



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011137404/10, 03.02.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
03.02.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
12.02.2009 US 61/152,094

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2013 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 20.12.2014 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: WO 03075955 A1, 18.09.2003. US  
4752473 A1, 21.06.1988. RU 2315101 C2,  
20.01.2008(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 12.09.2011(86) Заявка РСТ:  
US 2010/022970 (03.02.2010)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2010/093537 (19.08.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ДЗИН Хонг (US),  
ЧЭН Син (US),  
СУББАРАО Канта (US)

(73) Патентообладатель(и):

МЕДИММЬОН, ЭлЭлСи (US),  
ДЗЕ ГАВЕРНМЕНТ ОФ ДЗЕ ЮНАЙТЕД  
СТЕЙТС ОФ АМЕРИКА НЭШНЛ  
ИНСТИТЮТС ОФ ХЕЛТ (US)

## (54) ВАРИАНТЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА И НЕЙРАМИНИДАЗЫ ГРИППА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и вирусологии. Описан реассортантный вирус гриппа. Вирус гриппа содержит 6 внутренних геномных сегментов от одного или нескольких вирусов-доноров и геномные сегменты, которые кодируют НА полипептид и NA полипептид. При этом, НА

полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. Описаны также иммуногенная композиция и вакцины, содержащие такой вирус, а также его применение для получения лекарственного средства. Изобретение может быть использовано в медицине. 7 н. и 9 з.п. ф-лы, 4 ил., 3 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 535 970** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

*C12N* 7/00 (2006.01)

*A61K* 39/145 (2006.01)

*A61P* 31/16 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011137404/10, 03.02.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**03.02.2010**

Priority:

(30) Convention priority:  
**12.02.2009 US 61/152,094**

(43) Application published: **20.03.2013** Bull. № 8

(45) Date of publication: **20.12.2014** Bull. № 35

(85) Commencement of national phase: **12.09.2011**

(86) PCT application:  
**US 2010/022970 (03.02.2010)**

(87) PCT publication:  
**WO 2010/093537 (19.08.2010)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**DZIN Khong (US),  
ChEhN Sin (US),  
SUBBARAO Kanta (US)**

(73) Proprietor(s):

**MEDIMM'JuN, EhLEhSi (US),  
DZE GAVERNMENT OF DZE JuNAJTED  
STEJTS OF AMERIKA NEhShNL INSTIT'JuTS  
OF KhELT (US)**

(54) **INFLUENZA HAEMAGGLUTININ AND NEURAMINIDASE VARIANTS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology and virology. An influenza virus contains 6 internal genome segments of one or more virus donors and genome segments coding an NA polypeptide, and the NA polypeptide. The NA polypeptide comprises the amino acid sequence SEQ ID NO:6. There are also

described immunogenic composition and vaccine containing the above virus, as well as using it for preparing a therapeutic agent. The invention can be used in medicine.

EFFECT: what is described is an influenza reassortant virus.

16 cl, 4 dwg, 3 tbl

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вакцины против различных и эволюционирующих штаммов гриппа важны с точки зрения здоровья общества, а также имеют коммерческое значение, поскольку каждый год происходит инфицирование многих индивидуумов различными штаммами и типами вируса гриппа. Дети, пожилые люди, те, кто лишен адекватной медицинской помощи, и люди с нарушенным иммунитетом подвергаются особому риску смерти от таких инфекций. Осложнение проблемы инфекций гриппа состоит в том, что новые штаммы гриппа быстро эволюционируют и могут распространяться среди различных видов, тем самым вызывая необходимость непрерывного получения новых вакцин.

Многочисленные вакцины, способные вызывать защитный иммунный ответ, специфичный к таким другим вирусам/штаммам вирусов и к вирусам/штаммам вируса гриппа, получали в течение более 50 лет и они содержали цельновирусные вакцины, вакцины из расщепленных вирусов, вакцины из поверхностных антигенов и живые аттенуированные вирусные вакцины. Однако, несмотря на то что соответствующие составы вакцин любого из этих типов способны вызывать системный иммунный ответ, живые аттенуированные вирусные вакцины обладают преимуществом в виде дополнительной способности стимулировать местный иммунитет слизистых дыхательных путей. Значительная работа по получению вирусов гриппа и их фрагментов для получения вакцин проделана авторами настоящего изобретения и коллегами; см., например, заявки США №№ 60/420708, которая подана 23 октября 2002 года; 60/574117, которая подана 24 мая 2004 года; 10/423828, которая подана 25 апреля 2003 года; 60/578962, которая подана 12 июня 2004 года; и 10/870690, которая подана 16 июня 2004 года, описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылки.

По причине постоянного возникновения (или повторного возникновения) различных штаммов гриппа, постоянно нужны новые противогриппозные вакцины. Такие вакцины обычно создают с использованием антигенных фрагментов вновь возникающих штаммов вируса, таким образом, крайне желательны полипептиды и полинуклеотиды новых, вновь возникающих или вновь повторно возникающих штаммов вируса (в частности, последовательности антигенных генов).

Настоящее изобретение относится к новым и/или вновь выделенным вариантам гемагглютинина и нейраминидазы гриппа, которые допускают использование в получении вакцин многочисленных типов, а также в исследованиях, диагностике и т.д. Другие многочисленные преимущества станут ясны после рассмотрения приведенного ниже.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе в некоторых аспектах изобретение содержит выделенный или рекомбинантный полипептид, который выбран из: полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую любой из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатками 89-1063 SEQ ID NO:1, остатками 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатками 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатками 1063-1728 SEQ ID NO:5; полипептида, содержащего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6; полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую открытой рамкой считывания любой из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5; любой альтернативной (например, зрелой формы без сигнального пептида или полипептида, который представлен на поверхности вируса (например, гриппа)) формы полипептида, содержащего аминокислотную

последовательность любой из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6; любого полипептида, который кодируется полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости по существу по всей длине полинуклеотида, состоящего

5 из нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5; любого полипептида, который кодируется полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с полинуклеотидом, состоящим из нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ

10 ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5; и фрагмента любого указанного выше, где последовательность содержит полипептид гемагглютинаина или нейраминидазы или фрагмент полипептида гемагглютинаина или нейраминидазы. В

15 одном из вариантов осуществления такие полипептидные фрагменты образуют антитело, которое специфически связывает полноразмерный полипептид по изобретению. В различных вариантах осуществления выделенные или рекомбинантные полипептиды по изобретению по существу идентичны приблизительно 300 последовательным аминокислотным остаткам любого из указанных выше полипептидов. В других

20 вариантах осуществления изобретение содержит выделенные или рекомбинантные полипептиды, которые содержат аминокислотную последовательность, которая по существу идентична по меньшей мере приблизительно 350 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 400 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 450 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 500 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 520 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 550

25 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 559 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 565 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 566 аминокислотам, последовательно расположенным в любом из указанных выше полипептидов. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность (например, которая перечислена в «ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ»

30 в настоящем документе) содержит менее чем 565, 559 и т.д. аминокислот. В таких вариантах осуществления более короткие перечисленные полипептиды необязательно содержат менее чем 565, 559 и т.д. аминокислот. В других вариантах осуществления полипептиды по изобретению (например, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ

35 ID NO:6) необязательно содержат слитые белки, белки с лидерной последовательностью, полипептид-предшественник, белки с сигналом секреции или сигналом локализации или белки с эпитопными метками, меткой «E-tag» или гистидиновой (His) эпитопной меткой. В других вариантах осуществления данное изобретение относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей

40 мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 98,5%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,2%, по меньшей мере 99,4%, по меньшей мере 99,6%, по меньшей мере 99,8% или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательностей с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-

45 340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6. В другом варианте осуществления полипептид по изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от любого из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков

16-340 SEQ ID NO:6 или остатков 341-562 SEQ ID NO:6 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислотных остатков. Последовательности гемагглютинаина по изобретению могут содержать эти последовательности как с немодифицированными, так и с модифицированными многоосновными сайтами расщепления (тем самым делая возможным рост вирусов в яйцах). Полипептидные последовательности гемагглютинаина SEQ ID NO:2 и 6 содержат эндогенные аминоконцевые сигнальные пептидные последовательности, однако полипептидные последовательности гемагглютинаина по изобретению также содержат зрелую (с отщепленным аминоконцевым сигнальным пептидом) форму полипептидов гемагглютинаина. Сайты расщепления любой полипептидной последовательности гемагглютинаина любого штамма гриппа можно обычным способом определить или предсказать, используя любое число способов из данной области.

В других аспектах изобретение относится к композиции с одним или несколькими перечисленными выше полипептидами или их фрагментами. Изобретение также включает полипептиды, которые специфически связывают поликлональные антисыворотки, индуцированные против по меньшей мере 1 антигена, который содержит по меньшей мере одну описанную выше аминокислотную последовательность или ее фрагмент. Такие антитела со специфичностью к описанным выше полипептидам также являются признаками изобретения. В одном из вариантов осуществления полипептиды по изобретению являются иммуногенными.

Изобретение также относится к иммуногенным композициям, содержащим иммунологически эффективное количество одного или нескольких любых описанных выше полипептидов (например, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ ID NO:6), а также к способам стимуляции иммунной системы индивидуума для получения защитного иммунного ответа против вируса гриппа посредством введения индивидууму иммунологически эффективного количества любого из указанных выше полипептидов в физиологически приемлемом носителе.

Дополнительно изобретение относится к реассортантному вирусу гриппа, который содержит один или несколько указанных выше полипептидов или полинуклеотидов в дополнение к иммуногенным композициям, содержащим иммунологически эффективное количество такого реассортантного вируса гриппа. Способы стимуляции иммунной системы индивидуума для получения защитного иммунного ответа против вируса гриппа посредством введения иммунологически эффективного количества такого реассортантного вируса гриппа в физиологически приемлемом носителе также являются частью изобретения.

В других аспектах изобретение содержит выделенный или рекомбинантный полинуклеотид, который выбран из: полинуклеотида, содержащего любую из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5 или комплементарных им последовательностей, полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6, или его комплементарных им нуклеотидных последовательностей, полинуклеотида, который гибридизуется в условиях высокой жесткости по существу по всей длине любого из описанных выше полинуклеотидов, и полинуклеотида, содержащего всю или фрагмент любой из таких нуклеотидных последовательностей, где последовательность кодирует

полипептид гемагглютинаина или нейраминидазы или фрагмент полипептида гемагглютинаина или нейраминидазы. Изобретение также включает выделенный или рекомбинантный полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность, которая по существу идентична по меньшей мере приблизительно 300 аминокислотам любого полипептида, кодируемого указанными выше полинуклеотидами, или по меньшей мере приблизительно 350 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 400 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 450 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 500 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 502 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 550 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 559 аминокислотам; по меньшей мере приблизительно 565 аминокислотам; или по меньшей мере приблизительно 566 аминокислотам любого полипептида, кодируемого указанными выше полинуклеотидами. Кроме того, в ситуациях, где аминокислота имеет длину менее чем, например, 566, 565, 559 и т.д. (например, см. «ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ»), следует понимать, что длина необязательно составляет менее чем 566, 565, 559 и т.д. Изобретение также включает любой из указанных выше полинуклеотидов, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид гемагглютинаина или нейраминидазы или один или несколько фрагментов одного или нескольких полипептидов гемагглютинаина или нейраминидазы. Другие аспекты по изобретению включают выделенные или рекомбинантные полинуклеотиды, которые кодируют полипептид (например, полипептид гемагглютинаина или нейраминидазы), последовательность которого обладает по меньшей мере 98% идентичностью, по меньшей мере 98,5% идентичностью, по меньшей мере 99% идентичностью, по меньшей мере 99,2% идентичностью, по меньшей мере 99,4% идентичностью, по меньшей мере 99,6% идентичностью, по меньшей мере 99,8% идентичностью или по меньшей мере 99,9% идентичностью с по меньшей мере одним из описанных выше полипептидов. Изобретение также содержит выделенные или рекомбинантные полинуклеотиды, которые кодируют полипептид гемагглютинаина или нейраминидазы, полученный посредством созревания или рекомбинации одного или нескольких описанных выше полинуклеотидов. В одном из вариантов осуществления полинуклеотид по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько, например, из лидерной последовательности, последовательности предшественника или последовательности эпитопной метки или подобную, и необязательно может кодировать слитый белок.

В других вариантах осуществления изобретение относится к композиции веществ, которая содержит два или более описанных выше полинуклеотидов (например, библиотеку, содержащую по меньшей мере приблизительно 2, 5, 10, 50 или более полинуклеотидов). Такие композиции необязательно можно получать расщеплением одного или нескольких описанных выше полинуклеотидов (например, механически, химически, ферментативно рестрикционной эндонуклеазой/РНКазой/ДНКазой и т.д.). Другие композиции по изобретению включают, например, композиции, полученные инкубированием одного или нескольких описанных выше полинуклеотидов в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и термостабильной полинуклеотидной полимеразы.

Изобретение также относится к клеткам, содержащим по меньшей мере один из описанных выше полинуклеотидов или его расщепленный или амплифицированный фрагмент или продукт. Такие клетки необязательно могут экспрессировать полипептид, кодируемый таким полинуклеотидом. Другие варианты осуществления изобретения

включают векторы (например, плазмиды, космиды, фаги, вирусы, вирусные фрагменты и т.д.), которые содержат любой из описанных выше полинуклеотидов. Такие векторы необязательно могут включать вектор экспрессии. Предпочтительные векторы экспрессии по изобретению включают, но без ограничения, векторы, которые содержат последовательности промоторов и терминатора pol I, или векторы, использующие как промоторы pol I, так и pol II, «систему промоторов pol I/pol II» (например, Zobel et al., Nucl. Acids Res. 1993, 21:3607; US20020164770; Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:9345; Fodor et al., J. Virol. 1999, 73:9679; и US20030035814). Клетки, трансдуцированные такими векторами, также входят в настоящее изобретение.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к вирусу (например, к вирусу гриппа), содержащему один или несколько описанных выше полинуклеотидов (например, кодирующих гемагглютинин и/или нейраминидазу) или один или несколько их фрагментов. Иммуногенные композиции, содержащие такой вирус, также являются частью настоящего изобретения. Такие вирусы могут включать реассортантный вирус, такой как реассортантный вирус 6:2 (например, содержащий 6 внутренних геномных сегментов из одного или нескольких вирусов-доноров и 2 геномных сегмента (например, геномные сегменты HA или NA), содержащие один или несколько описанных выше полинуклеотидов (или один или несколько их фрагментов)). В одном из вариантов осуществления геномный сегмент может кодировать полипептид гемагглютинина и/или нейраминидазы по изобретению. В одном из вариантов осуществления реассортантные вирусы по изобретению представляют собой живые вирусы. В другом варианте осуществления реассортантный вирус по изобретению представляет собой чувствительный к температуре (*ts*), адаптированный к холоду (*ca*) или аттенуированный (*att*) вирус. В одном из вариантов осуществления реассортантный вирус по изобретению содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или 6 внутренних геномных сегментов вируса-донора (например, A/Ann Arbor/6/60, PR8 и т.д.). В другом варианте осуществления реассортантный вирус по изобретению содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или 6 внутренних геномных сегментов вируса-донора, отличного от A/Ann Arbor/6/60. Один предпочтительный вариант осуществления изобретения представляет собой реассортантный вирус гриппа, где вирус представляет собой реассортантный вирус гриппа 6:2 и содержит 6 внутренних геномных сегментов из A/Ann Arbor/6/60 и 2 геномных сегмента, которые кодируют полипептид, выбранный из группы, состоящей из: полипептидов SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6. В альтернативном варианте осуществления реассортантный вирус гриппа по изобретению содержит реассортантный вирус гриппа 6:2, где указанный вирус содержит 6 внутренних геномных сегментов из одного или нескольких вирусов-доноров, отличных от A/Ann Arbor/6/60, и 2 геномных сегмента, которые кодируют полипептид, выбранный из группы, состоящей из: полипептидов SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6. В другом альтернативном варианте осуществления реассортантный вирус гриппа по изобретению включает реассортантный вирус гриппа 6:2, где указанный вирус содержит 6 внутренних геномных сегментов из одного или нескольких вирусов-доноров, отличных от A/Ann Arbor/6/60, и 2 геномных сегмента, где 2 геномных сегмента кодируют полипептиды HA и/или NA из любого пандемического штамма гриппа. Способы получения реассортантного вируса гриппа путем культивирования клетки-

хозяина, содержащей вирус гриппа, в подходящей среде для культивирования в условиях, обеспечивающих репликацию реассортантного вируса гриппа, и выделения реассортантного вируса гриппа из одной или нескольких клеток-хозяев или из среды также являются частью изобретения.

5 В других вариантах осуществления в настоящем документе изобретение включает иммуногенные композиции, которые содержат иммунологически эффективное количество любого из описанных выше реассортантных вирусов гриппа. Другие варианты осуществления содержат способы стимуляции иммунной системы индивидуума для получения защитного иммунного ответа против вируса гриппа посредством введения  
10 индивидууму иммунологически эффективного количества любого описанного выше реассортантного вируса гриппа (необязательно в физиологически эффективном носителе).

Другие аспекты по изобретению включают способы получения выделенного или рекомбинантного полипептида посредством культивирования любой описанной выше  
15 клетки-хозяина в подходящей среде для культивирования в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида, и выделения полипептида из одной или нескольких клеток-хозяев или из среды, в которой росли клетки.

Иммуногенные композиции также являются признаками изобретения. Например, иммуногенные композиции, содержащие один или несколько любых описанных выше  
20 полипептидов и/или полинуклеотидов и необязательно эксципиент, такой как фармацевтически приемлемый эксципиент, или один или несколько фармацевтически приемлемых компонентов введения. Иммуногенные композиции по изобретению также могут содержать любой один или несколько описанных выше вирусов (например, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми компонентами  
25 введения).

Способы получения иммуногенных реакций у субъекта посредством введения эффективного количества любого из указанных выше вирусов (или иммуногенных композиций) субъекту также входят в настоящее изобретение. Дополнительно способы профилактического или терапевтического лечения вирусной инфекции (например, вируса гриппа) у субъекта посредством введения любого одного или нескольких  
30 описанных выше вирусов (или иммуногенных композиций) в количестве, эффективном для получения иммуногенной реакции против вирусной инфекции, также являются частью настоящего изобретения. Субъекты для такого лечения включают в качестве неограничивающих примеров птиц (например, домашних птиц) и млекопитающих  
35 (например, людей). Такие способы также могут включать введение субъекту *in vivo*, а также введение в одну или несколько клеток субъекта *in vitro* или *ex vivo*. Дополнительно такие способы также могут включать введение композиции вируса и фармацевтически приемлемого эксципиента, которые вводят субъекту в количестве, эффективном для профилактического или терапевтического лечения вирусной инфекции.

40 В других аспектах изобретение включает композиции веществ, содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептиды гемагглютинина и/или нейраминидазы одного или нескольких пандемических штаммов гриппа, и нуклеотидные последовательности, которые кодируют один или несколько полипептидов из A/Ann Arbor/6/60. Дополнительно изобретение включает композиции веществ,  
45 содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептиды гемагглютинина и/или нейраминидазы одного или нескольких пандемических штаммов гриппа, и нуклеотидные последовательности, которые кодируют один или несколько полипептидов из PR8, A/LENINGRAD/17 или A/Ann Arbor/6/60. Такие последовательности



могут содержать те, что перечислены в «ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ» в настоящем документе. Дополнительно предпочтительные варианты осуществления изобретения включают композиции веществ, содержащие последовательности, которые кодируют гемагглютинин и/или нейраминидазу одного или нескольких пандемических штаммов гриппа, и нуклеотидные последовательности, которые кодируют выбранный основной штамм в реассортанте 6:2. Такие композиции предпочтительно содержат последовательности, которые кодируют гемагглютинин и нейраминидазу, выбранные из «ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ» в настоящем документе и основного штамма, где основным штаммом является PR8, A/LENINGRAD/17 или A/Ann Arbor/6/60. Изобретение также включает такие композиции, как описано выше, где гемагглютинин содержит модифицированный многоосновный сайт расщепления. Изобретение также включает живую аттенуированную противогриппозную вакцину, которая содержит такие указанные выше композиции.

Эти и другие цели и признаки изобретения более полно проявятся после прочтения следующего подробного описания в сочетании с сопроводительными фигурами и приложением.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

На фиг. 1: репликация вирусов контрольного заражения H2 wt в легких хорьков, вакцинированных различными показанными вакцинными вирусами H2. Титр показывает среднее для правого и левого легких.

На фиг. 2: репликация вирусов контрольного заражения H2 wt в NT хорьков, вакцинированных различными показанными вакцинными вирусами H2.

На фиг. 3: репликация вирусов контрольного заражения H2 wt в легких мышей, вакцинированных различными показанными вакцинными вирусами H2.

На фиг. 4: репликация вирусов контрольного заражения H2 wt в NT мышей, вакцинированных различными показанными вакцинными вирусами H2.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Настоящее изобретение относится к полипептидам и полинуклеотидам гемагглютинина и нейраминидазы гриппа, а также к векторам, композициям, реассортантным вирусам гриппа и т.п., которые содержат такие полипептиды и полинуклеотиды, и к способам их использования. В настоящем документе более подробно описаны дополнительные признаки изобретения.

### **Определения**

Пока не определено иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют такое же значение, в котором их обычно понимает специалист в той области, к которой относится изобретение. Следующие определения дополняют известное в данной области и ориентированы на данную заявку и их необязательно следует приписывать к любому связанному или несвязанному случаю, например, к любому обычно допускаемому патентом или заявкой. Несмотря на то, что любые способы и вещества, схожие или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, можно использовать на практике для тестирования по настоящему изобретению, предпочтительные вещества и способы описаны в настоящем документе. Таким образом, использованная в настоящем документе терминология приведена только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Как используют в этом описании и приложенной формуле изобретения, форма единственного числа включает множественную форму обозначаемого до тех пор, пока контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, указание на «вирус» включает

множество вирусов; указание на «клетку-хозяина» включает смеси клеток-хозяев и т.п.

Термин «реассортант», когда он указывает на вирус, говорит о том, что вирус содержит генетические и/или полипептидные компоненты, полученные из более чем одного родительского вирусного штамма или источника. Например, реассортант 7:1 содержит 7 вирусных геномных сегментов (или генных сегментов) от первого вируса и один дополняющий вирусный геномный сегмент, например, кодирующий гемагглютинин или нейраминидазу по изобретению. Реассортант 6:2 содержит 6 геномных сегментов, например, 6 внутренних геномных сегментов от первого вируса и два дополняющих геномных сегмента, т.е. геномные сегменты, кодирующие гемагглютинин и нейраминидазу, от второго вируса или от второго и третьего вируса.

Термин «клетка-хозяин» обозначает клетку, которая содержит гетерологичный полинуклеотид, такой как вектор, и поддерживает репликацию и/или экспрессию полинуклеотида. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические клетки, такие как *E. coli*, или эукариотические клетки, такие как клетки дрожжей, насекомых, амфибий, птиц или млекопитающих, включая клетки человека. В одном из вариантов осуществления клетки-хозяева могут представлять собой, но без ограничения, клетки Vero (почка африканской зеленой мартышки), клетки ВНК (почка детеныша хомяка), первичные клетки почки курицы (РСК), клетки почки собаки Мадин-Дарби (MDCK), клетки почки коровы Мадин-Дарби (MDBK), клетки 293 (например, клетки 293T) и клетки COS (например, клетки COS1, COS7).

