретению представляют собой усовершенствование существующей технологии ВПЧ (раскрытой, например, Kang et al., PloS one 14 (2019), e0216871; 10.1371/journal.pone.0216871; Haynes, Exp. Rev. Vacc. 8 (2009), 435–445; Schotsaert et al., Sci. Rep. 6 (2016), 24402; 10.1038/srep24402; Mohan, T. et al., Sci. Rep. 7 (2017), 40226; 10.1038/srep40226), поскольку РНК-ВПЧ для иммунной системы имитируют заражение живым вирусом посредством экспрессии РНК.

РНК-ВПЧ по настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии «обратной генетики» (Perez et al., Meth. Mol. Biol. 1602 (2017), 251–273; 10.1007/978-1-4939-6964-7_16). Для этого из полевого вируса выделяют отдельные сегменты вируса гриппа, транскрибируют их с РНК на ДНК и клонируют в ДНК-плазмиды. Плазмиды, содержащие ДНК каждого сегмента IAV, затем трансфицируют в клеточную линию. В трансфицированных клетках плазмиды продуцируют либо вирусную копию РНК, либо вирусную информационную РНК для продукции вирусных белков. Размещение промоторов на плаزمидах определяет, экспрессируются ли вирусная РНК, вирусные белки, или и то, и другое после трансфекции плазмид в клеточную культуру. Эта технология уже давно используется для получения химерных вирусов.

В целом, в данной области техники известны ВПЧ как частицы, состоящие из одного или нескольких вирусных структурных белков, но лишенные вирусного генома, т.е. кодирующие эти вирусные структурные белки ВПЧ. Поскольку у ВПЧ отсутствует вирусный геном, они не способны размножаться в клетках для генерации инфекционных частиц, и обеспечивают более безопасные и потенциально более экономичные вакцины и вакцинные продукты. Кроме того, ВПЧ часто могут быть получены путем гетерологичной экспрессии и могут быть легко очищены. Большинство ВПЧ, раскрытых в предшествующем уровне техники, содержат по меньшей мере коровый белок вируса, который управляет почкованием и высвобождением частиц из клетки-хозяина. ВПЧ гриппа могут быть получены путем трансфекции клеток-хозяев плазмидами, кодирующими белки НА, NA и М. После инкубации трансфицированных клеток в течение подходящего времени для обеспечения экспрессии белка (например, в течение приблизительно 72 часов) ВПЧ могут быть выделены из надосадочной жидкости клеточных культур. Например, протокол очистки или выделения ВПЧ гриппа из надосадочной жидкости клеток включает низкоскоростное центрифугирование (для удаления клеточного детрита), вакуумную фильтрацию и ультрацентрифугирование ВПЧ на 20% глицерине. Вирусоподобная частица может также включать субвирусную частицу (СВЧ), которая обычно меньше по размеру, чем вирус, и представляет собой частицу без

вирусного капсида или генома.

Настоящие ВПЧ, хотя и содержат определенные вирусные нуклеиновые кислоты, явно отличаются от спасенных вирусов, известных в данной области техники (например, Fodor et al., *J. Virol.* 73 (1999), 9679-9682; Hoffman et al., *Arch. Virol.* 146 (2001), 2275-2289; WO 01/04333 A1; WO 2007/016598 A2), из-за отсутствия способности к воспроизведению в клетке для получения инфекционных вирусных частиц. US 2017/058265 A1 использует различные конструкции и клетки ВПЧ, но не предлагает их использовать для вакцин; этот документ направлен на способные к репликации полностью инфекционные вирусы для использования в различных перечисленных вакцинных технологиях (но без ссылки на использование этих ВПЧ в контексте вакцинации). Также интересно отметить, что включение NS1 позволяет сделать такие конструкции иммунными антагонистами; вот почему предпочтительно, чтобы ВПЧ по настоящему изобретению не содержали рибонуклеопротеинового комплекса NS1. Watanabe et al., 2002 описывают дельта NS1 рекомбинантный вирус гриппа (который не является ВПЧ), который может размножаться в интерферондефицитных клетках (в клетках со сниженным собственным иммунным ответом). Можно отметить, что ВПЧ согласно настоящему изобретению, в отличие от всех этих конструкций, не могут размножаться ни в одной клеточной линии, поскольку отсутствует генетическая информация для (абсолютно необходимых для репликации вируса) РНК-зависимых РНК-полимераз.

Предпочтительно, минимальные требования к ВПЧ в вакцине по настоящему изобретению составляют: только один или два RNP внутри; в любом случае PA, PB1, PB2 или NS1 никогда не могли быть использованы в качестве матрицы для РНК в RNP; это гарантирует, что ВПЧ не сможет реплицироваться (PA, PB1, PB2) или проявлять какую-либо иммунную антагонистическую функцию. ВПЧ по настоящему изобретению не содержат нуклеиновой кислоты, которая может создавать инфекционные частицы в клетке-хозяине. Вот почему, по определению, ВПЧ по настоящему изобретению лишены по меньшей мере одного из рибонуклеопротеиновых комплексов, которые необходимы для репликации вируса, т.е. PB1, PB2 и NS2 (было показано, что NS1 незаменим для репликации вируса в субстратах, дефицитных в пути IFN (Garcia-Sastre et al., *Virol.* 252 (1998), 324-330); характеристика биологических и молекулярных свойств рекомбинантного вируса гриппа delNS1 позволила предположить, что NS1 является кодируемым вирусом ингибитором IFN-опосредованных противовирусных ответов). Предпочтительно, чтобы ВПЧ согласно настоящему изобретению не содержали более одного рибонуклеопротеинового комплекса PB1, PB2 и NS2, т.е. два или все три; также предпочтительно, чтобы ВПЧ по настоящему изобретению не содержали NS1

рибонуклеопротеинового комплекса. В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения ВПЧ по настоящему изобретению содержат только NP рибонуклеопротеиновый комплекс, предпочтительно с М рибонуклеопротеиновым комплексом, в качестве единственного рибонуклеопротеинового комплекса.

Фактически, ВПЧ согласно настоящему изобретению – из-за обязательного отсутствия необходимого генетического материала для воспроизводимости в клетке-хозяине (т.е. PB1, PB2 и/или NS2) – являются неинфекционными, поскольку они способны только связываться и проникать в клетку, но не могут размножаться какой-либо клеткой-хозяином с образованием инфекционных частиц, которые затем способны проникать в другие клетки.

В отличие от ВПЧ предшествующего уровня техники, ВПЧ по настоящему изобретению содержат вирусный генетический материал (NP-рибонуклеопротеиновый комплекс; предпочтительно также М-рибонуклеопротеиновый комплекс) и, следовательно, могут также называться «РНК-ВПЧ», но являются – как ВПЧ предшествующего уровня техники – нереплицирующимися, неинфекционными капсидными структурами вируса гриппа. Соответственно, ВПЧ по настоящему изобретению способны проникать в клетку, но не происходит репродукции вируса/ВПЧ в клетке. Соответственно, ясно, что как используется в настоящей заявке, например, термин «нуклеопротеидный (NP)-рибонуклеопротеиновый комплекс» означает рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP), кодирующий NP (т.е. RNP с вирусной РНК (вРНК), кодирующей NP; см. также, например, фиг.11). Таким образом, ВПЧ, используемые в вакцинах по настоящему изобретению, представляют собой ВПЧ, экспрессирующие HA и NA на своей поверхности, и имеют интегрированный RNP с вРНК, кодирующей NP, но не RNP, кодирующий по меньшей мере один из PB1, PB2 и NS2 (и, предпочтительно, также не содержащий RNP, кодирующий NS1), особенно не RNP, кодирующий все PB1, PB2, NS1 и NS2.

Как минимум, поверхностные белки IAV гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA) необходимы для построения оболочки ВПЧ. Белок М добавляют для большей стабильности, а также для того, чтобы сделать ВПЧ внешне идентичным истинному вирусу. RNP сегмента NP будет служить источником вирусной РНК. Преимущество NP состоит в том, что он экспрессируется в относительно больших количествах сразу после инфицирования, а также не обладает известной иммуноантагонистической функцией. Добавление М-сегмента в качестве RNP позволяет использовать РНК-ВПЧ в качестве векторов для вакцинации против патогенов, отличных от гриппа, поскольку к М-сегменту

также можно добавлять чужеродные последовательности других патогенов без серьезного ограничения его функциональности (фиг.3).

Соответственно, ВПЧ по настоящему изобретению предпочтительно проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность. Используемый в настоящей заявке термин «гемагглютининовая активность» относится к способности НА-содержащих ВПЧ или их частей связывать и агглютинировать красные кровяные клетки (эритроциты). Используемый в настоящей заявке термин «нейраминидазная активность» относится к ферментативной активности НА-содержащих ВПЧ или их частей по отщеплению остатков сиаловой кислоты от субстратов, включая белки, такие как фетуин.

Гемагглютинин НА вируса гриппа представляет собой вирусный поверхностный гликопротеин, который обычно содержит примерно 560 аминокислот (например, 566 аминокислот) и составляет 25% от общего вирусного белка. НА представляет собой белковый антиген, который очень полезен в качестве иммуногена и отвечает за адгезию вирусной частицы к клетке-хозяину и ее проникновение в клетку-хозяина, в частности, в респираторный эпителий, на ранних стадиях инфекции (или проникновение в клетку (для ВПЧ по настоящему изобретению)). В вирусах гриппа (H1-H18) идентифицировано восемнадцать различных подтипов НА. Нейраминидаза (NA) вируса гриппа является вторым мембранным гликопротеином вирусов гриппа. Было показано, что присутствие вирусной NA важно для создания многогранного защитного иммунного ответа против заражающего вируса. Для большинства вирусов гриппа А NA имеет длину 413 аминокислот и кодируется геном из 1413 нуклеотидов. В вирусах гриппа было идентифицировано девять различных подтипов NA (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 и N9), все из которых были обнаружены среди диких птиц. NA участвует в разрушении клеточного рецептора вирусного НА путем отщепления терминальных остатков нейраминовой кислоты (также называемой сиаловой кислотой) от углеводных фрагментов на поверхности инфицированных клеток. NA также отщепляет остатки сиаловой кислоты от вирусных белков, предотвращая агрегацию вирусов. Используя этот механизм, предполагается, что NA облегчает высвобождение вирусного потомства, предотвращая накопление вновь образованных вирусных частиц вдоль клеточной мембраны, а также способствуя транспорту вируса через слизь, присутствующую на поверхности слизистой оболочки. NA является важной антигенной детерминантой, которая подвержена антигенным вариациям.

Последовательности белков НА и NA, используемые согласно настоящему изобретению, представляют собой последовательности, например, доступные в Базе данных исследований гриппа (IRD). IRD содержит данные эпиднадзора за гриппом птиц и

млекопитающих, не являющихся человеком, клинические данные о людях, связанные с экстрактами вируса, фенотипические характеристики вирусов, выделенных из экстрактов, а также все геномные и протеомные данные, имеющиеся в общедоступных репозиториях для вирусов гриппа. IRD связывает эпиднадзор и клинические данные хозяев с данными о последовательности и фенотипе для всех хорошо охарактеризованных штаммов вируса гриппа, а также данные, полученные из общедоступных источников данных для хорошо охарактеризованных штаммов вируса, которые будут дополнены данными, сгенерированными IRD. По состоянию на 28 марта 2020 IRD содержит 95 032 записи для белков HA и 82 794 записи для белков NA.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления белок HA в ВПЧ по настоящему изобретению выбран из группы белков HA, описанных в IRD, предпочтительно HA сезонного, непандемического гриппа. В IRD это можно выбрать, например, путем исключения последовательностей pH1N1 2009 из «Классификации клад» при поиске белков HA.

Белок NA в ВПЧ по настоящему изобретению предпочтительно выбирают из группы белков NA, раскрытых в IRD, предпочтительно NA сезонного, непандемического гриппа.

Конечно, также возможны модифицированные/рекомбинантные версии белков HA и NA, т.е. как раскрыто в WO 2020/000101 A1).

Сегмент 5 РНК вируса гриппа А кодирует NP (полипептид длиной 498 аминокислот), который богат остатками аргинина, глицина и серина, и имеет суммарный положительный заряд при нейтральном pH. Большая часть полипептида имеет преобладание основных аминокислот и общее прогнозируемое значение pI, равное 9,3, но С-концевые 30 остатков NP с pI 3,7 являются заметно кислыми. У вирусов гриппа В и С длина гомологичного полипептида NP составляет 560 и 565 остатков, соответственно. Выравнивание прогнозированных аминокислотных последовательностей генов NP трех типов вируса гриппа выявляет значительное сходство между тремя белками, при этом NP типов А и В демонстрируют наивысшую степень консервативности. Филогенетический анализ штаммов вируса, выделенных от разных хозяев, показывает, что ген NP относительно хорошо сохраняется.

Седьмой сегмент РНК вирусов гриппа (ген М) кодирует как белок М1, так и белок М2. М1 представляет собой матриксный белок, который находится непосредственно под вирусной оболочкой в виде димеров и взаимодействует с вирусным рибонуклеопротеиновым (vRNP) комплексом, образуя мостик между компонентами внутреннего ядра и мембранными белками. vRNP содержат детерминанты диапазона

хозяев. М1 контактирует как с вирусной РНК, так и с NP, способствуя образованию комплексов RNP и вызывая диссоциацию RNP от ядерного матрикса. М1 играет жизненно важную роль в сборке, привлекая вирусные компоненты к месту сборки, и играет важную роль в процессе почкования, включая образование вирусных частиц. Белок М1 образует слой под участками мембраны клетки-хозяина, богатыми вирусным гемагглютинином, нейраминидазой и трансмембранными белками М2, и способствует почкованию зрелых вирусов. М1 состоит из двух доменов, соединенных линкерной последовательностью. N-концевой домен имеет многоспиральную структуру, которую можно разделить на два субдомена. С-концевой домен также имеет альфа-спиральную структуру. М2 представляет собой мембранный белок, встроенный в оболочку вируса и выступающий над поверхностью вируса в виде тетрамеров. Внеклеточный домен М2 распознается иммунной системой хозяина. Трансмембранный домен М2 обладает активностью ионного канала, который участвует в процессе снятия оболочки вируса в клетке. Белок М2 представляет собой протонселективный виropорин, встроенный в вирусную оболочку вируса гриппа А. Сам канал представляет собой гомотетрамер (состоит из четырех идентичных звеньев М2), где звенья представляют собой спирали, стабилизированные двумя дисульфидными связями, и активируется низким рН. Протонная проводимость белка М2 гриппа А необходима для репликации вируса. Таким образом, ген М кодирует как матриксные, так и мембранные белки и выполняет несколько функций (см., например, Furuse et al., *Viol. J.* 6 (2009), 67; doi:10.1186/1743-422X-6-67).

Предпочтительный вариант осуществления настоящих ВПЧ дополнительно содержит рибонуклеопротеиновый комплекс матриксного белка (М).

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления ВПЧ по настоящему изобретению содержат:

- белок NA и белок NA на поверхности ВПЧ,
- NP рибонуклеопротеиновый комплекс и, предпочтительно, комплекс рибонуклеопротеина М,

при этом ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере двух из PB1, PB2, NS1 и NS2; предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере трех из PB1, PB2, NS1 и NS2; еще более предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса NS1; особо предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса PB1, PB2, NS1 и NS2.

