



(51) МПК

A61K 39/00 (2006.01)*C12N 15/44* (2006.01)*C07K 14/11* (2006.01)*A61P 31/14* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2008119501/15, 18.10.2006**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.10.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

18.10.2005 US 60/727,513**10.03.2006 US 60/780,847****15.05.2006 US 60/800,006****17.07.2006 US 60/831,196****21.07.2006 US 60/832,116**

(см. прод.)

(43) Дата публикации заявки: **27.11.2009** Бюл. № 33(45) Опубликовано: **10.06.2013** Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 02/00885 A2, 03.01.2002. GALARZA J.M. et al. Vims-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge // Viral. Immunol., 2005, v.18, №1, pp.244-251. CHEN H. et al. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China // Proc Nati Acad Sci USA, 2004, Jul 13; 101(28), (см. прод.)**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **19.05.2008**(86) Заявка РСТ:
US 2006/040862 (18.10.2006)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/047831 (26.04.2007)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

**СМИТ Гейл (US),
БРАЙТ Рик (US),
ПУШКО Питер (US),
ЧЖАН Цзинью (US),
МАХМУД Кутуб (US)**

(73) Патентообладатель(и):

НОВАВАКС, ИНК. (US)

(54) ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ГРИППА (VLPs)

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, а именно биофармацевтики, и может быть использована для приготовления вакцин. Для этого вакцина, включающая VLP гриппа,

включает белки М1, НА и NA вируса гриппа, где указанная вакцина индуцирует стойкий иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека, восприимчивого к гриппу, и где белок М1 гриппа получен из

штамма A/Indonesia/5/05 вируса гриппа. Группа изобретений также относится к применению вакцины с вышеуказанным составом для индукции стойкого иммунитета к инфицированию вирусом гриппа у человека.

Использование данного состава вакцины позволяет наиболее эффективным способом получать количества VLP, необходимые для производства вакцин. 6 н. и 15 з.п. ф-лы, 41 ил., 31 пр., 2 табл.

(30) (продолжение): 19.09.2006 US 60/845,495;

(56) (продолжение):

pp.10452-10457. BENDER C. et al. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998 // Virology, 1999, Feb 1; 254(1), 115-253. WOOD J.M. et al. Preparation of vaccines against H5N1 influenza // Vaccine, 2002, May 15; 20 Suppl 2:S84-87.

RU 2 4 8 3 7 5 1 C 2

RU 2 4 8 3 7 5 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)**C12N 15/44** (2006.01)**C07K 14/11** (2006.01)**A61P 31/14** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008119501/15, 18.10.2006**(24) Effective date for property rights:
18.10.2006

Priority:

(30) Convention priority:

18.10.2005 US 60/727,513**10.03.2006 US 60/780,847****15.05.2006 US 60/800,006****17.07.2006 US 60/831,196****21.07.2006 US 60/832,116**

(to be continued)

(43) Application published: **27.11.2009 Bull. 33**(45) Date of publication: **10.06.2013 Bull. 16**(85) Commencement of national phase: **19.05.2008**

(86) PCT application:

US 2006/040862 (18.10.2006)

(87) PCT publication:

WO 2007/047831 (26.04.2007)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

SMIT Gejl (US),**BRAJT Rik (US),****PUSHKO Piter (US),****ChZhAN Tszin'ju (US),****MAKhMUD Kutub (US)**

(73) Proprietor(s):

NOVAVAKS, INK. (US)**(54) FUNCTIONAL INFLUENZA VIRUS-LIKE PARTICLES (VLPs)**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine, namely biopharmaceuticals, and may be used for making vaccines. For this purpose, the vaccine containing the influenza VLPs comprises the MI, HA and NA proteins of the influenza virus wherein said vaccine induces a long-lived immunity to influenza virus infection in an individual susceptible to influenza, and wherein the MI protein of influenza is

prepared of the influenza strain A/Indonesia/5/05. The group of inventions also refers to the use of the vaccine of the composition mention above for the induction of the long-lived immunity to influenza virus infection in an individual.

EFFECT: use of the given composition of the vaccine enables the most effective method to prepare an amount of VLPs necessary for the vaccine production.

21 cl, 41 dwg, 31 ex

(30) Priority: **19.09.2006 US 60/845,495;**

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки 60/727513, зарегистрированной 18 октября 2005 г., предварительной заявки 60/780847, зарегистрированной 10 марта 2006 г., предварительной заявки 60/800006, зарегистрированной 15 мая 2006 г., предварительной заявки 60/831196, зарегистрированной 17 июля 2006 г., предварительной заявки 60/832116, зарегистрированной 21 июля 2006 г., и предварительной заявки 60/845495, зарегистрированной 19 сентября 2006 г., все из которых включены здесь в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Известный уровень техники

Вирус гриппа является членом семейства Orthomyxoviridae (в качестве обзора см. Murphy and Webster, 1996). Существует три подтипа вирусов гриппа, обозначаемых А, В и С. Вирион гриппа содержит сегментированный отрицательно-смысловой геном РНК. Вирион гриппа включает следующие белки: гемагглютинин (НА), нейраминидазу (NA), матрикс (М1), белок-ионный канал протонов (М2), нуклеопротеин (NP), основной белок 1 полимеразы (РВ1), основной белок 2 полимеразы (РВ2), кислый белок полимеразы (РА) и неструктурный белок 2 (NS2). НА, NA, М1 и М2 связаны с мембраной, тогда как NP, РВ1, РВ2, РА и NS2 являются белками, связанными с нуклеокапсидом. NS1 является единственным неструктурным белком, не связанным с вирионными частицами, но специфичным для инфицированных вирусом гриппа клеток. Белок М1 представляет собой наиболее представленный белок в частицах вируса гриппа. Белки НА и NA представляют собой гликопротеины оболочки, ответственные за прикрепление вируса и проникновение вирусных частиц в клетку, и являются источниками главных иммунодоминантных эпитопов для нейтрализации вирусов и защитного иммунитета. Как белок НА, так и NA рассматриваются в качестве наиболее важных компонентов для профилактических противогриппозных вакцин.

Инфицирование вирусом гриппа инициируется путем прикрепления поверхностного белка НА вириона к клеточному рецептору, содержащему сиаловую кислоту (гликопротеинам и гликолипидам). Белок NA опосредует процессинг рецептора с сиаловой кислотой, и проникновение вируса в клетку зависит от зависимо от НА, опосредуемого рецептором эндоцитоза. В кислых границах интернализованных эндосом, содержащих вирион гриппа, белок НА подвергается конформационным изменениям, которые ведут к слиянию мембран вируса и клетки-хозяина с последующей декапсидацией вируса и опосредуемым М2 высвобождением белков М1 из связанных с нуклеокапсидом рибонуклеобелков (RNPs), которые поступают в клеточное ядро для синтеза вирусной РНК. Антитела к молекуле НА могут предотвращать инфицирование вирусом путем нейтрализации вирусной инфекционности, тогда как антитела к белкам NA опосредуют их эффект на ранних стадиях репликации вирусов.

Вакцины с инаktivированными вирусами гриппа А и В в настоящее время лицензированы в виде трехвалентных вакцин для парентерального введения. Эти трехвалентные вакцины получают как одновалентную массу в аллантоисной полости яиц эмбрионов цыплят, очищают с помощью скоростного зонального центрифугирования или колоночной хроматографии, инаktivируют формалином или β-пропиолактоном и составляют в виде смеси двух штаммов, штамма типа А и типа В вирусов гриппа, циркулирующих в популяции людей в данном году. Доступные коммерческие вакцины против гриппа представляют собой вирусные вакцины с полным вирусом (WV) или субвирионные (SV; разложенные на

компоненты или с очищенным антигеном поверхности). Вакцина WV содержит интактные инактивированные вирионы. Вакцины SV, обработанные растворителями, такими как три-н-бутилфосфат (Flu-Shield, Wyeth-Lederle), содержат примерно все вирусные структурные белки и некоторые из вирусных оболочек. Вакцины SV, солюбилизованные тритоном X-100 (Fluzone, Sanofi-Aventis; Fluvirin, Novartis), содержат главным образом агрегаты мономеров HA, NA и NP, хотя присутствуют остаточные количества других вирусных структурных белков. Живая, ослабленная, адаптированная к холоду вирусная вакцина (FluMist, MedImmune) была недавно допущена на рынок FDA для коммерческого применения в качестве вакцины с интраназальной доставкой, показанной для активной иммунизации и профилактики заболевания, вызываемого вирусами гриппа А и В у здоровых детей и подростков 5-17 лет и здоровых взрослых 18-49 лет.