«Иммунологически эффективное количество» вируса гриппа представляет собой количество, достаточное для усиления собственного иммунного ответа индивидуума (например, человека) при последующем контакте с вирусом гриппа. Уровни индуцированного иммунитета можно отслеживать, например, посредством измерения количеств нейтрализующих секреторных и/или сывороточных антител, например, посредством нейтрализации бляшек, фиксации комплемента, иммуносорбента, меченного ферментом, или анализа микронеutralизации.

«Защитный иммунный ответ» против вируса гриппа относится к иммунному ответу, который проявляет индивидуум (например, человек), который защищает от заболевания, когда впоследствии у индивидуума происходит контакт и/или инфицирование таким вирусом гриппа. В некоторых случаях вирус гриппа (например, циркулирующий в природе) все еще может вызывать инфекцию, но не может вызывать тяжелую инфекцию. В типичном случае защитный иммунный ответ приводит к обнаружимым уровням образуемых хозяином сывороточных и секреторных антител, которые способны нейтрализовать вирус того же штамма и/или подгруппы (а также, возможно, другой не вакцинный штамм и/или подгруппу) *in vitro* и *in vivo*.

В настоящем документе «антитело» представляет собой белок, который содержит один или несколько полипептидов, по существу или частично кодируемых генами иммуноглобулинов или фрагментами генов иммуноглобулинов. Известные гены иммуноглобулинов включают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, ипсилон и мю, а также множество генов вариабельной области иммуноглобулина. Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа или ипсилон, которые в свою очередь определяют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Типичная структурная единица иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» (приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет вариабельную область приблизительно от 100 до 110 или более

аминокислот, которые несут основную ответственность за распознавание антигена. Термины «вариабельная легкая цепь» (VL) и «вариабельная тяжелая цепь» (VH) относятся к этим легким и тяжелым цепям, соответственно. Антитела существуют в виде интактных иммуноглобулинов или в виде множества хорошо описанных фрагментов, которые получают расщеплением с использованием различных пептидаз. Таким образом, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с получением F(ab)'<sub>2</sub>, димера Fab, который сам по себе представляет легкую цепь, соединенную с VH-CH1 дисульфидной связью. F(ab)'<sub>2</sub> можно разделить в мягких условиях с разрушением дисульфидной связи в шарнирной области, тем самым превращая димер (Fab)'<sub>2</sub> в мономер Fab'. По существу мономер Fab' представляет собой Fab с частью шарнирной области (более подробное описание других фрагментов антител см. в Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1999)). Несмотря на то, что различные фрагменты антител определены в отношении расщепления интактного антитела, профессионалы признают, что такие фрагменты Fab' можно синтезировать *de novo* или химически или используя способы рекомбинации ДНК. Таким образом, термин антитело, как применяют в настоящем документе, содержит антитела или фрагменты, полученные или модификацией целого антитела, или синтезированные *de novo* с использованием способов рекомбинации ДНК. Антитела содержат, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, много- или одноцепочечные антитела, включая одноцепочечные Fv (sFv или scFv) антитела, в которых вариабельная тяжелая и вариабельная легкая цепи соединены вместе (напрямую или через пептидный линкер) с образованием непрерывного полипептида, и гуманизированные или химерные антитела.

#### **Вирус гриппа**

Полипептиды и полинуклеотиды по изобретению, например, SEQ ID NO:1-8, представляют собой варианты последовательностей HA и NA гриппа. В основном, вирусы гриппа состоят из внутреннего рибонуклеопротеинового ядра, содержащего сегментированный одноцепочечный РНК геном, и внешней липопротеиновой оболочки, выложенной матриксным белком. Геном вирусов гриппа состоит из восьми геномных сегментов линейной (-) цепи рибонуклеиновой кислоты (РНК), которая кодирует иммуногенные белки гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA), и шесть внутренних полипептидов ядра: нуклеопротеин нуклеокапсида (NP); матриксные белки (M); неструктурные белки (NS); и 3 белка РНК полимераз (PA, PB1, PB2). Во время репликации происходит транскрипция геномной вирусной РНК в (+) цепь информационной РНК и (-) цепь геномной кРНК в ядре клетки-хозяина. Каждый из восьми геномных сегментов упакован в рибонуклеопротеиновые комплексы, которые в дополнение к РНК содержат NP и полимеразный комплекс (PB1, PB2 и PA).

Обычно грипп разделяют на категории грипп А и грипп В. Вирусы гриппа А и гриппа В содержат по восемь сегментов одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью. Геном гриппа А кодирует одиннадцать полипептидов. Сегменты 1-3 кодируют три полипептида, образующие РНК-зависимую РНК полимеразу. Сегмент 1 кодирует белок полимеразного комплекса PB2. Остальные белки полимераз PB1 и PA кодируют сегмент 2 и сегмент 3, соответственно. Кроме того, сегмент 1 некоторых штаммов гриппа кодирует малый белок, PB1-F2, который образуется из альтернативной рамки считывания в кодирующей PB1 области. Сегмент 4 кодирует поверхностный гликопротеин гемагглютинин (HA), который участвует в прикреплении и проникновении в клетку во время инфекции. Сегмент 5 кодирует полипептид нуклеопротеина нуклеокапсида (NP), основной структурный компонент, связанный с вирусной РНК.

Сегмент 6 кодирует оболочечный гликопротеин нейраминидазу (NA). Сегмент 7 кодирует два матричных белка, обозначенные M1 и M2, которые транслируются с дифференциально сплайсированной мРНК. Сегмент 8 кодирует NS1 и NS2, два неструктурных белка, которые транслируются с альтернативно сплайсированных вариантов мРНК. Восемь геномных сегментов гриппа В кодируют 11 белков. Три самых больших гена кодируют компоненты РНК полимеразы, PB1, PB2 и PA. Сегмент 4 кодирует белок NA. Сегмент 5 кодирует NP. Сегмент 6 кодирует белок NA и белок NB. Оба белка, NB и NA, транслируются с перекрывающихся рамок считывания двухцистронной мРНК. Сегмент 7 гриппа В также кодирует два белка: M1 и M2. Самый маленький сегмент кодирует два продукта: NS1 транслируется с полноразмерной РНК, тогда как NS2 транслируется со сплайсированного варианта мРНК.

#### **Вакцина против вируса гриппа**

Последовательности, композиции и способы в настоящем документе главным образом, но не исключительно, связаны с получением вирусов гриппа для вакцин. Исторически вакцины против вируса гриппа главным образом получали в куриных яйцах с зародышами с использованием штаммов вируса, выбранных или основанных на эмпирических предсказаниях ожидаемых штаммов. Затем получали реассортантные вирусы, которые содержат выбранные антигены гемагглютинин и/или нейраминидазу с учетом одобренного аттенуированного, чувствительного к температуре исходного штамма. После культивирования вируса посредством нескольких пассирований в куриных яйцах, вирусы гриппа выделяли и необязательно инактивировали, например, используя формальдегид и/или β-пропиолактон (или альтернативно использовали в живых аттенуированных вакцинах). Таким образом, следует принимать во внимание, что последовательности HA и NA (например, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ ID NO:6) достаточно эффективны в конструировании противогриппозных вакцин. Настоящее изобретение включает вирусы/вакцины, содержащие полипептиды HA и/или NA и полинуклеотиды из A/Japan/57 и A/swine/MO/2006 (включая те полипептиды и полинуклеотиды HA, которые содержат модифицированные многоосновные сайты расщепления, такие как модификации, описываемые в настоящем документе); и включая те вирусы/вакцины, которые содержат остов (т.е. 6 внутренних геномных сегментов), такой как остов *sa* A/AA/6/60, A/Leningrad/17 или PR8.

Попытки получения рекомбинантных и реассортантных вакцин в культуре клеток были осложнены неспособностью некоторых штаммов, одобренных для получения вакцины, к эффективному росту в стандартных условиях культивирования клеток. Однако перед работой авторы настоящего изобретения и их коллеги предоставили векторную систему и способы для получения рекомбинантных и реассортантных вирусов в культуре и, таким образом, сделали возможным быстрое получение вакцин, соответствующих одному или нескольким выбранным антигенным штаммам вируса, например, любому из штаммов А или В, различным субтипам или субштаммам и т.д., например, содержащим последовательности HA и/или NA, приведенным в настоящем документе. См., Multi-Plasmid System for the production of influenza virus, заявку США № 60/420708, которая подана 23 октября 2002 года, заявку США № 10/423828, которая подана 25 апреля 2003 года, и заявку США № 60/574117, которая подана 24 мая 2004 года. Обычно культуры поддерживают в системе, такой как инкубатор культуры клеток, под контролем влажности и CO<sub>2</sub>, при постоянной температуре с использованием регулятора температуры, такого как термостат, для того чтобы гарантировать, что температура не превысит 35°C. Реассортантные вирусы гриппа можно быстро получить

введением поднабора векторов, соответствующих геномным сегментам исходного вируса гриппа, в сочетании с дополняющими сегментами, полученными из штаммов, представляющих интерес (например, антигенные варианты HA и/или NA, приведенные в настоящем документе). Обычно исходные штаммы выбирают на основе желаемых свойств, относящихся к введению вакцины. Например, для получения вакцины, например, для получения живой аттенуированной вакцины, исходный штамм вируса-донора можно выбирать по аттенуированному фенотипу, холодовой адаптации и/или чувствительности к температуре. В одном из вариантов осуществления сходный вирус-донор содержит 6 внутренних геномных сегментов (т.е. остов), который дает одно или несколько следующих свойств: чувствительный к температуре, адаптированный к холоду или аттенуированный. Как объясняется в другой части настоящего документа и, например, в патентной заявке № 10/423828, и т.д., в различных вариантах осуществления изобретения используют штамм гриппа A/Ann Arbor (AA)/6/60 в качестве «остова», на который добавляют гены HA и/или NA (например, такие как те последовательности, которые перечислены в настоящем документе, и т.д.) для создания желаемых реассортантных вирусов. Таким образом, например, в реассортанте 6:2 2 гена (т.е. NA и HA) будут из штамма(ов) гриппа, против которого желательно получить иммуногенную реакцию, тогда как другие 6 генов будут из штамма Ann Arbor или другого основного штамма и т.д. Вирус Ann Arbor можно использовать за то, что он является адаптированным к холоду, аттенуированным, чувствительным к температуре. Конечно, следует принимать во внимание, что последовательности HA и NA, приведенные в настоящем документе, допускают получение реассортанта с использованием множества других генов вирусов или типов вирусов (например, множество различных «остовов», таких как PR8 и т.д., которые содержат другие гены гриппа, присутствующие в реассортанте, а именно гены не HA и не NA).

Различные варианты осуществления в настоящем документе могут содержать живые аттенуированные вакцины, которые содержат последовательности HA и/или NA, приведенные в настоящем документе для A/Japan/57 или A/swine/MO/2006. Такие вакцины обычно содержат, например, полипептиды HA и/или NA SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ ID NO:6 или соответствующие им кодирующие нуклеотиды SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатки 89-1063 SEQ ID NO:1, остатки 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатки 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатки 1063-1728 SEQ ID NO:5. Одна проблема, связанная с выращиванием вакцинных штаммов вируса (например, реассортантов) в яйцах, состоит в том, что определенные штаммы (которые могут участвовать в пандемии), могут убивать яйца, в которых должны образоваться вакцины, и, таким образом, сложно манипулировать, получать вакцины и т.д. с применением традиционного получения реассортантов (неплазмидная «помощь»). Такие штаммы представляют интерес в силу очевидных указаний на то, что они могут вызывать грипп у людей и возможно являются пандемическими. Таким образом, использование систем плазмидной помощи для создания/манипулирования реассортантами гриппа с использованием штаммов вируса s (например, последовательности HA и NA, приведенные в настоящем документе) является довольно желательным и представляет собой признаки изобретения. Однако следует принимать во внимание, что текущие последовательности также можно использовать с неплазмидными или традиционными системами.

В различных вариантах осуществления в настоящем документе антигенные последовательности (например, полипептиды HA и/или NA), а также вирусы и вакцины из таких вирусов содержат модифицированные многоосновные сайты расщепления.

Некоторые высоко патогенные штаммы гриппа содержат многоосновные аминокислотные сайты расщепления внутри последовательностей гемагглютинина. См., например, Li et al., J. of Infectious Diseases, 179:1132-8, 1999. Такие сайты расщепления в типичных вариантах осуществления в настоящем документе представляют собой, например, сайты с модифицированными или измененными последовательностями по сравнению с последовательностями дикого типа, из которых получены текущие последовательности, (например, для того, чтобы в них сделать невозможным расщепление или уменьшить расщепление и т.д.). Такие модификации/изменения могут различаться в различных штаммах вследствие различных последовательностей сайтов расщепления в последовательностях дикого типа. Например, 4 многоосновных остатка (аргинин-аргинин-лизин-лизин) в положениях 326-329 зрелого H5 обычно удаляют из последовательностей, приведенных в настоящем документе (по сравнению с wt). В различных вариантах осуществления многоосновные сайты расщепления можно модифицировать множеством способов (все они входят в изобретение). Например, из многоосновного сайта расщепления можно удалить одну аминокислоту за раз (например, удалить один аргинин, удалить два аргинина, удалить два аргинина и лизин или удалить два аргинина и два лизина). Дополнительно также можно удалить или изменить аминокислотный остаток, расположенный непосредственно выше против хода транскрипции сайта расщепления (например, от R до T и т.д.); также нуклеотиды, кодирующие аминокислотный остаток непосредственно после сайта расщепления, также можно модифицировать. Кроме того, полипептидные последовательности гемагглютинина вируса гриппа содержат аминоконцевые сигнальные пептидные последовательности, таким образом, полипептидные последовательности гемагглютинина по изобретению включают как зрелую (с отщепленным аминоконцевым сигнальным пептидом) форму полипептидов гемагглютинина, так и форму гемагглютинина до расщепления. Сайты расщепления различных полипептидных последовательностей гемагглютинина любого штамма гриппа можно определить обычным способом или предсказать с использованием любого числа способов, известных в данной области.

Термины «чувствительный к температуре», «адаптированный к холоду» и «аттенуированный», как применяют к вирусам (обычно используемым в качестве вакцин или для получения вакцин), которые необязательно содержат текущие последовательности, хорошо известны в данной области. Например, термин «чувствительный к температуре» (*ts*) указывает, например, на то, что вирус показывает уменьшение титра при 39°C по сравнению 33°C в 100 раз или более для штаммов гриппа А, или что вирус показывает уменьшение титра при 37°C по сравнению 33°C в 100 раз или более для штаммов гриппа В. Термин «адаптированный к холоду» (*ca*) указывает на то, что вирус показывает рост при 25°C в пределах 100 крат относительно его роста при 33°C, тогда как термин «аттенуированный» (*att*) указывает на то, что вирус реплицируется в верхних дыхательных путях хорьков, но его не обнаруживают в тканях их легких и он не вызывает гриппоподобного заболевания у животного. Следует понимать, что вирусы с промежуточными фенотипами, т.е. вирусы, показывающие уменьшение титра менее чем в 100 раз при 39°C (для вирусов штамма А) или при 37°C (для вирусов штамма В) или показывающие рост при 25°C, который составляет более 100 крат относительно его роста при 33°C (например, в пределах менее 200 крат, 500 крат, 1000 крат, 10000 крат) и/или показывающие сниженный рост в легких относительно роста в верхних дыхательных путях хорьков (т.е. частично аттенуированные) и/или менее выраженное гриппоподобное заболевание у животного, представляют собой

вирусы, которые также эффективны и которые можно использовать в сочетании с последовательностями HA и NA в настоящем документе.

Кроме того, последовательности HA и NA по настоящему изобретению необязательно используют в реассортантных вакцинах или в их получении (и/или в других *ts*, *cs*, *sa* и/или *att* вирусах и вакцинах). Однако следует отметить, что последовательности HA и NA и т.д. по изобретению не ограничены конкретными вакцинными композициями или способами получения и, таким образом, могут быть использованы в вакцине по существу любого типа или любом способе получения вакцины, в которых используют штаммоспецифические антигены HA и NA (например, любые из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6 или соответствующие нуклеотиды, кодирующие конкретные антигены HA и NA, например, SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатки 89-1063 SEQ ID NO:1, остатки 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатки 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатки 1063-1728 SEQ ID NO:5).

#### FluMist™

Как указано ранее, существуют многочисленные примеры и типы противогриппозной вакцины. Примером противогриппозной вакцины является FluMist™, которая представляет собой живую, аттенуированную вакцину, которая защищает детей и взрослых от заболевания гриппом (Belshe et al. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N Engl J Med 338:1405-12; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282:137-44). Способы и композиции по настоящему изобретению можно адаптировать к/использовать для получения вакцины FluMist™. Однако специалисты в данной области должны принимать во внимание, что последовательности, способы, композиции и т.д., приведенные в настоящем документе, также можно адаптировать к получению схожих или даже других вирусных вакцин.

Вакцинные штаммы FluMist™ содержат, например, генные сегменты HA и NA, полученные из штаммов (например, из штаммов дикого типа), на которые направлена вакцина, вместе с шестью генными сегментами, PB1, PB2, PA, NP, M и NS, из обычного исходного вируса-донор (ИВД). Таким образом, приведенные в настоящем документе последовательности HA могут быть частью различных составов FluMist™. ИВД для штаммов гриппа A FluMist™ (ИВД-А) создан посредством нескольких пассирований штамма A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) дикого типа в первичной культуре ткани почки курицы при последовательно снижающихся температурах (Maassab (1967) Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C Nature 213:612-4). ИВД-А эффективно реплицируется при 25°C (*sa*, адаптированный к холоду), но его рост ограничен при 38 и 39°C (*ts*, чувствительный к температуре). Дополнительно этот вирус не реплицируется в легких инфицированных хорьков (*att*, аттенуирование). Полагают, что фенотип *ts* вносит вклад в аттенуирование вакцины у людей посредством ограничения ее репликации во всех, кроме самых холодных областей дыхательных путей. Стабильность этого свойства демонстрировали на животных моделях и в клинических исследованиях. В отличие от фенотипа *ts* штаммов гриппа, созданных посредством химического мутагенеза, свойство *ts* у ИВД-А не возвращается к исходному состоянию после пассирования в инфицированных хомячках или в изолятах культуральной жидкости от детей (см. последний обзор Murphy & Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines Viral Immunol 15:295-323).

Клинические исследования среди более чем 20000 взрослых и детей, включающие 12

отдельных штаммов реассортантов 6:2, показали, что эти вакцины являются аттенуированными, безопасными и эффективными (Belshe et al. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N Engl J Med 338:1405-12; Boyce et al. (2000) Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults Vaccine 19:217-26; Edwards et al. (1994) A randomized controlled trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease J Infect Dis 169:68-76; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282:137-44). Реассортанты, несущие шесть внутренних генов ИВД-А и два генных сегмента НА и NA вируса дикого типа (т.е., реассортанты 6:2), постоянно поддерживают фенотипы *ca*, *ts* и *att* (Maassab et al. (1982) Evaluation of a cold- recombinant influenza virus vaccine in ferrets J. Infect. Dis. 146:780-900).

Получение такого реассортантного вируса с использованием штаммов гриппа В является более сложным, однако в недавней работе (см., например, Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus, заявку США № 60/420708, которая подана 23 октября 2002 года, заявку США № 10/423828, которая подана 25 апреля 2003 года, и заявку США № 60/574117, которая подана 24 мая 2004 года) описана система восьми плазмид для генерации вируса гриппа В полностью из клонированной кДНК. Также описаны способы получения аттенуированного живого вируса гриппа А и В, подходящего для вакцинных составов, таких как живые вирусные вакцинные составы, которые можно использовать для интраназального введения.

Система и способы, описанные ранее, можно использовать для быстрого получения в культуре клеток рекомбинантных и реассортантных вирусов гриппа А и В, включая вирусы, пригодные для использования в качестве вакцин, включая живые аттенуированные вакцины, такие как вакцины, подходящие для интраназального введения. Последовательности (например, нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатки 89-1063 SEQ ID NO:1, остатки 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатки 88-1062 SEQ ID NO:5 или остатки 1063-1728 SEQ ID NO:5 и соответствующие аминокислоты, кодируемые нуклеотидными последовательностями в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 или остатки 341-562 SEQ ID NO:6), способы и т.д. по настоящему изобретению необязательно используют в сочетании с такой предыдущей работой, включающей, например, реассортантные вирусы гриппа для получения вакцины для получения вирусов для вакцин.

Способы и композиции для профилактического введения вакцин

Как указано выше, альтернативно или в дополнение к использованию в получении вакцины FluMist™, настоящее изобретение можно использовать в других вакцинных составах. В основном, рекомбинантные и реассортантные вирусы по изобретению (например, содержащие полинуклеотиды SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатки 89-1063 SEQ ID NO:1, остатки 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатки 88-1062 SEQ ID NO:5 или остатки 1063-1728 SEQ ID NO:5 или полипептиды SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 или остатки 341-562 SEQ ID NO:6 или их фрагменты) можно вводить профилактически в иммунологически эффективном количестве и в соответствующем носителе или эксципиенте для стимуляции иммунного ответа, специфичного к одному или нескольким штаммам вируса гриппа, как определено последовательностями НА и/или NA.

В типичном случае носитель или эксципиент представляет собой фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, такой как стерильная вода, водный



физиологический раствор, водные буферные физиологические растворы, водные растворы декстрозы, водные растворы глицерина, этанол или их сочетания. Получение таких растворов, гарантирующих стерильность, pH, изотоничность и стабильность, осуществляют согласно протоколам, установленным в данной области. Как правило, носитель или эксципиент выбирают для того, чтобы минимизировать аллергические и другие нежелательные эффекты и чтобы отвечать требованиям конкретного пути введения, например, подкожного, внутримышечного, интраназального и т.д.

Связанный аспект изобретения относится к способам стимуляции иммунной системы индивидуума для получения защитного иммунного ответа против вируса гриппа. В способах иммунологически эффективное количество рекомбинантного вируса гриппа (например, содержащего молекулу НА и/или NA по изобретению), иммунологически эффективное количество полипептида по изобретению и/или иммунологически эффективное количество нуклеиновой кислоты по изобретению вводят индивидууму в физиологически приемлемом носителе.

Как правило, вирусы гриппа по изобретению вводят в количестве, достаточном для стимуляции иммунного ответа, специфичного к одному или нескольким штаммам гриппа вирус (т.е. против штаммов НА и/или NA по изобретению). Предпочтительно введение вирусов гриппа вызывает защитный иммунный ответ на такие штаммы.