Предпочтительно комплекс рибонуклеопротеина М в ВПЧ по настоящему изобретению содержит нуклеиновые кислоты, выбранные из группы генов М, описанных

в IRD. Кроме того, нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие М белок в ВПЧ по настоящему изобретению, могут быть представлены как кодирующие модифицированный белок, например, гибридный белок, содержащий или состоящий из М-белка (белков) гриппа и антигена из возбудителя, не являющегося вирусом гриппа. В соответствии с этим предпочтительным вариантом осуществления ВПЧ по настоящему изобретению дополнительно содержат генетически модифицированный М рибонуклеопротеиновый комплекс, предпочтительно содержащий вирусную РНК, кодирующую антиген патогена, отличного от вируса гриппа, особенно где М-рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую гибридный белок, содержащий М-белок, и белок или антигенный белковый фрагмент патогена, не являющегося вирусом гриппа. Соответственно, термины «М-белок» или «М-рибонуклеопротеиновый комплекс», используемые в настоящей заявке, включают оба варианта осуществления настоящего изобретения в этом отношении, М-белок (дикого типа, нативный, из вируса гриппа) или М-рибонуклеопротеиновый комплекс (дикого типа, нативный, из вируса гриппа) («вариант осуществления М вируса гриппа») и его генно-инженерные формы, например, гибридный белок из (одного) М белка (белков) гриппа и антигена из патогена, отличного от вируса гриппа, и соответствующий рибонуклеопротеиновый комплекс с вРНК, кодирующей этот гибридный белок (вариант осуществления гибрида гриппа/не гриппа»).

Например, патоген, не являющийся вирусом гриппа, может быть вирусом, отличным от вируса гриппа, грамположительной или грамотрицательной бактерией, грибом, простейшим или прионом, предпочтительно негриппозным РНК-вирусом, ДНК-вирусом или ретровирусом, особенно если вирус представляет собой вирус SARS-COV-1, SARS-COV-2 или вирус Денге.

Предпочтительно М рибонуклеопротеиновый комплекс содержит РНК, кодирующую гибридный белок, содержащий белок М (гриппа) и антиген патогена или его иммуногенную часть. Предпочтительно патоген представляет собой вирусный, бактериальный, грибковый или протозойный патоген. В этом контексте особенно предпочтительными являются антигены из патогенов *Acinetobacter baumannii*, рода *Anaplasma*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenale*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Ascaris lumbricoides*, рода *Aspergillus*, *Astroviridae*, рода *Babesia*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella henselae*, вируса ВК, *Blastocystis hominis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, рода *Borrelia*, *Borrelia* spp., рода *Brucella*, *Brugia malayi*, семейства *Bunyaviridae*, *Burkholderia ceracia* и других видов *Burkholderia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, семейства

Caliciviridae, рода *Campylobacter*, *Candida albicans*, *Candida* spp, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, приона CJD, *Clonorchis sinensis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Coccidioides* spp, коронавирусов, *Corynebacterium diphtheriae*, *Coxiella burnetii*, вируса Конго-крымской геморрагической лихорадки, *Cryptococcus neoformans*, рода *Cryptosporidium*, цитомегаловирус, вирусов Денге (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4), *Dientamoeba fragilis*, вируса Эбола (EBOV), рода *Echinococcus*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, рода *Ehrlichia*, *Entamoeba histolytica*, рода *Enterococcus*, рода *Enterovirus*, *Enteroviruses*, главным образом вируса Коксаки А и *Enterovirus 71* (EV71), *Epidermophyton* spp, вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), *Escherichia coli* O157:H7, O111 и O104:H4, *Fasciola hepatica* и *Fasciola gigantica*, приона FFI, надсемейства *Filarioidea*, флавивирусов, *Francisella tularensis*, рода *Fusobacterium*, *Geotrichum candidum*, *Giardia intestinalis*, *Gnathostoma* spp, приона GSS, вируса Гуанарито, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, генипавирусов (вируса Хендра, вируса Нипах), вируса гепатита А, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса гепатита D, вируса гепатита Е, вируса простого герпеса 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2), *Histoplasma capsulatum*, HIV (вируса иммунодефицита человека), *Northaewa wegneckii*, бокавируса человека (HBoV), вируса герпеса человека 6 (HHV-6) и вируса герпеса человека 7 (HHV-7), метапневмовируса человека (hMPV), вируса папилломы человека (HPV), вируса парагриппа человека (PIV), вируса японского энцефалита, вируса JC, вируса Хунин, *Kingella kingae*, *Klebsiella granulomatis*, приона Ку-ру, вируса Ласса, *Legionella pneumophila*, рода *Leishmania*, рода *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), вирус Мачупо, видов *Malassezia*, вируса Марбург, вируса кори, *Metagonimus yokagawai*, клады *Microsporidia*, вируса контагиозного моллюска (MCV), вируса эпидемического паротита, *Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium lepromatosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Naegleria fowleri*, *Necator americanus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia* spp, *Onchocerca volvulus*, *Orientia tsutsugamushi*, семейства *Orthomyxoviridae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paragonimus* spp, *Paragonimus westermani*, парвовируса B19, рода *Pasteurella*, рода *Plasmodium*, *Pneumocystis jirovecii*, полиовируса, вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса (RSV), риновируса, риновирусов, *Rickettsia akari*, рода *Rickettsia*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, вируса лихорадки долины Рифт, ротавируса, вируса краснухи, вируса Сабиа, рода *Salmonella*, *Sarcoptes scabiei*, SARS-COV-1, SARS-COV-2, рода *Schistosoma*, рода *Shigella*, вируса Син Номбре, хантавируса, *Sporothrix schenckii*, рода *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*

pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Strongyloides stercoralis, рода Taenia, Taenia solium, вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), Toxocara canis или Toxocara cati, Toxoplasma gondii, Treponema pallidum, Trichinella spiralis, Trichomonas vaginalis, Trichophyton spp., Trichuris trichiura, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Ureaplasma urealyticum, вируса Varicella zoster (VZV), Variola major или Variola minor, приона vCJD, вируса венесуэльского конского энцефалита, Vibrio cholerae, вируса Западного Нила, вируса западного энцефалита лошадей, Wuchereria bancrofti, вируса желтой лихорадки, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis и Yersinia pseudotuberculosis.

Подходящие примеры таких антигенов раскрыты, например, в WO 2015/149944 A2.

Поскольку микровоспаления, вызываемые ВПЧ согласно настоящему изобретению, также подходят для преодоления ослабления иммунитета в опухолях, технология ВПЧ согласно настоящему изобретению также может быть использована для индукции иммунного ответа против онкогенов или белков злокачественной ткани (например, опухолевых антигенов, расположенных на поверхности опухолевых клеток и являющихся специфичными для опухолевых клеток (т.е. не присутствующих на доброкачественных клетках)).

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение также относится к вакцине, содержащей ВПЧ по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Предпочтительно ВПЧ по настоящему изобретению представлены в виде фармацевтического препарата, пригодного для применения у людей. Таким образом, ВПЧ по настоящему изобретению можно комбинировать с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, которые представляют собой обычные носители (наполнители) и вспомогательные вещества, физиологически и фармацевтически приемлемые для применения у людей. Такие фармацевтически приемлемые носители известны специалистам-практикам в соответствующей области техники и могут быть легко найдены, например, в Remington's Pharmaceutical Science, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., в его обновленных/текущих изданиях, в которых описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки одной или нескольких терапевтических композиций, таких как одна или несколько противогриппозных вакцин и дополнительные фармацевтические агенты. В общем, природа фармацевтически приемлемого носителя зависит от конкретного используемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости/растворы для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные

растворы солей, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (например, в виде порошка, пилюль, таблеток или капсул) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, фармацевтические сорта маннитола, лактозы, крахмала или стеарата магния, которые обычно стабилизируют и/или увеличивают период полувыведения композиции или лекарственного средства. В дополнение к биологически нейтральным носителям вводимые фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и рН-буферные агенты и т.п., например, ацетат натрия или сорбитан монолаурат.

Подходящие фармацевтические композиции ВПЧ по настоящему изобретению для парентерального введения включают, без ограничения указанными, стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Неограничивающие примеры неводных растворителей включают пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло и масло канола, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевые и буферные среды. Парентеральные носители включают, например, раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Носители для внутривенного введения включают, например, растворы для восполнения жидкости и питательных веществ, растворы для восполнения электролитов (такие как средства на основе декстрозы Рингера) и т.п. В таких композициях и препаратах также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие агенты, красители, стабилизаторы, инертные газы и т.п.

Некоторые из композиций потенциально могут быть введены в виде фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты или основания, образованной реакцией с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, хлорная кислота, азотная кислота, тиоциановая кислота, серная кислота и фосфорная кислота, и с органическими кислотами, такими как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота и фумаровая кислота, или путем реакции с неорганическим основанием, таким как гидроксид натрия, гидроксид аммония, гидроксид калия, и с органическим основанием, таким как моно-, ди-, триалкил- и ариламины и замещенные этаноламины.

В настоящей заявке предусмотрены фармацевтические композиции, которые включают терапевтически эффективное количество ВПЧ по настоящему изобретению, отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Специалисту в данной области техники хорошо известны подходящие фармацевтические составы, пригодные для настоящих целей, например, существует много подходящих примеров и предложений для фармацевтических составов противогриппозных вакцин, которые также применимы для ВПЧ по настоящему изобретению. Фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения указанными, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. Носитель и композиция могут быть стерильными, и состав должен соответствовать способу введения. Композиция также может содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих агентов, или буферных агентов рН. Композиция предпочтительно представляет собой жидкость или водный раствор, суспензию, эмульсию или дисперсию. Жидкая или водная композиция может быть лиофилизирована и восстановлена раствором или буфером перед использованием. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды. Можно использовать любой из общеизвестных фармацевтических носителей, например, стерильный солевой раствор или кунжутное масло. Среда может также содержать обычные фармацевтические вспомогательные вещества, такие как, например, фармацевтически приемлемые соли для регулирования осмотического давления, буферы, консерванты и т.п. Другими средами, которые можно использовать в композициях и способах введения, как описано, являются нормальный физиологический раствор и кунжутное масло.

Предпочтительно вакцина по настоящему изобретению разработана как интраназально доставляемая вакцина, т.е. вакцина, которую можно вводить индивидууму интраназально. Соответственно, этот состав интраназальной вакцины предпочтительно представляет собой аэрозоль или назальный спрей. Поскольку РНК-ВПЧ согласно настоящему изобретению сама вызывает необходимое микровоспаление, дополнительный адъювант не требуется. Соответственно, эта вакцина может быть получена даже без какого-либо дополнительного адъюванта. Это особо предпочтительно, если необходим быстрый, простой и дешевый способ производства.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ВПЧ по настоящему изобретению.

Особо предпочтительный аспект настоящего изобретения относится к вирусоподобным частицам гриппа (ВПЧ), где ВПЧ содержат:

- гемагглютининовый (НА) белок и нейраминидазный (NA) белок на поверхности ВПЧ,

- нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс,

- рибонуклеопротеиновый комплекс матричного белка (M),

при этом ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере из PB1, PB2 и NS.

Предпочтительно, эти ВПЧ по настоящему изобретению дополнительно содержат генетически модифицированный M рибонуклеопротеиновый комплекс, предпочтительно, при этом M рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую антиген патогена, не являющегося вирусом гриппа, онкоген или белок злокачественной ткани, особенно где M рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую гибридный белок, содержащий белок M и белок или фрагмент антигенного белка патогена, не являющегося вирусом гриппа.

Согласно предпочтительному варианту осуществления этого аспекта настоящего изобретения, этот невирусный патоген, не являющийся вирусом гриппа, выбирают из негриппозного вируса, грамположительной или грамотрицательной бактерии, грибка, простейшего или приона, предпочтительно РНК-вируса, не относящегося к гриппу, ДНК-вируса или ретровируса, особенно когда вирус представляет собой вирус SARS-COV-1, SARS-COV-2 или вирус Денге.

Другим аспектом настоящего изобретения является способ получения ВПЧ в соответствии с настоящим изобретением, включающий стадии:

- обеспечение однонаправленных векторов для НА, NA, PA, PB1 и PB2;

- обеспечение двунаправленного вектора для NP,

- обеспечение либо однонаправленного, либо двунаправленного вектора для M,

- экспрессию векторов в рекомбинантной клеточной системе для получения ВПЧ по настоящему изобретению.

Хотя (как указывалось выше) можно использовать и другие двунаправленные векторы (при условии, что эта установка не приводит к репродуктивной вирусной частице, т.е. частице, которая является инфекционной после образования в клетке-хозяине, в которую была доставлена ВПЧ); однако предпочтительно только один (для NP), еще более предпочтительно только два (для NP и M) двунаправленных вектора используют для получения ВПЧ по настоящему изобретению.

Поскольку настоящий способ предпочтительно предназначен для получения композиций для применения в медицине, настоящий способ дополнительно включает этапы упаковки ВПЧ в конечный контейнер и получения из ВПЧ фармацевтической

композиции, готовой к применению для введения человеческим индивидуумам.

Предпочтительной для получения ВПЧ в соответствии с настоящим изобретением является любая клетка, которая поддерживает репликацию вируса гриппа и соответствует приемлемым стандартам для утверждения регулирующими органами. Поэтому по регуляторным причинам ВПЧ по настоящему изобретению предпочтительно получают в клетках/линиях клеток, которые одобрены регулирующими органами. Соответственно, продукция в клетках Мадин-Дарби почек собак (MDCK), клетках почек африканской зеленой мартышки (Vero), клетках 293, клетках 293Т, клетках почек свиньи (PK), клетках почек трехполосных дурукули (OMK), клетках Мадин-Дарби почек быка (MDBK), клетках почки куриного эмбриона (CEK), фибробластах куриного эмбриона, первичных клетках куриной почки или клетках, выделенных из хориоаллантаоисной мембраны куриных яиц с эмбрионами, предпочтительно в клетках MDCK или клетках Vero, особо предпочтительно к клеткам в MDCK. Культура клеток MDCK является особенно предпочтительной, поскольку клетки MDCK уже были одобрены FDA и EMA в качестве клеточных линий для производства вакцин (например, Flucelvax и Optaflu). Клетки MDCK представляют собой модельную клеточную линию млекопитающих, используемую в биомедицинских исследованиях. Клетки MDCK используются для широкого спектра исследований клеточной биологии, включая полярность клеток, межклеточные адгезии, коллективную клеточную подвижность, а также ответы на факторы роста. Это одна из немногих моделей клеточных культур, которая подходит для трехмерных клеточных культур и многоклеточных перестроек, известных как морфогенез ветвления.

Настоящее изобретение также относится к применению настоящих ВПЧ для медицинского использования, предпочтительно для профилактики заболеваний, вызванных патогенами, и для лечения и профилактики опухолевых заболеваний (т.е. в иммуноонкологии), предпочтительно для профилактики или лечения возникающих вирусных заболеваний, особенно для профилактики гриппа. Предпочтительными вызываемыми вирусом возникающими заболеваниями, которые следует предотвращать и лечить с помощью вакцин в соответствии с настоящим изобретением, являются те, которые идентифицированы в Graham et al. (Graham et al., Nat. Immunol. 19 (2018), 20-28), а именно парамиксовирусы, особенно вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус Нипах; тогавирусы (-альфавирусы), особенно вирус краснухи, вирус Чикунгунья, вирус западного энцефалита лошадей, вирус восточного энцефалита лошадей, вирус венесуэльского энцефалита лошадей, вирус Маяро, вирус реки Росс, вирус леса Барма, вирус О'ньонг-ньонг, вирус леса Семлики, вирус Гета, вирус Синдбис; реовирусы, особенно ротавирусы, новые ротавирусы, вирус Банна, ортореовирусы Нельсон-Бей;

ортомиксовирусы, особенно вирус гриппа А и В, несколько подтипов вируса гриппа А, вирус Дхори, вирус Тогото, вирус Бурбона; аденовирусы, особенно аденовирус 4 и 7, аденовирус 14 или 81 или другие серотипы; рабдовирусы; вирус бешенства, вирус везикулярного стоматита (VSV); пикорнавирусы, особенно полиовирусы 1, 2 и 3, вирус гепатита А, EV71, EV-D68, риновирусы, вирус Люнгана; папилломавирусы, особенно HPV 6, 11, 16 и 18, а также другие серотипы; поксвирусы, особенно вирус натуральной оспы, вирус оспы обезьян; гепаднавирусы, особенно вирус гепатита В; герпесвирусы, особенно вирус ветряной оспы, CMV, EBV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, HHV-8; флавивирусы, особенно вирус желтой лихорадки, клещевого энцефалита (КЭ), японского энцефалита (ЯЭ), вирус Денге, ВГС, вирус Зика, вирус энцефалита Сент-Луис, вирус Западного Нила, вирус Повассан, вирус омской геморрагической лихорадки, вирус энцефалита долины Мюррей, вирус энцефалита Росио, вирус Кьясанурского леса, вирус Алхурма, вирус русского весенне-летнего клещевого энцефалита, вирус центрально-европейского клещевого энцефалита, вирус Весселсброн, вирус Буссукара, вирус Каципакор, вирус Ильеуса, вирус Игуапе, вирус Усуту; гепавирусы, особенно вирус гепатита Е; пневмовирусы, особенно респираторно-синцитиальный вирус (РСВ); метапневмовирус; филовирусы, особенно вирус Эбола, вирус Марбург, ретровирусы, особенно ВИЧ-1, коронавирусы, особенно SARS-COV-1, SARS-COV-2, вирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS); парвовирусы, особенно вирус B19, бокавирус; калицивирусы, особенно норовирус; полиомавирусы, особенно вирус JC, вирус BK; аренавирусы, особенно вирус Ласса, вирус Мачупо, вирус Хунин, вирус Гуанарито, вирус Чапаре, вирус Сабиа, вирус Флексаль, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Лухо; полиомавирусы, особенно SV40, вирус клеток Меркеля; артеривирусы, особенно вирус обезьяньей геморрагической лихорадки; буньявирусы, особенно хантавирусы, вирус долины Рифт, вирус Конго-крымской геморрагической лихорадки, вирус калифорнийского энцефалита, вирус Батаи, вирус Бханджа, вирус Добрава-Белград, вирус Эрве, вирус Пуумала, вирус Сеула, вирус Тахина, вирус тяжелой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом, вирус энцефалита Ла-Кросс, вирус долины Кэш, вирус каньона Джеймстаун, вирус зайца-беляка, вирус Хартленд, вирус Оропуш; астровирусы, особенно астровирус. В ВПЧ по настоящему изобретению вирусные антигены из этих вирусов могут быть введены в ген М для индукции иммунных ответов против этого рекомбинантного антигена при введении ВПЧ по настоящему изобретению (в виде вакцин) (человеческому) индивидууму.