Несколько рекомбинантных продуктов было разработано в качестве кандидатов для рекомбинантной вакцины против гриппа. Эти подходы были сфокусированы на экспрессии, продукции и очистке белков HA и NA вируса гриппа типа А, включая экспрессию этих белков с применением инфицированных бакуловирусом клеток насекомого (Crawford et al., 1999; Johansson, 1999; Treanor et al., 1996), вирусных векторов (Pushko et al., 1997; Berglund et al., 1999) и вакцин с конструктами ДНК (Olsen et al., 1997).

Crawford et al. (1999) показал, что HA вируса гриппа, экспрессируемый в клетках насекомого, инфицированных бакуловирусом, способен предотвращать летальное заболевание гриппом, вызванное подтипами вируса H5 и H7 птичьего гриппа. В то же время другая группа показала, что бакуловирусная экспрессия белков вируса гриппа HA и NA индуцирует иммунные ответы у животных, более высокие по сравнению с индуцируемыми общепринятой вакциной (Johansson et al., 1999). Иммуногенность и эффективность экспрессирующегося в бакуловирусной системе гемагглютиниона вируса гриппа лошадей сравнивали с кандидатной вакциной гомологичной ДНК (Olsen et al., 1997). Взятые вместе данные продемонстрировали, что высокая степень защиты против нагрузки вирусом гриппа может быть индуцирована рекомбинантными белками HA или NA с применением различных экспериментальных подходов и в различных животных моделях.

Lakey et al. (1996) показали, что происходящая из бакуловирусной системы HA вакцина против гриппа хорошо переносилась и была иммуногенной у группы людей-добровольцев при фазе I исследования безопасности при росте дозы. Однако результаты исследований фазы II, проведенные в нескольких клинических точках на людях-добровольцах, вакцинированных несколькими дозами вакцин против гриппа, включающих белки HA и/или NA, показали, что вакцины с рекомбинантной субъединицей белка не вызывают защитного иммунитета [G. Smith, Protein Sciences; M. Perdue, USDA, Personal Communications]. Эти результаты показали, что конформационные эпитопы, расположенные на поверхности пепломеров инфекционных вирионов HA и NA, важны для выработки нейтрализующих антител и защитного иммунитета.

В отношении включения других белков вируса гриппа в кандидатные рекомбинантные гриппозные вакцины был осуществлен ряд исследований, включая эксперименты с привлечением нуклеобелка, NP, одного или в сочетании с белком M1 (Ulmer et al., 1993; Ulmer et al., 1998; Zhou et al., 1995; Tsui et al., 1998). Эти кандидатные вакцины, которые состояли из квазиинвариантных внутренних белков вириона, вызывали широкий спектр иммунных ответов, которые были в первую очередь

клеточными (как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетки памяти). Эти эксперименты включали использование ДНК или вирусных генных векторов. Были необходимы относительно большие количества вводимой ДНК, так как результаты экспериментов с более низкими дозами ДНК показали отсутствие или низкую защиту (Chen et al., 1998). Следовательно, дополнительные доклинические и клинические исследования могут потребоваться для оценки таких подходов на основе ДНК, включая безопасность, эффективность и устойчивость NP и M1 вируса гриппа.

Недавно при попытке разработать более эффективные вакцины против гриппа в качестве носителей эпитопов белка M2 вируса гриппа применены белки частиц. Логика разработки вакцины на основе M2 заключалась в том, что в исследованиях на животных защитный иммунитет против гриппа вызывался белками M2 (Slepishkin et al., 1995). Neirynck et al. (1999) применяли трансмембранный домен M2 из 23 аминокислот в качестве аминоконцевого гибридного партнера с основой антигена вируса гепатита В (HBsAg) для экспонирования эпитопа(ов) M2 на поверхности капсидоподобных частиц HBsAg. Однако несмотря на тот факт, что как полноразмерный белок M2, так и M2-HBsAg VLP индуцировали определяемые антитела и защиту у мышей, маловероятно, что будущие вакцины против гриппа будут основываться исключительно на белке M2, так как белок M2 присутствовал в низком количестве копий на вирион, был слабо антигенным, неспособным вызывать выработку антител, которые связывают свободные вирионы гриппа, и был не способен блокировать присоединение вируса к клеточным рецепторам (т.е. нейтрализовать вирус).

Так как предшествующие исследования показали, что поверхностные гликопротеины вируса гриппа, HA и NA, являются главными мишенями для индукции защитного иммунитета против вируса гриппа и что M1 обеспечивает консервативную мишень для клеточного иммунитета в отношении вируса гриппа, новая кандидатная вакцина может включать эти вирусные антигены в качестве белковой макромолекулярной частицы, такой как вирусоподобные частицы (VLPs). Кроме того, частица с этими антигенами вируса гриппа может экспонировать конформационные эпитопы, которые вызывают выработку нейтрализующих антител ко многим штаммам вирусов гриппа.

Несколько исследований показали, что рекомбинантные белки вируса гриппа могут самособираться в VLPs в клеточной культуре с применением экспрессионных плазмид для млекопитающих или бакуловирусных векторов (Gomez-Puertas et al., 1999; Neumann et al., 2000; Latham and Galarza, 2001). Gomez-Puertas et al. (1999) показали, что эффективное образование VLP зависит от уровней экспрессии вирусных белков. Neumann et al. (2000) создали систему экспрессионных плазмид для млекопитающих для формирования инфекционных вирусоподобных частиц гриппа полностью из клонированных кДНК. Latham and Galarza (2001) сообщали об образовании VLPs гриппа в клетках насекомого, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом, коэкспрессирующим гены HA, NA, M1 и M2. Эти исследования показали, что белки вириона гриппа могут самособираться при коэкспрессии в клетках эукариот.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предлагается вирусоподобная частица (VLP), включающая белок M1 вируса гриппа и белки H5 и N1, гемагглютинин и нейраминидаза. В одном осуществлении белок M1 происходит от штамма вируса

гриппа, отличного при сравнении с белками H5 и N1. В другом осуществлении указанные H5 или N1 происходят от клада 1 H5N1 вируса гриппа.

В настоящем изобретении предлагается также VLP, экспрессируемая в эукариотной клетке, включающая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих белки H5 и N1, и белок вируса гриппа M1, в условиях, которые позволяют образовываться VLPs. В одном осуществлении указанная эукариотная клетка выбрана из группы, состоящей из клеток дрожжей, насекомых, амфибий, птиц и млекопитающих. В другом осуществлении указанная эукариотная клетка представляет собой клетку насекомого.

В настоящем изобретении предлагается также VLP, которая вызывает образование нейтрализующих антител у человека или животного, которые являются защитными в отношении инфицирования вирусом гриппа при введении указанному человеку или животному.

В настоящем изобретении предлагается также иммуногенная композиция, включающая эффективную дозу VLP изобретения. В одном осуществлении указанная композиция включает адъювант.

В настоящем изобретении предлагается также вакцина, включающая эффективную дозу VLP изобретения. В одном осуществлении указанная вакцина включает, по меньшей мере, вторую VLP, которая включает HA и NA из различных штаммов вируса гриппа. В другом осуществлении указанная вакцина включает адъювант.

В настоящем изобретении предлагается также способ индукции прочного иммунитета к инфицированию вирусом гриппа у животного, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы вакцины, включающей VLP изобретения. В одном осуществлении указанная вакцина вводится животному перорально, внутривенно, интраназально, внутримышечно, внутривенно или подкожно.

В настоящем изобретении предлагается также применение VLP изобретения для получения вакцины для животного, где вакцина индуцирует прочный иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у указанного животного.

В настоящем изобретении предлагается также способ получения VLP изобретения, включающий экспрессию белков M1, HA и NA в эукариотной клетке.

В настоящем изобретении предлагается вакцина, включающая VLP гриппа, где указанная VLP включает белки M1, HA и NA вируса гриппа, где указанная вакцина индуцирует прочный иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека. В одном осуществлении указанная вакцина включает VLP гриппа, где указанная VLP состоит по существу из белков M1, HA и NA вируса гриппа, где указанная вакцина индуцирует прочный иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека. В другом осуществлении указанная вакцина включает VLP гриппа, где указанная VLP состоит из белков вируса гриппа, выбранных из группы, состоящей из белков M1, HA и NA вируса гриппа, где указанная вакцина индуцирует прочный иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека.