Дозировки и способы, для того чтобы вызвать защитный иммунный ответ против одного или нескольких штаммов гриппа, известны специалистам в данной области. См., например, USPN 5922326; Wright et al., Infect. Immun. 37:397-400 (1982); Kim et al., Pediatrics 52:56-63 (1973); и Wright et al., J. Pediatr. 88:931-936 (1976). Например, вирусы гриппа предоставляют в диапазоне приблизительно 1-1000  $\text{HID}_{50}$  (инфекционная доза

человека), т.е. приблизительно  $10^5$ - $10^8$  БОЕ (бляшкообразующие единицы) на введенную дозу. Обычно дозу будут корректировать в пределах данного диапазона на основе, например, возраста, физического состояния, массы тела, пола, диеты, времени введения и других клинических факторов. Профилактический вакцинный состав вводят системно, например, посредством подкожной или внутримышечной инъекции с использованием иглы и шприца или безыгольного инъекционного устройства. Альтернативно вакцинный состав вводят интраназально, или по каплям, или в виде крупнодисперсного аэрозоля (больше чем приблизительно 10 мкм) или спрея в верхние дыхательные пути. Несмотря на то, что любой из указанных выше путей доставки ведет к защитному системному иммунному ответу, интраназальное введение дает дополнительное преимущество, вызывая иммунитет на слизистой в месте проникновения вируса гриппа. Для интраназального введения часто предпочтительными являются аттенуированные живые вирусные вакцины, например, аттенуированные, адаптированные к холоду и/или чувствительные к температуре рекомбинантные или реассортантные вирусы гриппа. См. выше. Несмотря на то, что предпочтительной является стимуляция защитного иммунного ответа одной дозой, дополнительные дозировки можно вводить тем же или другим путем, чтобы добиться желаемого профилактического эффекта.

В типичном случае аттенуированный рекомбинантный грипп по данному изобретению, который используют в вакцинах, является достаточно аттенуированным, так что симптомы инфекции или по меньшей мере симптомы тяжелой инфекции не возникнут у большинства индивидуумов, иммунизированных (или иным образом инфицированных) аттенуированным вирусом гриппа. В некоторых случаях аттенуированный вирус гриппа все еще может давать симптомы легкого заболевания (например, легкого заболевания верхних дыхательных путей) и/или распространяться на невакцинированных индивидуумов. Однако его вирулентность достаточно снижена,

так что у вакцинированных или случайных хозяев не возникнут тяжелые инфекции нижних дыхательных путей.

Альтернативно иммунный ответ можно стимулировать нацеливанием вирусов гриппа, содержащих последовательности, приведенные в настоящем документе, на дендритные клетки *ex vivo* или *in vivo*. Например, пролиферирующие дендритные клетки подвергают воздействию вирусов в достаточном количестве и в течение достаточного периода времени, чтобы допустить захват антигенов гриппа дендритными клетками. Затем клетки переносят субъекту, подлежащему вакцинации, стандартными способами внутривенной трансплантации.

Несмотря на то, что стимуляцию защитного иммунного ответа можно вызвать одной дозой, можно вводить дополнительные дозировки тем же или другим путем, чтобы получить желаемый профилактический эффект. Например, у новорожденных и младенцев может требоваться несколько введений, для того чтобы вызвать достаточный уровень иммунитета. Введение можно продолжать с интервалами на всем протяжении детства по мере необходимости для поддержания достаточных уровней защиты против инфекции гриппа дикого типа. Аналогичным образом, взрослым, которые особенно подвержены повторным или тяжелым инфекциям гриппа, таким как, например, работники здравоохранения, работники дневного ухода, члены семей детей младшего возраста, пожилых людей, и индивидуумам с нарушенной сердечно-легочной функцией могут требоваться множественные иммунизации для установления и/или поддержания защитного иммунного ответа. Можно осуществлять мониторинг уровней индуцированного иммунитета, например, посредством измерения количества нейтрализующих секреторных и сывороточных антител, и корректировать дозировки или повторять вакцинации по мере необходимости для того, чтобы вызывать и поддерживать уровни защиты.

Необязательно, состав для профилактического введения вируса гриппа также содержит один или несколько адъювантов для усиления иммунного ответа на антигены гриппа. Подходящие адъюванты включают: полный адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда, сапонин, минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, блок-сополимерные полиолы, полианионы, пептиды, масляные или углеводородные эмульсии, бацилла Кальмета-Герена (БЦЖ), *Corynebacterium parvum* и синтетический адъювант QS-21.

При желании, профилактическое введение вакцины против вируса гриппа можно осуществлять в сочетании с введением одной или нескольких иммуностимулирующих молекул. Иммуностимулирующие молекулы включают различные цитокины, лимфокины и хемокины с иммуностимулирующей, иммунопотенцирующей и провоспалительной активностями, такие как интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); факторы роста (например, гранулоцитарно-макрофагальный (GM) колониестимулирующий фактор (CSF)); и другие иммуностимулирующие молекулы, такие как фактор воспаления макрофагов, лиганд Flt3, B7.1; B7.2 и т.д.

Иммуностимулирующие молекулы можно вводить в том же составе, что и вирус гриппа, или можно вводить отдельно. Белок (например, полипептид НА и/или NA по изобретению, например, любой из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6) или вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид (например, любой из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 или остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5), кодирующий этот белок, можно вводить для получения иммуностимулирующего эффекта.

Описанные выше способы можно использовать для терапевтического и/или профилактического лечения заболевания или нарушения, обычно гриппа, посредством введения вектора по изобретению, содержащего гетерологичный полинуклеотид, который кодирует терапевтически или профилактически эффективный полипептид НА и/или NA (или пептид), или РНК НА и/или NA (например, антисмысловой РНК или рибозима), в популяцию клеток-мишеней *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Обычно полинуклеотид, кодирующий полипептид (или пептид), или РНК, представляющая интерес, функционально связаны с соответствующими регуляторными последовательностями, как описано выше в разделах, озаглавленных «Экспрессирующие векторы» и «Дополнительные экспрессирующие элементы». Необязательно, более чем одну гетерологичную кодирующую последовательность встраивают в один вектор или вирус. Например, в дополнение к полинуклеотиду, кодирующему терапевтически или профилактически активный полипептид НА и/или NA, или РНК, вектор также может содержать дополнительные терапевтические или профилактические полипептиды, например, антигены, костимулирующие молекулы, цитокины, антитела и т.д. и/или маркеры и т.п.

Тогда как вакцинация индивидуума аттенуированным вирусом гриппа конкретного штамма конкретной подгруппы может индуцировать перекрестную защиту против вирусов гриппа различных штаммов и/или подгрупп, при желании, перекрестную защиту можно усилить посредством вакцинации индивидуума аттенуированными вирусами гриппа по меньшей мере двух штаммов, например, каждый из которых представляет отличающуюся подгруппу. Дополнительно, вакцинные комбинации необязательно могут содержать смеси пандемических вакцин (например, против пандемических штаммов гриппа, таких как различные штаммы птиц, см., например, последовательности в настоящем документе, или другие пандемические штаммы) и непандемических штаммов. Вакцинные смеси (или несколько вакцинаций) могут содержать компоненты из штаммов гриппа, принадлежащих человеку, и/или штаммов гриппа, не принадлежащих человеку (например, из штаммов птиц и человека и т.д.). Аналогичным образом, аттенуированные вакцины против вируса гриппа по данному изобретению необязательно можно комбинировать с вакцинами, которые индуцируют защитные иммунные ответы против других инфекционных агентов.

### **ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ ПО ИЗОБРЕТЕНИЮ**

В данной области хорошо известно, что сегменты полинуклеотидов НА и NA вирусов гриппа содержат как кодирующую область (кодирует ORF), так и не кодирующие области (NCR), расположенные относительно кодирующей последовательности НА и NA выше и ниже по направлению транскрипции. Также известно, что для этих NCR можно получить праймеры для облегчения амплификации целых сегментов НА и NA вируса гриппа (см., например, Hoffmann et al. Arch Virol. 2001 Dec; 146(12):2275-89). Кроме того, известно, что NCR в НА и NA гриппа могут повышать эффективность получения реассортантов. Следовательно, нуклеотидные последовательности этих NCR (включая их фрагменты и варианты (с идентичностью, например, по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 96%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 98,5%, или по меньшей мере приблизительно 98,7%, или по меньшей мере приблизительно 99%, или по меньшей мере

мере приблизительно 99,1%, или по меньшей мере приблизительно 99,2%, или по меньшей мере приблизительно 99,3%, или по меньшей мере приблизительно 99,4%, или по меньшей мере приблизительно 99,5%, или по меньшей мере приблизительно 99,6%, или по меньшей мере приблизительно 99,7%, или по меньшей мере приблизительно 99,8%, или по меньшей мере приблизительно 99,9%)) входят в объем данного изобретения. При амплификации сегментов HA и NA любого пандемического штамма, можно получить и использовать полинуклеотидные праймеры для связывания консервативных (например, среди родственных штаммов) областей NCR в HA и NA для амплификации (например, посредством RT-ПЦР). В одном из вариантов осуществления полинуклеотиды HA и NA по изобретению содержат как NCR, так и ORF последовательностей HA и NA (включая их фрагменты и варианты (например, по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 96%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 98,5%, или по меньшей мере приблизительно 98,7%, или по меньшей мере приблизительно 99%, или по меньшей мере приблизительно 99,1%, или по меньшей мере приблизительно 99,2%, или по меньшей мере приблизительно 99,3%, или по меньшей мере приблизительно 99,4%, или по меньшей мере приблизительно 99,5%, или по меньшей мере приблизительно 99,6%, или по меньшей мере приблизительно 99,7%, или по меньшей мере приблизительно 99,8%, или по меньшей мере приблизительно 99,9%)) пандемических штаммов вируса. В альтернативных вариантах осуществления полинуклеотиды HA и NA по изобретению не содержат NCR, но содержат ORF (включая ее фрагменты и варианты (например, по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 96%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 98,5%, или по меньшей мере приблизительно 98,7%, или по меньшей мере приблизительно 99%, или по меньшей мере приблизительно 99,1%, или по меньшей мере приблизительно 99,2%, или по меньшей мере приблизительно 99,3%, или по меньшей мере приблизительно 99,4%, или по меньшей мере приблизительно 99,5%, или по меньшей мере приблизительно 99,6%, или по меньшей мере приблизительно 99,7%, или по меньшей мере приблизительно 99,8%, или по меньшей мере приблизительно 99,9%)) последовательностей HA и NA пандемических штаммов вируса (например, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, остатки 89-1063 SEQ ID NO:1, остатки 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатки 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатки 1063-1728 SEQ ID NO:5).

Полинуклеотиды HA и NA по изобретению, например, SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатки 89-1063 SEQ ID NO:1, остатки 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатки 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатки 1063-1728 SEQ ID NO:5 и их фрагменты, необязательно используют при многих различных возможностях, альтернативных или дополняющих вакцины, описанные выше. Другие образцовые использования описаны в настоящем документе для иллюстративной цели, а не в качестве ограничения фактической области использования. Различные способы конструирования, очистки и описания нуклеотидных последовательностей по изобретению также описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие одну или несколько

нуклеотидных последовательностей по изобретению, благоприятно используют в качестве зондов для определения соответствующих или родственных полинуклеотидов во многих случаях, таких как эксперименты по гибридизации нуклеиновых кислот, например, для выявления и/или описания гомологичных вариантов гриппа (например, 5 гомологов последовательностей, приведенных в настоящем документе, и т.д.), инфицирующих другие виды, или в других вспышках гриппа и т.д. Зонды могут представлять собой молекулы ДНК или РНК, такие как фрагменты рестрикции геномной или клонированной ДНК, кДНК, продукты амплификации ПЦР, транскрипты и олигонуклеотиды, и их длина может варьировать от олигонуклеотидов всего лишь 10 приблизительно в 10 нуклеотидов до полноразмерных последовательностей или кДНК 15 свыше 1 т.п.н. или более. Например, в некоторых вариантах осуществления зонд по изобретению содержит нуклеотидную последовательность или подпоследовательность, выбранную, например, из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID 15 NO:5 или последовательностей, комплементарных им. Альтернативно нуклеотидные последовательности, которые представляют собой варианты одной из обозначенных выше последовательностей, используют в качестве зондов. Наиболее обычно такие варианты содержат одно или несколько консервативных изменений нуклеотидов. Например, можно выбрать пары (или наборы) олигонуклеотидов, в которых две (или 20 более) нуклеотидных последовательности представляют собой консервативные изменения друг друга, где одна нуклеотидная последовательность идентично соответствует первому варианту или и другая(ие) идентично соответствуют дополнительным вариантам. Такие пары олигонуклеотидных зондов особенно эффективны, например, в экспериментах по специфической гибридизации для 25 определения полиморфных нуклеотидов или, например, для определения гомологичных вариантов НА и NA гриппа, например, гомологичных текущим последовательностям НА и NA, инфицирующих другие виды или присутствующих в других (например, разделенных во времени и/или географически) вспышках гриппа. В других применениях выбирают более отличающиеся зоны, то есть выбирают зонды, которые идентичны по 30 меньшей мере приблизительно на 91% (или приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 98,5%, приблизительно на 98,7%, приблизительно на 99%, приблизительно на 99,1%, приблизительно на 99,2%, приблизительно на 99,3%, приблизительно на 99,4%, 35 приблизительно на 99,5%, или приблизительно на 99,6%, или более приблизительно на 99,7%, приблизительно на 99,8%, приблизительно на 99,9% или более).

Зонды по изобретению, в качестве примеров которых приведены, например, последовательности, полученные из последовательностей, приведенных в настоящем документе, также можно использовать для идентификации дополнительных эффективных 40 полинуклеотидных последовательностей в соответствии с обычными процедурами в данной области. В одном наборе вариантов осуществления один или несколько зондов, как описано выше, используют для скрининга библиотек продуктов экспрессии или хромосомных сегментов (например, библиотек экспрессии или геномных библиотек) для идентификации клонов, которые содержат последовательности, обладающие 45 идентичностью или значительным сходством последовательностей, например, с одним или несколькими зондами из последовательностей, приведенных в настоящем документе, т.е. варианты, гомологи и т.д. Следует понимать, что в дополнение к таким материальным способам, как скрининг библиотеки, также можно использовать

компьютерные биоинформационные подходы, например, BLAST и другие алгоритмы поиска гомологии последовательностей и т.п., для идентификации родственных полинуклеотидных последовательностей. Полинуклеотидные последовательности, идентифицированные таким образом, также являются признаком изобретения.

5 Олигонуклеотидные зонды необязательно получают различными способами, хорошо известными специалистам в данной области. Наиболее обычно их получают хорошо известными способами синтеза, такими как твердофазный фосфоамидитный  
 10 трехэфирный способ, описанный в публикации Beaucage и Caruthers (1981) *Tetrahedron Letts* 22(20):1859-1862, например, используя автоматизированный синтезатор, или как описано в публикации Needham-Van Devanter et al. (1984) *Nucl Acids Res*, 12:6159-6168. Олигонуклеотиды также можно получить на заказ и заказать во множестве  
 15 коммерческих источников, известных профессионалам. При необходимости, очистку олигонуклеотидов обычно осуществляют или посредством нативного электрофореза в акриламидном геле или посредством анионообменной ВЭЖХ, как описано в публикации Pearson and Regnier (1983) *J Chrom* 255:137-149. Последовательности  
 20 синтетических олигонуклеотидов можно подтвердить с использованием способа химического расщепления авторов Maxam and Gilbert (1980) in Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, New York, *Methods in Enzymology* 65:499-560. Специальные олигонуклеотиды также можно легко заказать во многих коммерческих источниках, известных профессионалам.

В других случаях, например, касающихся свойств клеток или организмов, экспрессирующих полинуклеотиды и полипептиды по изобретению (например, содержащих вирус, который содержит последовательности по изобретению), удобно использовать зонды, которые представляют собой полипептиды, пептиды или антитела.  
 25 Например, выделенные или рекомбинантные полипептиды, полипептидные фрагменты и пептиды, полученные из любой из аминокислотных последовательностей по изобретению (например, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ ID NO:6), и/или  
 30 кодируемые полинуклеотидными последовательностями по изобретению, например, выбранными из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5, удобно использовать для идентификации и выделения антител, например, из библиотек фагового дисплея, комбинаторных библиотек, поликлональных сывороток и т.п. Полипептидные  
 35 фрагменты по изобретению включают пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из по меньшей мере 5 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 10 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 15 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 20 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 25 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 40  
 40 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 50 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 60 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 70 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 80 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 90 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере  
 45 последовательных 100 аминокислотных остатков, или по меньшей мере последовательных 125 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 150 последовательных аминокислотных остатков, или по меньшей мере последовательных 175 аминокислотных остатков, или по меньшей мере последовательных 200

аминокислотных остатков, или по меньшей мере последовательных 250 аминокислотных остатков, или по меньшей мере последовательных 350 или по меньшей мере последовательных 400, или по меньшей мере последовательных 450, или по меньшей мере последовательных 500 или по меньшей мере последовательных 550 аминокислотных остатков аминокислотной последовательности полипептида НА или NA по изобретению (например, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ ID NO:6). Полинуклеотиды, кодирующие указанные полипептидные фрагменты и антитела, которые специфически связывают указанные полипептиды, также представляют собой предпочтительные варианты осуществления изобретения.

Антитела, специфичные к любой полипептидной последовательности или подпоследовательности, например, из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6, и/или кодируемой полинуклеотидными последовательностями по изобретению, например, выбранными из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5, подобным образом расценивают в качестве зондов для оценки продуктов экспрессии, например, из клеток или тканей. Кроме того, антитела в частности подходят для оценки экспрессии белков, содержащих аминокислотные подпоследовательности, например, из приведенного в настоящем документе или кодируемого полинуклеотидными последовательностями по изобретению, например, выбранными из приведенного в настоящем документе, *in situ*, в наборе тканей, в клетке, ткани или организме, например, в организме, инфицированном неидентифицированным вирусом гриппа или т.п. Антитела можно метить непосредственно обнаружимым реактивов, или определять опосредованно посредством мечения вторичного антитела, специфичного к константной области тяжелой цепи (т.е. к изотипу) специфичного антитела. Дополнительные подробности относительно получения специфичных антител предоставлены ниже.

#### Диагностические анализы

Полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению можно использовать в диагностических анализах для определения гриппа (и/или гемагглютинирина и/или нейраминидазы) в образце, для определения последовательностей, похожих на гемагглютинин и/или нейраминидазу, и для определения различий штаммов в клинических изолятах гриппа с использованием химически синтезированных или рекомбинантных полинуклеотидных фрагментов, например, выбранных из последовательностей, приведенных в настоящем документе. Например, фрагменты последовательностей гемагглютинирина и/или нейраминидазы, содержащие по меньшей мере от 10 до 20 нуклеотидов, можно использовать в качестве праймеров для амплификации полинуклеотидов с использованием способов полимеразной цепной реакции (ПЦР), хорошо известных в данной области (например, ПЦР с обратной транскрипцией), и в качестве зондов в анализах гибридизации полинуклеотидов для определения целевого генетического вещества, такого как РНК гриппа в клинических образцах.

Зонды по изобретению, например, в качестве примера которых приведены уникальные подпоследовательности, выбранные из приведенных в настоящем документе, также можно использовать для идентификации дополнительных эффективных полинуклеотидных последовательностей (например, для описания дополнительных штаммов гриппа) согласно обычным процедурам в данной области. В одном наборе предпочтительных вариантов осуществления используют один или несколько зондов,

как описано выше, для скрининга библиотек продуктов экспрессии или клонированных вирусных полинуклеотидов (т.е. библиотек экспрессии или геномных библиотек) для идентификации клонов, которые содержат последовательности, со значительной идентичностью последовательностей или идентичные последовательностям,

5 приведенным в настоящем документе. В свою очередь каждую из этих идентифицированных последовательностей можно использовать для получения зондов, включая пары или наборы различных зондов, как описано выше. Следует понимать, что в дополнение к таким материальным способам, как скрининг библиотеки, также можно использовать компьютерные биоинформационные подходы, например, BLAST  
10 и другие алгоритмы поиска гомологии последовательностей, и т.п., для идентификации родственных полинуклеотидных последовательностей.

Зонды по изобретению, в частности, можно использовать для определения присутствия и для определения идентичности полинуклеотидов гриппа в клетках, тканях или других биологических образцах (например, смыв носовой полости или бронхиальный  
15 лаваж). Например, зонды по изобретению удобно использовать для того, чтобы определить, подвергался ли воздействию или инфицирован ли гриппом или конкретным штаммом(ами) гриппа биологический образец, такой как субъект (например, человеческий субъект) или модельная система (такая как образец культивируемых клеток). Определение гибридизации выбранного зонда с полинуклеотидами,  
20 происходящими из (например, выделенными из) биологического образца или модельной системы, указывает на воздействие или инфекцию вирусом (или родственным вирусом), из которого выбран полинуклеотид зонда.

Следует принимать во внимание то, что конструкция зонда зависит от предполагаемого применения. Например, когда несколько аллельспецифичных  
25 взаимодействий зонд-мишень должны быть определены в одном анализе, например, на одном ДНК-чипе, желательно, чтобы все зонды обладали схожими температурами плавления. Таким образом, длины зондов корректируют так, чтобы температуры плавления для всех зондов на чипе были очень схожими (следует принимать во внимание, что для достижения конкретной  $T_m$  могут потребоваться различные длины для  
30 различных зондов, если различные зонды имеют различное содержание GC). Несмотря на то, что в конструировании зонда в первую очередь следует учитывать температуру плавления, другие факторы необязательно используют для дополнительной корректировки конструкции зонда, такие как стремление избежать самокомплементарность праймеров и т.п.

35 Векторы, промоторы и системы экспрессии

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным конструкциям, содержащим одну или несколько полинуклеотидных последовательностей, описываемых в настоящем документе. Такие конструкции необязательно содержат вектор, например, плазмиду, космиду, фаг, вирус, бактериальную искусственную хромосому (БИХ), дрожжевую  
40 искусственную хромосому (ДИХ) и т.д., в которые встроены одна или несколько полинуклеотидных последовательностей по изобретению, например, содержащих любые из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5 или их подпоследовательностей и т.д., в прямой или обратной ориентации. Например,  
45 встроенный полинуклеотид может содержать вирусную хромосомную последовательность или кДНК, включая целую или часть по меньшей мере одной из полинуклеотидных последовательностей по изобретению. В одном из вариантов осуществления конструкция дополнительно содержит регуляторные последовательности,



включая, например, промотор, функционально связанный с последовательностью. Большое число подходящих векторов и промоторов известно специалистам в данной области и коммерчески доступно.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению можно включить в любой один из множества векторов, подходящих для получения смысловой или антисмысловой РНК и необязательно полипептидных (или пептидных) продуктов экспрессии (например, молекулы гемагглютинина и/или нейраминидазы по изобретению или их фрагменты). Такие векторы содержат хромосомные, нехромосомные и синтетические последовательности ДНК, например, производные SV40; бактериальные плазмиды; фаговую ДНК; бакуловирус; плазмиды дрожжей; векторы, полученные из сочетания плазмид и фаговой ДНК, ДНК вируса, такого как вирус коровьей оспы, аденовирус, вирус оспы птиц, вирус псевдобешенства, аденовирус, аденоассоциированный вирус, ретровирусы и многие другие (например, pCDL). Можно использовать любой вектор, который допускает введение генетического материала в клетку и, если репликация является желаемой, который поддается репликации в соответствующем хозяине.