Обеспечены способы лечения или профилактики заболевания или инфекции, или их симптомов, вызванных вирусом гриппа (или другими (вирусными) заболеваниями).

Способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей ВПЧ по настоящему изобретению (например, вакцины ВПЧ), субъекту (например, млекопитающему, в частности, человеку). Один вариант осуществления включает способ лечения субъекта, страдающего заболеванием или инфекцией, или подверженного риску или предрасположенного к ним, или их симптома, вызванного патогеном, особенно вирусом гриппа. Способ включает введение субъекту (например, субъекту-млекопитающему) количества или терапевтического количества вакцины, содержащей ВПЧ, достаточного для лечения заболевания, инфекции или их симптомов, вызванных патогеном, особенно вируса гриппа в условиях, при которых лечат заболевание, инфекцию и/или их симптомы.

В одном варианте осуществления описанные в настоящей заявке способы включают введение субъекту (включая человека, который, как установлено, нуждается в таком лечении) эффективного количества вакцины по настоящему изобретению для получения такого эффекта. Способы лечения соответствующим образом применяют у субъектов, в частности людей, страдающих, имеющих, восприимчивых или подверженных риску заболевания, расстройства, инфекции или их симптома, а именно, вызванным патогеном, особенно патогеном гриппа. Определение субъекта, нуждающегося в таком лечении, может быть основано на суждении субъекта или медицинского работника, и может быть субъективным (например, мнение) или объективным (например, поддающимся измерению с помощью теста или диагностического метода).

Кроме того, предусмотрены профилактические способы предотвращения или защиты от заболевания или инфекции или их симптомов, вызванных патогеном, особенно вирусом гриппа. Такие способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей иммуногенную композицию по настоящему изобретению (например, вакцину ВПЧ), субъекту (например, млекопитающему, такому как человек), в частности, до заражения субъекта или до начала заболевания, такого как грипп.

Следовательно (и как показано в следующем разделе примеров), для создания РНК-ВПЧ используют поверхностные молекулы НА, NA и полимеразы PA, PB1, PB2, экспрессированные в виде белков, и сегменты NP и М, экспрессированные в виде белков и РНК. НА, NA PA, PB1 и PB2 используются при конструировании РНК-ВПЧ в однонаправленной плазмиде, которая продуцирует только вирусный белок. Например, для этой цели в качестве однонаправленной плазмиды можно использовать PCAGGS (фиг.11). После трансфекции в клетку эта плазида экспрессирует только информационные РНК,

которые затем транслируются в вирусные белки с помощью собственного механизма клетки. Двухнаправленная плаزمид, такая как рНWXccdВ (фиг.12), может быть использована для экспрессии NP и М как в мРНК, так и в вирусной копии РНК (вРНК). Экспрессия отрицательно-смысловой геномной РНК (вРНК) стимулируется промоторной и терминирующей последовательностью РНК-полимеразы I человека, например, мышинной терминирующей последовательностью на рНWXccdВ. Кассета транскрипции полимеразы II (например, промотор β-актина цыпленка и полиА) в ориентации, противоположной звену полимеразы I, кодирует мРНК того же вирусного гена. После успешного клонирования сегментов в соответствующие плазмиды все плазмиды вместе трансформируют в подходящую клеточную линию, например, целевую линию MDCK. Самосборка объединяет белки и РНК в вирусные оболочки с поверхностными белками, а также с двумя RNP, которые содержат вирусную РНК М и NP. Готовые РНК-ВПЧ затем высвобождают в среду для культивирования клеток и собирают там.

Изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами и фигурами, но не ограничивается ими.

На фигуре 1 показан принцип запуска клеточного иммунитета вирусной РНК. Заражение дендритных клеток гриппом или экспрессия вирусной РНК вызывает некроптоз. Процесс некроптоза включает перфорацию клеточных мембран, что, в свою очередь, приводит к высвобождению внутриклеточных компонентов, которые воспринимаются другими клетками как сигнал повреждения. Кроме того, перфорация также оставляет вирусные нуклеиновые кислоты и белки в межклеточном пространстве и, таким образом, улучшает их обработку клетками врожденного иммунитета, которые были активированы этими молекулярными паттернами, ассоциированными с повреждением (DAMP), а затем обеспечивает более эффективную презентацию клеткам адаптивной иммунной системы, таким как Т-клетки.

На фигуре 2 представлена структура вириона вируса гриппа (IAV). (a) Электронно-микроскопическое изображение частицы вируса гриппа. (b) Графическое представление вириона IAV: в липидном бислое, происходящем из клетки-хозяина, имеются шипы HA и NA и ионные каналы M2. Прочность вириона поддерживается оболочкой из матричного белка M1. Генетическая информация вируса разделена на 8 сегментов, которые расположены внутри вириона в виде рибонуклеопротеинового комплекса. (c) Схематическая иллюстрация рибонуклеопротеинового комплекса (RNP): генетическая информация намотана в виде отрицательной одноцепочечной РНК вокруг цепи нуклеопротеинов (NP). Кроме того, RNP имеют собственный полимеразный комплекс (PB1, PB2 и PA), который начинает независимо реплицировать вирусную РНК после

успешного проникновения вириона в клетку-хозяина.

На фигуре 3 показано схематическое изображение РНК-ВПЧ и плазмид, необходимых для ее производства. Поверхность ВПЧ идентична поверхности вириона IAV (см. фиг.2). Внутри РНК-ВПЧ находятся два рибонуклеопротеиновых комплекса, которые экспрессируют вирусную РНК для NP и М после инокуляции *de novo*. Когда РНК-ВПЧ образуется в клеточной культуре, НА, NA и полимеразы PA, PB1, PB2 необходимы только в виде белков, поэтому экспрессия этих белков осуществляется с помощью плазмиды, которая продуцирует только информационную РНК, а белки транслируются клеточным механизмом хозяина. Поскольку NP и М необходимы как в виде белка, так и в виде вирусной копии РНК (вРНК), требуется двунаправленная плазида, которая экспрессирует информационную РНК, а также вРНК.

На фигуре 4 показана гибель клеток, вызванная РНК-ВПЧ. Дендритные клетки человека инфицировали различными конструкциями ВПЧ, и после восьмичасовой инкубации анализировали гибель клеток с помощью проточной цитометрии с визуализацией. В качестве отрицательного контроля использовали пустую ВПЧ (НА/NA (Prot.)) и носитель (среду для культивирования клеток). Положительным контролем служило заражение вирусом гриппа и ВПЧ всеми тремя полимеразными RNP.

На фигуре 5 показана экспериментальная схема для измерения индукции клеточного иммунитета РНК-ВПЧ. Дендритные клетки человека инфицировали РНК-ВПЧ или контролями. После четырехчасовой инкубации добавляли дендритные клетки от того же донора, и еще через четыре часа добавляли Т-клетки от другого донора. Гибель клеток в инфицированных дендритных клетках активирует добавленные дендритные клетки, которые, в свою очередь, вызывают пролиферацию Т-клеток (см. фиг.1).

На фигуре 6 показан клеточный иммунитет, запускаемый РНК-ВПЧ. Дендритные клетки человека инфицировали различными конструкциями ВПЧ и культивировали с ДК и чужеродными Т-клетками (см. фиг.5). Пролиферацию Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. В качестве отрицательного контроля использовали пустую ВПЧ (НА/NA (Prot.)) и носитель инфекции (среду для культивирования клеток). Положительным контролем служило заражение вирусом гриппа и ВПЧ, содержащими все три полимеразных RNP.

На фигуре 7 показан примерный план исследования заражения IAV.

На фигуре 8 показан примерный план исследования заражения с использованием химерной вакцины против IAV и PRCv.

На фигуре 9 показано получение химерной двунаправленной плазмиды,

содержащей генетическую информацию М-сегмента IAV, а также генетическую информацию от SARS-CoV-2 с использованием сборки по Гибсону. Вкратце: плаزمида pHW2000, содержащая М-сегмент IAV, а также специфическую область SARS-CoV-2, амплифицируется с использованием специфических праймеров, создающих перекрытие из 20 пар оснований между двумя ампликонами. В процессе сборки нуклеаза отщепляет ДНК от 5'-конца, позволяя осуществлять отжиг двух ампликонов. ДНК-полимераза и лигаза заполняют любые промежутки и соединяют ДНК, удаляя любые разрывы в ДНК. Продукт этого процесса представляет собой двунаправленную плазмиду, содержащую химерную последовательность М IAV и белок SARS-CoV-2.

На фигуре 10 показана схема получения химерной РНК-ВПЧ IAV SARS-CoV-2. (a) Сегменты HA, NA, PB1, PB2 и PA сохраняют в однонаправленных (pUNI) плаزمидях с помощью обратной генетики. NP и М сохраняют в двунаправленных плазмидях (pBI). (b) Специфическую область SARS-CoV-2 подвергают обратной транскрипции и амплифицируют с помощью ПЦР. (c) Химерную двунаправленную плазмиду, содержащую генетическую информацию М-сегмента IAV и части SARS-CoV-2, производят с помощью сборки по Гибсону (см. фиг.9). (d) HA, NA, PB1, PB2, PA, NP и химерную плазмиду М трансформируют в культуру клеточной линии MDCK. (e) Химерная РНК-ВПЧ IAV-SARS-CoV-2 возникает в результате самосборки в клеточной линии, и её собирают в надосадочной жидкости клеточной культуры. (f) Подробное описание химерной РНК-ВПЧ IAV-SARS-CoV-2.

На фигуре 11 показана плазмидная карта pCAGGS.

На фигуре 12 показана плазмидная карта pHWX.

Примеры

I. Доказательство концепции настоящего изобретения *in vitro*.

Чтобы продемонстрировать функциональность настоящего изобретения, были сконструированы следующие ВПЧ с поверхностными белками HA и NA и различными конфигурациями RNP:

1. Пустая ВПЧ, имеющая на поверхности только белки HA и NA.
2. ВПЧ с рибонуклеопротеиновым комплексом NP
3. ВПЧ с рибонуклеопротеиновым комплексом NP и М. Следует отметить, что из-за двунаправленной природы плазмиды М pHWX помимо HA и NA присутствуют как RNP, так и поверхностный белок.
4. ВПЧ с NP и всеми полимеразами в виде рибонуклеопротеинового комплекса. Эта конструкция была разработана в качестве положительного контроля и не подходит в качестве вакцины из соображений биологической безопасности.

Для вакцины-прототипа использовали NA и NA из штамма вируса A/New Caledonia/20/1999 и M, полимеразы и NP из штамма вируса A/California/4/2009. Отдельные сегменты ВБК выделяли согласно Hoffmann et al. (Arch. Virol. 146 (2001), 2275-2289, 10.1007/s007050170002). Сначала из вирусных изолятов выделяли vРНК. vРНК переписывали в кДНК с использованием праймера UNI12 и обратной транскриптазы. Сегментспецифические последовательности затем амплифицировали с помощью ПЦР с использованием сегментспецифичных праймеров и очищали с помощью гель-электрофореза (Hoffmann et al., 2001). Отдельные сегменты клонировали в соответствующие им плазмиды с использованием рестрикционных ферментов и лигаз, трансформировали в бактерии *E. coli* и высевали на чашки с агаром. Отдельные колонии отбирали для проверки полноты и правильности клонированной вставки с использованием секвенирования по Сэнгеру. Плазмиды затем совместно трансформировали в клетки MDCK с помощью липофектамина. После трансформации РНК-ВПЧ были созданы путем «самосборки» в клетках MDCK (Nayaket et al., Virus Res. 106 (2004), 147–165; 10.1016/j.virusres.2004.08.012). Затем РНК-ВПЧ собирали в среде для культивирования клеток. В дальнейшем планируется использовать более простые и эффективные методы создания плазмид и РНК-ВПЧ, например, клонирование в одном сосуде (Choi et al., Sci. Rep. 9, (2019) 8318; 10.1038/s41598-019-44813-z).

Индукция клеточной гибели ВПЧ была протестирована на дендритных клетках человека, поскольку способность вызывать некроптоз в иммунных клетках имеет решающее значение для эффективности вакцины (Hartmann et al., 2017). Для этого дендритные клетки из моноцитов, полученных от анонимных доноров крови, выращивали путем добавления цитокинов ГМ-КСФ и ИЛ-4. Затем эти дендритные клетки инфицировали различными конструкциями ВПЧ или штаммом гриппа NC/99 в качестве положительного контроля. Через восемь часов после инфицирования индукцию гибели клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. В то время как включение только NP RNP в ВПЧ не приводило к значительному увеличению скорости гибели клеток по сравнению с неинфицированным отрицательным контролем, наблюдалось значительное увеличение при включении как NP, так и M RNP, что было неожиданно выше, чем для ВПЧ, где также все полимеразы были включены как RNP (фиг.4).

Способность ВПЧ вызывать клеточный иммунный ответ проверяли методом совместного культивирования Т-клеток с дендритными клетками. Для этой цели дендритные клетки человека инфицировали конструкциями ВПЧ или контролями (вирусом или носителем). Через 4 часа добавляли дендритные клетки от того же донора крови, чтобы они могли активироваться сигналами повреждения от мертвых

инфицированных клеток. Эту смесь клеток снова культивировали через 4 часа с Т-клетками от другого донора в течение 2,5 дней. Эти чужеродные Т-клетки были активированы, с одной стороны, реакцией «трансплантат против хозяина», а с другой стороны, состоянием дендритных клеток и, таким образом, были стимулированы к пролиферации. Затем пролиферацию измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием разбавления красителя, связанного с каждым клеточным делением (пролиферацией) (фиг.5).