В настоящем изобретении предлагается также применение VLP гриппа, где указанная VLP включает белки M1, HA и NA вируса гриппа, для получения вакцины, где вакцина индуцирует прочный иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека.

Таким образом, в изобретении предлагается макромолекулярная белковая структура, содержащая (a) первый белок M1 вируса гриппа и (b) дополнительный структурный белок, который может включать второй или более белок M1 вируса

гриппа; первый, второй или более белок НА вируса гриппа; первый, второй или более белок NA вируса гриппа; и первый, второй или более белок М2 вируса гриппа. Если дополнительный структурный белок происходит не из второго или более белка М1 вируса гриппа, то включаются оба или все члены группы, например

5 первый и второй белки М2 вируса гриппа. Как таковые предлагаются функциональная структура из белков вируса гриппа, включающая субвиральную частицу, VLP, или капсомерную структуру или ее часть, вакцина, мультивалентная вакцина и их смеси, состоящие по существу из структурных белков вируса гриппа,

10 получаемых с помощью способа изобретения. В особенно предпочтительном осуществлении макромолекулярная белковая структура вируса гриппа включает белки НА, NA и М1 вируса гриппа, которые представляют собой продукты экспрессии генов вируса гриппа, клонированные в виде синтетических фрагментов из

15 вируса дикого типа.

Макромолекулярная белковая структура может также включать дополнительный структурный белок, например нуклеопротеин (NP), мембранные белки из видов, отличных от вирусов не гриппа и мембранный белок из источника, не являющегося вирусом гриппа, которые происходят от птиц или млекопитающих и различных

20 подтипов вируса гриппа, включая подтип А и В вирусов гриппа. Изобретение может включать гибридную макромолекулярную белковую структуру, которая включает часть из, по меньшей мере, одного белка, обладающего частью, не продуцируемой вирусом гриппа.

Профилактика гриппа может быть осуществлена с помощью предложения

25 макромолекулярной белковой структуры, которая может самособираться в клетке-хозяине из рекомбинантного конструктора. Макромолекулярная белковая структура изобретения обладает способностью к самосборке в гомотипические или гетеротипические вирусоподобные частицы (VLPs), которые экспонируют

30 конформационные эпитопы на белках НА и NA, что вызывает выработку нейтрализующих антител, которые являются защитными. Композиция может представлять собой вакцинную композицию, которая также содержит носитель или разбавитель и/или адъювант. Функциональные VLPs гриппа вызывают выработку

35 нейтрализующих антител против одного или более штаммов или типов вируса гриппа в зависимости от того, содержат ли VLPs гриппа белки НА и/или NA от одного или более штаммов или типов вируса. Вакцина может включать белки вируса гриппа, которые представляют собой белки вируса гриппа дикого типа.

Предпочтительно, чтобы структурные белки, содержащие VLP гриппа или ее часть,

40 могли происходить из различных штаммов вирусов гриппа дикого типа. Вакцины против гриппа можно вводить человеку или животным для индукции защитного иммунитета против одного или более штаммов или типов вируса гриппа.

Макромолекулярные белковые структуры изобретения могут проявлять гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность.

45 В изобретении предлагается способ получения VLP, происходящей от вируса гриппа, с помощью создания рекомбинантного конструктора, который кодирует структурные гены вируса гриппа, включая М1, НА, и, по меньшей мере, один структурный белок, происходящий от вируса гриппа. Рекомбинантный конструктор

50 применяют для трансфекции, инфицирования или трансформации подходящей клетки-хозяина рекомбинантным бакуловиром. Клетку-хозяина культивируют в условиях, которые позволяют экспрессироваться М1, НА и, по меньшей мере, одному структурному белку, происходящему от вируса гриппа, и VLP образуется в клетке-

хозяине. Инфицированные культуральные среды, содержащие функциональную VLP гриппа, собирают и VLP очищают. Изобретение характеризуется также дополнительной стадией котрансфекции, коинфицирования или котрансформации клетки-хозяина вторым рекомбинантным конструктором, который кодирует второй белок вируса гриппа, тем самым включая второй белок вируса гриппа в VLP. Такие структурные белки могут происходить от вируса гриппа, включая NA, M2 и NP, и, по меньшей мере, один структурный белок происходит от птиц или млекопитающих. Структурный белок может быть от подтипа А и В вирусов гриппа. В соответствии с изобретением клетка-хозяин может представлять собой эукариотную клетку. Кроме того, VLP может представлять собой гибридную VLP.

В изобретении характеризуется также способ составления лекарственного вещества, содержащего VLP вируса гриппа, с помощью введения рекомбинантных конструкторов, кодирующих гены вируса гриппа в клетки-хозяева, и позволения самосборки рекомбинантных белков вируса гриппа в функциональную гомотипическую или гетеротипическую VLP в клетках. VLP гриппа выделяют и очищают и лекарственное вещество составляют как содержащее VLP гриппа. Лекарственное вещество может дополнительно содержать адъювант. Кроме того, в изобретении предлагается способ составления лекарственного продукта с помощью смешивания такого лекарственного вещества, содержащего VLP гриппа, с липидным пузырьком, т.е. неионным липидным пузырьком. Таким образом, функциональные гомотипические или гетеротипические VLPs могут созревать как покрытые частицы из инфицированных клеток. Зрелые VLPs гриппа могут быть выделены и очищены с помощью ультрацентрифугирования или колоночной хроматографии в виде лекарственных веществ и составлены одни или с адъювантами, такими как Novasomes®, продукт Novavax, Inc., в качестве лекарственных продуктов, таких как вакцины. Novasomes®, который обеспечивает усиленный иммунный ответ, дополнительно описывается в патенте США № 4911928, который включен здесь в качестве ссылки.

В изобретении предлагается способ определения гуморального иммунитета в отношении инфицирования вирусом гриппа у позвоночного с помощью предложения тест-реагента, включающего эффективное количество детектирующего антитела белка вируса гриппа, обладающего, по меньшей мере, одним конформационным эпитопом макромолекулярной структуры вируса гриппа. Тест-реагент вводится в контакт с образцом жидкости организма от позвоночного, проверяемого на инфицирование вирусом гриппа. Антителам, специфичным для вируса гриппа, содержащимся в образце, дают связаться с конформационным эпитопом макромолекулярной структуры вируса гриппа с образованием комплексов антиген-антитело. Комплексы отделяют от несвязанных комплексов и вводят в контакт с определяемым меченым связывающим иммуноглобулины агентом. Оценивают количество определяемого меченого связывающего иммуноглобулины агента, которое связалось с комплексами.

Вирус гриппа может быть определен в образце от животного или человека, подозреваемого на инфицирование или инфицированного вирусом, с помощью обеспечения антителами, которые имеют определяемую метку, продуцирующую сигнал, или присоединены к определяемому меченому реагенту, обладающему специфичностью, по меньшей мере, к одному конформационному эпитопу частицы вируса гриппа. Образец вводят в контакт с антителами и антителам позволяют связаться с вирусом гриппа. Присутствие вируса гриппа в образце определяют с

помощью определяемой метки.

В изобретении предлагаются способы лечения, профилактики и выработки защитного иммунного ответа с помощью введения позвоночному эффективного количества композиции изобретения.

5 Альтернативно, лекарственное вещество, VLP гриппа, может быть составлено в виде лабораторных реагентов, применяемых для исследований структуры вируса гриппа и клинических диагностических тестов. В изобретении предлагается также набор для лечения вируса гриппа с помощью введения эффективного количества
10 композиции изобретения и инструкции для применения.

В изобретении предлагается также VLP, включающая белки HA, NA и M1, происходящие от вируса птичьего гриппа, который может вызывать заболеваемость или смертность у позвоночных. В одном осуществлении указанные белки HA, NA
15 и M1 происходят от вируса птичьего гриппа типа A. В другом осуществлении HA выбран из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 и H16, а NA выбран из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 и N9. В другом осуществлении указанные белки HA и NA представляют собой H5 и N1 соответственно. В другом осуществлении указанные белки HA и NA
20 представляют собой H9 и N2 соответственно. В другом осуществлении указанный HA и/или NA проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность предпочтительно. В одном осуществлении VLP состоит по существу из белков HA, NA и M1, т.е. в VLP присутствуют по существу только белки вируса гриппа.