В векторе экспрессии представляющая интерес полинуклеотидная последовательность НА и/или NA физически расположена вблизи и ориентирована относительно соответствующей последовательности управления транскрипцией (например, промотор и необязательно один или несколько энхансеров) для управления синтезом мРНК. То есть, полинуклеотидная последовательность, представляющая интерес, функционально связана с соответствующей управляющей транскрипцией последовательностью. Примеры таких промоторов включают: промоторы LTR или SV40, промоторы lac или trp *E. coli*, промотор фага лямбда P<sub>L</sub> и другие промоторы, которые, как известно, управляют экспрессией генов в прокариотических или эукариотических клетках или их вирусах.

Множество промоторов пригодно для использования в экспрессирующих векторах для регуляции транскрипции геномных сегментов вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления используют промотор ДНК зависимой РНК полимеразы II (Pol II) цитомегаловируса (ЦМВ). При желании, например, для регуляции экспрессии в определенных условиях, можно заменить другими промоторами, которые индуцируют транскрипцию РНК в точно определенных условиях, или в точно определенных тканях или клетках. Многочисленные промоторы вирусов и млекопитающих, например, промоторы человека, доступны или их можно выделить в соответствии с конкретным предполагаемым применением. Например, альтернативные промоторы, полученные из геномов вирусов животных и человека, включают такие промоторы, как промоторы аденовирусов (таких как Аденовирус 2), вируса папилломы, вируса гепатита В, вируса полиомы и вируса обезьяны 40 (SV40) и различных ретровирусов. Промоторы млекопитающих среди многих других включают промоторы актина, промоторы иммуноглобулинов, промоторы теплового шока и т.п.

Транскрипцию необязательно усиливают путем включения энхансерной последовательности. Энхансеры в типичном случае представляют собой короткие, например, 10-500 п.н., действующие в цис-положении элементы ДНК, которые действуют согласованно с промоторами для усиления транскрипции. Многие энхансерные последовательности выделены из генов млекопитающих (гемоглобин, эластаза, альбумин, альфафетопротеин и инсулин) и вирусов эукариотических клеток. Энхансер можно сплайсировать в вектор в положении 5' или 3' относительно гетерологичной кодирующей последовательности, но в обычном случае его встраивают в участок 5' относительно промотора. В обычном случае промотор и, при желании, дополнительные

усиливающие транскрипцию последовательности выбирают для оптимизации экспрессии в типе клетки-хозяина, в которую нужно ввести гетерологичную ДНК (Scharf et al. (1994) Heat stress promoters and transcription factors Results Probl Cell Differ 20:125-62; Kriegler et al. (1990) Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to control expression of transferred genes Methods in Enzymol 185:512-27). Необязательно ампликон также может содержать сайт связывания рибосомы или внутренний участок связывания рибосомы (IRES) для инициации трансляции.

Векторы по изобретению также в желательном порядке содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК, такие как сайт полиаденилирования или последовательность терминатора. Такие последовательности обычно доступны из 5' и иногда с 3' нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. В одном из вариантов осуществления сигнальные последовательности полиаденилирования SV40 могут предоставлять двунаправленный сайт полиаденилирования, который изолирует транскрипцию молекул (+) цепи мРНК с промотора Pol I, который иницирует репликацию (-) цепи вирусного генома.

Кроме того, как описано выше, экспрессирующие векторы необязательно содержат один или несколько генов маркеров селекции для обеспечения фенотипического признака для отбора трансформированных клеток-хозяев, в дополнение к ранее перечисленным генам, маркеры, такие как дигидрофолатредуктаза или устойчивость к неомицину, подходят для селекции в культуре эукариотических клеток.

Вектор, содержащий соответствующую полинуклеотидную последовательность, как описано выше, а также соответствующий промотор или последовательность регуляции, можно использовать для трансформации клетки-хозяина, обеспечивающей экспрессию белка. Несмотря на то, что векторы по изобретению можно реплицировать в бактериальных клетках, наиболее часто будет желательно вводить их в клетки млекопитающих, например, клетки Vero, клетки ВНК, клетки MDCK, клетки 293, клетки COS или т.п., с целью экспрессии.

Как описано в другом месте, последовательности НА и NA в настоящем документе в различных вариантах осуществления могут содержаться в плаزمидях, включенных в реассортант плазмидной «помощи». См., например, заявки США №№ 60/420708, которая подана 23 октября 2002 года; 60/574117, которая подана 24 мая 2004 года; 10/423828, которая подана 25 апреля 2003 года; 60/578962, которая подана 12 июня 2004 года; и 10/870690, которая подана 16 июня 2004 года; и US20020164770, которые включены в настоящий документ по ссылке. Например, предпочтительные экспрессирующие векторы по изобретению включают в качестве неограничивающих примеров векторы, содержащие последовательности промотора и терминатора pol I, или векторы, использующие промоторы как pol I, так и pol II «система промоторов pol I/pol II» (например, Zobel et al., Nucl. Acids Res. 1993, 21:3607; US20020164770; Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:9345; Fodor et al., J. Virol. 1999, 73:9679; и US20030035814). Полученные реассортанты могут содержать гены НА и NA, расположенные с 6 другими генами гриппа из штамма-донора A/Ann Arbor/6/60 (и/или его производных и модификаций), остова штамма-донора PR8, остова штамма-донора A/Leningrad/17 и т.д. Другие основные штаммы описаны, например, в 20040137013 и 20030147916, которые включены в настоящий документ по ссылке.

#### **Дополнительные элементы экспрессии**

Обычно геномный сегмент, кодирующий белки НА и/или NA вируса гриппа, содержит любые дополнительные последовательности, необходимые для его экспрессии, включая трансляцию в функциональный вирусный белок. В других случаях можно использовать

миниген или другую искусственную конструкцию, кодирующую вирусные белки, например, белки НА и/или NA. Кроме того, в таком случае часто желательно включать конкретные сигналы инициации, которые способствуют эффективной трансляции гетерологичной кодирующей последовательности. Эти сигналы могут включать, например, иницирующий кодон ATG и смежные последовательности. Чтобы обеспечить трансляцию всей вставки, иницирующий кодон вставляют в правильной рамке считывания относительно вирусного белка. Экзогенные транскрипционные элементы и иницирующие кодоны могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии можно усилить, включая энхансеры, соответствующие используемой клеточной системе.

При желании, полинуклеотидные последовательности, которые кодируют дополнительные экспрессируемые элементы, такие как сигнальные последовательности, последовательности секреции и локализации и т.п., можно встроить в вектор, обычно, в рамку считывания полинуклеотидной последовательности, представляющей интерес, например, чтобы направить экспрессию полипептида в желаемый клеточный компартмент, мембрану или органеллу или чтобы направить секрецию полипептида в периплазматическое пространство или в среду для культивирования клеток. Такие последовательности известны специалистам и включают лидерные пептиды секреции, нацеливающие на органеллу последовательности (например, последовательности ядерной локализации, сигналы удержания в эндоплазматическом ретикулуле, последовательности митохондриального транзита), последовательности мембранной локализации/якорные последовательности (например, последовательности остановки переноса, GPI якорные последовательности) и т.п.

Когда желательна трансляция полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью по изобретению, дополнительные специфичные к трансляции сигналы инициации могут повысить эффективность трансляции. Эти сигналы могут включать, например, иницирующий кодон ATG и смежные последовательности, область IRES и т.д. В некоторых случаях, например, полноразмерные молекулы кДНК или хромосомные сегменты, содержащие кодирующую последовательность, включающую, например, полинуклеотидную последовательность по изобретению (например, как в приведенных в настоящем документе последовательностях), кодон инициации трансляции и связанные элементы последовательностей, встраивают в соответствующий вектор экспрессии вместе с полинуклеотидной последовательностью, представляющей интерес. В таких случаях часто не требуются дополнительные сигналы управления трансляцией. Однако в тех случаях, когда встраивают только одну кодирующую полипептид последовательность или ее часть, для экспрессии рассматриваемой последовательности часто предусматривают экзогенные сигналы управления трансляцией, включая, например, иницирующий кодон ATG. Иницирующий кодон встраивают с соблюдением правильной рамки считывания, чтобы обеспечить транскрипцию полинуклеотидной последовательности, представляющей интерес. Экзогенные транскрипционные элементы и иницирующие кодоны могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии можно повысить, включив энхансеры, соответствующие используемой клеточной системе (см., например, Scharf D. et al. (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:125-62; Bittner et al. (1987) *Methods in Enzymol* 153:516-544).

#### **Получение рекомбинантного вируса**

Вирусы с минус-цепью РНК можно сконструировать генетическими способами и получать с использованием рекомбинантного подхода обратной генетики (см., например,

USPN 5166057 Palese et al). Такой способ исходно применяли для конструирования геномов вируса гриппа (Luytjes et al. (1989) Cell 59:1107-1113; Enami et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567), а также успешно применяли к большому множеству вирусов с сегментированной и несегментированной минус-цепью РНК, например, к

5 вирусу бешенства (Schnell et al. (1994) EMBO J. 13:4195-4203); VSV (Lawson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4477-4481); вирусу кори (Radecke et al. (1995) EMBO J. 14: 5773-5784); вирусу чумы скота (Baron & Barrett (1997) J. Virol. 71:1265-1271); вирусу парагриппа человека (Hoffman & Banerjee (1997) J. Virol. 71:3272-3277; Dubin et al. (1997) Virology 235:323-332); SV5 (He et al. (1997) Virology 237:249-260); вирусу собачьей чумы

10 (Gassen et al. (2000) J. Virol. 74:10737-44); и вирусу Сендай (Park et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5537-5541; Kato et al. (1996) Genes to Cells 1:569-579). Специалисты в данной области хорошо знакомы с этими и аналогичными способами получения вируса гриппа, содержащего последовательности НА и NA по изобретению. Реассортантные вирусы гриппа, полученные в соответствии с такими способами, также являются

15 признаком по изобретению, поскольку представляют собой реассортантный вирус гриппа, содержащий один или несколько полинуклеотидов и/или полипептидов по изобретению.

#### **Культура клеток и хозяева экспрессии**

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, которым введены

20 (трансдуцированы, трансформированы или трансфицированы) векторы по изобретению, и к получению полипептидов по изобретению рекомбинантными способами. Клетки-хозяева конструируют генетическими способами (т.е. трансдуцируют, трансформируют или трансфицируют) с использованием вектора, такого как вектор экспрессии, по данному изобретению. Как описано выше, вектор может находиться в форме плазмиды,

25 вирусной частицы, фага и т.д. Примеры соответствующих хозяев экспрессии включают: бактериальные клетки, такие как *E. coli*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Neurospora crassa*; или клетки насекомых, таких как *Drosophila* и *Spodoptera frugiperda*.

Чаще всего клетки млекопитающих используют для культивирования молекул НА

30 и NA по изобретению. Подходящие клетки-хозяева для репликации вируса гриппа включают, например, клетки Vera, клетки ВНК, клетки MDCK, клетки 293 и клетки COS, включая клетки 293Т, клетки COS7 или т.п. Обычно совместные культуры содержат две из указанных выше клеточных линий, например, клетки MDCK и клетки 293Т или

35 COS, используемые в соотношении, например, 1:1, для повышения эффективности репликации. Обычно клетки культивируют в стандартной коммерческой среде для культивирования, такой как модифицированная по способу Дульбекко среда Игла с добавлением сыворотки (например, 10% эмбриональная телячья сыворотка), или в среде, не содержащей сыворотку, при контролируемых влажности и концентрации CO<sub>2</sub>,

40 подходящих для поддержания нейтрального буферного pH (например, при pH от 7,0 до 7,2). Необязательно среда содержит антибиотики для предотвращения бактериального роста, например, пенициллин, стрептомицин и т.д., и/или дополнительные питательные вещества, такие как L-глутамин, пируват натрия, заменимые аминокислоты, дополнительные добавки, способствующие благоприятным характеристикам роста, например, трипсин, β-меркаптоэтанол и т.п.

45 Сконструированные клетки-хозяева можно культивировать в стандартных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для активации промоторов, селекции трансформантов или амплификации встроенных полинуклеотидных последовательностей. Условия культивирования, такие как

температура, pH и т.п., обычно представляют собой те, что использовали ранее для конкретной клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалистам в данной области и доступны в источниках, процитированных в настоящем документе, включая, например, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3rd edition, Wiley-Liss, New York и цитируемые в нем источники. Другие полезные источники включают, например, Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5th ed., Livingston, Edinburgh; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work and Burdon (eds.) Elsevier, Amsterdam. Дополнительные подробности относительно процедур культивирования тканей, представляющих конкретный интерес при получении вируса гриппа *in vitro*, содержит, например, Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*. в Cohen and Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*, который в полном объеме включен в настоящий документ для всех целей. Дополнительно, специалисты в данной области хорошо знакомы с изменениями в таких процедурах, адаптированных к настоящему изобретению, и легко определяют их посредством обычных экспериментов.

Клетки для получения вируса гриппа (например, содержащего последовательности НА и/или NA по изобретению) можно культивировать в среде, содержащей сыворотку или не содержащей сыворотку. В некоторых случаях, например, для получения очищенных вирусов, как правило, желательно растить клетки-хозяева в среде, не содержащей сыворотки. Клетки можно культивировать в малом масштабе, например, менее чем в 25 мл среды, культуральных пробирках или колбах или в больших колбах при встряхивании, во вращающихся бутылках или на бусах микроносителя (например, бусы микроносителя DEAE-Dextran, такие как Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories; бусы из сополимера стирола-триметиламина, такие как Hillex, SoloHill, Ann Arbor) в культурах в колбах, бутылках или реакторах. Бусы микроносителя представляют собой маленькие сферы (диаметр в диапазоне 100-200 мкм), которые предоставляют большую площадь поверхности для роста прилипающих клеток на единицу объема культуры клеток. Например, один литр среды может содержать более чем 20 миллионов бусин микроносителя, предоставляя более чем 8000 квадратных сантиметров поверхности для роста. Для коммерческого получения вирусов, например, для получения вакцины, часто желательно культивировать клетки в биореакторе или ферментере. Биореакторы доступны в объемах от менее чем 1 л до более чем 100 л, например, биореактор Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); биореакторы NBS (New Brunswick Scientific, Edison, NJ); биореакторы лабораторного и коммерческого масштаба компании B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Germany).

Независимо от объема культуры, во многих желательных аспектах по настоящему изобретению важно поддерживать в культурах соответствующую температуру, чтобы обеспечить достаточный выход рекомбинантного и/или реассортантного вируса гриппа с использованием температурно-зависимых мультиплазмидных систем (см., например, Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus, заявку США № 60/420708, которая подана 23 октября 2002 года, заявку США № 10/423828, которая подана 25 апреля 2003 года, и заявку США № 60/574117, которая подана 24 мая 2004 года), нагревать растворы вирусов для фильтрации и т.д. Обычно регулятор, например, термостат или другое устройство для измерения и поддержания температуры системы культуры клеток и/или другого раствора, используют для того, чтобы гарантировать, что температура находится на правильном уровне в течение соответствующего периода (например, репликация вируса и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе (например, где

реассортантные вирусы получают из сегментов в векторах) векторы, содержащие геномные сегменты гриппа, вводят (например, трансфицируют) в клетки-хозяева согласно хорошо известным в данной области способам введения гетерологичных полинуклеотидов в эукариотические клетки, включая, например, копреципитацию с фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию и трансфекцию, используя полиаминные реактивы для трансфекции. Например, векторы, например, плазмиды, можно трансфицировать в клетки-хозяева, такие как клетки COS, клетки 293Т или сочетания клеток COS или 293Т и клеток MDCK, используя полиаминный реактив для трансфекции TransIT-LT1 (Minis) по инструкциям производителя для того, чтобы получить реассортантные вирусы и т.д. Таким образом, в одном примере приблизительно 1 мкг каждого вектора вводят в популяцию клеток-хозяев с использованием приблизительно 2 мкл TransIT-LT1, разведенного в 160 мкл среды, предпочтительно не содержащей сыворотки среды, общим объемом 200 мкл. Смеси ДНК:реактив для трансфекции инкубируют при комнатной температуре в течение 45 минут, после чего добавляют 800 мкл среды. Смесь для трансфекции добавляют к клеткам-хозяевам, и клетки культивируют, как описано, другими способами, хорошо известными специалистам в данной области. Таким образом, для получения рекомбинантных или реассортантных вирусов в культуре клеток, векторы, содержащие каждый из 8 геномных сегментов, (например, PB2, PB1, PA, NP, M, NS, NA и NA по изобретению) смешивают приблизительно с 20 мкл TransIT-LT1 и трансфицируют в клетки-хозяева. Необязательно, содержащую сыворотку среду перед трансфекцией заменяют на не содержащую сыворотку среду, например, Opti-MEM I, и инкубируют в течение 4-6 часов.

Альтернативно можно использовать электропорацию для введения таких векторов, содержащих геномные сегменты гриппа, в клетки-хозяева. Например, плазмидные векторы, содержащие вирус гриппа А или гриппа В, удобно вводить в клетки Vera с использованием электропорации в соответствии со следующей процедурой. Вкратце, приблизительно  $5 \times 10^6$  клеток Vera, например, выращенных в модифицированной среде Игла (MEM) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), ресуспендируют в 0,4 мл OptiMEM и помещают в кювету для электропорации. 20 мкг ДНК в объеме до 25 мкл добавляют к клеткам в кювете, которую затем мягко перемешивают касанием. Электропорацию осуществляют по инструкциям производителя (например, BioRad Gen Pulser II, соединенный с Capacitance Extender Plus) при напряжении 300 В, емкости 950 мкФ с константой времени 28-33 мс. Клетки повторно перемешивают мягким касанием и приблизительно через 1-2 минуты после электропорации непосредственно в кювету добавляют 0,7 мл MEM с 10% FBS. Затем клетки переносят в две лунки стандартной 6-луночной чашки для культивирования тканей, которая содержит 2 мл MEM, 10% FBS. Кювету промывают, чтобы собрать все оставшиеся клетки, и суспензию смыва делят между двумя лунками. Конечный объем составляет приблизительно 3,5 мл. Затем клетки инкубируют в условиях, которые допускают вирусный рост, например, приблизительно при температуре 33°C для адаптированных к холоду штаммов.

В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать множество систем экспрессии, таких как системы на основе вирусов. В тех случаях, когда аденовирус используют в качестве вектора экспрессии, кодирующую последовательность необязательно лигируют в комплекс транскрипции/трансляции аденовируса, состоящий из позднего промотора и состоящей из трех частей лидерной последовательности. Вставка во второстепенную область E1 или E3 вирусного генома приведет к

жизнеспособному вирусу, способному экспрессировать полипептиды, представляющие интерес, в инфицированных клетках-хозяевах (Logan and Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci 81:3655-3659). Кроме того, энхансеры транскрипции, такие как энхансер вируса саркомы Рауса (RSV), можно использовать для повышения экспрессии в клетках-хозяевах

5 млекопитающих.

Штамм клеток-хозяев необязательно выбирают по его способности модулировать экспрессию встроенных последовательностей или осуществлять процессинг экспрессируемого белка желаемым образом. Такие модификации белка включают в качестве неограничивающих примеров ацетилирование, карбоксилирование,

10 гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование.

Посттрансляционный процессинг, при котором происходит расщепление прекурсорной формы до зрелой формы белка, иногда важен для правильной вставки, укладки и/или функции. Дополнительно также важна правильная локализация внутри клетки-хозяина (например, на поверхности клетки). Различные клетки-хозяева, такие как COS, CHO,

15 ВНК, MDCK, 293, 293T, COS7 и т.д., имеют специальный клеточный механизм и типичные механизмы для такой посттрансляционной активности, и их можно выбирать для того, чтобы обеспечить правильную модификацию и процессинг текущего введенного инородного белка.

Для длительного высокопродуктивного получения рекомбинантных белков,

20 кодируемых полинуклеотидами по изобретению или содержащих

подпоследовательности, кодируемые ими, необязательно используют стабильные экспрессионные системы. Например, клеточные линии, стабильно экспрессирующие полипептид по изобретению, трансфицируют с использованием экспрессирующих

25 векторов, которые содержат вирусные участки начала репликации или эндогенные экспрессирующие элементы и ген селективного маркера. Например, после введения

вектора, клетки выращивают в течение 1-2 дней в обогащенных средах перед тем, как их переводят на селективные среды. Задача селективного маркера состоит в том, чтобы придать устойчивость при селекции, и его присутствие делает возможным рост и сбор клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности. Таким образом,

30 устойчивые скопления стабильно трансформированных клеток, например, полученных из одного типа клеток, могут пролиферировать при использовании способов культивирования тканей, соответствующих типу клеток.

Клетки-хозяева, трансформированные нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид по изобретению, необязательно культивируют в условиях,

35 подходящих для экспрессии и сбора кодируемого белка из культуры клеток. Клетки, экспрессирующие указанный белок, можно сортировать, выделять и/или очищать.

Белок или его фрагмент, полученный посредством рекомбинантной клетки, может быть секретлируемым, мембраносвязанным или удерживаемым внутриклеточно, в зависимости от последовательности (например, в зависимости от кодируемого слитыми

40 белками сигнала удержания в мембране или т.п.) и/или используемого вектора.

Продукты экспрессии, соответствующие полинуклеотидам по изобретению, также можно получать в клетках, не принадлежащих животным, таких как клетки растений, дрожжей, грибов, бактерий и т.п. В дополнение к Sambrook, Berger and Ausubel, см. ниже, детали относительно культур клеток можно найти в публикации Payne et al. (1992) Plant

45 Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and Atlas and Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

В бактериальных системах можно выбрать множество экспрессирующих векторов в зависимости от предполагаемого использования экспрессируемого продукта.

Например, когда для получения антител нужны большие количества полипептида или его фрагментов, благоприятно использовать векторы, управляющие повышенным уровнем экспрессии слитых белков, которые легко очищать. Такие векторы включают в качестве неограничивающих примеров многофункциональные векторы клонирования и экспрессии *E. coli*, такие как BLUESCRIPT (Stratagene), в которых кодирующую последовательность, представляющую интерес, например, последовательности, содержащие те, что обнаружены в настоящем документе, и т.д., можно лигировать в вектор в одну рамку считывания с последовательностями для аминоконцевой трансляции, включающей метионин и последующие 7 остатков бета-галактозидазы, с получением каталитически активного слитого белка бета-галактозидазы; векторы pIN (Van Heeke & Schuster (1989) J Biol Chem 264:5503-5509); векторы pET (Novagen, Madison WI) и т.п. Аналогичным образом, в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* можно использовать множество векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как альфа фактор, алкогольоксидаза и PGH, для получения желаемых продуктов экспрессии. Обзоры см. в Ausubel, ниже, и Grant et al., (1987); Methods in Enzymology 153:516-544.

#### **Гибридизация нуклеиновых кислот**

Сравнительную гибридизацию можно использовать для идентификации нуклеиновых кислот (например, SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5) по изобретению, включая консервативные изменения нуклеиновых кислот по изобретению. Этот способ сравнительной гибридизации представляет собой предпочтительный способ распознавания нуклеиновых кислот по изобретению. Кроме того, целевые нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются с нуклеиновыми кислотами, которые представлены, например, теми, что приведены в настоящем документе, в условиях с высокой, сверхвысокой и сверхсверхвысокой жесткостью представляют собой признаки по изобретению. Примеры таких нуклеиновых кислот включают нуклеиновые кислоты с одной или несколькими молчащими или консервативными заменами нуклеиновых кислот по сравнению с данной последовательностью нуклеиновой кислоты.