Как и в экспериментах по гибели клеток, пустые ВПЧ не могли вызвать повышенную пролиферацию Т-клеток по сравнению с отрицательным контролем. Это свидетельствует, что вакцинация поверхностными белками в первую очередь вызывает антителиоопосредованный иммунитет. С другой стороны, ВПЧ с М- и NP RNP были способны вызывать по меньшей мере такую же высокую пролиферацию Т-клеток, как и при заражении настоящим вирусом гриппа (положительный контроль). Интересно, что комбинация М/NP RNP оказалась даже более эффективной, чем комбинация NP и всех трех полимераз. Конструкция ВПЧ, содержащая только NP RNP, была способна вызывать небольшое увеличение пролиферации Т-клеток. Эти данные показывают, что ВПЧ, состоящая из поверхности, включающей белки HA, NA и М, заполненной NP и М RNP, является хорошим индуктором клеточного противовирусного иммунитета (фиг.6).

Таким образом, настоящее изобретение состоит из объединения технологии ВПЧ и комплексов, экспрессирующих вирусную РНК, и полученной в результате вакцины, похожей на инфекционную частицу для иммунной системы. После абсорбции в организме эти РНК-ВПЧ ведут себя как инфекционный вирион IAV, проникая в ядро клетки и начиная экспрессировать вирусную РНК через принесенные с собой полимеразы. Затем эта вновь синтезированная РНК запускает воспалительный сигнальный каскад, повышающий клеточный иммунитет. Именно этот шаг не используется в современных стратегиях вакцинации. Мы уже доказали, что эта инновация создает клеточный иммунитет, необходимый для долговременной защиты в системе клеточной культуры.

II. Доказательство концепции настоящего изобретения *in vivo*.

В условиях *in vivo* доказательство концепции обеспечивается двумя экспериментами. Первый эксперимент направлен на проверку действия РНК-ВПЧ в качестве единственной вакцины против свиного гриппа. Во втором эксперименте создают РНК-ВПЧ-вакцину с более широкой активностью против гриппа и коронавируса свиней, вызывающего у свиней патологии, сопоставимые с наблюдаемыми у людей при заражении современным вирусом SARS-CoV-2.

II.1. Доказательство концепции вакцинации против IAV с РНК-ВПЧ у свиней.

РНК-ВПЧ с сегментами из недавно выделенного свиного изолята IAV H1N1 конструируют, как описано в разделах выше. Эффективность РНК-ВПЧ в качестве вакцины против гриппа тестируют в эксперименте с контрольным заражением, в котором полезность РНК-ВПЧ сравнивают с обычной ветеринарной противогриппозной вакциной. 30 животных разделяют на три группы по 10 особей: (i) животные, получающие РНК-ВПЧ плюс носитель, (ii) животные, получающие обычную вакцину и носитель, и (iii) группа, получающая носитель. После вакцинации 5 из десяти животных заражают инфекцией IAV (фиг.7). Клинические признаки, результаты лабораторных анализов (такие как вирусная нагрузка и уровни цитокинов) и клеточных иммунологических анализов служат показателями эффективности вакцины.

II.2 Доказательство концепции комбинаторной вакцинации против IAV и коронавируса.

Для этого эксперимента конструируют РНК-ВПЧ, в которой часть нуклеопротеиновой последовательности свиного респираторного коронавируса (PRCv) добавляют к RNP М-сегмента. PRCv имеет структуру, аналогичную SARS-CoV-2, и служит моделью, поскольку в настоящее время нет модели на животных для тестирования инфекций SARS-CoV-2. 40 животных разделяют две группы по 20 особей: (i) животные, получающие РНК-ВПЧ плюс носитель, и (ii) группа, получавшая носитель. После вакцинации группы по пять особей из двадцати животных заражают IAV, PRCv, комбинацией IAV и PRCv, или носителем (фиг.8). Клинические признаки, результаты лабораторных анализов (такие как вирусная нагрузка и уровни цитокинов) и клеточных иммунологических анализов служат показателями эффективности вакцины.

II.3 Подтверждение концепции комбинированной вакцинации против IAV и SARS-CoV-2.

Для этого эксперимента будет сконструирована РНК-ВПЧ с химерным IAV М-RNP. Химерный М-RNP будет содержать генетическую информацию М-сегмента IAV, а также генетическую информацию, полностью или частично описывающую один из белков SARS-CoV-2. ВПЧ будет построена, как описано выше. Эти ВПЧ будут использоваться для вакцинации свиней. После вакцинации и возможной ревакцинации у животных будет взята кровь, которая будет использована в серологических и клеточных иммунологических анализах *in vitro*. Как только будет определена действующая и пригодная для использования животная модель SARS-CoV-2, РНК-ВПЧ против SARS-CoV-2 будет протестирована в исследовании заражения *in vivo* (фиг.9 и 10).

Сокращения

DAI	ДНК-зависимый активатор ИФН-регуляторных факторов
DAMP	Молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением
DC	дендритные клетки
HA	гемагглютинин
IAV	Вирус гриппа А
LAIV	Аттенуированная живая вирусная вакцина
NA	нейраминидаза
NP	нуклеопротеид
PAMP	Молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами
PRCv	респираторный коронавирус свиней
PHK	Рибонуклеиновая кислота
RNP	Рибонуклеопротеиновые комплексы
ZBP1	Z-ДНК-связывающий белок 1

Последовательности

SEQ ID NO: 1 (pCAGGS):

GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCC
ATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTTATTTTGTGCAGCGATGGGGG
CGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAG
GTGCGGGCGGAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCG
GCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGC
GCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCC
CTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAG
CCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGTG
CGTGGGAGCGCCGCTGCGGCCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGCGCGGGGCTTT
GTGCGCTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGG
GGAACAAAGGCTGCGTGGGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGGAGAGGGGTGTGGGCGCGCGGTCCGGCT
GTAACCCCCCTGCACCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGC
GGGGCTGGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGG
CCGCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGC
GGCGAGCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAATC
TGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCACCCCTCTAGCGGGCGGGGCGAAGCGGTGCGGGCGC
GGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCCCGCGCCCGCTCCCTTCTCCATCTCCAGC
CTCGGGGCTGCCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGCGAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGT
GTGACCGGGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCA
ACGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATTTTTGGCAAAGAATTCCTCGAGGAATTCACCTCCTCAGGTGCA
GGTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTT
CCCTCTGCCAAAAATATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAAT
TTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAA
TCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGA
ACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCATAGA

AAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGTFTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAA
AATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCC
TCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGT
GCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCC
CTAACTCCGCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCG
AGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA
AAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATA
AAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGAT
CCGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCT
CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAAT
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAGGCCAGG
AACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATC
GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTC
CCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGC
GTGGCGCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCT
GTGTGCACGAACCCCCGTTTCCAGCCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC
GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCG
CTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACCAAACCACCGCTGG
TAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG
ATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAT
CAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA
GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTG
TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCA
GTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG
AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAA
GCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGT
CACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC
CATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTG
TTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTG
TGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATCTGAGAATAGTGATGCGGGCAGCCGAGTTGCTCTTGCCCGGC
GTCAATACGGGATAATAACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCG
GGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACT
GATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAA
AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATT
TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTTC
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG

SEQ ID NO: 2 (pHWX):

CAGCTGGTTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCTTCCC
 AATCCTCCCCCTTGCTGTCCTGCCCCACCCACCCCCAGAAATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGA
 TGCAATTTCTCATTTTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGG
 GAGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGCATTTA
 GGTGACCGCCGGGAGGGCGTCCCCGGCCCCGGCGCTGCTCCCGCGTGTGTCTGGGGTTGACCAGAGGGCC
 CCGGGCGCTCCGTGTGTGGCTGCGATGGTGGCGTTTTTGGGGACAGGTGTCCGTGTGCGCGCTGCGCTGG
 GCCGGCGCGTGGTGGTGACGCGACCTCCCCGGCCCCGGGGAGGTATATCTTTTCGCTCCGAGTCGGCAT
 TTTGGGCCGCCGGGTTATTGGAGACGGGGTCGACCTGCAGACTGGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTT
 ATATTTCCCAGAACATCAGGTTAATGGCGTTTTTGTGTCTTTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTC
 TTCCCCGATAACGGAAACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATA
 TGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCA
 TCCGTGCCCCGGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATAACGGCTCTCTCTTTT
 ATAGGTGTAAACCTTAAACTGCATTTACCAGCCCCTGTTCTCGTCAGCAAAGAGCCGTTTCAATTTCAAT
 AAACCGGGCGACCTCAGCCATCCCTTCCCTGATTTTTCCGCTTTCAGCGTTCGGCACGCAGACGACGGGCT
 TCATTTCTGCATGGTTGTGCTTACCAGACCGGAGATATTGACATCATATATGCCTTGAGCAACTGATAGCT
 GTCGCTGTCAACTGTCACTGTAATACGCTGCTTCATAGCATAACCTCTTTTTGACATACTTCGGGTATAACA
 TATCAGTATATATTCTTATACCGCAAAAATCAGCGCGCAAAATACGCATACTGTTATCTGGCTTTTAGTAA
 GCCGGATCCACGCGTCGTCTCTCCCCCCCCAACTTCGGAGGTCGACCAGTACTCCGGTTAACTGCTAGAC
 CCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG
 CTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATT
 TTGGAAAGTCCCCTGATTTTTGGTGCCAAAACAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGAAAA
 TCCCCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCG
 ATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCATAAGGTGATGTACTGGGCATAATGCCAGG
 CGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATCGACGTGAGGTGGCACTTTTCG
 GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGA
 CAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTG
 CCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTTTGCCTTCCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT
 GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT
 TATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGA
 GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATA
 ACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTT
 TTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAA
 CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTC
 TGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCTGGTTCTCGCGG
 TATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG
 GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGT
 CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT

GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGAC
 CCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA
 AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
 TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG
 AACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA
 AGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGG
 GGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA
 TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAG
 GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCT
 CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGG
 GCCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGCTGTCCTTTTGTCTACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCCTGATT
 CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAG
 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGagcgcccaatacgcaaaccgctctccccgcggttgcccgatt
 cattaatg

SEQ ID NO: 3 (вирус гриппа А (A/California/04/2009(H1N1)) ген полимеразы PB2
 (PB2) сегмента 1; FJ969516.1 вирус гриппа А (A/California/04/2009(H1N1)) ген полимеразы
 PB2 (PB2) сегмента 1, полная кодирующая последовательность)

ATGGAGAGAATAAAAGAACTGAGAGATCTAATGTGCGAGTCCCGCACTCGCGAGATACTCACTAAGACCA
 CTGTGGACCATATGGCCATAATCAAAAAGTACACATCAGGAAGGCAAGAGAAGAACCCCGCACTCAGAAT
 GAAGTGGATGATGGCAATGAGATAACCAATTACAGCAGACAAGAGAATAATGGACATGATTCCAGAGAGG
 AATGAACAAGGACAAACCCCTCTGGAGCAAAACAAACGATGCTGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACCTC
 TGGCCGTAACATGGTGGAAATAGGAATGGCCCAACAACAAGTACAGTTTCATTACCCTAAGGTATATAAAAC
 TTATTTTCGAAAAGGTCGAAAGGTTGAAACATGGTACCTTCGGCCCTGTCCACTTCAGAAATCAAGTTAAA
 ATAAGGAGGAGAGTTGATACAAACCCCTGGCCATGCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGTGATTA
 TGGAAGTTGTTTTCCCAAATGAAGTGGGGGCAAGAATACTGACATCAGAGTCACAGCTGGCAATAACAAA
 AGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAGGATGTAAAATTGCTCCCTTGATGGTGGCGTACATGCTAGAAAGAGAA
 TTGGTCCGTAAAACAAGGTTTCTCCAGTAGCCGGCGGAACAGGCAGTGTTTATATTGAAGTGTGCACT
 TAACCCAAGGGACGTGCTGGGAGCAGATGTACACTCCAGGAGGAGAAGTGAGAAATGATGATGTTGACCA
 AAGTTTGATTATCGCTGCTAGAAACATAGTAAGAAGAGCAGCAGTGTGAGCAGACCCATTAGCATCTCTC
 TTGGAAATGTGCCACAGCACACAGATTGGAGGAGTAAGGATGGTGGACATCCTTAGACAGAATCCAAC TG
 AGGAACAAGCCGTAGACATATGCAAGGCAGCAATAGGGTTGAGGATTAGCTCATCTTTCAGTTTTGGTGG
 GTTCACTTTCAAAAAGGACAAGCGGATCATCAGTCAAGAAAGAAGAAGTGTAAACGGGGCAACCTCCAA
 ACACTGAAAATAAGAGTACATGAAGGGTATGAAGAATTCACAATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCTATTC
 TCAGAAAGGCAACCAGGAGATTGATCCAGTTGATAGTAAGCGGGAGAGACGAGCAGTCAATTGCTGAGGC
 AATAATTGTGGCCATGGTATTCTCACAGGAGGATTGCATGATCAAGGCAGTTAGGGGGCGATCTGAACTTT
 GTCAATAGGGCAAACCAGCGACTGAACCCCATGCACCAACTCTTGAGGCATTTCCAAAAAGATGCAAAAAG
 TGCTTTCCAGAACTGGGGAAATTGAATCCATCGACAATGTGATGGGAATGATCGGAATACTGCCCGACAT
 GACCCCAAGCACGGAGATGTCGCTGAGAGGGATAAGAGTCAGCAAAATGGGAGTAGATGAATACTCCAGC

ACGGAGAGAGTGGTAGTGAGTATTGACCGATTTTTAAGGGTTAGAGATCAAAGAGGGAACGTA CTACTATTGT
 CTCCCGAAGAAGTCAGTGAAACGCAAGGAACTGAGAAGTTGACAATAACTTATTCGTCAATGATGTG
 GGAGATCAATGGCCCTGAGTCAGTGCTAGTCAACACTTATCAATGGATAATCAGGAACTGGGAAATTGTG
 AAAATTCAATGGTCACAAGATCCCACAATGTTATACAACAAAATGGAATTTGAACCATTTTCAGTCTCTTG
 TCCCTAAGGCAACCAGAAGCCGGTACAGTGGATTCGTAAGGACACTGTTCCAGCAAATGCGGGATGTGCT
 TGGGACATTTGACACTGTCCAAATAATAAAAACCTTCTCCCTTTGCTGCTGCCCCACCAGAACAGAGTAGG
 ATGCAATTTTCTCATTGACTGTGAATGTGAGAGGATCAGGGTTGAGGATACTGGTAAGAGGCAATTCTC
 CAGTATTCAATTACAACAAGGCAACCACAAACGACTTACAGTCTTTGGAAAGGATGCAGGTGCATTGACTGA
 AGATCCAGATGAAGGCACATCTGGGGTGGAGTCTGCTGTCTGAGAGGATTTCTCATTTTGGGCAAAGAA
 GACAAGAGATATGGCCAGCATTAAGCATCAATGAACTGAGCAATCTTGCAAAAAGGAGAGAAGGCTAATG
 TGCTAATTGGGCAAGGGGACGTAGTGTGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAG
 CCAGACAGCGACCAAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAG

SEQ ID NO: 4 (вирус гриппа А (A/California/04/2009(H1N1)) ген полимеразы PB1 (PB1) сегмента 2; МК159411.1 вирус гриппа А (A/California/04/2009(H1N1)) ген полимеразы PB1 (PB1) сегмента 2, полная кодирующая последовательность; и ген нефункционального PB1-F2 белка (PB1-F2), полная последовательность)

AGCAAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACTCTACTTTTCCCTAAAAATCCAGCGCAAA
 ATGCCATAAGCACCACATTCCTTTATACTGGAGATCCTCCATACAGCCATGGAACAGGAAACAGGATACAC
 CATGGACACAGTAAACAGAACACACCAATACTCAGAAAAGGGAAAGTGGACGACAAACACAGAGACTGGT
 GCACCCSAGCTCAACCCGATTGATGGACCACTACCTGAGGATAATGAACCAAGTGGGTATGCACAAACAG
 ACTGTGTTCTAGAGGCTATGGCTTTCTTTGAAGAATCCCACCCAGGAATATTTGAGAATTCATGCCTTGA
 AACAAATGGAAGTTGTTCAACAAACAAGGGTAGATAAACTAACTCAAGGTCGCCAGACTTATGATTGGACA
 TTAACAGAAATCAACCGGCAGCAACTGCATTGGCCAACACCATAGAAGTCTTTAGATCGAATGGCCTAA
 CAGCTAATGAGTCAGGAAGGCTAATAGATTTCTTAAAGGATGTAATGGAATCAATGAACAAAGAGGAAAT
 AGAGATAACAACCCACTTTCAAAGAAAAAGGAGAGTAAGAGACAACATGACCAAGAAGATGGTCACGCAA
 AGAACAAATAGGGAAGAAAAACAAGACTGAATAAGAGAGGCTATCTAATAAGAGCACTGACATTAATA
 CGATGACCAAAGATGCAGAGAGAGGCAAGTTAAAAAGAAGGGCTATCGCAACACCTGGGATGCAGATTAG
 AGGTTTCGTATACTTTGTTGAACTTTAGCTAGGAGCATTTGCCAAAAGCTTGAACAGTCTGGGCTCCCA
 GTAGGGGGCAATGAAAAGAAGGCCAAACTGGCAAATGTTGTGAGAAAGATGATGACTAATTCACAAGACA
 CAGAGATTTCTTTCACAATCACTGGGGACAACACTAAGTGGAAATGAAAATCAAAATCCTCGAATGTTCTT
 GGCGATGATTACATATATCACCAGAAATCAACCCGAGTGGTTCAGAAACATCCTGAGCATGGCACCCATA
 ATGTTCTCAAACAAAATGGCAAGACTAGGGAAAGGGTACATGTTTCGAGAGTAAAAGAATGAAGATTCGAA
 CACAAATACCAGCAGAAATGCTAGCAAGCATTGACCTGAAGTACTTCAATGAATCAACAAAGAAGAAAAT
 TGAGAAAATAAGGCCTCTTCTAATAGATGGCACAGCATCACTGAGTCTGGGATGATGATGGGCATGTTT
 AACATGCTAAGTACGGTCTTGGGAGTCTCGATACTGAATCTTGGACAAAAGAAATACACCAAGACAATAT
 ACTGGTGGGATGGGCTCCAATCATCCGACGATTTTGCTCTCATAGTGAATGCACCAAACCATGAGGGAAAT
 ACAAGCAGGAGTGGACAGATTCTACAGGACCTGCAAGTTAGTGGGAATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCC

TATATAAATAAGACAGGGACATTTGAATTCACAAGCTTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCTAATTTTA
GCATGGAGCTACCCAGCTTTGGAGTGTCTGGAGTAAATGAATCAGCTGACATGAGTATTGGAGTAACAGT
GATAAAGAACAACATGATAAACAATGACCTTGGACCTGCAACGGCCCAGATGGCTCTTCAATTGTTTCATC
AAAGACTACAGATACACATATAGGTGCCATAGGGGAGACACACAAATTCAGACGAGAAGATCATTGAGT
TAAAGAAGCTGTGGGATCAAACCCAATCAAAAAGTAGGGCTATTAGTATCAGATGGAGGACCAAACCTATA
CAATATACGGAATCTTCACATTCCTGAAGTCTGCTTAAAAATGGGAGCTAATGGATGATGATTATCGGGGA
AGACTTTGTAATCCCCTGAATCCCTTTGTCAGTCATAAAGAGATTGATTCTGTAAACAATGCTGTGGTAA
TGCCAGCCCATGGTCCAGCCAAAAGCATGGAATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCCTGGATTCCCAA
GAGGAATCGTTCTATTCTCAACACAAGCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGC
TGCAATCTATTGAGAAATTTTTCCCTAGCAGTTCATATAGGAGACCGGTTGGAATTTCTAGCATGGTGG
AGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGGATTGATGCCAGGGTCTGACTTCGAGTCTGGACGGATCAAGAAAGAAGA
GTTCTCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAACTCAGACGGCAAAAATAATGAATTTAACTT
GTCCTTCATGAAAAAATGCCTTGTTTTCTACT

SEQ ID NO: 5 (вирус гриппа А (А/California/04/2009(H1N1)), ген полимеразы PA
(PA) сегмента 3; FJ966081.1 вирус гриппа А (А/California/04/2009(H1N1)), ген полимеразы
PA (PA) сегмента 3, полная кодирующая последовательность)

ATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATCGTCGAGCTTGCGGAAAAGGCAATGAAAGAAT
ATGGGGAAGATCCGAAAATCGAAACTAACAAGTTTGCTGCAATATGCACACATTTGGAAGTTTGTTCAT
GTATTCGGATTTCCATTTTCATCGACGAACGGGGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGTGACCCGAATGCA
CTATTGAAGCACCGATTTGAGATAATTGAAGGAAGAGACCGAATCATGGCCTGGACAGTGGTGAACAGTA
TATGTAACACAACAGGGGTAGAGAAGCCTAAATTTCTTCCCTGATTTGTATGATTACAAAGAGAACCGGTT
CATTGAAATTGGAGTAACACGGAGGGAAGTCCACATATATTACCTAGAGAAAGCCAACAAAATAAAATCT
GAGAAGACACACATTCACATCTTTTCATTCACTGGAGAGGAGATGGCCACCAAAGCGGACTACACCCTTG
ACGAAGAGAGCAGGGCAAGAATCAAACTAGGCTTTTCACTATAAGACAAGAAATGGCCAGTAGGAGTCT
ATGGGATTCCTTTTCGTCAAGTCCGAAAGAGGCGAAGAGACAATTGAAGAAAAATTTGAGATTACAGGAACT
ATGCGCAAGCTTGCCGACCAAAGTCTCCCACCGAACTTCCCCAGCCTTGAAAACCTTAGAGCCTATGTAG
ATGGATTCGAGCCGAACGGCTGCATTGAGGGCAAGCTTTCCCAAATGTCAAAGAAGTGAACGCCAAAAT
TGAACCATTCCTTGAGGACGACACCACGCCCTCAGATTGCCTGATGGGCCTCTTTGCCATCAGCGGTCA
AAGTTCCTGCTGATGGATGCTCTGAAATTAAGTATTGAAGACCCGAGTACGAGGGGGAGGGAATACCAC
TATATGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTCCTTTGGCTGGAAAGAGCCTAACATAGTCAAACCACATGA
GAAAGGCATAAATCCCAATTACCTCATGGCTTGGAAAGCAGGTGCTAGCAGAGCTACAGGACATTGAAAAT
GAAGAGAAGATCCCAAGGACAAAGAACATGAAGAGAACAAGCCAATTGAAGTGGGCACTCGGTGAAAATA
TGGCACCAGAAAAAGTAGACTTTGATGACTGCAAAGATGTTGGAGACCTTAAACAGTATGACAGTGATGA
GCCAGAGCCCAGATCTCTAGCAAGCTGGGTCCAAAATGAATTCATAAGGCATGTGAATTGACTGATTCA
AGCTGGATAGAACTTGATGAAAATAGGAGAAGATGTTGCCCCGATTGAACATATCGCAAGCATGAGGAGGA
ACTATTTTACAGCAGAAGTGTCCCACTGCAGGGCTACTGAATACATAATGAAGGGAGTGTACATAAATAC
GGCCTTGCTCAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAGCTGATCCCAATGATAAGCAAATGTAGG
ACCAAAGAAGGAAGACGGAAAACAACCTGTATGGGTTCAATATAAAGGAAGGTCTCATTTGAGAAATG

ATACTGATGTGGTGAACCTTTGTAAGTATGGAGTTCTCACTCACTGACCCGAGACTGGAGCCACACAAATG
 GGAAAAATACTGTGTTCTTGAAATAGGAGACATGCTCTTGAGGACTGCGATAGGCCAAGTGTGAGGCC
 ATGTTCCCTATATGTGAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAAATGGGGCATGGAAATGAGGCGCT
 GCCTTCTTCAGTCTCTTCAGCAGATTGAGAGCATGATTGAGGCCGAGTCTTCTGTCAAAGAGAAAACAT
 GACCAAGGAATCTTTGAAAACAAATCGGAAACATGGCCAATCGGAGAGTCACCCAGGGGAGTGGAGGAA
 GGCTCTATTGGGAAAGTGTGCAGGACCTTACTGGCAAAATCTGTATTCAACAGTCTATATGCGTCTCCAC
 AACTTGAGGGGTTTTCGGCTGAATCTAGAAAATTGCTTCTCATTGTTTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGA
 ACCTGGAACCTTCGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATCGAGGAGTGCCTGATTAATGATCCCTGGGTT
 TTGCTTAATGCATCTTGGTTCAACTCCTTCCTCACACATGCACTGAAGTAG

SEQ ID NO: 6 (вирус гриппа А (A/California/04/2009(H1N1)), ген нуклеокапсидного
 белка (NP) сегмента 5; FJ966083.1 вирус гриппа А (A/California/04/2009(H1N1)), ген
 нуклеокапсидного белка (NP) сегмента 5, полная кодирующая последовательность)

ATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCATATGAACAAATGGAGACTGGTGGGGAGCGCCAGGATGCCACAG
 AAATCAGAGCATCTGTGCGAAGAATGATTGGTGGAAATCGGGAGATTCTACATCCAAATGTGCACTGAACT
 CAAACTCAGTGATTATGATGGACGACTAATCCAGAATAGCATAACAATAGAGAGGATGGTGCTTTCTGCT
 TTTGATGAGAGAAGAAATAAATACCTAGAAGAGCATCCAGTGCTGGGAAGGACCCTAAGAAAACAGGAG
 GACCCATATATAGAAGAGTAGACGGAAAGTGGATGAGAGAACTCATCCTTTATGACAAAAGAAGAAATAAG
 GAGAGTTTTGGCGCCAAGCAAACAATGGCGAAGATGCAACAGCAGGTCTTACTCATATCATGATTTGGCAT
 TCCAACCTGAATGATGCCACATATCAGAGAACAAGAGCGCTTGTTGCGACCGGAATGGATCCCAGAATGT
 GCTCTCTAATGCAAGGTTCAACACTTCCCAGAAGGTCTGGTGCCGAGGTGCTGCGGTGAAAGGAGTTGG
 AACAAATAGCAATGGAGTTAATCAGAATGATCAAACGTGGAATCAATGACCGAAATTTCTGGAGGGGTGAA
 AATGGACGAAGGACAAGGGTTGCTTATGAAAAGAAATGTGCAATATCCTCAAAGGAAAATTTCAAACAGCTG
 CCCAGAGGGCAATGATGGATCAAGTAAGAGAAAAGTCGAAAACCCAGGAAAACGCTGAGATTGAAGACCTCAT
 TTTCCCTGGCACGGTCAGCACTCATCTGAGGGGATCAGTTGCACATAAAATCCTGCCTGCCTGCTTGTGTG
 TATGGGCTTGCAAGTAGCAAGTGGGCATGACTTTGAAAGGGAAGGGTACTCACTGGTGGGATAGACCCAT
 TCAAATTACTCCAAAACAGCCAAGTGGTCAGCCTGATGAGACCAAATGAAAACCCAGCTCACAAGAGTCA
 ATTGGTGTGGATGGCATGCCACTCTGCTGCATTTGAAGATTTAAGAGTATCAAGTTTCATAAGAGGAAAG
 AAAGTGATTCCAAGAGGAAAGCTTTCCACAAGAGGGGTCCAGATTGCTTCAAATGAGAATGTGGAAACCA
 TGGACTCCAATACCCTGGAACCTGAGAAGCAGATACTGGGCCATAAGGACCAGGAGTGGAGGAAATACCAA
 TCAACAAAAGGCATCCGCAGGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTTCTCAGTGCAGCGGAATCTCCCTTTT
 GAAAGAGCAACCGTTATGGCAGCATTTCAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATGCCAACAGAAG
 TTATAAGAATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAAGATTTGTCTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTC
 GGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCTTTGACATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGA
 GACAATGCAGAGGAGTATGACAGTTGA

SEQ ID NO: 7 (вирус гриппа А (A/California/04/2009(H1N1)), гены матриксного
 белка 2 (M2) и матриксного белка 1 (M1) сегмента 7; FJ969513.1 вирус гриппа А
 (A/California/04/2009(H1N1)), гены матриксного белка 2 (M2) и матриксного белка 1 (M1)
 сегмента 7, полная кодирующая последовательность)

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCCTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGA
 TCGCGCAGAGACTGGAAGTGTCTTTGCAGGAAAGAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAA
 GACAAGACCAATCTTGTACCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGT
 GAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCGAACAACATGG
 ATAGAGCAGTTAAACTATACAAGAAGCTCAAAAAGAGAAATAACGTTCCATGGGGCCAAGGAGGTGTCACT
 AAGCTATTCAACTGGTGCACCTGCCAGTTGCATGGGCCCTCATATACAACAGGATGGGAACAGTGACCACA
 GAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAACAGATTTGCTGATTCACAGCATCGGTCTCACAGAC
 AGATGGCTACTACCACCAATCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAAATGGTGTGGCTAGCACTACGGCAA
 GGCTATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGGTTGCTAATCAGACTAGG
 CAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGACCTTC
 TTGAAAATTTGCAGGCCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCA
 TTGCAGCAAATATCATTTGGGATCTTGCACCTGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTTCAAATGTAT
 TTATCGTCGCTTTAAATACGGTTTGAAGAGGGCCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAA
 GAATATCAACAGGAACAGCAGAGTGTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTAGAGT
 AA

SEQ ID NO: 8 (вирус гриппа А (A/New Caledonia/20/1999(H1N1)), ген HA сегмента
 4; CY031336.1 вирус гриппа А (A/New Caledonia/20/1999(H1N1)), последовательность
 сегмента 4)

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAAACAACCAAAATGAAAGCAAACTACTGGTCTGTATGTACATTTAC
 AGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGACACAGTA
 CTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGTCACAATGGAAAACATATGTC
 TACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGA
 ATGCGAATTAAGTATTTCCAAGGAATCATGGTCTACATTTGTAGAAAACACCAAACTCCTGAGAATGGAACA
 TGTTACCCAGGGTATTTCCGCCACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGA
 GATTCGAAATATTTCCCAAAGAAAGCTCATGGCCACCCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTC
 CCATAATGGGAAAAGCAGTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAAC
 CTGAGCAAGTCTATGTAAACAACAAGAGAAAGAAGTCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCTA
 ACATAGGGGACCAAAGGGCCCTCATCATAACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAG
 CAGAAGATTCACCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTACTAC
 TGGACTCTGCTGGAACCTGGGATACAATAATATTTGAGGCAAAATGGAATCTAATAGCGCCATGGTATG
 CTTTTGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAAATGCACCAATGGATGAATGTGATGC
 GAAGTGTCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCAGAATGTACACCCAGTCACAATA
 GGAGAGTGTCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCA
 TTCAATCCAGAGGTTTGTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTTGAAGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGG
 GTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAGTACACAAAAT
 GCCATTAACGGGATTACAACAAGGTGAATTTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGG
 GCAAAGAATTCACAAAATTTGGAAAGAAGGATGGAAAACCTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGA

CATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCC
 AATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAATGCCAAAGAAATAGGAAACGGGT
 GTTTTGAATTCTATCACAAGTGTAACAATGAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATGGAAC TTATGACTATCC
 AAAATATTCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTTGATGGAGTGAAATTTGGAATCAATGGGAGTC
 TATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCA
 GCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCTGAGACCAGAATTTTCAGAAATAT
 AAGAAAAAACACCCTTGTTTCTACT

SEQ ID NO: 9 (вирус гриппа А (A/New Caledonia/20/1999(H1N1)), ген NA сегмента
 6; CY033624.1 вирус гриппа А (A/New Caledonia/20/1999(H1N1)), сегмент 6, полная
 последовательность)