25 В изобретении предлагается также способ получения VLP, включающий трансфекцию векторов, кодирующих белки вируса птичьего гриппа, в подходящую клетку-хозяина и экспрессию указанных белков вируса птичьего гриппа в условиях, которые позволяют образовываться VLPs. В одном осуществлении этот
30 способ включает трансфекцию клетки-хозяина рекомбинантными молекулами ДНК, которые кодируют белки вируса гриппа HA, NA и M1.

Изобретение также включает антигенный состав, включающий VLP, включающую белки HA, NA и M1, происходящие от вируса птичьего гриппа, который может вызывать заболеваемость или смертность у позвоночного. В другом
35 осуществлении HA выбран из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 и H16, а NA выбран из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 и N9. В другом осуществлении указанные белки HA и NA представляют собой H5 и N1 соответственно. В другом осуществлении указанные
40 белки HA и NA представляют собой H9 и N2 соответственно. В другом осуществлении указанный антигенный состав вводят субъекту перорально, внутривенно, интраназально, внутримышечно, внутривенно или подкожно.

В изобретении дополнительно предлагается способ вакцинации позвоночного
45 против вируса птичьего гриппа, включающий введение указанному позвоночному индуцирующего защитную реакцию количества VLP, включающей белки HA, NA и M1, происходящие от вируса птичьего гриппа.

Данное изобретение также включает способ индукции стойкого иммунитета в
50 отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP вируса гриппа. В одном осуществлении указанная VLP состоит по существу из HA, NA и M1. В другом осуществлении указанная VLP включает белки

вируса гриппа, где указанные белки вируса гриппа состоят из НА, NA и М1. В другом осуществлении указанные НА и/или NA проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность предпочтительно.

5 Данное изобретение также включает способ индукции стойкого иммунитета в отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP вируса птичьего гриппа. В одном осуществлении указанная VLP гриппа состоит по существу из НА, NA и М1 птиц. В другом осуществлении указанная VLP
10 гриппа включает белки вируса гриппа, где указанные белки вируса гриппа состоят из НА, NA и М1 птиц.

Данное изобретение дополнительно включает способ индукции стойкого иммунитета в отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной
15 эффективной дозы VLP вируса сезонного гриппа. В одном осуществлении указанная VLP гриппа состоит по существу из НА, NA и М1 вируса сезонного гриппа. В другом осуществлении указанная VLP гриппа включает белки вируса гриппа, где указанные белки вируса гриппа состоят из НА, NA и М1 вируса
20 сезонного гриппа.

Данное изобретение дополнительно включает способ индукции стойкого иммунитета в отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы, по меньшей мере, VLP одного вируса сезонного гриппа. В одном
25 осуществлении указанная VLP гриппа состоит из НА, NA и М1 вируса сезонного гриппа. В другом осуществлении указанная VLP гриппа состоит по существу из НА, NA и М1 вируса сезонного гриппа.

Данное изобретение дополнительно включает способ индукции стойкого защитного ответа антител на инфицирование вирусом гриппа или, по меньшей мере, на один его симптом у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа.
30

Данное изобретение включает способ индукции стойкого защитного клеточного иммунного ответа на инфицирование вирусом гриппа или, по меньшей мере, на один его симптом у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа.
35

Данное изобретение дополнительно включает способ составления вакцины, которая индуцирует стойкий иммунитет в отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома у субъекта, включающий добавление к
40 указанному составу эффективной дозы VLP гриппа. В одном осуществлении указанный стойкий иммунитет в отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома возникает от одной дозы. В другом осуществлении указанный стойкий иммунитет в отношении инфицирования вирусом
45 гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома возникает от многократных доз.

Данное изобретение дополнительно включает вакцину, включающую VLP гриппа, где указанная вакцина индуцирует стойкий иммунитет в отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома при введении субъекту.
50 В одном осуществлении указанная VLP гриппа представляет собой VLP вируса птичьего гриппа. В другом осуществлении указанная VLP гриппа представляет собой VLP вируса сезонного гриппа.

Данное изобретение дополнительно включает антигенный состав,

включающий VLP гриппа, где указанная вакцина индуцирует стойкий иммунитет в отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома при введении субъекту. В одном осуществлении указанная VLP гриппа представляет собой VLP вируса птичьего гриппа. В другом осуществлении

5 указанная VLP гриппа представляет собой VLP вируса сезонного гриппа.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена нуклеотидная последовательность гена нейраминидазы (NA) вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEQ ID NO:1).

10

На фиг. 2 представлена нуклеотидная последовательность гена гемагглютинаина (HA) вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEQ ID NO:2).

На фиг. 3 представлена нуклеотидная последовательность гена белка матрикса M1 (M1) вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEQ ID NO:3).

15

На фиг. 4 представлены векторы для переноса для конструирования рекомбинантных бакуловирусов для экспрессии белков HA, NA и M1 вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). На фиг. 4A представлен вектор для переноса для экспрессии индивидуальных генов, а на фиг. 4B представлен вектор для переноса для множественной экспрессии генов.

20

На фиг. 5 представлена экспрессия белков HA, NA и M1 вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) в клетках Sf-9S.

На фиг. 6 представлена очистка VLPs птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) методом градиента плотности сахарозы.

25

На фиг. 7 представлено определение белка вируса гриппа с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Антитела, применяемые при анализе Вестерн-блоттингом, представляют собой следующее: (A) кроличье анти-H9N2; (b) мышинное анти-M1 mAb; и (C) мышинное анти-BACgp64.

30

На фиг. 8 представлено определение белков вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), включая субвиральные частицы, VLP и комплексы VLP с помощью электронной микроскопии.

На фиг. 9 представлена гемагглютининовая активность очищенных VLPs вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2).

35

На фиг. 10 представлена нейраминидазная активность очищенных VLPs вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2).

На фиг. 11 представлена иммунизация и схема взятия крови для изучения иммуногенности рекомбинантного вируса гриппа с помощью очищенных VLPs вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2).

40

На фиг. 12 представлены результаты исследования иммуногенности у мышей, иммунизированных рекомбинантными VLPs гриппа H9N2. На фиг. 12A представлены сыворотки от мышей BALB/c, иммунизированных рекомбинантными VLPs, включающими белки HA, NA и M1 из вируса птичьего гриппа типа A/H9N2/Hong Kong/1073/99. На фиг. 12B представлены сыворотки от новозеландских белых кроликов, иммунизированных инактивированным вирусом птичьего гриппа типа A H9N2, при взаимодействии в Вестерн-блоттах, содержащих инактивированный вирус птичьего гриппа типа A H9N2 (дорожки 1 и 3) или адаптированного к холоду вируса птичьего гриппа типа A H9N2 (дорожки 2 и 4).

45

50

На фиг. 13 представлено среднее геометрическое антительных ответов у мышей BALB/c после первичной и вторичной иммунизации.

На фиг. 14 представлены ответы ингибирования гемагглютинаина (HI) сыворотки у мышей BALB/c.

На фиг. 15 представлена потеря массы (%) мышей BALB/c, нагруженных H9N2 гриппа.

На фиг. 16 представлены титры вируса в легких на 3 и 5 день после нагрузки H9N2.

На фиг. 17A, 17B и 17C представлен антительный ответ на A/Fujian/411/2002 при иммунизации VLP H3N2.

На фиг. 18A и B представлены изотипы антител IgG мыши.

На фиг. 19 представлены ответы ингибирования гемагглютинаина (HI) антителами у мышей SD, иммунизированных вакциной с H9N2 VLP.

На фиг. 20A и 20B представлены ответы ингибирования гемагглютинаина (HI) антителами при различных дозах H9N2 VLPs с и без адьюванта у мышей BALB/c.

На фиг. 21 представлены ответы ингибирования гемагглютинаина сыворотки (HI) антителами у мышей BALB/c при различных дозах VLPs.

На фиг. 22 представлены ответы ингибирования гемагглютинаина (HI) сыворотки у хорьков.

На фиг. 23 представлены ответы ингибирования гемагглютинаина (HI) сыворотки хорьков из пулов сыворотки на 21 и 42 дни после введения различных штаммов H3N2 VLPs.

На фиг. 24 представлено антитело против HA (конечная точка титра разведения) мышей, инокулированных внутримышечно H5N1 (Vietnam/1203/2003) VLPs при низких дозах.

На фиг. 25 представлено антитело против HA (конечная точка титра разведения) мышей, инокулированных интраназально H5N1 (Vietnam/1203/2003) VLPs при низких дозах.