Считается, что тестовая целевая нуклеиновая кислота специфически гибридизуется с зондовой нуклеиновой кислотой, когда она с зондом гибридизуется по меньшей мере на половину так же хорошо, как и с идеально совпадающей комплементарной мишенью, т.е. при отношении сигнала к шуму, равном по меньшей мере половине отношения при гибридизации зонда и мишени в условиях, в которых идеально совпадающий зонд связывается с идеально совпадающей комплементарной мишенью при отношении сигнала к шуму, которое по меньшей мере приблизительно в 5-10 раз выше, чем наблюдают при гибридизации любых неподходящих целевых нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты «гибридизуются», когда они связываются, обычно в растворе. Нуклеиновые кислоты гибридизуются благодаря различным хорошо описанным физико-химическим силам, таким как образование водородных связей, вытеснение растворителя, укладка оснований в стопку и т.п. Многочисленные протоколы для гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известны в данной области. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2, «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays», (Elsevier,



New York), а также в Ausubel, Sambrook, and Berger and Kimmel, ниже. В Hames and Higgins (1995) Gene Probes 1 IRL Press в Oxford University Press, Oxford, England, (Hames and Higgins 1) и Hames and Higgins (1995) Gene Probes 2 IRL Press в Oxford University Press, Oxford, England (Hames and Higgins 2) приведены подробности о синтезе, мечении, обнаружении и определении количества ДНК и РНК, включая олигонуклеотиды.

Пример жестких условий гибридизации для гибридизации комплементарных нуклеиновых кислот, которые содержат более 100 комплементарных остатков, на фильтре в Саузерн- или нозерн-блоттинге представляет собой 50% формалина с 1 мг гепарина при температуре 42°C, при этом гибридизацию проводят в течение ночи.

Пример жестких условий отмывания содержит отмывание в 0,2×SSC при температуре 65°C в течение 15 минут (описание буфера SSC и других параметров гибридизации нуклеиновых кислот см. в Sambrook, ниже). Часто отмыванию в условиях высокой жесткости предшествует отмывание в условиях низкой жесткости для удаления фонового сигнала зонда. Пример отмывания в условиях низкой жесткости представляет собой 2×SSC при температуре 40°C в течение 15 минут. В основном, 5-кратное (или выше) отношение сигнала к шуму по сравнению с наблюдаемым для несвязанного зонда в анализе специфической гибридизации указывает на определение специфической гибридизации.

После гибридизации негибридизованные нуклеиновые кислоты можно удалить посредством серии отмываний, жесткость которых можно корректировать в зависимости от желаемого результата. Условия отмывания низкой жесткости (например, с использованием более высокой концентрации соли и более низкой температуры) увеличивают чувствительность, но могут давать сигналы неспецифической гибридизации и сильные фоновые сигналы. Условия более высокой жесткости (например, с использованием более низкой концентрации соли и более высокой температуры, которая ближе к  $T_m$ ) снижает фоновый сигнал, обычно с сохранением главным образом специфического сигнала. Также см. Rapley, R. and Walker, J.M. eds., Molecular Biomethods Handbook (Humana Press, Inc. 1998).

«Жесткие условия отмывания при гибридизации» в контексте экспериментов по гибридизации нуклеиновых кислот, таких как гибридизация по Саузерну и нозерну, зависят от последовательности и различаются при различных параметрах среды. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в Tijssen (1993), выше, и в Hames and Higgins, 1 и 2. Жесткие условия гибридизации и отмывания можно легко определить эмпирическим путем для любой тестовой нуклеиновой кислоты. Например, при определении условий высокой жесткости гибридизации и отмывания, условия гибридизации и отмывания постепенно повышают (например, повышая температуру, снижая концентрацию соли, повышая концентрацию детергента и/или понижая концентрацию органических растворителей, таких как формалин, в гибридизации или отмывании), пока они не будут отвечать выбранному набору критериев. Например, условия гибридизации и отмывания постепенно повышают до тех пор, пока зонд связывается с идеально совпадающей комплементарной мишенью при отношении сигнала к шуму, которое по меньшей мере в 5 раз превышает наблюдаемое для гибридизации зонда с несовпадающей мишенью.

В основном, отношение сигнала к шуму, по меньшей мере в 2 раза (или выше, например, по меньшей мере в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз или более) превышающее наблюдаемое для неродственного зонда в анализе специфической гибридизации, указывает на определение специфической гибридизации. Определение по меньшей мере строгой гибридизации между двумя последовательностями в контексте

настоящего изобретения указывает на относительно сильное структурное сходство, например, с нуклеиновыми кислотами по настоящему изобретению, предоставленными в списках последовательностей в настоящем документе.

«Очень жесткие» условия выбирают равными температуре плавления ( $T_m$ ) для конкретного зонда.  $T_m$  представляет собой температуру (при определенных ионной силе и pH), при которой 50% тестовой последовательности гибридизуется с идеально совпадающим зондом. Для целей настоящего изобретения, как правило, условия высокой жесткости гибридизации и отмывания выбирают приблизительно на 5°C ниже  $T_m$  для конкретной последовательности при определенных ионной силе и pH (как указано ниже, на условия высокой жесткости также можно ссылаться в сравнительных терминах). Целевые последовательности, которые имеют близкое родство или идентичны нуклеотидной последовательности, представляющей интерес (например, «зонду»), можно идентифицировать в жестких условиях или условиях высокой жесткости. Условия более низкой жесткости соответствуют менее комплементарным последовательностям.

Условиями гибридизации и отмывания «сверхвысокой жесткости» являются те, в которых жесткость условий гибридизации и отмывания повышают до тех пор, пока отношение сигнала к шуму для связывания зонда с идеально совпадающей комплементарной целевой нуклеиновой кислотой не превысит по меньшей мере в 10 раз наблюдаемое для гибридизации с любыми несовпадающими целевыми нуклеиновыми кислотами. Считается, что целевая нуклеиновая кислота, которая гибридизуется с зондом в таких условиях, при отношении сигнала к шуму, по меньшей мере равном половине от наблюдаемого для идеально совпадающей комплементарной целевой нуклеиновой кислоты, связывается с зондом в условиях сверхвысокой жесткости.

При определении жестких условий или условий высокой жесткости гибридизации (или даже более строгой гибридизации) и отмывания, условия гибридизации и отмывания постепенно повышают (например, повышая температуру, снижая концентрацию соли, повышая концентрацию детергента и/или повышая концентрацию органических растворителей, таких как формамид, при гибридизации или отмывании), пока они не будут отвечать выбранному набору критериев. Например, по желанию, условия гибридизации и отмывания постепенно повышают до тех пор, пока зонд, содержащий одну или несколько полинуклеотидных последовательностей по изобретению, например, последовательности или уникальные подпоследовательности, выбранные из приведенных в настоящем документе (например, SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатки 89-1063 SEQ ID NO:1, остатки 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатки 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатки 1063-1728 SEQ ID NO:5) и/или комплементарных полинуклеотидных последовательностей, связывается с идеально совпадающей комплементарной мишенью (также нуклеиновая кислота содержит одну или несколько последовательностей или подпоследовательностей нуклеиновых кислот, выбранных из приведенных в настоящем документе и/или их комплементарных полинуклеотидных последовательностей), при отношении сигнала к шуму, которое по меньшей мере в 2 раза (и необязательно в 5 раз, в 10 раз или в 100 раз или более) превышает наблюдаемое для гибридизации зонда с несовпадающей мишенью (например, с полинуклеотидной последовательностью, содержащей одну или несколько последовательностей или подпоследовательностей, выбранных из известных последовательностей гриппа, присутствующих в публичных базах данных, таких как GenBank, на момент подачи, и/или их комплементарных полинуклеотидных последовательностей).

Используя полинуклеотиды по изобретению или их подпоследовательности, можно

получить новые целевые нуклеиновые кислоты; такие целевые нуклеиновые кислоты также являются признаком изобретения. Например, такие целевые нуклеиновые кислоты содержат последовательности, которые гибридизуются при жестких условиях с уникальным олигонуклеотидным зондом, соответствующим любому полинуклеотиду по изобретению, например, SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остаткам 89-1063 SEQ ID NO:1, остаткам 1064-1729 SEQ ID NO:1, остаткам 88-1062 SEQ ID NO:5 и остаткам 1063-1728 SEQ ID NO:5).

Аналогичным образом можно определить даже более высокие уровни жесткости посредством постепенного повышения условий гибридизации и/или отмывания рассматриваемого анализа гибридизации. Например, где жесткость условий гибридизации и отмывания повышают до тех пор, пока отношение сигнала к шуму для связывания зонда с идеально совпадающей комплементарной целевой нуклеиновой кислотой не превысит по меньшей мере в 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или 500 раз или более по сравнению с наблюдаемым для гибридизации с любыми несовпадающими целевыми нуклеиновыми кислотами. Конкретный сигнал будет зависеть от метки, использованной в рассматриваемом анализе, например, флуоресцентной метки, колориметрической метки, радиоактивной метки или т.п. Считается, что указанная нуклеиновая кислота, которая гибридизуется с зондом в таких условиях при отношении сигнала к шуму, равном по меньшей мере половине от идеально совпадающей комплементарной целевой нуклеиновой кислоты, связывается с зондом при условиях сверхсверхвысокой жесткости и также является признаком изобретения.

Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизуются друг с другом при жестких условиях, все еще являются по существу идентичными, если полипептиды, которые они кодируют, по существу идентичны. Это происходит, например, когда копию нуклеиновой кислоты создают с использованием максимальной вырожденности кодонов, допускаемой генетическим кодом.

#### **Клонирование, мутагенез и экспрессия биологических молекул, представляющих интерес**

Основные тексты, в которых описаны молекулярно-биологические способы, которые применимы к настоящему изобретению, такие как клонирование, мутация, культура клеток и т.п., включают Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2000 («Sambrook») и Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместное предприятие между Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (дополняли по 2002) («Ausubel»). В этих текстах описаны мутагенез, использование векторов, промоторов и многие другие рассматриваемые темы, связанные, например, с созданием молекул НА и/или NA и т.д.

Различные типы мутагенеза необязательно используют в настоящем изобретении, например, для получения и/или выделения, например, новых или вновь выделенных молекул НА и/или NA и/или для дальнейшей модификации/мутации полипептидов (например, молекул НА и NA, как в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатках 16-340 SEQ ID NO:2, остатках 341-562 SEQ ID NO:2, остатках 16-340 SEQ ID NO:6 и остатках 341-562 SEQ ID NO:6) по изобретению. Они включают в качестве неограничивающих примеров сайт-специфичный, случайный точечный мутагенез, гомологичную рекомбинацию (перетасовка ДНК), мутагенез с использованием урацилсодержащих матриц, олигонуклеотид-специфичный мутагенез, мутагенез модифицированной фосфоротиоатом ДНК, мутагенез с использованием двухнитевой ДНК с пропусками или т.п. Дополнительные подходящие способы включают точечную репарацию ошибочно

спаренных оснований, мутагенез с использованием штаммов-хозяев с недостаточностью репарации, рестрикцию-селекцию и рестрикцию-очистку, делеционный мутагенез, мутагенез посредством синтеза целого гена, репарацию двунитевых разрывов и т.п. Мутагенез, например, включающий химерные конструкции, также входит в настоящее изобретение. В одном из вариантов осуществления мутагенез можно направлять посредством известной информации о встречающейся в природе молекуле или измененной или мутировавшей встречающейся в природе молекуле, например, о последовательности, сравнениях последовательностей, физических свойствах, кристаллической структуре или т.п.

Эти процедуры описаны в указанных выше текстах и примерах, приведенных в настоящем документе, а также в следующих публикациях (и процитированных в них источниках): Sieber, et al., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); Ling et al., *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*, *Anal Biochem* 254(2):157-178 (1997); Dale et al., *Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method*, *Methods Mol Biol* 57:369-374 (1996); I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res* 23, 3067-8 (1995); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); Arnold, *Protein engineering for unusual environments*, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Bass et al., *Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities*, *Science* 242:240-245 (1988); Fritz et al., *Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro*, *Nucl Acids Res* 16:6987-6999 (1988); Kramer et al., *Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations*, *Nucl Acids Res* 16:7207 (1988); Sakamar and Khorana, *Total synthesis and expression of a gene for the a-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)*, *Nucl Acids Res* 14:6361-6372 (1988); Sayers et al., *Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl Acids Res* 16:791-802 (1988); Sayers et al., *Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide*, (1988) *Nucl Acids Res* 16:803-814; Carter, *Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors*, *Methods in Enzymol* 154:382-403 (1987); Kramer & Fritz *Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA*, *Methods in Enzymol* 154:350-367 (1987); Kunkel, *The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis*, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J, eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel et al., *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Methods in Enzymol* 154, 367-382 (1987); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template*, *Methods in Enzymol* 154:329-350 (1987); Carter, *Site-directed mutagenesis*, *Biochem J* 237:1-7 (1986); Eghtedarzadeh & Henikoff, *Use of oligonucleotides to generate large deletions*, *Nucl Acids Res* 14: 5115 (1986); Mandecki, *Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:7177-7181 (1986); Nakamaye & Eckstein, *Inhibition of restriction endonuclease NciI cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl Acids Res* 14:9679-9698 (1986); Wells et al., *Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin*, *Phil Trans R Soc Lond A* 317:415-423 (1986); Botstein & Shortle, *Strategies and applications of in vitro mutagenesis*, *Science* 229: 1193- 1201(1985); Carter et al., *Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors*, *Nucl Acids Res* 13:4431-4443 (1985); Grundström et al., *Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis*, *Nucl Acids Res* 13:3305-3316(1985); Kunkel, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:488-492 (1985); Smith, *In vitro mutagenesis*, *Ann Rev Genet* 19:423-462(1985); Taylor

et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, Nucl Acids Res 13:8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, Nucl Acids Res 13:8765-8787 (1985); Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985); Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, Nucl Acids Res 12:9441-9456 (1984); Kramer et al., Point Mismatch Repair, Cell 38:879-887 (1984); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223: 1299-1301 (1984); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into MB vectors, Methods in Enzymol 100:468-500 (1983); and Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, Nucl Acids Res 10:6487-6500 (1982).  
Дополнительные подробности относительно многих указанных выше способов можно найти в Methods in Enzymol Volume 154, в котором также описаны эффективные способы контроля для устранения проблем, связанных с различными способами мутагенеза, выделения, экспрессии генов и другими способами.

Олигонуклеотиды, например, для использования в мутагенезе по настоящему изобретению, например, мутирующие библиотеки молекул НА и/или НА по изобретению, или для изменения таковых, обычно синтезируют химически в соответствии с твердофазным фосфоамидитным трехэфирным способом, описанным в публикации Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letts 22(20):1859-1862, (1981), например, с использованием автоматизированного синтезатора, как описано в Needham-VanDevanter et al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984).

Кроме того, по существу любой полинуклеотид может быть специальным или стандартным заказанным из любого из множества коммерческих источников, таких как The Midland Certified Reagent Company (mrc@oligos(dot)com), The Great American Gene Company (www(dot)genco(dot)com), ExpressGen Inc. (www(dot)expressgen(dot)com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) и многие другие. Аналогичным образом, пептиды и антитела могут быть специально заказаны из любого из множества источников, таких как PeptidoGenic (доступен по адресу pkim@ccnet(dot)com), HTI Bioproducts, Inc. (www(dot)htibio(dot)com), BMA Biomedicals Ltd. (U.K.), Bio. Synthesis, Inc. и многие другие.

Настоящее изобретение также относится к клеткам- и организмам-хозяевам, содержащим молекулу НА и/или НА или другой полипептид и/или полинуклеотид по изобретению, например, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, остатки 89-1063 SEQ ID NO: 1, остатки 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатки 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатки 1063-1728 SEQ ID NO:5. Клетки-хозяева конструируют генетически (например, трансформируют, трансдуцируют или трансфицируют) с использованием векторов по данному изобретению, которые могут представлять собой, например, вектор клонирования или вектор экспрессии. Вектор может быть, например, в форме плазмиды, бактерии, вируса, оголенного полинуклеотида или конъюгированного полинуклеотида. Векторы вводят в клетки и/или микроорганизмы стандартными способами, включающими электропорацию (см., From et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 5824 (1985), инфицирование вирусными векторами, высокоскоростную баллистическую пенетрацию малыми частицами с нуклеиновой кислотой или внутри матрицы малых бусин или частиц или на поверхности (Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)). В Berger, Sambrook, and Ausubel приведено множество соответствующих способов трансформации. См. выше.

Доступно несколько хорошо известных способов введения целевых нуклеиновых кислот в бактериальные клетки, любой из которых можно использовать в настоящем

изобретении. Они включают: слияние клеток-реципиентов с бактериальными протопластами, содержащими ДНК, электропорацию, бомбардировку снарядами и инфицирование вирусными векторами и т.д. Бактериальные клетки можно использовать для амплификации плазмид, содержащих ДНК конструкции по данному изобретению.

5 Бактерии выращивают до лог-фазы, а плазмиды в бактериях можно выделить множеством известных в данной области способов (см., например, Sambrook). Кроме того, в изобилии коммерчески доступны наборы для очистки плазмид от бактерий, (см., например, EasyPrep™, FlexiPrep™, оба из Pharmacia Biotech; StrataClean™, из Stratagene; и, QIAprep™ из Qiagen). Выделенными и очищенными плазмидами затем  
10 дополнительно манипулируют для получения других плазмид, которые используют для трансфекции клеток или встраивают в родственные векторы для инфицирования организмов. Типичные векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации транскрипции и трансляции и промоторы, которые можно использовать для регуляции экспрессии конкретной целевой нуклеиновой  
15 кислоты. Векторы необязательно содержат универсальные экспрессирующие кассеты, содержащие по меньшей мере одну независимую последовательность терминатора, последовательности, допускающие репликацию кассеты у эукариотов или прокариотов или у тех и других (например, челночные векторы) и маркеры селекции как для прокариотических, так и для эукариотических систем. Векторы подходят для репликации  
20 и интеграции у прокариотов, эукариотов или необязательно у тех и других. См. Gilman & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, et al., Nature. 328:731 (1987); Schneider, B., et al., Protein Expr Purif 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (все выше). Каталог бактерий и бактериофагов, которые можно использовать для клонирования, предоставляет, например, ATCC, например, ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna  
25 et al. (eds.), который опубликован в ATCC. Дополнительные базовые процедуры для секвенирования, клонирования и другие аспекты молекулярной биологии и подлежащие теоретические соображения также можно найти в Watson et al. (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY. См. выше. Дополнительные векторы, которые можно использовать с последовательностями, приведенными в настоящем  
30 документе, проиллюстрированы выше в разделе, относящемся к получению вируса гриппа для вакцин, и цитируемых в нем ссылок.

#### **Получение и сбор полипептидов**

После трансдукции подходящей клеточной линии- или штамма-хозяина и роста клеток-хозяев до соответствующей плотности клеток, выбранный промотор индуцируют  
35 соответствующими средствами (например, температурным сдвигом или химическим индуктором) и культивируют клетки в течение дополнительного периода. Затем в некоторых вариантах осуществления секретируемый полипептидный продукт, например, полипептид НА и/или NA, как в форме секретируемого слитого белка, и т.д., собирают из среды для культивирования. В других вариантах осуществления из клетки получают  
40 вирусную частицу, содержащую полипептид НА и/или NA по изобретению.

Альтернативно клетки можно собирать посредством центрифугирования, разрушать физическими или химическими средствами, и полученный неочищенный экстракт  
сохранять для дальнейшей очистки. Эукариотические или микробные клетки, используемые в экспрессии белков, можно разрушать любым удобным способом,  
45 включая периодическое повторение замораживания-оттаивания, обработку звуком, механическое разрушение или использование средств, лизирующих клетки, или другие способы, которые хорошо известны специалистам в данной области. Дополнительно клетки, экспрессирующие полипептидный продукт НА и/или NA по изобретению, можно

использовать без отделения полипептида от клетки. В таких случаях полипептид по изобретению необязательно экспрессируют на поверхности клетки и, таким образом, исследуют (например, имея молекулы НА и/или NA (или их фрагменты, например, содержащие слитые белки или т.п.) на связанные с поверхностью клетки антитела, и

5 т.д. Такие клетки также являются признаками изобретения.

Экспрессируемые полипептиды можно собирать и очищать от культур рекомбинантных клеток любым из множества способов, хорошо известных в данной области, включая преципитацию сульфатом аммония или этанолом, экстрагирование кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на

10 фосфоцеллюлозе, хроматографию гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию (например, с использованием любой системы мечения, известной специалистам в данной области), хроматографию на гидроксипатите и хроматографию с лектином. При завершении конфигурации зрелого белка по желанию можно использовать стадии повторной укладки белков. Также можно использовать

15 высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на конечных стадиях очистки. В дополнение к указанным в настоящем документе источникам, множество способов очистки хорошо известны в данной области, включая, например, приведенные в Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; and Bollag et al. (1996) *Protein Methods*. 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana

20 Press, NJ, Harris and Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and Angal *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3rd Edition Springer Verlag, NY; Janson and Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, Second Edition Wiley-VCH, NY; and

25 Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ.

Когда экспрессируемые полипептиды по изобретению получают в вирусах, вирусы обычно собирают из среды для культивирования, в которой росли инфицированные (трансфицированные) клетки. Обычно неочищенную среду осветляют перед

30 концентрированием вирусов гриппа. Некоторые способы включают ультрафильтрацию, адсорбцию на сульфате бария и элюирование, и центрифугирование. Например, неочищенную среду от инфицированных культур можно сначала осветлить посредством центрифугирования, например, на скорости 1000-2000×g в течение периода времени, достаточного для удаления клеточного дебриса и других крупных твердых частиц, например, от 10 до 30 минут. Затем супернатант осветленной среды необязательно

35 центрифугируют для осаждения вируса гриппа, например, на скорости 15000×g, в течение приблизительно 3-5 часов. После ресуспендирования вирусного осадка в соответствующем буфере, таком как STE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,0001 M ЭДТА) или фосфатно-солевой буфер (PBS) при pH 7,4, вирус концентрируют центрифугированием в градиенте плотности на сахарозе (60%-12%) или тартрате калия

40 (50%-10%). Подходят непрерывные или ступенчатые градиенты, например, градиент сахарозы от 12% до 60% четырьмя ступенями по 12%. Градиенты центрифугируют на скорости и в течение времени, достаточных для концентрирования вирусов в видимой полосе для сбора. Альтернативно и для большинства крупномасштабных коммерческих применений вирус элюируют из градиентов плотности с использованием ротора

45 зональной центрифуги, работающего в непрерывном режиме. Дополнительные подробности, достаточные для того, чтобы направлять специалиста в получении вирусов гриппа из культуры ткани, предоставлены, например, в Furminger. *Vaccine Production*, in Nicholson et al. (eds.) *Textbook of Influenza* pp. 324-332; Merten et al. (1996) *Production of*

influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, in Cohen & Shafferman (eds.) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines pp. 141-151, и патент США № 5690937. При желании, собранный вирус можно хранить при -80°C в присутствии сахарозы-фосфата-глутамата (SPG) в качестве стабилизатора.