AATGAATCCAAATCAAAAAATAATAACCATTTGGATCAATCAGTATAGCAATCGGAATAATTAGTCTAATG
 TTGCAAATAGGAAATATTTCAATATGGGCTAGTCACTCAATCCAAACTGGAAGTCAAAACCACACTG
 GAGTATGCAACCAAAGAATCATCACATATGAAAACAGCACCTGGGTGAATCACACATATGTTAATATTA
 CAACACTAATGTTGTTGCTGGAAAGGACAAAACCTTCAGTGACATTTGGCCGGCAATTCATCTCTTTGTCT
 ATCAGTGGATGGGCTATATACACAAAAGACAAACAGCATAAGAATTTGGCTCCAAAGGAGATGTTTTTGTCA
 TAAGAGAACCTTTTCATATCATGTTCTCACTTGGAAATGCAGAACCTTTTTTCTGACCCAAGGTGCTCTATT
 AAATGACAAACATTCAAATGGGACCGTTAAGGACAGAAGTCTTATAGGGCCTTAATGAGCTGTCTCTA
 GGTGAAGCTCCGTCCCATAACAATTCAAAGTTTGAATCAGTTGCATGGTCAGCAAGCGCATGCCATGATG
 GCATGGGCTGGTTAACAATCGGAATTTCTGGTCCAGACAATGGAGCTGTGGCTGTACTAAAATACAACGG
 CATAATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAAAAAGCGAATATTAAGAACACAAGAGTCTGAATGTGTCTGT
 GTGAACGGGTGATGTTTACCATAATGACCGATGGCCCGAGTAATGGGGCCGCCTCGTACAAAATCTTCA
 AGATCGAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCCAATTTTCATTATGAGGAATGTT
 CTGTTACCCAGACACTGGCACAGTGATGTGTGTATGCAGGGACAACCTGGCATGGTTCAAATCGACCTTGG
 GTGTCTTTTAATCAAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCTGCAGTGGGGTGTTCGGTGACAATCCGC
 GTCCCAAAGATGGAGAGGGCAGCTGTAATCCAGTGACTGTTGATGGAGCAGACGGAGTAAAGGGGTTTC
 ATACAAATATGGTAATGGTGTTTGGATAGGAAGGACTAAAAGTAACAGACTTAGAAAGGGGTTTGAGATG
 ATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGATACCGACAGTGATTTCTCAGTGAAACAGGATGTTGTGGCAATAA
 CTGATTGGTCAGGGTACAGCGGAAGTTTCGTTCAACATCCTGAGTTAACAGGATTGGACTGTATAAGACC
 TTGCTTCTGGGTTGAGTTAGTCAGAGGACTGCCTAGAGAAAATACAACAATCTGGACTAGTGGGAGCAGC
 ATTTCTTTTTGTGGCGTAAATAGTGATACTGCAAACCTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCGTTCA
 CCATTGACAAGTAG

SEQ ID No: от 3 до 9 доступны в базе данных UNIPROT.

Настоящее изобретение раскрывает следующие предпочтительные варианты
 осуществления:

1. Вирусоподобные частицы гриппа (ВПЧ), содержащие:

- гемагглютининовый (НА) белок и нейраминидазный (НА) белок на поверхности

ВПЧ,

- нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс,
где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере одного из PB1, PB2 и NS2.

2. ВПЧ по варианту осуществления 1, дополнительно содержащие рибонуклеопротеиновый комплекс матричного белка (М).

3. ВПЧ согласно варианту осуществления 1 или 2, где белок НА выбран из группы белков НА сезонного, непандемического гриппа.

4. ВПЧ по любому из вариантов осуществления 1-3, где белок НА выбран из группы белков НА сезонного, непандемического гриппа.

5. ВПЧ по любому из вариантов осуществления 1-4, дополнительно включающие генетически модифицированный М-рибонуклеопротеиновый комплекс, предпочтительно содержащий вирусную РНК, кодирующую антиген патогена, не являющегося вирусом гриппа, онкогена или белка злокачественной ткани, в частности, где М-рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую гибридный белок, содержащий белок М, и белок или фрагмент антигенного белка патогена, не являющегося вирусом гриппа.

6. ВПЧ согласно варианту осуществления 5, в которых, в частности, патоген, не являющийся вирусом гриппа, выбран из вируса, отличного от вируса гриппа, грамположительной или грамотрицательной бактерии, грибка, простейшего или приона, предпочтительно не являющегося вирусом гриппа РНК-вируса, ДНК-вируса или ретровируса, особенно где вирус представляет собой вирус SARS-COV-1, SARS-COV-2 или вирус Денге.

7. ВПЧ по любому из вариантов осуществления 1-6, содержащие:

- белок НА и белок NA на поверхности ВПЧ,

- NP рибонуклеопротеиновый комплекс, и, предпочтительно, М-рибонуклеопротеиновый комплекс,

где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере двух из PB1, PB2, NS1 и NS2; предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере трех из PB1, PB2, NS1 и NS2; еще более предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса NS1; особо предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса PB1, PB2, NS1 и NS2.

8. ВПЧ по любому из вариантов осуществления 1-7, запускающие воспалительную гибель клеток (некроптоз) при проникновении в клетку.

9. Вакцина, содержащая ВПЧ по любому из вариантов осуществления 1-8 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

10. Вакцина по варианту осуществления 9, представляющая собой интраназальную вакцину, предпочтительно аэрозоль или назальный спрей.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая ВПЧ по любому из вариантов осуществления 1-8.

12. Способ получения ВПЧ по любому из вариантов осуществления 1-8, включающий стадии:

- обеспечение однонаправленных векторов для НА, NA, PA, PB1 и PB2;
- обеспечение двунаправленного вектора для NP;
- обеспечение либо однонаправленного, либо двунаправленного вектора для М;
- экспрессия векторов в рекомбинантной клеточной системе для получения ВПЧ в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8.

13. Способ по варианту осуществления 12, дополнительно включающий стадии упаковки ВПЧ в конечный контейнер и получения из ВПЧ фармацевтической композиции, готовой к применению для введения человеческим индивидуумам.

14. Способ по варианту осуществления 12 или 13, где векторы экспрессируют в клетках Мадин-Дарби почки собаки (MDCK), клетках почки африканской зеленой марышки (Vero), клетках 293, клетках 293Т, клетках почки свиньи (PK), клетках почек трехполосных дурукули (OMK), клетках Мадин-Дарби почки быка (MDBK), клетках почки куриного эмбриона (CEK), фибробластах куриного эмбриона, первичных клетках куриной почки или клетках, выделенных из хориоаллантоисной мембраны куриных яиц с эмбрионом, предпочтительно в клетках MDCK или клетках Vero, особенно в клетках MDCK.

15. ВПЧ по любому из вариантов осуществления 1-8 для медицинского применения, предпочтительно для профилактики заболеваний, вызываемых патогенами, особенно для профилактики гриппа.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина, содержащая вирусоподобные частицы (ВПЧ) гриппа и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где ВПЧ включают:

- гемагглютининовый (HA) белок и нейраминидазный (NA) белок на поверхности ВПЧ,

- нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс,

где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере одного из PB1, PB2 и NS2.

2. Вакцина по п.1, где ВПЧ дополнительно содержат рибонуклеопротеиновый комплекс матричного белка (M).

3. Вакцина по п.1 или п.2, где белок HA выбран из группы белков HA сезонного, непандемического гриппа.

4. Вакцина по любому из пп.1-3, где белок NA выбран из группы белков NA сезонного, непандемического гриппа.

5. Вакцина по любому из пп.1-4, где ВПЧ дополнительно содержат генетически модифицированный М-рибонуклеопротеиновый комплекс, предпочтительно включающий вирусную РНК, кодирующую антиген патогена, не являющегося вирусом гриппа, онкоген или белок злокачественной ткани, в частности, где М-рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую гибридный белок, содержащий белок М и белок или фрагмент антигенного белка патогена, не являющегося вирусом гриппа.

6. Вакцина по п.5, где патоген, не являющийся вирусом гриппа, выбран из вируса, отличного от гриппа, грамположительной или грамотрицательной бактерии, грибка, простейшего организма или приона, предпочтительно негриппозного РНК-вируса, ДНК-вируса или ретровируса, особенно где вирус представляет собой вирус SARS-COV-1, SARS-COV-2 или вирус Денге.

7. Вакцина по любому из пп.1-6, где ВПЧ содержат:

- белок HA и белок NA на поверхности ВПЧ,

- NP рибонуклеопротеиновый комплекс и, предпочтительно, М рибонуклеопротеиновый комплекс,

где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере двух из PB1, PB2, NS1 и NS2; предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере трех из PB1, PB2, NS1 и NS2; еще более предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса NS1; особо предпочтительно, где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса PB1, PB2, NS1 и NS2.

8. Вакцина по любому из пп.1-7, запускающая воспалительную гибель клеток (некроптоз) при проникновении ВПЧ в клетку.

9. Вакцина по любому из пп.1-8, представляющая собой интраназальную вакцину, предпочтительно аэрозоль или назальный спрей.

10. Вирусоподобные частицы гриппа (ВПЧ), содержащие:

- гемагглютининовый (НА) белок и нейраминидазный (НА) белок на поверхности ВПЧ,

- нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс,

- рибонуклеопротеиновый комплекс матричного белка (М),

где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере из одного из PB1, PB2 и NS.

11. ВПЧ по п.10, дополнительно содержащие генетически модифицированный М-рибонуклеопротеиновый комплекс, предпочтительно включающий вирусную РНК, кодирующую антиген патогена, не являющегося вирусом гриппа, онкоген или белок злокачественной ткани, в частности, где М-рибонуклеопротеиновый комплекс включает вирусную РНК, кодирующую гибридный белок, содержащий белок М и белок или фрагмент антигенного белка патогена, не являющегося вирусом гриппа.

12. ВПЧ по п.11, где патоген, не являющийся вирусом гриппа, выбран из вируса, отличного от вируса гриппа, грамположительной или грамотрицательной бактерии, грибка, простейшего организма или приона, предпочтительно РНК-вируса, не являющегося вирусом гриппа, ДНК-вируса или ретровируса, особенно где вирус представляет собой вирус SARS-COV-1, SARS-COV-2 или вирус Денге.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая вакцину по любому из пп.1-9 или ВПЧ по любому из пп.10-12.

14. Способ получения вакцины по любому из пп.1-9 или ВПЧ по любому из пп.10-12, включающий стадии:

- обеспечение однонаправленных векторов для НА, NA, PA, PB1 и PB2;

- обеспечение двунаправленного вектора для NP;

- обеспечение либо однонаправленного, либо двунаправленного вектора для М;

- экспрессию векторов в рекомбинантной клеточной системе для получения ВПЧ по любому из пп.10-12 и/или ВПЧ, определенные в любом из пп.1-9.

15. Способ по п.14, дополнительно включающий стадии упаковки ВПЧ в конечный контейнер и приготовления из ВПЧ фармацевтической композиции, готовой к применению для введения человеческим индивидуумам.

16. Способ по п.14 или п.15, где векторы экспрессируют в клетках Мадин-Дарби

почки собаки (MDCK), клетках почки африканской зеленой мартышки (Vero), клетках 293, клетках 293Т, клетках почки свиньи (PK), клетках почки трехполосного дурукули (OMK), клетках Мадин-Дарби почки быка (MDBK), клетках почки куриного эмбриона (CEK), фибробластах куриного эмбриона, первичных клетках куриной почки или клетках, выделенных из хориоаллантаической мембраны куриного эмбриона, предпочтительно в клетках MDCK или клетках Vero, особенно в клетках MDCK.

17. ВПЧ, определенные в любом из пп.1-10 для медицинского применения, предпочтительно для профилактики заболеваний, вызванных патогенами, особенно для профилактики гриппа.

ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ.34 РСТ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина, содержащая РНК-экспрессирующие вирусоподобные частицы (РНК-ВПЧ) гриппа и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где РНК-ВПЧ включают:

- гемагглютининовый (НА) белок нейраминидазный (NA) белок на поверхности ВПЧ,

- нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс,

где ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса PB1, PB2 и NS2;

где РНК-ВПЧ дополнительно содержат рибонуклеопротеиновый комплекс матричного белка (M); и

где отсутствует генетическая информация для РНК-зависимых РНК-полимераз.

2. Вакцина по п.1, где белок НА выбран из группы белков НА сезонного, непандемического гриппа.

3. Вакцина по любому из п.1 или п.2, где белок NA выбран из группы белков NA сезонного, непандемического гриппа.

4. Вакцина по любому из п.п.1-3, где РНК-ВПЧ дополнительно содержат генетически модифицированный М-рибонуклеопротеиновый комплекс.

5. Вакцина по любому из п.п.1-4, где М-рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую антиген патогена, не являющегося вирусом гриппа, онкоген или белок злокачественной ткани, в частности, где М-рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую гибридный белок, включающий белок М, и белок или фрагмент антигенного белка патогена, не являющегося вирусом гриппа.

6. Вакцина по п.5, где патоген, не являющийся вирусом гриппа, выбран из вируса, отличного от вируса гриппа, грамположительной или грамотрицательной бактерии, грибка, простейшего организма или приона, предпочтительно негриппозного РНК-вируса, ДНК-вируса или ретровируса, особенно где вирус представляет собой вирус SARS-COV-1, SARS-COV-2 или вирус Денге.

7. Вакцина по любому из п.п.1-6, где РНК-ВПЧ содержат:

- белок НА и белок NA на поверхности РНК-ВПЧ,

- NP-рибонуклеопротеиновый комплекс и М-рибонуклеопротеиновый комплекс,

где РНК-ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса из PB1, PB2, NS1 и NS2.

8. Вакцина по любому из п.п.1-7, запускающая воспалительную гибель клеток (некроптоз) при проникновении ВПЧ в клетку.

9. Вакцина по любому из пп.1-8, представляющая собой интраназальную вакцину, предпочтительно аэрозоль или назальный спрей.

10. Вирусоподобные частицы гриппа (РНК-ВПЧ), содержащие:

- гемагглютининовый (НА) белок и нейраминидазный (НА) белок на поверхности РНК-ВПЧ,

- нуклеопротеидный (NP) рибонуклеопротеиновый комплекс,

- рибонуклеопротеиновый комплекс матричного белка (М),

где РНК-ВПЧ не содержат рибонуклеопротеинового комплекса по меньшей мере из одного PB1, PB2 и NS; и

где отсутствует генетическая информация для РНК-зависимых РНК-полимераз.

11. РНК-ВПЧ по п.10, дополнительно содержащие генетически модифицированный М-рибонуклеопротеиновый комплекс, предпочтительно, где М-рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую антиген патогена, не являющегося вирусом гриппа, онкоген или белок злокачественной ткани, в частности, где М-рибонуклеопротеиновый комплекс содержит вирусную РНК, кодирующую гибридный белок, включающий белок М, и белок или фрагмент антигенного белка патогена, не являющегося вирусом гриппа.

12. РНК-ВПЧ по п.11, где патоген, не являющийся вирусом гриппа, выбран из вируса, отличного от вируса гриппа, грамположительной или грамотрицательной бактерии, грибка, простейшего организма или приона, предпочтительно РНК-вируса, не являющегося вирусом гриппа, ДНК-вируса или ретровируса, особенно где вирус представляет собой вирус SARS-COV-1, SARS-COV-2 или вирус Денге.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая вакцину по любому из пп.1-9 или РНК-ВПЧ по любому из пп.10-12.