На фиг. 26 представлен пример получения, выделения и очистки VLPs изобретения.

На фиг. 27 представлены мыши, инокулированные H3N2 VLPs, введенными внутримышечно, и затем нагруженные интраназально вирусом A/Aichi/2/68x31 (H3N2).

На фиг. 28 представлены мыши, инокулированные H3N2 VLPs, введенными интраназально, и затем нагруженные интраназально вирусом A/Aichi/2/68x31 (H3N2).

На фиг. 29 представлено сбрасывание вируса в смывы носовой полости хорька, инокулированного H9N2 VLP вакциной и затем нагруженного интраназально вирусом H9N2.

На фиг. 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F, 30G, 30H представлены антительные ответы ингибирования гемагглютинаина (HI) у мышей после инокуляции различными дозами A/Fujian/411/2002 (H3N2) VLPs внутримышечно или интраназально при тестировании против различных штаммов H3N2 вирусов гриппа.

Подробное описание изобретения

Применяемый здесь термин «бакуловирус», также известный как baculoviridae, относится к семейству оболочечных ДНК вирусов артропод, члены которого могут быть использованы в качестве экспрессионных векторов для получения рекомбинантных белков в клеточных культурах со вставкой. Вирион содержит один или более палочковидных нуклеокапсидов, содержащих молекулу кольцевой, гиперспирализованной двухцепочечной ДНК (отн. М.м. 54×10^6 - 154×10^6). Вирус, используемый в качестве вектора, представляет собой обычно вирус ядерного полиедроза (NVP) *Autographa californica*. Экспрессия введенных генов находится под контролем сильного промотора, который в норме регулирует экспрессию белкового

компонента полиэдро́за, большого ядерного включения, в которое вирусы вставляются в инфицированных клетках.

Применяемый здесь термин «происходящий от» относится к происхождению или источнику и может включать существующие в природе, рекомбинантные, неочищенные или очищенные молекулы. Белки и молекулы настоящего изобретения могут происходить от молекул вируса гриппа или быть не вирусными.

Применяемый здесь термин «первый» белок вируса гриппа, т.е. первый белок М1 вируса гриппа, относится к белку, такому как М1, НА, NA и М2, который происходит от конкретного штамма вируса гриппа. Штамм или тип первого вируса гриппа отличается от штамма или типа второго белка вируса гриппа. Таким образом, «второй» белок вируса гриппа, т.е. второй белок М1 вируса гриппа, относится к белку, такому как М1, НА, NA и М2, который происходит от второго штамма вируса гриппа, который представляет собой штамм или тип, отличный от первого белка вируса гриппа.

Применяемый здесь термин «гемагглютининовая активность» относится к способности НА-содержащих белков, VLPs, или их частей связываться с красными клетками крови (эритроцитами) и агглютинировать их.

Применяемый здесь термин «нейраминидазная активность» относится к ферментативной активности НА-содержащих белков, VLPs, или их частей отщепляющей остатки сиаловой кислоты от субстратов, включая белки, такие как фетуин.

Применяемый здесь термин «гетеротипический» относится к одному или более различным типам или штаммам вируса.

Применяемый здесь термин «гомотипический» относится к одному типу или штамму вируса.

Применяемый здесь термин «макромолекулярная белковая структура» относится к конструкции или организации одного или более белков.

Применяемый здесь термин «мультивалентная» вакцина относится к вакцине против множества типов или штаммов вируса гриппа.

Применяемый здесь термин «не относящийся к вирусу гриппа» относится к белку или молекуле, которые не происходят от вируса гриппа.

Применяемый здесь термин «вакцина» относится к препарату убитых или ослабленных патогенов или происходящих от них антигенных детерминант, который применяется для индукции образования антител или иммунитета против патогена. Вакцина дается для обеспечения иммунитета в отношении заболевания, например гриппа, которое вызывается вирусами гриппа. В настоящем изобретении предлагаются композиции вакцин, которые являются иммуногенными и обеспечивают защиту. Кроме того, термин «вакцина» также относится к суспензии или раствору иммуногена (например, VLP), который вводится позвоночному для выработки защитного иммунитета, т.е. иммунитета, который снижает тяжесть заболевания, связанного с инфекцией.

Применяемый здесь термин «стойкий иммунитет» относится к иммунному ответу, при котором, когда VLPs изобретения вводят позвоночному, возникает индукция иммунной системы у указанного позвоночного, что ведет к предотвращению инфицирования вирусом гриппа, ослаблению инфицирования вирусом гриппа или снижению, по меньшей мере, одного симптома, относящегося к инфицированию вирусом гриппа у указанного позвоночного. Стойкий иммунитет может также относиться к титру ингибирования гемагглютинации (HI) ≥ 40 у млекопитающего,

когда VLPs изобретения вводили и индуцировали иммунный ответ.

Применяемый здесь термин «адъювант» относится к соединению, которое при применении в сочетании со специфическим иммуногеном (например, VLP) в составе усиливает или другим образом изменяет или модифицирует конечный иммунный
 5 ответ. Модификация иммунного ответа включает интенсификацию или расширение специфичности только антительного или как антительного, так и клеточного иммунных ответов. Модификация иммунного ответа может также обозначать снижение или подавление определенных антиген-специфичных иммунных ответов.

Применяемый здесь термин «иммунный стимулятор» относится к соединению, которое увеличивает иммунный ответ путем собственных химических посредников организма (цитокинов). Эти молекулы включают различные цитокины, лимфокины и хемокины с иммуностимуляторной, иммунопотенцирующей и провоспалительной активностями, такие как интерлейкины (например, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-12,
 15 ИЛ-13); факторы роста (например, гранулоцит-макрофаг(GM)-колониестимулирующий фактор (CSF); и другие иммуностимулирующие молекулы, такие как воспалительный фактор макрофагов, лиганд Flt3, B7.1; B7.2 и т.д. Иммуностимуляторные молекулы можно вводить в том же составе, что и VLPs гриппа, или можно вводить отдельно. Для индукции иммуностимуляторного эффекта может быть введен либо белок, либо экспрессионный вектор.

Применяемый здесь термин «эффективная доза» обычно относится к такому количеству VLP изобретения, которое достаточно для выработки иммунитета, профилактики и/или ослабления инфицирования вирусом гриппа или снижения, по
 25 меньшей мере, одного симптома гриппозной инфекции и/или повышения эффективности другой дозы VLP. Эффективная доза может относиться к количеству VLP, достаточному для замедления или сведения к минимуму наступления инфицирования вирусом гриппа. Эффективная доза может также относиться к количеству VLP, которое обеспечивает терапевтическое преимущество при лечении или управлении инфицированием вирусом гриппа. Далее, эффективная
 30 доза представляет собой количество в отношении только VLPs или в сочетании с другими терапевтическими агентами, которые обеспечивают терапевтическое преимущество при лечении или управлении инфицированием вирусом гриппа. Эффективная доза может также представлять собой количество, достаточное для усиления собственного иммунного ответа субъекта (например, человека) на последующую экспозицию с вирусом гриппа. Уровни иммунитета могут быть прослежены, например, с помощью измерения количеств нейтрализующих
 40 секреторных и/или сывороточных антител, например, с помощью нейтрализации зон гемолиза, фиксации комплемента, иммуносорбента, связанного с ферментом или теста микронеutralизации. В случае вакцины «эффективная доза» представляет собой такую, которая предотвращает заболевание или снижает тяжесть симптомов.

Применяемый здесь термин «вирус птичьего гриппа» относится к вирусам гриппа, найденным главным образом у птиц, но которые могут также инфицировать
 45 человека или других животных. В некоторых случаях вирусы птичьего гриппа могут переноситься или распространяться от одного человека к другому. Вирус птичьего гриппа, который инфицирует человека обладает возможностью вызывать пандемию гриппа, т.е. заболеваемость и/или смертность у человека. Пандемия наступает, когда
 50 новый штамм вируса гриппа (вируса, к которому у человека нет природного иммунитета) появляется, распространяясь больше, чем у локальных индивидуумов, возможно, по всему земному шару и инфицируя одновременно много людей.