- 5 Альтернативно можно использовать бесклеточные системы транскрипции/трансляции для получения полипептидов, содержащих аминокислотную последовательность или подпоследовательность, например, из последовательностей, приведенных в настоящем документе, таких как SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ ID NO:6, или
- 10 кодируемых полинуклеотидными последовательностями по изобретению, например, SEQ ID NO: SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, остатками 89-1063 SEQ ID NO:1, остатками 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатками 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатками 1063-1728 SEQ ID NO:5. Коммерчески доступно множество подходящих систем транскрипции и трансляции *in vitro*. Общее руководство по протоколам транскрипции и трансляции *in vitro* приведено
- 15 в Tymms (1995) In vitro Transcription and Translation Protocols: Methods in Molecular Biology Volume 37, Garland Publishing, NY.

- Кроме того, полипептиды или их подпоследовательности, например, подпоследовательности, содержащие антигенные пептиды, можно получать вручную или используя автоматизированную систему, посредством прямого синтеза пептидов
- 20 с использованием твердофазных способов (см. Stewart et al. (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco; Merrifield J (1963) J Am Chem Soc 85:2149-2154). Образцовые автоматизированные системы включают Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City, CA). При желании, подпоследовательности можно синтезировать химически по отдельности и объединять с использованием химических
- 25 способов, чтобы предоставить полноразмерные полипептиды.

#### **Модифицированные аминокислоты**

- Экспрессируемые полипептиды по изобретению могут содержать одну или несколько модифицированных аминокислот. Присутствие модифицированных аминокислот может быть полезным, например, для (а) увеличения времени полужизни полипептида в
- 30 сыворотке, (b) ослабления/усиления антигенности полипептида, (с) повышения устойчивости полипептида при хранении и т.д. Аминокислоту(ы) модифицируют, например, одновременно с трансляцией или после трансляции во время получения рекомбинанта (например, N-связанное гликозилирование по мотивам N-X-S/T во время экспрессии в клетках млекопитающих), или модифицируют посредством синтеза
- 35 (например, через пэгилирование).

- Неограничивающие примеры модифицированных аминокислот включают гликозилированные аминокислоты, сульфатированные аминокислоты, пренилированные (например, фарнезилированные, геранилгеранилированные) аминокислоты, ацетилированные аминокислоты, ацилированные аминокислоты, пэгилированные
- 40 аминокислоты, биотинилированные аминокислоты, карбоксилированные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты и т.п., а также аминокислоты, модифицированные конъюгацией, например, с фрагментами липидов или другими средствами, образующими производные. Источники, достаточные для того, чтобы направлять специалиста в модификации аминокислот, часто встречаются повсеместно в литературе. Образцы
- 45 протоколов приведены в Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Human Press, Towata, NJ.

#### **Слитые белки**

Настоящее изобретение также относится к слитым белкам, содержащим



последовательности по изобретению (например, кодирующие полипептиды НА и/или NA, как представлено в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатках 16-340 SEQ ID NO:2, остатках 341-562 SEQ ID NO:2, остатках 16-340 SEQ ID NO:6 и остатках 341-562 SEQ ID NO:6) или их фрагменты, слитые, например, с иммуноглобулинами (или их частями),  
 5 последовательностями, которые кодируют, например, GFP (зеленый флуоресцентный белок), или другие схожие маркеры, и т.д. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют такие слитые белки, представляют собой другой аспект изобретения. Слитые белки по изобретению необязательно используют, например, в сходных применениях (включая, например, терапевтическое, профилактическое, диагностическое,  
 10 экспериментальное и т.д. применения, как описано в настоящем документе) в качестве неслитых белков по изобретению. В дополнение к слиянию с последовательностями иммуноглобулинов и последовательностями маркеров, белки по изобретению также необязательно сливают, например, с последовательностями, которые позволяют сортировать слитые белки и/или нацеливать слитые белки на конкретные типы клеток,  
 15 области и т.д.

### **Антитела**

Полипептиды по изобретению можно использовать для получения антител, специфичных к полипептидам, приведенным в настоящем документе, и/или к полипептидам, кодируемым полинуклеотидами по изобретению, например,  
 20 представленными в настоящем документе, и их консервативными вариантами. Антитела, специфичные к указанным выше полипептидам, можно использовать, например, для диагностических и терапевтических целей, например, связанных с активностью, распределением и экспрессией целевых полипептидов.

Антитела, специфичные к полипептидам по изобретению, можно получать способами, хорошо известными в данной области. Такие антитела могут включать в качестве неограничивающих примеров поликлональные, моноклональные, химерные, гуманизированные, одноцепочечные, Fab-фрагменты и фрагменты, полученные посредством экспрессионной библиотеки Fab.

Для получения антител не требуются полипептиды с биологической активностью (например, не требуется полноразмерный функциональный гемагглютинин или нейраминидаза). Однако полипептид или олигопептид должен быть антигенным. Пептиды, использованные для того, чтобы индуцировать специфические антитела, обычно имеют аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере приблизительно 4 аминокислоты, и часто по меньшей мере 5 или 10 аминокислот.  
 35 Можно слить короткие фрагменты полипептида с другим белком, таким как гемоцианин морского блюдца, и получать антитело против химерной молекулы.

Многочисленные способы получения поликлональных и моноклональных антител известны специалистам в данной области, и их можно адаптировать для получения антител, специфичных к полипептидам по изобретению и/или кодируемым  
 40 полинуклеотидными последовательностями по изобретению, и т.д. См., например, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; Paul (ed.) (1998) *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, Lippincott-Raven, Lippincott Williams & Wilkins; Harlow and Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, и процитированные в них источники; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed.) Academic Press, New York, NY; и Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497. Другие подходящие способы получения антител включают отбор библиотек рекомбинантных антител в фаговых или схожих векторах. См., Huse et al. (1989) *Science*

246:1275-1281; и Ward, et al. (1989) Nature 341:544-546. Специфичные моноклональные и поликлональные антитела и антисыворотки обычно будут связываться с  $K_D$ , например, по меньшей мере приблизительно 0,1 мкМ, по меньшей мере приблизительно 0,01 мкМ или лучше и обычно и по меньшей мере приблизительно 0,001 мкМ или лучше.

Для определенных терапевтических применений желательны гуманизированные антитела. Подробные способы получения химерных (гуманизированных) антитела можно найти в патенте США № 5482856. Дополнительные подробности относительно гуманизации и других способов получения и конструирования антител можно найти в Borrebaeck (ed.) (1995) Antibody Engineering, 2nd Edition Freeman and Company, NY (Borrebaeck); McCafferty et al. (1996) Antibody Engineering, A Practical Approach IRL at Oxford Press, Oxford, England (McCafferty), and Paul (1995) Antibody Engineering Protocols Humana Press, Towata, NJ (Paul). Дополнительные подробности относительно конкретных процедур можно найти, например, в Ostberg et al. (1983), Hybridoma 2:361-367, Ostberg, патент США № 4634664 и Engelman et al., патент США № 4634666.

#### **Определение полипептидов посредством иммунологической реактивности**

Поскольку полипептиды по изобретению предоставляют множество новых полипептидных последовательностей (например, содержащих молекулы НА и NA), полипептиды также обеспечивают новые структурные признаки, которые можно распознать, например, в иммунологических анализах. Получение антисывороток, которые специфически связывают полипептиды по изобретению, а также полипептиды, связываемые такими антисыворотками, являются признаками изобретения.

Например, изобретение содержит полипептиды (например, молекулы НА и NA), которые специфически связываются или обладают специфической иммунологической реактивностью с антителом или антисыворотками, созданными против иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из одной или нескольких последовательностей, приведенных в настоящем документе (например, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ ID NO:6), и т.д. Чтобы устранить перекрестную реактивность с другими гомологами, антитело или антисыворотки обедняют с использованием молекул НА и/или NA, найденных в публичных базах данных на момент подачи, например, «контрольного» полипептида(ов). Когда другие контрольные последовательности соответствуют нуклеиновой кислоте, полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой, создают и используют для целей обеднения антитела/антисывороток.

В одном обычном формате в иммунологическом анализе используют поликлональную антисыворотку, которую индуцировали против одного или нескольких полипептидов, содержащих одну или несколько последовательностей, соответствующих последовательностям, приведенным в настоящем документе (например, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатки 16-340 SEQ ID NO:2, остатки 341-562 SEQ ID NO:2, остатки 16-340 SEQ ID NO:6 и остатки 341-562 SEQ ID NO:6), и т.д., или их существенных подпоследовательностей (т.е., по меньшей мере приблизительно 30% от предоставленной полноразмерной последовательности). Набор потенциальных полипептидных иммуногенов, полученных из данных последовательностей, в совокупности называют ниже как «иммуногенные полипептиды». Полученные антисыворотки необязательно отбирают по наличию низкой перекрестной реактивности против контрольных гомологов гемагглютинаина и/или нейраминидазы, и любую такую перекрестную реактивность удаляют, например, иммуноабсорбцией, с использованием одного или нескольких контрольных гомологов гемагглютинаина и нейраминидазы, перед

использованием поликлональной антисыворотки в иммунологическом анализе.

Для того чтобы получить антисыворотки для использования в иммунологическом анализе, один или несколько иммуногенных полипептидов получают и очищают, как описано в настоящем документе. Например, рекомбинантный белок можно получить в рекомбинантной клетке. Мышей инбредной линии (используемой в данном анализе по причине большей воспроизводимости результатов вследствие фактической генетической идентичности мышей) иммунизируют иммуногенным белком(ами) в сочетании со стандартным адъювантом, таким как адъювант Фрейнда, и используя стандартный протокол иммунизации мышей (стандартное описание создания антитела, формат иммунологического анализа и условий, которые можно использовать для определения специфической иммунологической реактивности, см., например, в Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York). Дополнительные источники и обсуждение антител также можно найти в настоящем документе и применять для определения полипептидов посредством иммунологической реактивности. Альтернативно один или несколько синтетических или рекомбинантных полипептидов, полученных из последовательностей, описываемых в настоящем документе, конъюгируют с белком-носителем и используют в качестве иммуногена.

Поликлональные сыворотки собирают и титруют против иммуногенного полипептида в иммунологическом анализе, например, твердофазном иммунологическом анализе с одним или несколькими иммуногенными белками, иммобилизованными на твердой подложке. Поликлональные антисыворотки с титром  $10^6$  или более выбирают, объединяют и обедняют с использованием контрольных полипептидов гемагглютинаина и/или нейраминидазы для получения обедненных объединенных титрованных поликлональных антисывороток.

Обедненные объединенные титрованные поликлональные антисыворотки тестируют на перекрестную реактивность против контрольного гомолога(ов) в сравнительном иммунологическом анализе. В этом сравнительном анализе разграничивающие условия связывания определяют для обедненных титрованных поликлональных антисывороток, которые дают в результате по меньшей мере приблизительно в 5-10 раз более высокое отношение сигнала к шуму для связывания титрованных поликлональных антисывороток с иммуногенными полипептидами по сравнению со связыванием с контрольными гомологами. То есть, жесткость реакции связывания корректируют добавлением неспецифических конкурентов, таких как альбумин или обезжиренное сухое молоко, и/или посредством коррекции концентрации соли, температуры и/или т.п. Эти условия связывания используют в последующем анализе для определения специфичности связывания тестового полипептида (полипептида, который сравнивают с иммуногенными полипептидами и/или контрольными полипептидами) объединенными обедненными поликлональными антисыворотками. В частности, тестовые полипептиды, которые при разграничивающих условиях связывания проявляют по меньшей мере в 2-5 раз более высокое отношение сигнала к шуму, чем контрольные рецепторные гомологи, и по меньшей мере приблизительно  $\frac{1}{2}$  отношения сигнала к шуму по сравнению с иммуногенным полипептидом(ами), обладают значительным структурным сходством с иммуногенным полипептидом по сравнению с известным рецептором, и т.д., и следовательно представляют собой полипептиды по изобретению.

В другом примере иммунологические анализы в формате конкурентного связывания используют для определения тестового полипептида. Например, как отмечено, антитела с перекрестной реактивностью удаляют из смеси объединенных антисывороток посредством иммуноабсорбции с использованием контрольных полипептидов. Затем

иммуногенный полипептид(ы) иммобилизуют на твердой подложке, которую подвергают воздействию обедненных объединенных антисывороток. Тестовые белки добавляют в анализ, чтобы они конкурировали за связывание с объединенными обедненными антисыворотками. Способность тестового белка(ов) конкурировать за связывание с объединенными обедненными антисыворотками по сравнению с иммобилизованным белком(ами) сравнивают со способностью иммуногенного полипептида(ов), добавленного в анализ, конкурировать за связывание (иммуногенные полипептиды эффективно конкурируют с иммобилизованными иммуногенными полипептидами за связывание с объединенными антисыворотками). Процент перекрестной реактивности для тестовых белков вычисляют с использованием стандартных вычислений.

В параллельном анализе способность контрольного белка(ов) конкурировать за связывание с объединенными обедненными антисыворотками необязательно определяют по сравнению со способностью иммуногенного полипептида(ов) конкурировать за связывание с антисыворотками. Кроме того, вычисляют процент перекрестной реактивности для контрольного полипептида(ов), используя стандартные вычисления. Когда процент перекрестной реактивности по меньшей мере в 5-10 раз выше для тестовых полипептидов по сравнению с контрольным полипептидом(ами) и/или когда связывание тестовых полипептидов находится приблизительно в диапазоне связывания иммуногенных полипептидов, тестовые полипептиды считают специфически связывающимися с объединенными обедненными антисыворотками.

В основном, иммуноабсорбированные и объединенные антисыворотки можно использовать в иммунологическом анализе конкурентного связывания, как описано в настоящем документе, чтобы сравнить любой тестовый полипептид с иммуногенным и/или контрольным полипептидом(ами). Для того чтобы выполнить это сравнение, иммуногенный, тестовый и контрольный полипептиды анализируют в широком диапазоне концентраций и определяют количество каждого полипептида, необходимое для ингибирования 50% связывания обедненных антисывороток, например, с иммобилизованным контрольным, тестовым или иммуногенным белком, с использованием стандартных способов. Если количество тестового полипептида, необходимого для связывания в конкурентном анализе, равно менее чем двойному количеству иммуногенного полипептида, которое необходимо, то тестовый полипептид считают специфически связывающимся с антителом, полученным против иммуногенного белка, при условии, что количество по меньшей мере приблизительно в 5-10 раз выше количества контрольного полипептида.

В качестве дополнительного определения специфичности, объединенные антисыворотки необязательно полностью иммуносорбируют с использованием иммуногенного полипептида(ов) (а не контрольного полипептида(ов)) до тех пор, пока обнаруживают небольшое связывание или отсутствие связывания полученных обедненных иммуногенным полипептидом объединенных антисывороток с иммуногенным полипептидом(ами), использованным в иммуносорбции. Затем эти полностью иммуносорбированные антисыворотки тестируют на реактивность с тестовым полипептидом. Если наблюдают небольшую реактивность или отсутствие реактивности (т.е. не более чем 2х отношение сигнала к шуму, наблюдаемое для связывания полностью иммуносорбированных антисывороток с иммуногенным полипептидом), то тестовый полипептид специфически связан антисыворотками, индуцированными иммуногенным белком.

**Варианты нуклеиновых кислот и полипептидных последовательностей**

Как описано в настоящем документе, изобретение относится к полинуклеотидным последовательностям нуклеиновых кислот и аминокислотным последовательностям полипептидов, например, к последовательностям гемагглютинаина и нейраминидазы, и, например, к композициям и способам, содержащим указанные последовательности.

Примеры указанных последовательностей описаны в настоящем документе (например, SEQ ID NO:1-8). Однако специалист в данной области примет во внимание, что изобретение не обязательно ограничено этими последовательностями, описываемыми в настоящем документе, и что настоящее изобретение также относится ко многим родственным и неродственным последовательностям с функциями, описанными в настоящем документе, например, кодирующим молекулу НА и/или NA.

Специалист также примет во внимание, что многие варианты описанных последовательностей включены в изобретение. Например, консервативные изменения описанных последовательностей, которые дают функционально идентичную последовательность, включены в изобретение. Варианты полинуклеотидных последовательностей нуклеиновых кислот, где варианты гибридизуются по меньшей мере с одной описанной последовательностью, считают включенными в изобретение. Уникальные подпоследовательности последовательностей, описанных в настоящем документе, которые определяют, например, стандартными способами сравнения последовательностей, также включены в изобретение.

#### Молчащие изменения

Вследствие вырожденности генетического кода необязательно получают любую из множества последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды и/или вирусы по изобретению, некоторые из которых могут обладать более низкими уровнями идентичности последовательностей к последовательностям нуклеиновых кислот и полипептидов НА и NA в настоящем документе. Далее приведена типичная таблица кодонов, в которой точно определен генетический код, найденный во многих биологических и биохимических текстах.

Таблица 1 Таблица кодонов			
Аминокислота			Кодон
Аланин	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Цистеин	Cys	C	UGC UGU
Аспарагиновая кислота	Asp	D	GAC GAU
Глутаминовая кислота	Glu	E	GAA GAG
Фенилаланин	Phe	F	UUC UUU
Глицин	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Гистидин	His	H	CAC CAU
Изолейцин	Ile	I	AUA AUC AUU
Лизин	Lys	K	AAA AAG
Лейцин	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Метионин	Met	M	AUG
Аспарагин	Asn	N	AAC AAU
Пролин	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Глутамин	Gln	Q	CAA CAG
Аргинин	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Серин	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Треонин	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Валин	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Триптофан	Trp	W	UGG
Тирозин	Tyr	Y	UAC UAU

Таблица кодонов показывает, что многие аминокислоты кодируются более чем

одним кодоном. Например, кодоны AGA, AGG, CGA, CGC, CGG и CGU кодируют аминокислоту аргинин. Таким образом, в каждом положении в нуклеиновых кислотах по изобретению, где кодон точно определяет аргинин, кодон можно заменить на любой соответствующий кодон, описанный выше, без изменения кодируемого полипептида.

5 Понятно, что U в последовательности РНК соответствует Т в последовательности ДНК.

Такие «молчащие изменения» представляют собой один вид «консервативно модифицированных изменений», которые рассмотрены ниже. Специалист учтет, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением ATG, который, как правило, является единственным кодоном для метионина, и TTG, который, как правило, является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать стандартными способами для кодирования функционально идентичных полипептидов. Таким образом, в любой описанной последовательности, которая кодирует полипептид, подразумевают каждое молчащее изменение нуклеиновой кислоты. Следовательно, изобретение в 15 прямой форме предусматривает каждое и любое возможное изменение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по изобретению, которое можно выполнить посредством выбора комбинаций на основе возможных вариантов кодонов. Эти комбинации выполняют в соответствии со стандартным триплетным генетическим кодом (например, как приведено в таблице 1, или как обычно 20 доступно в данной области), которые применяют к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид гемагглютинаина или нейраминидазы по изобретению. Все такие изменения каждой нуклеиновой кислоты в настоящем документе конкретно предусмотрены и описаны посредством обсуждения последовательности в сочетании с генетическим кодом. Специалист вполне способен выполнить эти молчащие замены 25 с использованием способов, приведенных в настоящем документе.

#### **Консервативные изменения**

Вследствие вырожденности генетического кода, «молчащие замены» (т.е. замены в последовательности нуклеиновой кислоты, которые не ведут к изменению в кодируемом полипептиде) заключают в себе признак каждой последовательности нуклеиновой 30 кислоты по изобретению, которая кодирует аминокислоту. Аналогичным образом, «консервативные аминокислотные замены» в одной или нескольких аминокислотах в аминокислотной последовательности, замененные с использованием различных аминокислот с крайне схожими свойствами, также легко идентифицировать как крайне схожие с описанной конструкцией, такой как приведенная в настоящем документе. 35 Такие консервативные изменения каждой раскрытой последовательности являются признаком настоящего изобретения.

«Консервативные изменения» конкретной последовательности нуклеиновой кислоты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, если нуклеиновая кислота не 40 кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям, см. ниже таблицу 2. Специалист учтет, что индивидуальные замены, делеции или вставки, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшую процентную долю аминокислот (обычно менее чем 5%, более обычно менее чем 4%, 3%, 2% или 1%) в кодируемой последовательности, 45 представляют собой «консервативно модифицированные изменения», где изменения ведут к удалению аминокислоты, добавлению аминокислоты или замене аминокислоты на химически схожую аминокислоту. Таким образом, «консервативные изменения» перечисленных полипептидных последовательностей по настоящему изобретению

включают замены небольшой процентной доли, обычно менее чем 5%, более обычно менее чем 4%, 3%, 2% или 1%, аминокислот полипептидной последовательности, на консервативно выбранную аминокислоту из той же группы консервативных замен. Наконец, добавление последовательностей, которые не изменяют кодируемую

5 активность молекулы нуклеиновой кислоты, такое как добавление нефункциональной последовательности, представляет собой консервативное изменение основной нуклеиновой кислоты.

Таблица 2

Группы консервативных замен

1	Аланин (A)	Серин (S)	Треонин (T)	
2	Аспарагиновая кислота (D)	Глутаминовая кислота (E)		
3	Аспарагин (N)	Глутамин (Q)		
4	Аргинин (R)	Лизин (K)		
5	Изолейцин (I)	Лейцин (L)	Метионин (M)	Валин (V)
6	Фенилаланин (F)	Тирозин (Y)	Триптофан (W)	

### Уникальные подпоследовательности полипептидов и полинуклеотидов

В одном из аспектов изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая содержит уникальную подпоследовательность из нуклеиновой кислоты, выбранной из последовательностей молекул HA и NA, описываемых в настоящем документе, например, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, остатков 89-1063 SEQ ID NO:1, остатков 1064-1729 SEQ ID NO:1, остатков 88-1062 SEQ ID NO:5 и остатков 1063-1728 SEQ ID NO:5. Уникальная подпоследовательность является уникальной по сравнению с нуклеиновыми кислотами, соответствующими нуклеиновым кислотам, таким как, например, найденные в GenBank или других схожих публичных базах данных на момент подачи. Можно осуществить

20 выравнивание, например, с использованием BLAST с параметрами по умолчанию. Любую уникальную подпоследовательность можно использовать, например, в качестве зонда для идентификации нуклеиновых кислот по изобретению. См. выше.

Аналогичным образом, изобретение включает полипептид, который содержит уникальную подпоследовательность из полипептида, выбранного из последовательностей молекул HA и NA, описываемых в настоящем документе, например, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, остатков 16-340 SEQ ID NO:2, остатков 341-562 SEQ ID NO:2, остатков 16-340 SEQ ID NO:6 и остатков 341-562 SEQ ID NO:6. Здесь уникальная подпоследовательность является уникальной по сравнению с полипептидом, соответствующим, например, аминокислоте, соответствующей полинуклеотидной последовательности, найденной, например, в GenBank или других схожих публичных базах данных на момент подачи.