14. Способ получения вакцины по любому из пп.1-9 или РНК-ВПЧ по любому из пп.10-12, включающий стадии:

- обеспечение однонаправленных векторов для НА, NA, PA, PB1 и PB2;

- обеспечение двунаправленного вектора для NP,

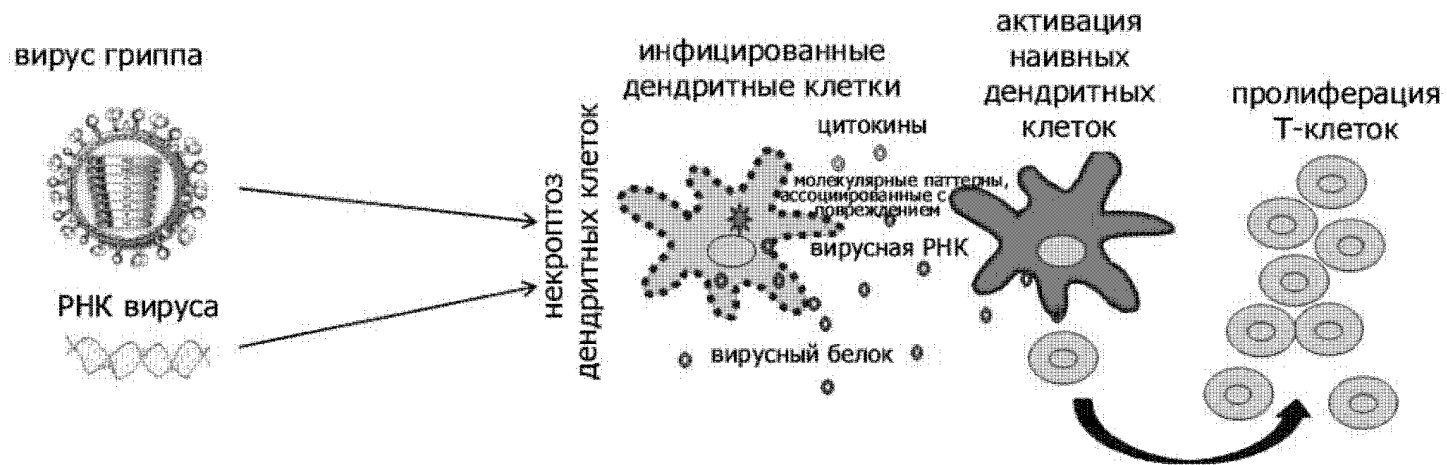
- обеспечение двунаправленного вектора для М,

- экспрессию векторов в рекомбинантной клеточной системе для получения РНК-ВПЧ по любому из пп.10-12 и/или РНК-ВПЧ, определенные в любом из пп.1-9.

15. Способ по п.14, дополнительно включающий стадии упаковки РНК-ВПЧ в конечный контейнер и приготовления из РНК-ВПЧ фармацевтической композиции, готовой к применению для введения человеческим индивидуумам.

16. Способ по п.14 или п.15, где векторы экспрессируют в клетках Мадин-Дарби почки собаки (MDCK), клетках почки африканской зеленой мартышки (Vero), клетках 293, клетках 293T, клетках почки свиньи (PK), клетках почки трехполосного дурукули (OMK), клетках Мадин-Дарби почки быка (MDBK), клетках почки куриного эмбриона (CEK), фибробластах куриного эмбриона, первичных клетках куриной почки или клетках, выделенных из хориоаллантаической мембраны куриного эмбриона, предпочтительно в клетках MDCK или клетках Vero, особенно в клетках MDCK.

17. РНК-ВПЧ, определенные в любом из пп.1-10, для медицинского применения, предпочтительно для профилактики заболеваний, вызванных патогенами, наиболее предпочтительно для профилактики гриппа.

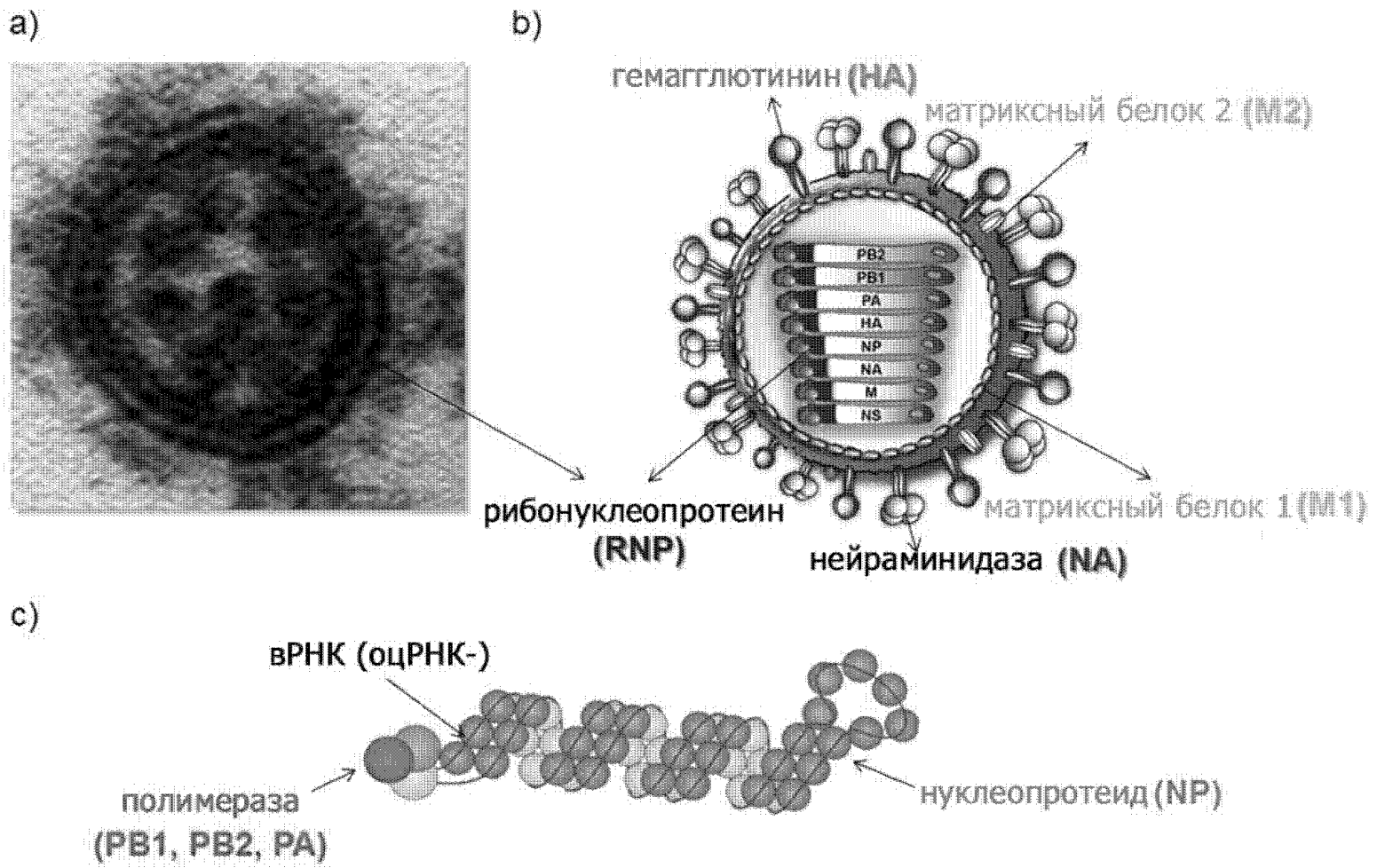


Фиг. 1

1/11

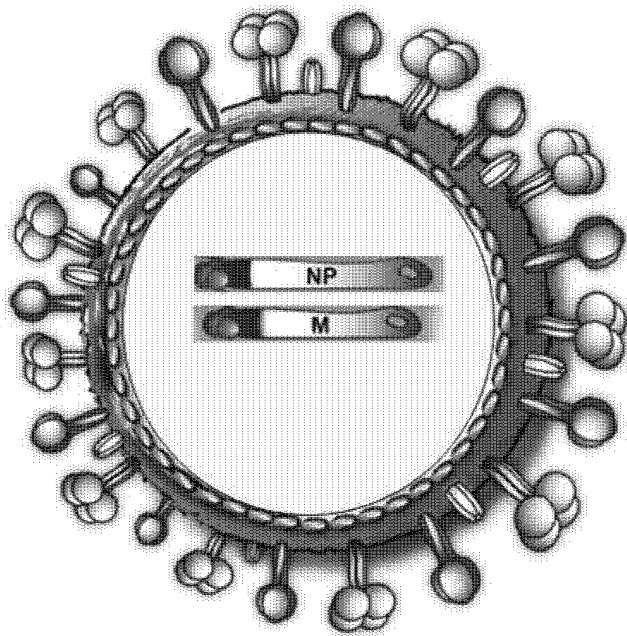


Фиг. 5



2/11

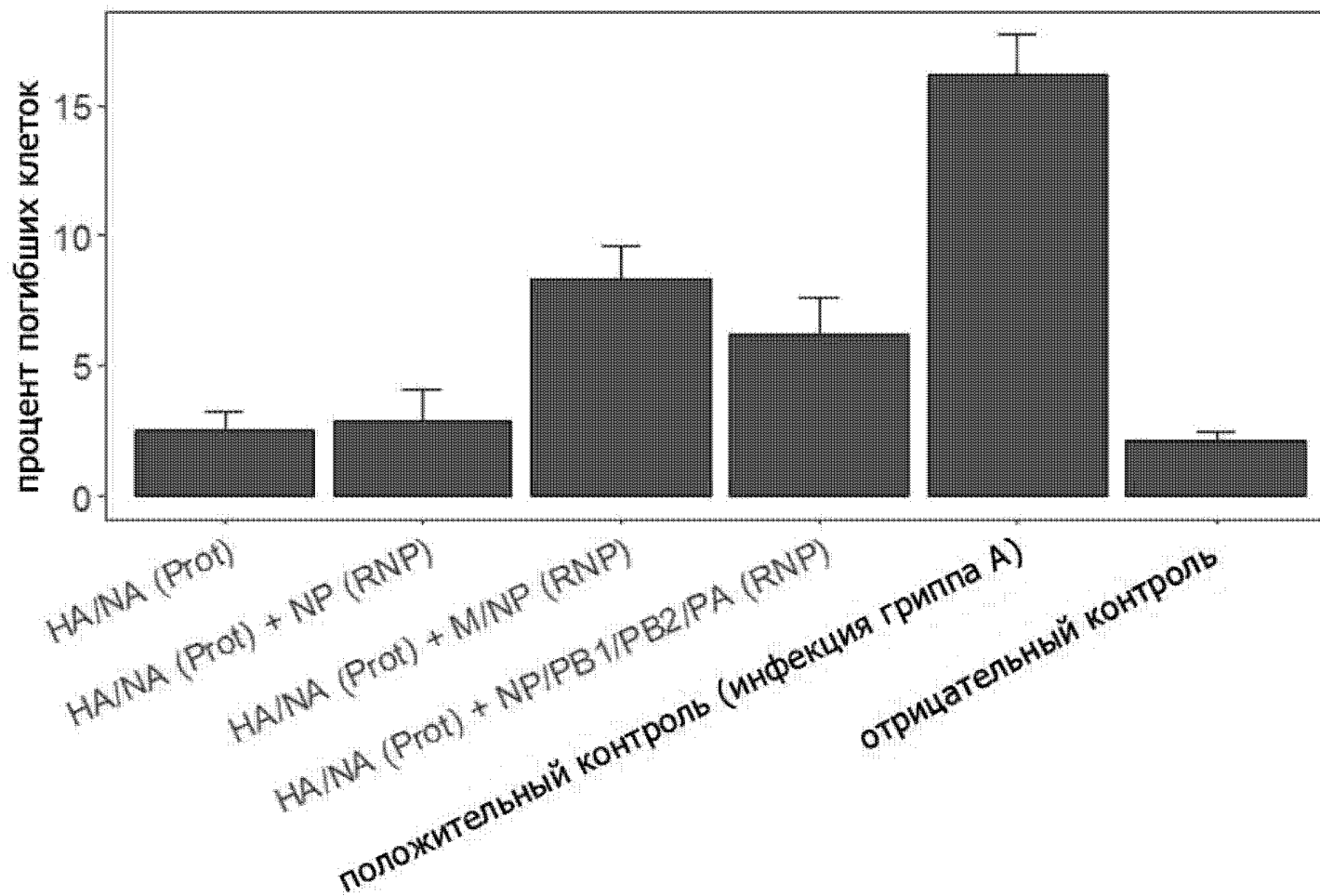
Фиг. 2



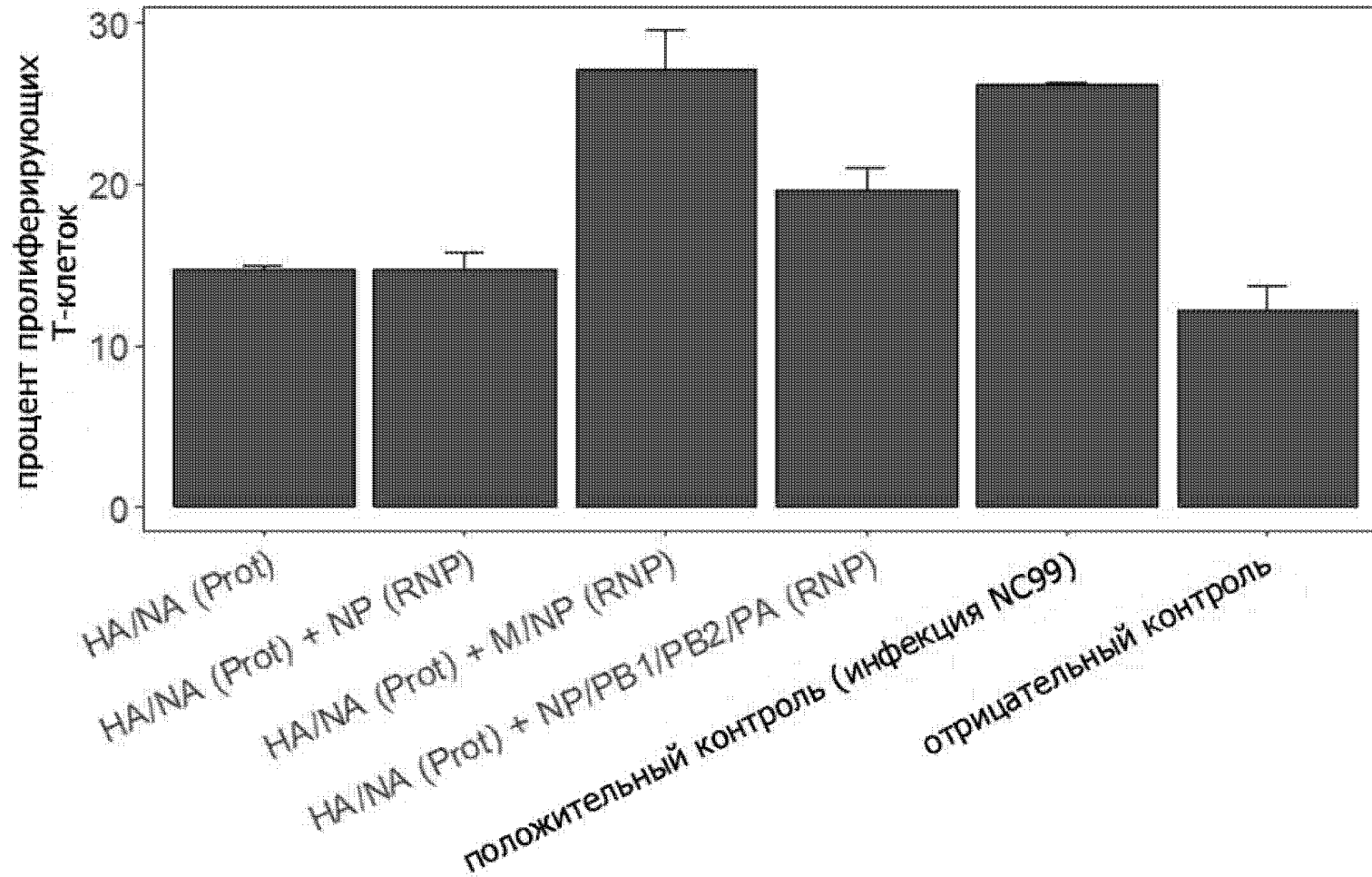
• плазмиды

- HA (однонаправленная - только белок)
- NA (однонаправленная)
- PA (однонаправленная)
- PB1 (однонаправленная)
- PB2 (однонаправленная)
- NP (двунаправленная - вРНК и белок)
- М (двунаправленная)