Применяемый здесь термин «вирус сезонного гриппа» относится к штаммам вируса гриппа, которые были определены как передающиеся в популяции людей во время данного сезона гриппа на основе эпидемиологических осмотров, проводимых национальными центрами гриппа по всему миру. Эти эпидемиологические исследования и некоторые выделенные вирусы гриппа посылаются в одну из четырех референсных лабораторий Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), одна из которых находится в центрах по контролю и профилактике заболеваемости (CDC) в Атланте, для подробного тестирования. Эти лаборатории тестируют, насколько хорошо антитела, выработанные к текущей вакцине, взаимодействуют с циркулирующим вирусом и новыми вирусами гриппа. Эта информация вместе с информацией об активности гриппа суммируется и представляется в консультативный комитет управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) и на заседание ВОЗ. Эти заседания приводят к выбору трех вирусов (двух подтипов А вируса гриппа и одного В вируса гриппа) для вхождения в вакцины против гриппа на последующие ослабленность и зиму. Выбор осуществляется в феврале для северного полушария и в сентябре для южного полушария. Обычно один или два из трех штаммов вируса в вакцине изменяются каждый год.

Применяемый здесь термин «по существу защитный антителы ответ» относится к иммунному ответу, опосредуемому антителами против вируса гриппа, которые появляются у позвоночного (например, человека), которые предотвращают или ослабляют инфицирование вирусом гриппа или снижают, по меньшей мере, один его симптом. VLPs изобретения могут стимулировать продукцию антител, таких как, например, нейтрализующие антитела, которые блокируют выход вирусов гриппа из клеток, блокируют репликацию указанного вируса гриппа путем связывания с вирусом и/или защищают клетки-хозяева от инфицирования и деструкции.

Применяемый здесь термин «по существу защитный клеточный ответ» относится к иммунному ответу, который опосредуется Т-лимфоцитами и/или другими белыми клетками крови, против вируса гриппа, обнаруживаемому у позвоночного (например, человека), который предотвращает или ослабляет инфицирование вирусом гриппа или снижает, по меньшей мере, один его симптом. Один важный аспект клеточного иммунитета включает антиген-специфический ответ цитолитических Т-клеток («CTL»s). CTLs обладают специфичностью к пептидным антигенам, которые представляются в связи с белками, кодируемыми главным комплексом гистосовместимости (МНС) и экспрессируются на поверхности клеток. CTLs способствуют индукции и промоции деструкции внутриклеточных микробов или лизису клеток, инфицированных такими микробами. Другой аспект клеточного иммунитета включает антиген-специфический ответ Т-клеток-хелперов. Т-клетки-хелперы действуют, помогая стимулировать функцию и сфокусировать активность неспецифических эффекторных клеток против клеток, экспонирующих пептидные антигены в связи с молекулами МНС на своей поверхности. «Клеточный иммунный ответ» также относится к продукции цитокинов, хемокинов и других таких молекул, продуцируемых активированными Т-клетками и/или другими белыми клетками крови, включая происходящие от CD4+ и CD8+ Т-клеток.

Применяемый здесь термин «стойкий иммунитет в большой популяции» относится к иммунитету, образующемуся в результате введения VLPs изобретения индивидуумам в популяции. Иммунитет у указанного индивидуума в указанной популяции ведет к предотвращению, ослаблению инфицирования вирусом гриппа

или снижению, по меньшей мере, одного симптома, относящегося к инфицированию вирусом гриппа у указанного индивидуума и предотвращает распространение указанного вируса гриппа другим индивидуумам в популяции. Термин популяция определяется как группа индивидуумов (например, школьники, пожилые, здоровые индивидуумы и т.д.) и может включать географическую область (например, конкретные города, школы, округа, рабочие места, страну, штат и т.д.).

Применяемый здесь термин «антигенный состав» или «антигенная композиция» относится к препарату, который при введении позвоночному, особенно птице или млекопитающему, будет индуцировать иммунный ответ.

Применяемый здесь термин «позвоночное», или «субъект», или «больной» относится к любому члену подтипа хордовых, включая без ограничения, человека и других приматов, включая приматов, не являющихся человеком, таких как шимпанзе и другие виды человекообразных приматов и обезьян. Сельскохозяйственные животные, такие как крупный рогатый скот, овцы, свиньи, козы и лошади; домашние животные, такие как собаки и кошки; лабораторные животные, включая грызунов, таких как мыши, крысы и морские свинки; птицы, включая домашних, диких и охотничье-промысловых птиц, таких как цыплята, индюшки и другие куриные птицы, утки, гуси и тому подобное, также являются не ограничивающими примерами. Термины «млекопитающие» и «животные» включаются в это определение. Для охвата предназначены как взрослые, так и новорожденные индивидуумы.

Грипп остается распространенной проблемой здравоохранения несмотря на доступность специальных инактивированных вирусных вакцин, которые эффективны на 60-80% при оптимальных условиях. Когда эти вакцины эффективны, заболевание обычно предотвращается с помощью препятствия инфицированию вирусом. Неудачность вакцины может возникнуть в результате аккумуляции антигенных различий (антигенной изменчивости и антигенного дрейфа). Например, вирус птичьего гриппа типа A H9N2 циркулировал совместно с вирусом гриппа человека типа A Sydney/97 (H3N2) у свиней и привел к генетической перестройке и возникновению новых штаммов вируса гриппа человека с пандемическим потенциалом (Peiris et al., 2001). В случае такой антигенной изменчивости маловероятно, что текущие вакцины будут обеспечивать адекватную защиту.

Другой причиной недостаточности программ по вакцинам против гриппа является относительно короткое сохранение иммунитета, вызываемое текущими вакцинами. Дополнительная неадекватность мер контроля за гриппом отражается в ограниченном применении текущих вакцин из-за реактогенности и побочных эффектов вакцин у маленьких детей, пожилых людей и людей с аллергией к компонентам яиц, которые применяются при производстве коммерчески лицензированных инактивированных вирусных вакцин против гриппа.

Кроме того, инактивированные вирусные вакцины против гриппа часто не содержат или содержат измененные конформационные эпитопы HA и NA, которые вызывают выработку нейтрализующих антител и играют главную роль в защите против заболевания. Таким образом, инактивированные вирусные вакцины, а также некоторые вакцины с рекомбинантными мономерными субъединицами белков вируса гриппа дают неадекватную защиту. С другой стороны, макромолекулярные белковые структуры, такие как капсомеры, субвирусные частицы и/или VLPs, включают множественные копии природных белков, экспонирующих конформационные эпитопы, что выгодно для оптимальной иммуногенности вакцин.

В настоящем изобретении описывается клонирование генов HA, NA и M1 вируса

птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) в отдельный бакуловирусный экспрессионный вектор поодиночке или совместно и продукция кандидатных вакцин против гриппа или реагентов, включающих рекомбинантные вирусные структурные белки, которые самособираются в функциональные и иммуногенные гомотипические

макромолекулярные белковые структуры, включая субвиральные частицы вируса гриппа и VLP гриппа, в инфицированных бакуловирусом клетках насекомого.

В настоящем изобретении описывается клонирование генов HA, NA, M1, M2 и NP вируса гриппа человека A/Sydney/5/97 и A/Fujian/411/2002 (H3N2) в бакуловирусные

экспрессионные векторы и продукция кандидатных вакцин против гриппа или реагентов, включающих вирусные структурные белки, которые самособираются в функциональные и иммуногенные гомотипические макромолекулярные белковые структуры, включая субвиральные частицы вируса гриппа и VLP гриппа, в инфицированных бакуловирусом клетках насекомого.

VLPs изобретения

VLPs гриппа изобретения пригодны для получения вакцин против вируса гриппа. Одной важной характеристикой данной системы является способность к замещению поверхностных гликопротеинов различными подтипами HA и/или NA или другими вирусными белками, таким образом позволяя каждый год модернизировать новые антигенные варианты вируса гриппа или получать их для пандемии гриппа. Так как антигенные варианты этих гликопротеинов идентифицированы, VLPs могут обновляться для включения этих новых вариантов (например, для вакцин против сезонного гриппа). Кроме того, поверхностные гликопротеины из потенциально пандемических вирусов, таких как H5N1 или другие сочетания HA, NA с пандемическим потенциалом, могут быть включены в VLPs без затрагивания высвобождающих генов, которые не циркулировали у людей в течение нескольких десятилетий. Это происходит потому, что VLPs не являются инфекционными, не реплицируются и не могут вызвать заболевание. Таким образом, эта система позволяет создавать новую кандидатную вакцину против гриппа каждый год и/или пандемическую вакцину против гриппа всякий раз, когда это необходимо.