30

Изобретение также относится к целевым нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются при жестких условиях с уникальным кодирующим олигонуклеотидом, который кодирует уникальную подпоследовательность полипептида, выбранного из последовательностей молекул HA и NA по изобретению, где уникальная подпоследовательность является уникальной по сравнению с полипептидом, соответствующим любому из контрольных полипептидов (последовательности, например, нуклеиновых кислот, соответствующие им, найдены, например, в GenBank или других схожих публичных базах данных на момент подачи). Уникальные последовательности определяют, как указано выше.

40

Сравнение последовательностей, идентичность и гомология

Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или

более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются аналогичными или имеют определенную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются аналогичными, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измеряют с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, которые описаны ниже, (или других алгоритмов, доступных специалистам) или посредством визуальной проверки.

Фраза «по существу идентичный» в контексте двух нуклеиновых кислот или полипептидов (например, ДНК, кодирующей молекулу НА или NA, или аминокислотной последовательности молекулы НА или NA) относится к двум или более

последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют по меньшей мере приблизительно 90%, предпочтительно 91%, наиболее предпочтительно 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или более идентичности нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измеряют с использованием алгоритма сравнения последовательностей или посредством визуальной проверки.

Такие «по существу идентичные» последовательности обычно считают «гомологичными», безотносительно фактического родства. Предпочтительно «существенная идентичность» существует в области аминокислотных последовательностей, которая составляет по меньшей мере приблизительно 200 остатков в длину, по меньшей мере приблизительно 250 остатков, по меньшей мере приблизительно 300 остатков, 350 остатков, 400 остатков, 425 остатков, 450 остатков, 475 остатков, 480 остатков, 490 остатков, 495 остатков, 499 остатков, 500 остатков, 502 остатков, 559 остатков, 565 остатков или 566 остатков или по всей длине двух последовательностей, подлежащих сравнению.

Для сравнения последовательностей и определения гомологии, обычно одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонную последовательности вводят в компьютер, если необходимо, обозначают координаты подпоследовательностей и определяют параметры программы алгоритма последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичности последовательностей для тестируемой последовательности(ей) относительно эталонной последовательности на основе определяемых параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма местной гомологии авторов Smith & Waterman, Adv Appl Math 2:482 (1981), с помощью алгоритма гомологичного выравнивания авторов Needleman & Wunsch, J Mol Biol 48:443 (1970), с помощью способа поиска сходства авторов Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85:2444 (1988), с помощью компьютерных реализаций алгоритмов, таких как GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, или посредством визуальной проверки (в целом см. Ausubel et al., выше).

Одним примером алгоритма, подходящего для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в публикации Altschul et al., J Mol Biol 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для выполнения анализа BLAST общедоступно через National Center for Biotechnology Information ([www\(dot\)ncbi.nlm.nih\(dot\)gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Этот алгоритм включает сначала определение пар последовательностей с высокими оценками (HSP) посредством выявления коротких слов длиной W в последовательности запроса, которые или



совпадают или отвечают некоторой положительной пороговой оценке  $T$  при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных.  $T$ , обозначаемая как порог оценки соседнего слова (см. Altschul et al., выше). Эти исходные совпадения соседних слов выступают в качестве затравки для инициации поиска для

5 выявления более длинных HSP, содержащих их. Затем совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока можно увеличить совокупную оценку выравнивания. Совокупные оценки для нуклеотидных последовательностей вычисляют с использованием параметров  $M$  (награда за пару совпадающих остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (штраф за несовпадающие остатки; всегда  $<0$ ).

10 Для аминокислотных последовательностей используют матрицу замен для вычисления совокупной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливают, если: совокупная оценка выравнивания снижается на значение  $X$  от ее максимального достигнутого значения; совокупная оценка снижается до нуля или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой;

15 или достигают конца любой из последовательностей. Параметры  $W$ ,  $T$  и  $X$  алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует в качестве значений по умолчанию длину слова ( $W$ ) 11, ожидание ( $E$ ) 10, отсечение 100,  $M=5$ ,  $N=-4$  и сравнение обеих цепей. Программа BLASTP для аминокислотных последовательностей использует значения

20 по умолчанию длину слова ( $W$ ) 3, ожидание ( $E$ ) 10 и матрицу замен BLOSUM62 (см., Henikoff & Henikoff (1989) Proc Natl Acad Sci USA 89:10915).

В дополнение к вычислению процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST также осуществляет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul. Proc Natl Acad Sci USA 90:5873-

25 5787 (1993)). Одной мерой сходства, предоставляемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ( $P(N)$ ), которая отражает вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будет случайным. Например, нуклеиновую кислоту считают схожей с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении

30 тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее чем приблизительно 0,1, более предпочтительно менее чем приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 0,001.

Другим примером эффективного алгоритма выравнивания последовательностей является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей

35 из группы родственных последовательностей с использованием прогрессивного парного выравнивания. Также он может строить дерево, отражающее кластеризационные взаимосвязи, использованные для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение способа прогрессивного выравнивания авторов Feng & Doolittle (1987) J. Mol Evol. 35: 351-360. И использованный способ аналогичен способу, описанному авторами Higgins

40 & Sharp (1989) CABIOS 5:151-153. Программа может выравнивать, например, до 300 последовательностей с максимальной длиной 5000 символов. Процедура множественного выравнивания начинается с парного выравнивания двух наиболее схожих последовательностей, которое создает кластер из двух выровненных последовательностей. Затем этот кластер можно выровнять со следующей наиболее

45 близкородственной последовательностью или с кластером выровненных последовательностей. Два кластера последовательностей можно выровнять посредством простого расширения парного выравнивания двух отдельных последовательностей. Конечное выравнивание получают посредством серии прогрессивных парных

выравниваний. Программу также можно использовать для построения дендрограммы или древесного представления кластеризационных взаимосвязей. Программу запускают, определяя конкретные последовательности и их аминокислотные или нуклеотидные координаты областей сравнения последовательностей.

Дополнительным примером алгоритма, подходящего для множественных выравниваний ДНК или аминокислотных последовательностей, является программа CLUSTALW (Thompson, J. D. et al. (1994) Nucl. Acids. Res. 22:4673-4680). CLUSTALW осуществляет множественные парные сравнения между группами последовательностей и собирает их в множественное выравнивание, основываясь на гомологии. Штрафы за открытие пропуска и продолжение пропуска могут составлять, например, 10 и 0,05, соответственно. Для аминокислотных выравниваний можно использовать алгоритм BLOSUM в качестве белковой матрицы весов. См., например. Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919.

### **Наборы и реактивы**

Настоящее изобретение необязательно предоставляют пользователю в виде набора. Например, набор по изобретению содержит одну или несколько нуклеиновых кислот, полипептидов, антител или клеточных линий, описываемых в настоящем документе (например, содержащих или с молекулами НА и/или НА по изобретению). Набор может содержать диагностическую нуклеиновую кислоту или полипептид, например, антитело, набор зондов, например, в виде микрочипа кДНК, упакованного в подходящий контейнер, или другой нуклеиновой кислоты, такой как один или несколько экспрессирующих векторов. Также набор может дополнительно содержать один или несколько дополнительных реактивов, например, субстраты, метки, праймеры, для мечения продуктов экспрессии, пробирки и/или другие аксессуары, реактивы для сбора образцов, буферы, камеры для гибридизации, покровные стекла и т.д. Набор необязательно дополнительно содержит набор инструкций или руководство пользователя, подробно рассказывающее о предпочтительных способах использования компонентов набора для обнаружения или применения диагностических наборов и т.д.

Когда используют согласно инструкциям, набор можно использовать, например, для оценки стадии или состояния заболевания, для оценки действия фармацевтического средства или другого лечебного вмешательства на прогрессирование стадии или состояния заболевания в клетке или организме или для применения в качестве вакцины и т.д.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к системным наборам, в которых осуществлены способы, композиции, системы и устройства, приведенные в настоящем документе. Системные наборы по изобретению необязательно содержат одно или несколько из следующего: (1) устройство, система, компонент системы или компонент устройства; (2) инструкции по осуществлению способов, описываемых в настоящем документе, и/или по работе устройства или компонентов устройства, приведенных в настоящем документе, и/или по использованию композиций, приведенных в настоящем документе. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к использованию любого устройства, компонента устройства, композиции или набора, приведенных в настоящем документе, для осуществления на практике любого способа или анализа, приведенных в настоящем документе, и/или к использованию любого устройства или набора для осуществления на практике любого анализа или способа, приведенных в настоящем документе.

Дополнительно наборы могут содержать одну или несколько систем трансляции, как указано выше, (например, клетку), с соответствующим упаковочным материалом,

контейнерами для хранения компонентов набора, материалы инструкций для осуществления на практике способов, приведенных в настоящем документе и/или т.п. Аналогичным образом, продукты систем трансляции (например, белки, такие молекулы как НА и/или NA) можно предоставить в форме набора, например, с контейнерами для хранения компонентов набора, материалами инструкций для осуществления на практике способов, приведенных в настоящем документе и/или т.п.

Чтобы облегчить использование способов и композиций по изобретению, любое из вакцинных компонентов и/или композиций, например, реассортантный вирус в аллантаоисной жидкости и т.д., и дополнительные компоненты, такие как буфер, клетки, среда для культивирования, которые можно использовать для упаковки и инфицирования вирусов гриппа для экспериментальных или терапевтических вакцинных задач, можно упаковать в форме набора. Обычно, в дополнение к указанным выше компонентам, набор содержит дополнительные материалы, которые могут включать, например, инструкции для осуществления способов по изобретению, упаковочный материал и контейнер.

### ПРИМЕРЫ

В 1957 году вирусы гриппа H2N2 вызвали пандемию и циркулировали у людей до 1968, когда их заменили вирусы гриппа H3N2. Обладая доказанной способностью вызывать заболевание, вирусы H2 могут обладать пандемическим потенциалом, обусловленным отсутствием H2-специфического иммунитета у людей, рожденных после 1968. Четырнадцать географически и хронологически различных вирусов гриппа H2 птиц и человека оценивали по их способности реплицироваться и вызывать ответ с образованием антител с широкой перекрестной реактивностью у хорьков. Сыворотки хорьков, которых инокулировали вирусами гриппа A/Japan/57 (H2N2), A/mallard/NY/78 (H2N2) и A/swine/MO/2006 (H2N3), вызывали ответ с образованием антител с широкой перекрестной реактивностью против гетерологичных вирусов H2 в анализах подавления гемагглютинации и нейтрализации.

Используя адаптированный к холоду (*ca*) остов A/Ann Arbor/6/60 (AA) (H2N2), получали три *ca* вируса: *ca* A/Japan/57, *ca* A/mallard/NY/78 и *ca* A/swine/MO/2006. Последовательности НА и NA из A/Japan/57 и A/swine/MO/2006 приведены в таблице 3. У хорьков оценивали способность каждого *ca* вакцинного вируса защищать от контрольного заражения гомологичным и гетерологичным H2 вирусом дикого типа (wt). Эффективность защиты в верхних дыхательных путях различалась. Вакцины *ca* AA и *ca* A/Japan/57 обеспечивали полную защиту против гомологичного контрольного заражения, несмотря на то, что вакцины *ca* A/mallard/NY/78 и *ca* A/swine/MO/2006 обеспечивали частичную защиту против гомологичного контрольного заражения со значительным снижением титров вируса по сравнению с имитацией иммунизации животных. Ни один из вакцинных вирусов *ca* не давал полной защиты против гетерологичного контрольного заражения в верхних дыхательных путях. В нижних дыхательных путях каждая вакцина *ca* давала полную защиту против контрольного заражения гомологичным вирусом wt. Вакцины *ca* AA и *ca* A/swine/MO/2006 обеспечивали полную защиту в нижних дыхательных путях против всех гетерологичных вирусов wt при контрольном заражении.

Таблица 3

## Последовательности HA/NA реассортантных вакцинных штаммов

SEQ ID NO	HA или NA	Название штамма	Аминокислота или нуклеотид
SEQ ID NO: 1	HA (H3)	<i>ca</i> A/Japan/57	Нуклеотид
SEQ ID NO: 2	HA (H3)	<i>ca</i> A/Japan/57	Аминокислота
SEQ ID NO: 3	NA (N2)	<i>ca</i> A/Japan/57	Нуклеотид
SEQ ID NO: 4	NA (N2)	<i>ca</i> A/Japan/57	Аминокислота
SEQ ID NO: 5	HA (H3)	<i>ca</i> A/swine/MO/2006	Нуклеотид
SEQ ID NO: 6	HA (H3)	<i>ca</i> A/swine/MO/2006	Аминокислота
SEQ ID NO: 7	NA (N3)	<i>ca</i> A/swine/MO/2006	Нуклеотид
SEQ ID NO: 8	NA (N3)	<i>ca</i> A/swine/MO/2006	Аминокислота

На фиг. 1 и 2 показана эффективность защиты, которую давали вакцины *ca* AA, *ca* A/Japan/57, *ca* A/mallard/NY/78 и *ca* A/swine/MO/2006 хорькам. Хорьков вакцинировали одной дозой реассортантной вирусной вакцины *ca*. Затем проводили контрольное заражение хорьков вирусами гриппа wt AA, wt A/Japan/57, wt A/mallard/NY/78 и wt A/swine/MO/2006. Через три дня после контрольного заражения собирали легкие и носовые раковины хорьков и определяли титр вируса в тканях. На фиг. 1 и 2 показана эффективность защиты, которую давали рекомбинантные вакцины H2 против гомологичного и гетерологичного вирусов H2 дикого типа в легких и носовых раковинах, соответственно, у хорьков.

На фиг. 3 и 4 показана эффективность защиты, которую давали вакцины *ca* AA, *ca* A/Japan/57, *ca* A/mallard/NY/78 и *ca* A/swine/MO/2006 мышам. Мышей вакцинировали одной дозой реассортантной вирусной вакцины *ca*. Затем проводили контрольное заражение мышей вирусами гриппа wt AA, wt A/Japan/57, wt A/mallard/NY/78 и wt A/swine/MO/2006. Через три дня после контрольного заражения собирали легкие и носовые раковины мышей и определяли титр вируса в тканях. На фиг. 3 и 4 показана эффективность защиты, которую давали рекомбинантные вакцины H2 против гомологичного и гетерологичного вирусов H2 дикого типа в легких и носовых раковинах, соответственно, у мышей.

Несмотря на то, что изложенное выше изобретение описано в некоторых подробностях с целью ясности и понятности, специалисту в данной области при прочтении описания будет ясно, что различные изменения в форме и подробностях можно осуществлять, не отступая от истинного объема изобретения. Например, все описанные выше способы и устройства можно использовать в различных сочетаниях. Все публикации, патенты, патентные заявки или другие документы, процитированные в этой заявке, включены по ссылке в полном объеме для любых целей в той же степени, как если бы было указано, что каждую отдельную публикацию, патент, патентную заявку или другой документ отдельно включают по ссылке для любых целей.

**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ***ca* A/Japan/57

SEQ ID NO:1 Нуклеотидная последовательность *ca A/Japan/57 H2*

Полная длина молекулы: 1773 о.

```

1  agcaaaaagca  ggggttatatc  catagacaac  caaaaagcaaa  acaatggcca
5  51  tcattttatct  cattctcctg  ttcacagcag  tgagagggga  ccagatatgc
10  101  attggataacc  atgccaataa  ttccacagag  aaggtcgaca  caattctaga
151  gcggaacgtc  actgtgactc  atgccaagga  cattcttgag  aagacccata
201  acggaaggtt  atgcaaacta  aacggaatcc  ctccacttga  actagggggac
251  tgtagcattg  ccggatggct  ccttggaat  ccagaatgtg  ataggcttct
301  aagtgtgcca  gaatggctct  atataatgga  gaaagaaaac  ccgagagacg
10  351  gtttgtgtta  tccaggcagc  ttcaatgatt  atgaagaatt  gaaacatctc
401  ctacgcagcg  tgaaacattt  cgagaaagta  aagattctgc  ccaaagatag
451  atggacacag  catacaacaa  ctggagggtt  acgggcctgc  gcggtgtctg
501  gtaatccatc  attcttcagg  aacatgggtc  ggctgacaaa  gaaaggatca
551  gattatccgg  ttgccaaagg  atcgtacaac  aatacaagcg  gagaacaaat
601  gctaataatt  tgggggggtg  accatcccaa  tgatgagaca  gaacaaagaa
15  651  cattgtacca  gaatgtggga  acctatgttt  ccgtaggcac  atcaacattg
701  aacaaaaggt  caaccccaga  aatagcaaca  aggcctaaag  tgaatggaca
751  aggaggtaga  atggaattct  cttggaccct  cttggatatg  tgggacacca
801  taaattttga  gagtactggt  aatctaattg  caccagagta  tggattcaaa
851  atatcgaaaa  gaggtagtct  agggatcatg  aaaacagaag  gaacacttga
20  901  gaactgtgag  accaaatgcc  aaactccttt  gggagcaata  aatacaacat
951  tgccttttca  caatgtccac  ccaactgaca  taggtgagtg  ccccaaatat
1001  gtaaaatcgg  agaagttggt  cttagcaaca  ggactaagga  atgttcccca
1051  gattgaatca  agaggattgt  ttggggcaat  agctgggttt  atagaaggag
1101  gatggcaagg  aatggttgat  ggttggtatg  gataccatca  cagcaatgac
1151  cagggatcag  ggtatgcagc  agacaaagaa  tccactcaaa  aggcatctga
25  1201  tggaatcacc  aacaaggtaa  attctgtgat  tgaaaagatg  aacacccaat
1251  ttgaagctgt  tgggaaagaa  ttcagtaact  tagagagaag  actggagaac
1301  ttgaacaaaa  agatggaaga  cgggtttcta  gatgtgtgga  catacaatgc
1351  tgagcttcta  gttctgatgg  aaaatgagag  gacacttgac  tttcatgatt
1401  ctaatgtcaa  gaatctgtat  gataaagtca  gaatgcagct  gagagacaac
30  1451  gtcaaagaac  taggaaatgg  atgttttgaa  ttttatcaca  aatgtgatga
1501  tgaatgcatg  aatagtgtga  aaaacgggac  gtatgattat  cccaagtatg
1551  aagaagagtc  taaactaaat  agaaatgaaa  tcaaaggggt  aaaattgagc
1601  agcatggggg  tttatcaaat  ccttgccatt  tatgctacag  tagcagggtc
1651  tctgtcactg  gcaatcatga  tggctgggat  ctctttctgg  atgtgtcca
1701  acgggtctct  gcagtgcagg  atctgcatat  gattataagt  cattttataa
35  1751  ttaaaaacac  ccttgtttct  act

```

SEQ ID NO:2 Аминокислотная последовательность *ca A/Japan/57 H2*

Полная длина молекулы: 562 а. о.

```

1  maiiylillf  tavrgdqici  gyhannstek  vtilernvt  vthakdilek
40  51  thngklckln  gipplelgdc  siagwllgnp  ecdrlsvpe  wsyimekenp
101  rdglcypgsf  ndyeelkhll  ssvkhfekvk  ilpkdrwtqh  tttggsraca
151  vsgnpsffrn  mvwltkkgsd  ypvakgsynn  tsgeqmliiw  gvhhpndete

```

45

201 qrtlyqnvgt yvsvgtstln krstpeiattr pkvngqggm efswtlldmw  
 251 dtinfestgn liapeygfki skrgssgimk tegtlencet kcqtplgain  
 301 ttlpfhnvhp ltigecpkyv kseklvlatg lrnvpqiesr glfgaiagfi  
 351 eggwqgmvdg wygyhhsndq gsgyaadkes tqkafdgitn kvnsviekmn  
 5 401 tqfeavgkef snlerrenl nkkmedgfld vwtynaellv lmenertldf  
 451 hdsnvknlyd kvrmqlrdnv kelgngcfef yhkcddecn svkngtydyp  
 501 kyeesklmr neikgvklss mgvyqilaiy atvagslsla immagisfwm  
 551 csngslqcri ci

# SEQ ID NO:3 Нуклеотидная последовательность *ca A/Japan/57 N2*

10 Полная длина молекулы: 1466 о.

1 agcaaaaagca ggagtgaaaa tgaatccaaa tcaaaaagata ataacaattg  
 51 gctctgtctc tctcaccatt gaaacagtat gcttcctcat gcagattgcc  
 101 atcctggcaa ctactgtgac attgcatttt aagcaacatg agtgcgactc  
 151 ccccgcgagc aaccaagtaa tgccatgtga accaataata atagaaagga  
 15 201 acataacaga gatagtgtat ttgaataaca ccaccataga gaaagagatt  
 251 tgccccgaag tagtggaata cagaaattgg tcaaagccgc aatgtcaa  
 301 tacaggattt gcaccttttt ctaaggacaa ttcaatccgg ctttctgctg  
 351 gtggggacat ttgggtgacg agagaacctt atgtgtcatg cgatcctggc  
 401 aagtgttatc aatttgcact cgggcagggg accacactag acaacaaaca  
 451 ttcaaattggc acaatacatg atagaatccc tcatcgaacc ctattaatga  
 20 501 atgagttggg tgttccattt catttaggaa ccaaacaagt gtgtgtagca  
 551 tgggtccagct caagttgtca cgatggaaaa gcattggttg atgtttgtgt  
 601 cactggggat gatagaaatg caactgctag cttcatttat gacgggaggc  
 651 ttgtggacag tattggttca tgggtctcaa atatcctcag gacccaggag  
 701 tcggaatgcg tttgtatcaa tgggacttgc acagtagtaa tgactgatgg  
 25 751 aagtgcata ggaagagccg atactagaat actattcatt aaagagggga  
 801 aaattgtcca tattagccca ttgtcaggaa gtgctcagca tatagaggag  
 851 tgttcctgtt accctcgata tcctgacgtc agatgtatct gcagagacaa  
 901 ctggaaggc tctaataaggc ccgttataga cataaatatg gaagattata  
 951 gcattgattc cagttatgtg tgctcagggc ttgttggcga cacacccagg  
 30 1001 aacgacgaca gctctagcaa tagcaattgc agggatccta acaatgagag  
 1051 agggaaatcca ggagtgaag gctgggcctt tgacaatgga gatgatgtat  
 1101 ggatgggaag aacaatcagc aaagattcac gctcagggtta tgaaactttc  
 1151 aaagtcattg gtggttggtc cacaccta atccaaatcgc aggtcaatag  
 1201 acaggtcata gttgacaaca ataattgggtc tggttactct ggtattttct  
 1251 ctgttgaggg caaaagctgc atcaataggt gcttttatgt ggagttgata  
 35 1301 aggggaaggc cacaggagac tagagtatgg tggacctcaa acagtattgt  
 1351 tgtgttttgt ggcacttcag gtacttatgg aacaggctca tggcctgatg  
 1401 gggcgaacat caatttcag cctatataag ctttcgcaat tttagaaaaa  
 1451 actccttggt tctact

# SEQ ID NO:4 Аминокислотная последовательность *ca A/Japan/57 N2*

40 Полная длина молекулы: 471 а. о.