Фиг. 3



Фиг. 4



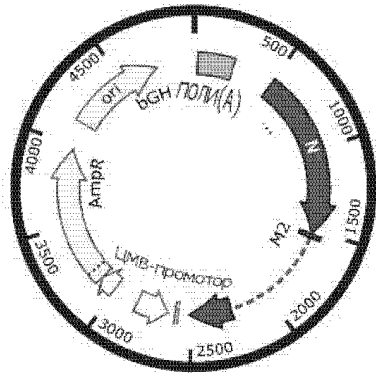
Фиг. 6

		вакцинация		
		РНК-ВПЧ	классическая вакцина	контрольный раствор
заражение	H1N1 IAV	5 животных	5 животных	5 животных
	контрольный раствор	5 животных	5 животных	5 животных

Фиг. 7

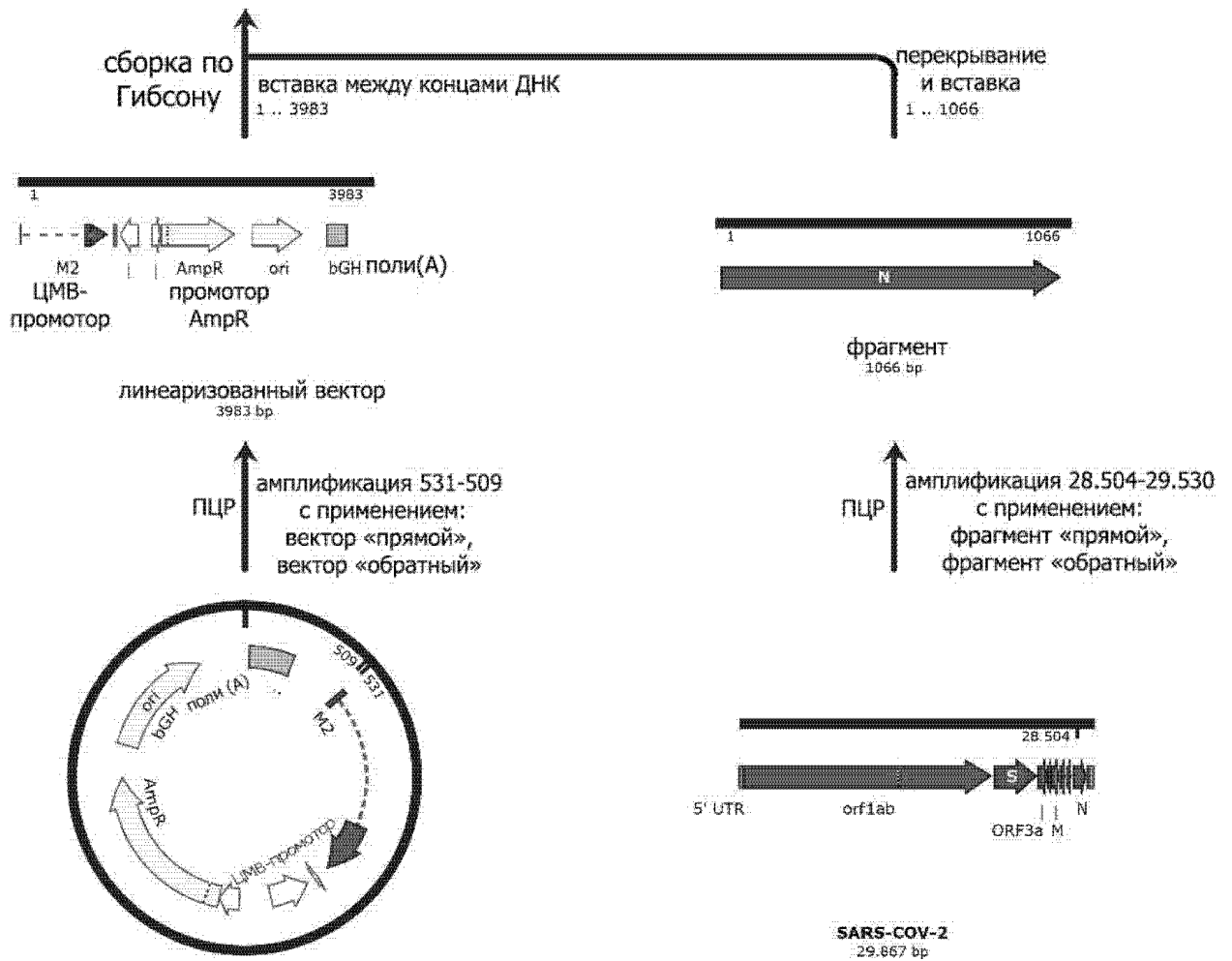
		вакцинация	
		РНК-ВПЧ	контрольный раствор
заражение	IAV	5 животных	5 животных
	PRCv	5 животных	5 животных
	IAV & PRCv	5 животных	5 животных
	контрольный раствор	5 животных	5 животных

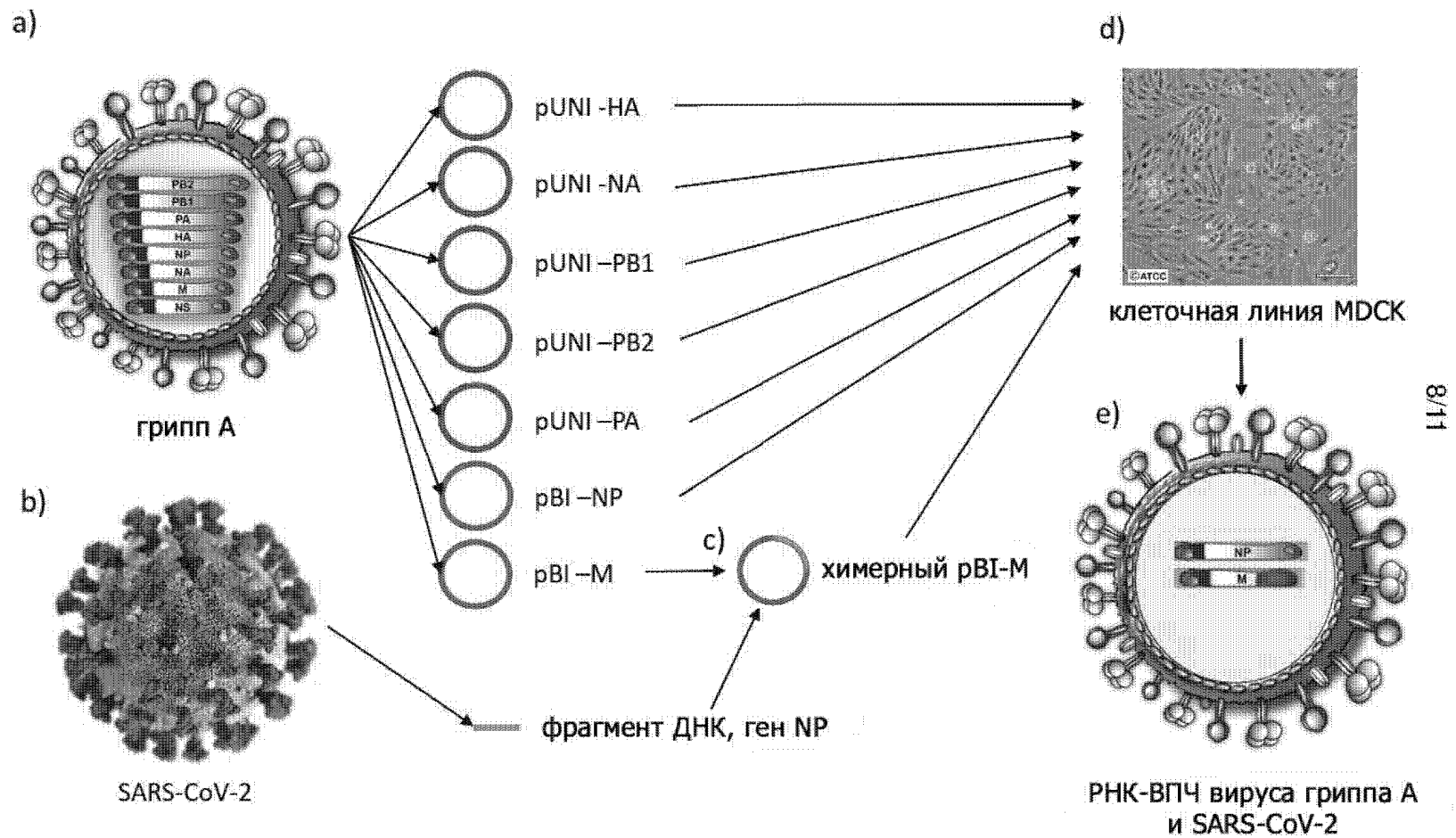
Фиг. 8



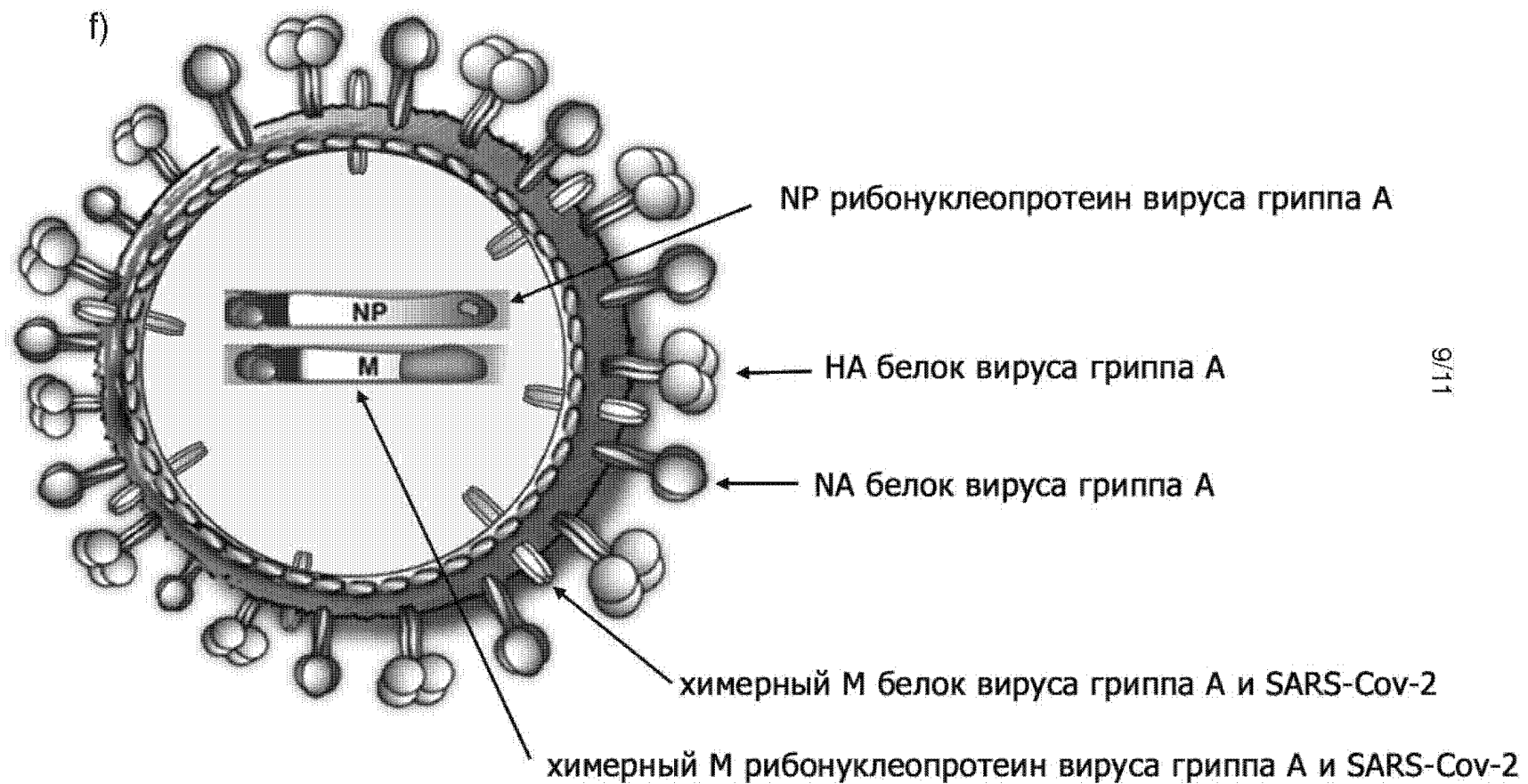
pHW IAV-M SARS-CoV2-M
4969 bp

ФИГ. 9





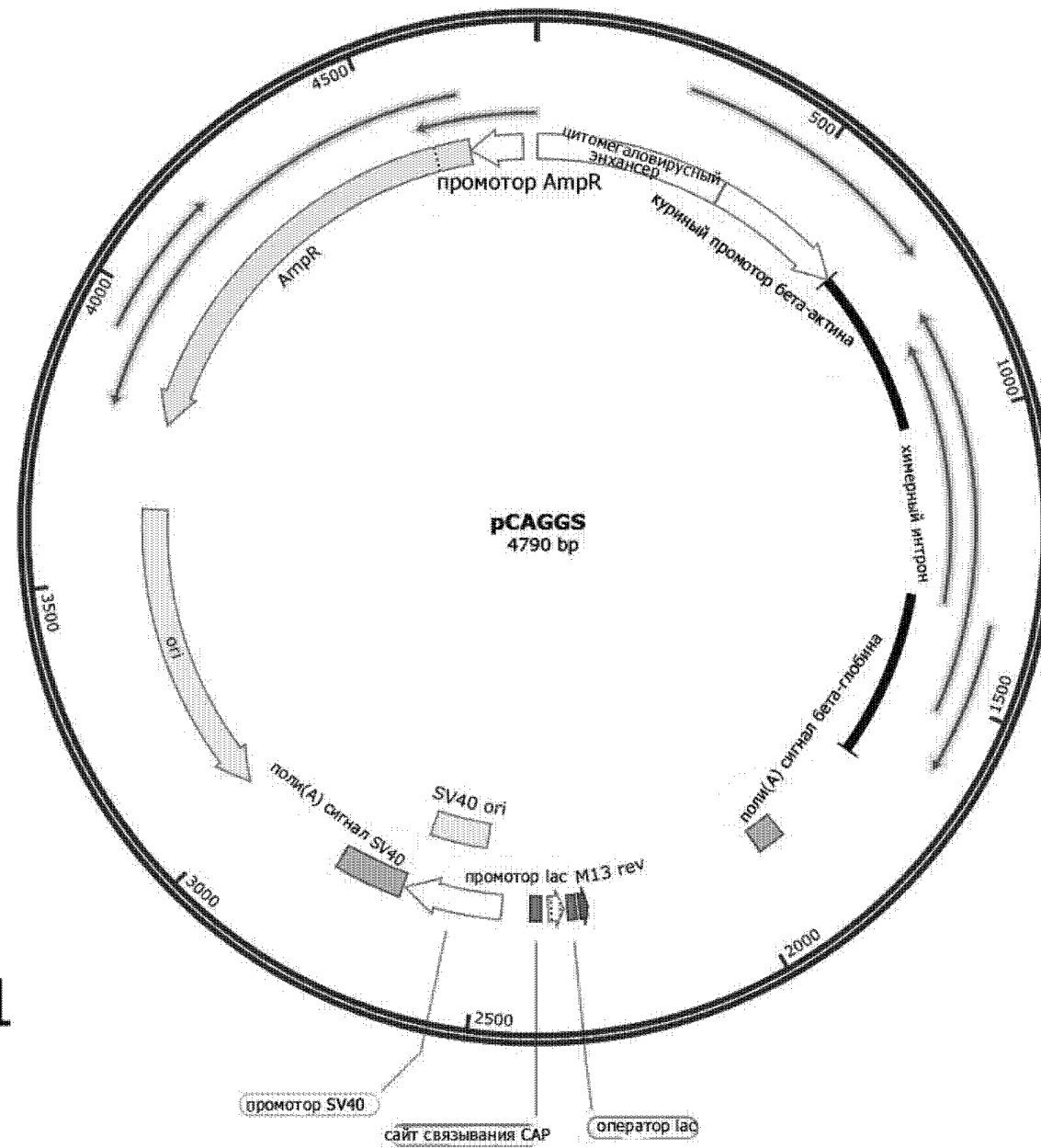
Фиг. 10



9/11

Фиг. 10 (Продолжение)

Фиг. 11



ФИГ. 12