Существует 16 различных гемагглютининов (HA) и 9 различных нейраминидаз (NA), все из которых найдены у диких птиц. Дикие птицы представляют собой первичный природный резервуар для всех типов вирусов гриппа А и, как считается, являются источником всех типов вирусов гриппа А у всех других позвоночных. Эти подтипы различаются из-за изменений в гемагглютинине (HA) и нейраминидазе (NA) на их поверхности. Возможны многие различные сочетания белков HA и NA. Каждое сочетание представляет собой отличный тип вируса гриппа А. Кроме того, каждый тип может быть дополнительно классифицирован в штаммы на основе различных мутаций, найденных в каждом из их 8 генов.

Все известные типы вирусов гриппа А могут быть обнаружены у птиц. Обычно

вирусы птичьего гриппа не инфицируют людей. Однако некоторые вирусы птичьего гриппа выработали генетические изменения, связанные со способностью преодолевать видовой барьер. Такой вирус способен вызвать пандемию, так как люди не имеют естественного иммунитета к вирусу и могут легко передавать его от человека к человеку. В 1997 г. вирус птичьего гриппа перешел от птиц к человеку в Гонконге при вспышке птичьего гриппа у домашних птиц. Этот вирус был идентифицирован как вирус гриппа H5N1. Вирус вызвал тяжелое респираторное заболевание у 18 человек, шесть из которых умерли. С этого времени возникло намного больше случаев известных инфекций H5N1 среди людей по всему миру; примерно половина из этих людей умерла.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает клонирование нуклеотидов HA, NA и M1 из вирусов птичьего гриппа, вирусов гриппа с пандемическим потенциалом и/или вирусов сезонного гриппа в экспрессионные векторы. В настоящем изобретении также описывается получение кандидатных вакцин против гриппа или реагентов, включающих белки вируса гриппа, которые самособираются в функциональные VLPs. Все сочетания вирусных белков должны быть коэкспрессированы с нуклеотидом M1.

VLPs изобретения состоят из или включают белки HA, NA и M1 вируса гриппа. В одном осуществлении указанная VLP включает HA из вируса птичьего, пандемического или сезонного гриппа и NA из вируса птичьего, пандемического или сезонного гриппа, где указанный HA выбран из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 и H16 и указанная NA выбрана из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 и N9. В другом осуществлении изобретение включает VLP, которая состоит по существу из HA, NA и M1. Указанные HA и NA могут быть из перечисленных выше HA и NA. Эти VLPs могут включать дополнительные белки вируса гриппа и/или белковые загрязнения в ничтожных концентрациях. В другом осуществлении указанная VLP гриппа включает белки вируса гриппа, где указанные белки вируса гриппа состоят из белков HA, NA и M1. Эти VLPs содержат HA, NA и M1 и могут содержать дополнительные клеточные составляющие, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительных белков вируса гриппа (отличных от фрагментов M1, HA и/или NA). В другом осуществлении HA и/или NA могут проявлять гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно при экспрессии на поверхности VLPs.

В другом осуществлении указанная VLP включает HA и NA вируса H5N1 и белок M1 (белок M1 может быть или не быть из одного и того же штамма вируса). В другом осуществлении указанная VLP состоит по существу из HA, NA вируса H5N1 и белка M1. Эти VLPs могут содержать дополнительные белки вируса гриппа и/или белковые загрязнения в ничтожных концентрациях. В дополнительном осуществлении указанная VLP состоит из HA, NA вируса H5N1 и белка M1. В другом осуществлении указанная VLP гриппа включает белки вируса гриппа, где указанные белки вируса гриппа состоят из белков H5, N1 и M1. Эти VLPs содержат H5, N1 и M1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительных белков вируса гриппа (отличных от фрагментов M1, H5 и/или N1). В другом осуществлении H5 и/или N1 могут проявлять гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно при экспрессии на поверхности VLPs.

В другом осуществлении указанная VLP включает HA и NA вируса H9N2 и белок M1. В другом осуществлении указанная VLP состоит по существу из HA и NA вируса H9N2 и белка M1. Эти VLPs могут включать дополнительные белки вируса гриппа и/или белковые загрязнения в ничтожных концентрациях. В дополнительном осуществлении указанная VLP состоит из HA и NA вируса H9N2 и белка M1. В другом осуществлении указанная VLP гриппа включает белки вируса гриппа, где указанные белки вируса гриппа состоят из белков H9, N2 и M1. Эти VLPs содержат H9, N2 и M1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловиральные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительных белков вируса гриппа (отличных от фрагментов M1, H9 и/или N2). В другом осуществлении H9 и/или N2 могут проявлять гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно при экспрессии на поверхности VLPs.

В другом осуществлении указанная VLP включает HA и NA из вируса В гриппа и белок M1. Вирусы В гриппа обычно находят только у человека. В отличие от вирусов А гриппа эти вирусы не классифицируются по подтипам. Вирусы В гриппа могут вызывать заболеваемость и смертность среди людей, но в целом связаны с менее тяжелыми эпидемиями, чем вирусы А гриппа. В другом осуществлении указанная VLP состоит по существу из HA, NA вируса В гриппа и белка M1. Эти VLPs могут включать дополнительные белки вируса гриппа и/или белковые загрязнения в ничтожных концентрациях. В другом осуществлении указанная VLP гриппа включает белки вируса гриппа, где указанные белки вируса гриппа состоят из белков HA, NA и M1. Эти VLPs содержат HA, NA и M1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловиральные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительных белков вируса гриппа (отличных от фрагментов M1, HA и/или NA). В другом осуществлении указанная VLP состоит из HA и NA вируса В гриппа и белка M1. В другом осуществлении HA и/или NA могут проявлять гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно при экспрессии на поверхности VLPs.

Изобретение охватывает также варианты указанных белков вируса гриппа, экспрессируемых на или в VLPs изобретения. Варианты могут содержать изменения в аминокислотных последовательностях составляющих белков. Термин «вариант» в отношении полипептида относится к аминокислотной последовательности, которая изменена по одной или более аминокислот по сравнению с референсной последовательностью. Вариант может иметь «консервативные» изменения, когда замещенная аминокислота имеет сходные структурные или химические свойства, например замещение лейцина на изолейцин. Альтернативно, вариант может иметь «неконсервативные» изменения, например замену глицина на триптофан. Аналогичные минорные вариации могут также включать делецию или вставку аминокислоты или оба варианта. Руководство для определения, какие аминокислотные остатки могут быть замещены, вставлены или подвергнуты делеции без уничтожения биологической или иммунологической активности, может быть найдено при использовании компьютерных программ, хорошо известных в данной области техники, например компьютерной программы DNASTAR.

Природные варианты могут возникать благодаря антигенным дрейфам. Антигенные дрейфы представляют собой небольшие изменения в вирусных белках, которые происходят непрерывно в течение времени. Таким образом, индивидуум,

инфицированный конкретным штаммом вируса гриппа, вырабатывает антитело против этого вируса, как только появляются более новые штаммы вируса, антитела против более старых штаммов больше не узнают более новый вирус и может наступить повторное инфицирование. Именно поэтому в каждый сезон существует новая вакцина против гриппа. Кроме того, некоторые изменения в вирусе гриппа могут вызывать преодоление вирусом гриппа видовой специфичности. Например, некоторые вирусы птичьего гриппа приобрели генетические вариации, связанные со способностью пересекать видовой барьер. Такой вирус способен вызывать пандемию, потому что люди не имеют естественного иммунитета к вирусу и вирус может легко распространяться от человека к человеку. Эти существующие в природе вариации вирусных белков являются осуществлением изобретения.