1 mnpnqkiiti gsvsltietv cflmqiaila ttvtlhfkqh ecdspasnv  
 51 mpcepiier niteivylmn ttiekeicpe vveyrnwskp qcqitgfapf  
 101 skdnsirlsa ggdiwvtrp yvscdpkcy qfalgggttl dnkhsngtih

45

151 driphrtllm nelgvpfhlg tkqvcvawss sschdgkaw1 hvcvtgddrn  
 201 atasfiydgr lvdsigswsq nilrtqesec vcingtctvv mtdgsasgra  
 251 dtrilfikeg kivhisplsg saqhieecsc yprypdvrci crdnwkgsnr  
 301 pvidinmedy sidssyvcsq lvgdtpnrdd sssnsncrdp nnergnpgvk  
 5 351 gwafdngddv wmgrtiskds rsgyetfkvi ggwstpnsks qvnrqvivdn  
 401 nnwsgysgif svegkscinr cfyvelirgr pqetrvwvts nsivvfcgts  
 451 gtygtgswpd ganinfmpi

*ca* A/swine/MO/2006

SEQ ID NO:5 Нуклеотидная последовательность *ca* A/swine/MO/2006 H2

10 Полная длина молекулы: 1772 о.

1 agcaaaagca ggggttatac catagacaac cgaacaaaga caatgaccat  
 51 cacttttctc atcctcctgt tcacagtagt gaaaggggac caaatatgca  
 101 tcggatacca tgccaacaat tccacagaaa aagttgacac aatccttgaa  
 151 cgaaacgtca ccgtgactca tgccaagaac attccttgaaa agacgcataa  
 15 201 tggaaagtgtg tgcagattga gtggaatccc tccattggaa ctgggggatt  
 251 gcagcattgc aggttggtct cttggaaatc cggaatgtga ccggctctta  
 301 agtgtacctg aatgggtccta tatagtggaa aaggaaaacc cggatgaatgg  
 351 tctgtgctat ccaggcagtt tcaatgatta tgaggaattg aaacatcttc  
 401 tcaccagtgt gacacacttt gagaaagtta agattctgcc cagagatcaa  
 20 451 tggacccagc acacaacaac tgggtggttct cgggcctgtg cagtatctgg  
 501 aaaccctgca ttcttttagga acatgggttg gcttacaag aaaggggtcaa  
 551 actactcaat tgctaaaagg tcatacaaca acacaagtgg ggagcaaattg  
 601 ctggtaatat gggggataca tcaccccaat gacgatgcgg aacagaggac  
 651 actgtaccag aatgtgggaa catatgtttc cgttggaaca tcaacactaa  
 701 ataagaggtc aatccctgaa atagcaacaa ggcccaaagt caatggacag  
 25 751 ggaggaagaa tggaaattctc ttggactcta ttggagacat gggatgtcat  
 801 aaatttttgag agcactggta atttaattgc accagaatac ggattcaaaa  
 851 tatcaaagag aggaagctca ggaattatga agacagagaa aatacttgaa  
 901 aattgtgaaa ccaaatgtca gaccccttg ggggcaataa atacaacatt  
 951 gccctttcac aacattcacc cattgacaat aggtgagtgc cccaagtatg  
 30 1001 taaagtcaga tagactgatt ttggcgacag gagtaagaaa tgtcccccag  
 1051 attgaatcaa ggggattggt tggagcaata gctgggttta tagaaggcgg  
 1101 atggcaagg atggttgatg gctggtatgg gtaccatcac agcaatgatc  
 1151 aaggatcagg atatgcagca gacaaagaat ccactcaaaa ggcaattgat  
 1201 gggataacta acaaagtaaa ttctgtgatt gaaaagatga aactcagtt  
 1251 tgaggctggt gggaaagagt tcaacaacct agagagaagg ctggaaaact  
 35 1301 taaataaaaa gatggaagat ggatttattg atgtatggac atataatgcc  
 1351 gaactcctag ttctaattgga aaatgagagg acacttgatt tccatgattc  
 1401 taatgtgaag aatctgtacg ataagggtcag aatgcaattg agagacaatg  
 1451 ctaaggaaat agggaacgga tgctttgagt tttatcataa atgtgatgat  
 1501 gaatgcatga atagtgtcag gaatgggaca tatgattatc ccaaatatga  
 40 1551 ggaagagtcc aagctgaaca ggaacgaaat caaaggagtg aaattgagca  
 1601 atatgggggt ttatcaaata cttgctatat acgctacagt tgcaggctct  
 1651 ttgtcactgg caatcatgat agctgggatt tctttctgga tgtgttctaa  
 1701 tgggtctctg caatgcagaa tttgcatatg actgtaagtc aatttgtaat  
 1751 taaaaacacc cttgtttcta ct

45 SEQ ID NO:6 Аминокислотная последовательность *ca* A/swine/MO/2006 H2

Полная длина молекулы: 562 а. о.

1 mtitflillf tvvkgdqici gyhannstek vtilernvt vthaknilek  
 51 thngklcrsls gipplelgdc siagwllgnp ecdrlsvpe wsyivekenp  
 101 vnglcypgsf ndyeelkhll tsvthfekvk ilprdqwtqh tttggsraca  
 151 vsgnpsffrn mvwltkkgsn ysiakrsynn tsgeqmlviw gihhpnddae  
 5 201 qrtlyqnvgt yvsvgtstln krsipeiatr pkvngqgrm efswtlletw  
 251 dvinfestgn liapeygfki skrgssgimk tekilencet kcqtplgain  
 301 ttlpfhnihp ltigecpkyv ksdrllilatg vrnvpqiesr glfgaiagfi  
 351 eggwqgmvdg wygyhhsndq gsgyaadkes tqkaidgitn kvnsviekmn  
 401 tqfeavgkef nnlerrlenl nkkmedgfid vwtynaellv lmenertldf  
 10 451 hdsnvknlyd kvrmlrdna keigngcfe yhkcddecn svrngtydyp  
 501 kyeesklr neikgvklsln mgvyqilaiy atvagsls la imiagisfwm  
 551 csngslqcri ci

# SEQ ID NO:7 Нуклеотидная последовательность *ca* A/swine/MO/2006 N3

Полная длина молекулы: 1453 о.

15 1 agcaaaaagca ggtgcsagat gaatccgaat cagaagataa taacaatcgg  
 51 ggtagtgaat accactctgt caacaatagc ccttctcatt ggagtgggaa  
 101 acttaatttt caacacagtc atacatgaga aaataggaga ccatcaaata  
 151 gtgacctatc caacaataac gaccctgca gtaccgaact gcagtgcacac  
 201 tataataaca tacaataaca ctgtgataaa caacataaca acaacaataa  
 251 taactgaaga agaaaggcct ttcaagtctc cactaccgct gtgccccttc  
 301 agaggattct tcccttttca caaggacaat gcaatacgac tgggtgaaaa  
 351 caaagacgtc atagtcacaa gagagcctta tgttagctgc gataatgaca  
 401 actgctggtc ctttgctctc acacaaggag cattgctagg gaccaaacat  
 451 agcaatggga ccattaaaga caggacacca tataggcttc taattcgttt  
 501 cccaatagga acagctccag tactaggaaa ttataaagag atatgcattg  
 25 551 cttggtcgag cagcagttgc tttgacggga aagagtggat gcatgtgtgc  
 601 atgacaggga acgataatga tgcaagtgcc cagataatat atggaggagg  
 651 aatgacagac tccattaaat catggagaaa ggacatacta agaactcagg  
 701 agtctgaatg ccaatgcatt gacgggactt gtgttggtgc tgtcacagat  
 751 ggccctgctg ctaatagtgc agattacagg gtttactgga tacgggaggg  
 30 801 aaaaataata aagtatgaaa atgttcccaa aacaaagata caacacttag  
 851 aagaatgttc ctgctatgtg gacattgatg tttactgtat atgtagggac  
 901 aattggaagg gctctaacag accttgatg agaatacaaca acgagactat  
 951 actggaaaca ggggtatgtat gtagtaaat ccaactcagac acccccaggc  
 1001 ccgctgaccc ttcaacaatg tcatgtgact cccaagcaa tgtcaatgga  
 1051 ggacccggag tgaaggggtt tggtttcaaa gctggcgatg atgtatgggt  
 35 1101 aggtagaaca gtgtcgacta gtggtagatc gggctttgaa attatcaaag  
 1151 ttacagaagg gtggatcaac tctcctaacc atgtcaaate aattacacaa  
 1201 acaactagtgc caaacaatga ctggtcaggc tattccggta gcttcattgt  
 1251 caaagccaag gactgttttc agccctgttt ttatgttgag cttatacgag  
 1301 ggaggcccaa caagaatgat gacgtctctt ggacaagtaa tagtatagtt  
 40 1351 acttttctgtg gactagacaa tgaacctgga tcgggaaatt ggccagatgg  
 1401 ttctaacatt gggtttatgc ccaagtaata gaaaaaagca ccttgtttct  
 1451 act

# SEQ ID NO:8 Аминокислотная последовательность *ca* A/swine/MO/2006 N2

Полная длина молекулы: 469 а. о.

45



1 mnpnqkiiti gvvnttlsti alligvgnli fntvihekig dhqivtypti  
 51 ttpavpncsd tiitynntvi nnitttiite eerpfksplp lcpfrgffpf  
 101 hkdnairlge nkdvivtrep yvscdndncw sfaltqgall gtkhsngtik  
 151 drtpyrslir fpigtapvlg nykeiciaws ssscfdgkew mhvcmtgndn  
 5 201 dasaqiiygg rmtdsikswr kdilrtqese cqcidgtcvv avtdgpaans  
 251 adyrvywire gkiikyenvp ktkiqhleec scyvdiidvyc icrdnwkgkn  
 301 rpwmrinnet iletgyvcsk fhsttprpad pstmscdsps nvnggpgvkq  
 351 fgfkagddvw lgrtvstsgs sgfeikvte gwinspnvhk sitqtlvpnn  
 401 dwsgysgsfi vkakdcfqc fyvelirgrp nknddvswts nsivtfcgld  
 10 451 nepgsgnwps gsnigfmpk

### Формула изобретения

1. Реассортантный вирус гриппа 6:2 для получения вакцин, где упомянутый реассортантный вирус содержит 6 внутренних геномных сегментов от одного или  
 15 несколько вирусов-доноров и геномные сегменты, которые кодируют НА полипептид и NA полипептид, где НА полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

2. Реассортантный вирус гриппа по п.1, где NA полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

20 3. Реассортантный вирус гриппа по п.1, где один или несколько вирусов-доноров содержат A/Ann Arbor/6/60.

4. Реассортантный вирус гриппа по п.1, где один или несколько вирусов-доноров содержат иной, чем A/Ann Arbor/6/60.

5. Реассортантный вирус гриппа по п.4, где один или несколько вирусов-доноров  
 25 являются PR8 или A/Leningrad/17.

6. Реассортантный вирус гриппа по п.1 или 2, где один или несколько вирусов-доноров выбирают по одному или нескольким фенотипическим признакам, выбранным из группы, состоящей из: аттенуированный, адаптированный к холоду и чувствительный к температуре.

30 7. Иммуногенная композиция для получения вакцин, которая содержит иммунологически эффективное количество реассортантного вируса гриппа по п.6.

8. Применение реассортантного вируса гриппа по п.6 для получения лекарственного средства, которое при введении пациенту иммунологически эффективного количества с физиологически эффективным носителем стимулирует индукцию иммунного ответа  
 35 иммунной системы против вирусов гриппа.

9. Применение реассортантного вируса гриппа по п.6 для получения лекарственного средства, которое при введении пациенту иммунологически эффективного количества вызывает иммуногенную реакцию против вирусной инфекции для профилактического и терапевтического лечения вирусной инфекции.

40 10. Живая аттенуированная противогриппозная вакцина, содержащая иммунологически эффективное количество иммуногенной композиции по п.7.

11. Вакцина на основе расщепленного или убитого вируса для получения иммуногенной реакции против вирусной инфекции, которая содержит иммунологически эффективное количество реассортантного вируса по п.1.

45 12. Способ получения реассортантных вирусов гриппа в культуре клеток, включающий:

i) введение множества векторов, содержащих полинуклеотиды, соответствующие геному вируса гриппа, в популяцию клеток-хозяев, способных поддерживать репликацию

вируса гриппа, где множество векторов содержит полинуклеотиды, соответствующие по меньшей мере 6 внутренним геномным сегментам от одного или несколько вирусодоноров и двум геномным сегментам поверхностного антигена, где геномные сегменты поверхностного антигена кодируют НА и NA полипептид, где геномный сегмент

5 поверхностного антигена, который кодирует НА полипептид, продуцирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.;

ii) культивирование популяции клеток-хозяев; и

iii) извлечение множества вирусов гриппа.

13. Способ по п.12, где геномный сегмент поверхностного антигена, который кодирует

10 NA полипептид, продуцирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

14. Способ по п.12 или 13, где один или несколько вирусов-доноров выбирают по одному или нескольким фенотипическим признакам, выбранным из группы, состоящей из: аттенуированный, адаптированный к холоду и чувствительный к температуре.

15 15. Способ по п.12, где один или несколько вирусов-доноров содержат A/Ann Arbor/6/60.

16. Способ по п.12, где один или несколько вирусов-доноров содержат иной, чем A/Ann Arbor/6/60.

20

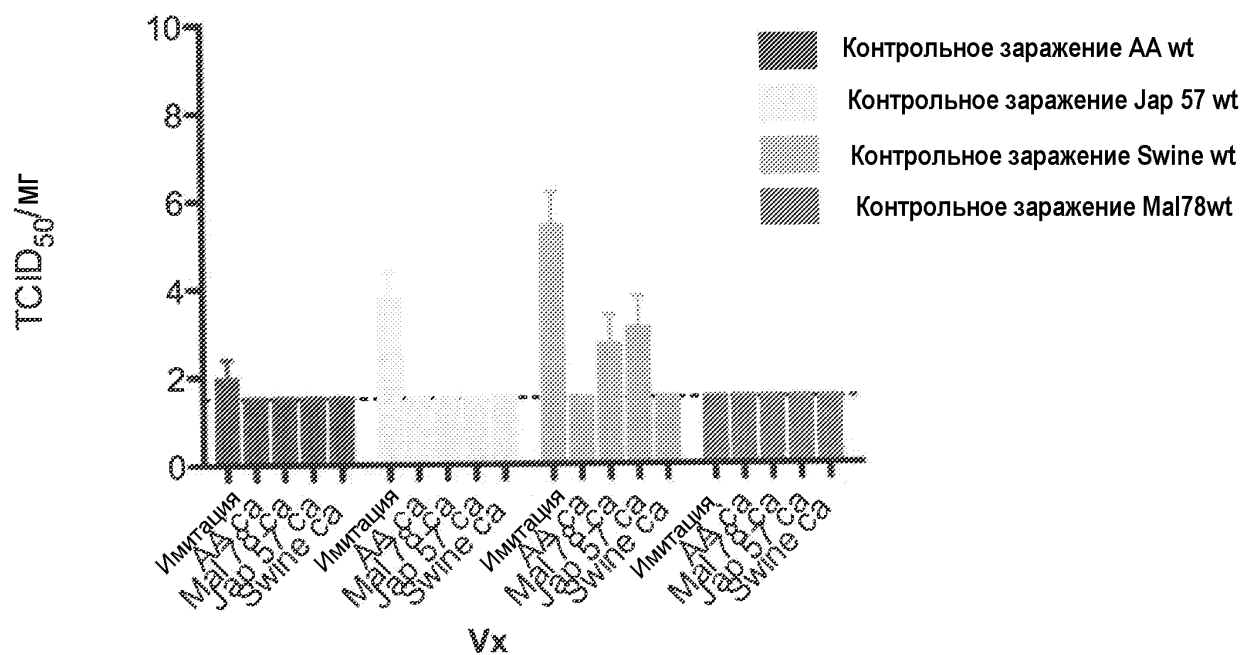
25

30

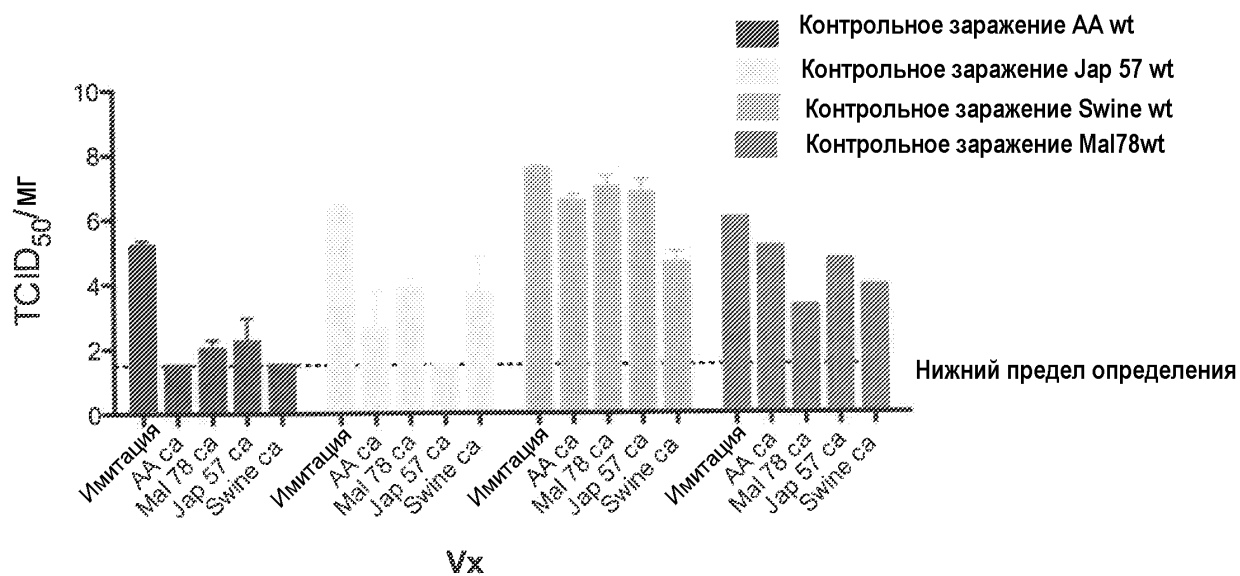
35

40

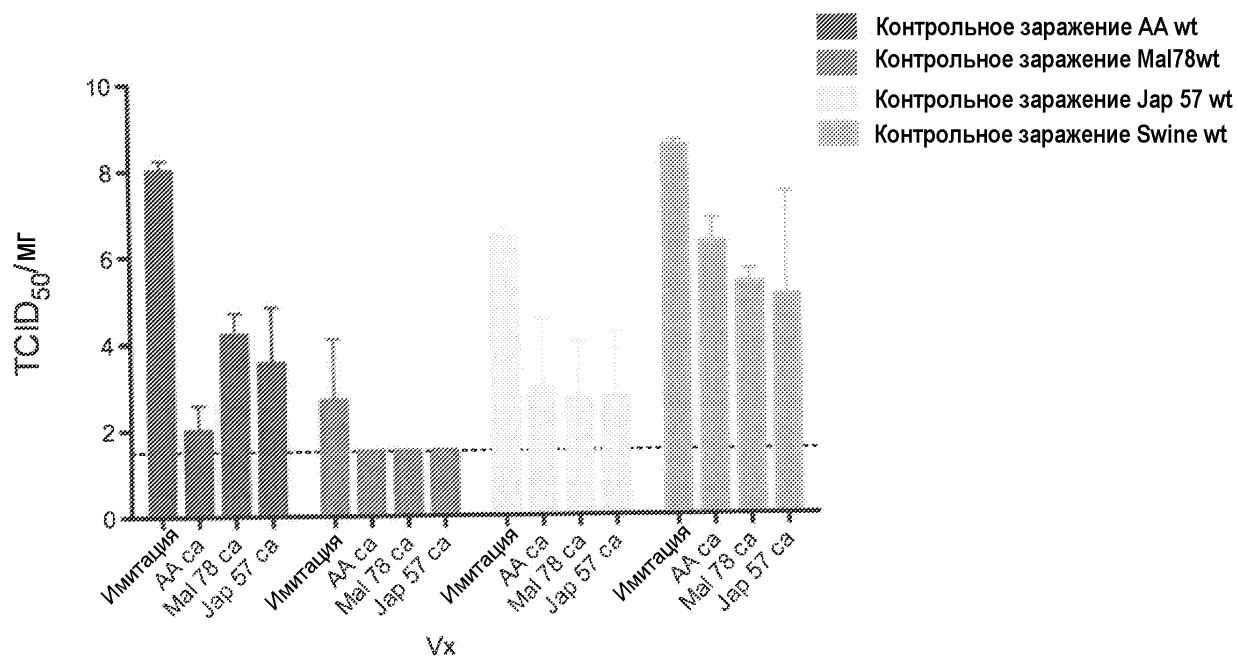
45



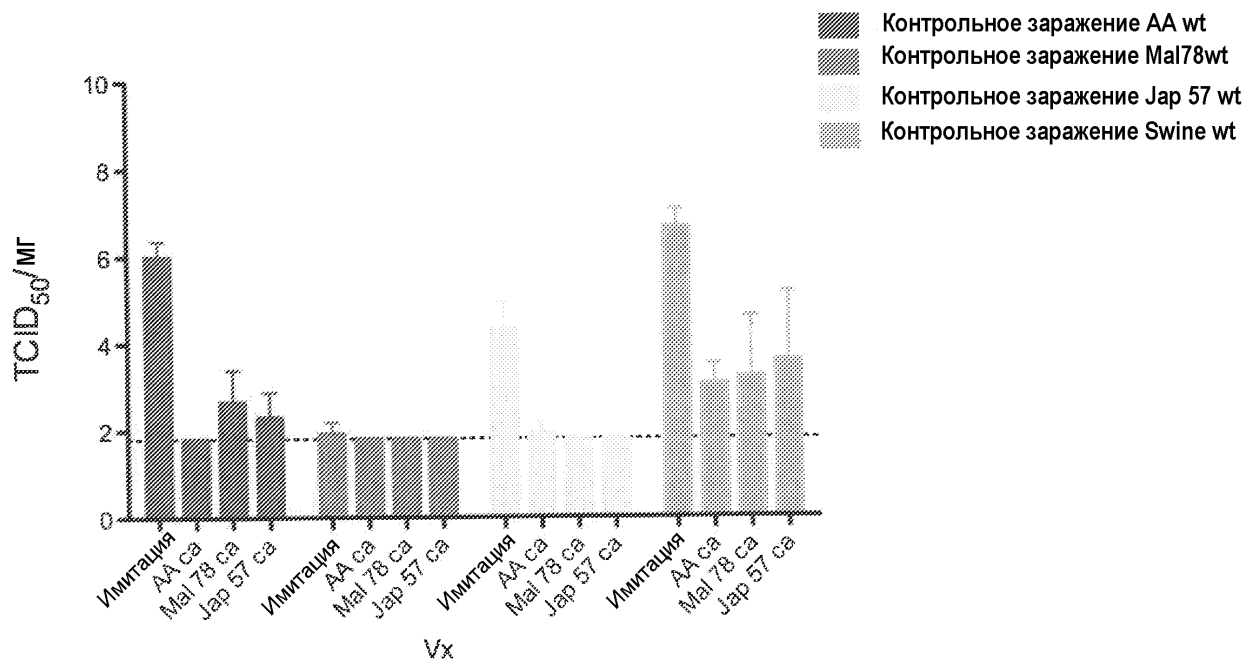
Фиг.1



Фиг.2



**Фиг.3**



**Фиг.4**