Обычные тексты, в которых описываются молекулярно-биологические способы, которые применимы к настоящему изобретению, такие как клонирование, мутация, клеточная культура и тому подобное, включают Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 2000 ("Sambrook") и Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместная деятельность Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc. ("Ausubel"). Эти тексты описывают мутагенез, применение векторов, промоторов и многие другие важные темы, относящиеся, например, к клонированию и мутации молекул НА и/или NA и т.д. Таким образом, изобретение также охватывает применение известных методов конструирования белков и способов рекомбинантных ДНК для улучшения или изменения характеристик белков вируса гриппа, экспрессируемых на или в VLPs изобретения. Могут быть использованы различные типы мутагенеза для получения и/или выделения вариантов молекул НА, NA и/или M1 и/или для дополнительной модификации/мутации полипептидов изобретения. Они включают, но не ограничиваются этим, сайт-направленный, случайный точечный мутагенез, гомологичную рекомбинацию (перестановки ДНК), мутагенез с применением содержащих урацил матриц, олигонуклеотид-направленный мутагенез, мутагенез с модифицированной фосфоротиоатом ДНК, мутагенез с применением двойных разрывов ДНК или тому подобное. Дополнительные подходящие методы включают точечное ошибочное спаривание оснований при репарации, мутагенез с использованием штаммов хозяина с дефектной репарацией, ограничение селекции и ограничение очистки, делеционный мутагенез, мутагенез с помощью тотального синтеза генов, разрыв репарации двойной спирали и тому подобное. Мутагенез, например, включающий химерные конструкторы, также включается в настоящее изобретение. В одном осуществлении мутагенез может управляться с помощью известной информации о существующей в природе молекуле или об измененной, или о существующей молекуле с природной мутацией, например, о последовательности, сравнениях последовательностей, физических свойствах, кристаллической структуре или тому подобное.

Изобретение дополнительно включает варианты белков вируса гриппа, которые проявляют существенную биологическую активность, например способность вызывать эффективный антительный ответ при экспрессии на или в VLP. Такие варианты включают делеции, вставки, повторы и замены, выбранные в соответствии с общими правилами, известными в данной области техники как обладающие низким эффектом на активность.

Методы клонирования указанных белков вируса гриппа известны в данной области техники. Например, ген вируса гриппа, кодирующий конкретный белок вируса гриппа, может быть выделен с помощью ОТ-ПЦР из полиаденилированной мРНК, экстрагированной из клеток, которые были инфицированы вирусом гриппа. 5
Результирующий генный продукт может быть клонирован в виде вставки ДНК в вектор. Термин «вектор» относится к средствам, с помощью которых нуклеиновая кислота может мультиплицироваться и/или переноситься между организмами, клетками или клеточными компонентами. Векторы включают плазмиды, вирусы, 10
бактериофаги, провирусы, фагемиды, транспозоны, искусственные хромосомы и тому подобное, что реплицируется автономно или может интегрироваться в хромосому клетки-хозяина. Вектор может также быть депротеинизированным полинуклеотидом РНК, депротеинизированным полинуклеотидом ДНК, полинуклеотидом, состоящим из как ДНК, так и РНК в одной и той же цепи, 15
полилизин-конъюгированной ДНК или РНК, пептид-конъюгированной ДНК или РНК, липосом-конъюгированной ДНК или тому подобное, что автономно не реплицируется. Во многих, но не во всех общих осуществлениях векторы настоящего изобретения представляют собой плазмиды или бакмиды.

Таким образом, изобретение включает нуклеотиды, которые кодируют белки вируса гриппа НА, NA и/или М1, клонированные в экспрессионный вектор, который может экспрессироваться в клетке, которая индуцирует образование VLPs. «Экспрессионный вектор» представляет собой вектор, такой как плаزمид, который способен стимулировать экспрессию, а также репликацию включенной в него 25
нуклеиновой кислоты. Обычно нуклеиновая кислота, которая будет экспрессироваться, «оперативно связана» с промотором и/или энхансером и является объектом транскрипционного регуляторного контроля промотором и/или энхансером. В одном осуществлении указанные нуклеотиды, которые кодируют НА 30
из вируса птичьего, пандемического и/или сезонного гриппа, выбраны из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15 и N16. В другом осуществлении указанные нуклеотиды, которые кодируют NA из вируса птичьего, пандемического и/или сезонного гриппа, выбраны из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 и N9. В другом осуществлении указанный вектор 35
включает нуклеотиды, которые кодируют белок вируса гриппа НА, NA и/или М1. Предпочтительный экспрессионный вектор представляет собой бакуловиральный вектор. После того как нуклеотиды, кодирующие указанные белки вируса гриппа, клонированы, с указанными нуклеотидами можно дополнительно манипулировать. 40
Например, специалист в данной области техники может создать мутацию в конкретных основаниях в кодирующей области для получения вариантов. Варианты могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в обеих. Такие варианты могут усиливать иммуногенность белка вируса гриппа или удалять сайт сплайсинга из белка или РНК. Например, в одном осуществлении 45
донорское и акцепторное сайты сплайсинга на белке М вируса гриппа (полноразмерном) мутируются для предотвращения сплайсинга мРНК М в транскрипты М1 и М2. В другом осуществлении НА конструируется для удаления или мутации сайта расщепления. Например, дикий тип НА N5 обладает сайтом расщепления, который содержит множество основных аминокислот (RRRKR). Эта 50
последовательность дикого типа делает НА более восприимчивым к множеству повсеместных протеаз, которые могут присутствовать у хозяина или в системе экспрессии этих Nas. В одном осуществлении удаление этих аминокислот может

снизить восприимчивость НА к различным протеазам. В другом осуществлении сайт расщепления может быть мутирован для удаления сайта расщепления (например, мутирован до RESR).

В изобретении также применяются нуклеиновая кислота и полипептиды, которые кодируют НА, HA и M1. В одном осуществлении нуклеиновая кислота или белок НА вируса гриппа идентичен, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% SEQ ID NOs 1, 11, 31, 32, 39, 38, 46, 47, 54 или 55. В другом осуществлении нуклеиновая кислота или белок HA вируса гриппа идентичен, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% SEQ ID NOs 2, 10, 56, 57, 58, 27, 28, 29, 30, 37, 36, 33, 34, 35, 42, 43, 44, 45, 50, 51, 52 или 53. В другом осуществлении нуклеиновая кислота или белок M1 вируса гриппа идентичен, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% SEQ ID NOs 12, 40, 41, 48 или 49.

В некоторых осуществлениях созданы мутации, содержащие изменения, которые дают молчащие замены, добавки или делеции, но не изменяют свойств или активностей кодируемого белка или способа продукции белка. Варианты нуклеотидов могут быть получены по разнообразным причинам, например, для оптимизации экспрессии кодонов у конкретного хозяина (замена кодонов в мРНК человека на те, которые предпочтительны для клеток насекомого, таких как клетки Sf9). См. патентную публикацию США 2005/0118191, включенную здесь в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей. Примеры последовательностей изобретения с оптимизированными кодонами раскрыты ниже (например, SEQ ID 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54).

Кроме того, нуклеотиды могут быть секвенированы для гарантии того, что были клонированы корректные кодирующие области и они не содержат каких-либо нежелательных мутаций. Нуклеотиды могут быть субклонированы в экспрессионный вектор (например, бакуловирус) для экспрессии в любой клетке. Представленное выше является только одним примером того, как могут быть клонированы белки вируса гриппа. Специалист в данной области техники понимает, что дополнительные способы доступны и возможны.

В изобретении также предлагаются конструкторы и/или векторы, которые включают нуклеотиды, кодирующие структурные гены вируса птичьего, пандемического и/или сезонного гриппа, включая NA, M1 и/или HA. Вектор может представлять собой, например, фаг, плазмиду, вирусный или ретровирусный вектор. Конструкторы и/или векторы, которые кодируют структурные гены вируса птичьего, пандемического и/или сезонного гриппа, включая NA, M1 и/или HA, должны быть оперативно связаны с подходящим промотором, таким как AcMNPV полигедриновый промотор (или другой бакуловирусный), промотор фага лямбда PL, промотор E. coli lac, rhoA и tac, ранний и поздний промоторы SV40 и промоторы ретровирусных LTRs, которые являются не ограничивающими примерами. Другие подходящие промоторы должны быть известны специалисту в данной области техники и зависят от клетки-хозяина и/или желаемой скорости экспрессии. Экспрессионные конструкторы должны дополнительно содержать сайты инициации транскрипции, терминации транскрипции и в транскрибируемой области сайт связывания рибосом для трансляции. Кодирующая часть транскриптов, экспрессируемая конструкторами, должна предпочтительно включать кодон инициации трансляции в начале и кодон терминации, соответственно расположенный на конце полипептида, который будет транслироваться.

Экспрессионные векторы должны предпочтительно включать, по меньшей мере,

один селективируемый маркер. Такие маркеры включают дигидрофолатредуктазу, G418 или устойчивость к неомицину для культуры эукариотных клеток и гены устойчивости к тетрациклину, канамицину или ампициллину для культивирования в *E. coli* и других бактериях. Среди векторов предпочтительными являются вирусные векторы, такие как бакуловирус, поксвирус (например, вирус коровьей оспы, вирус птичьей оспы, вирус канареечной оспы, вирус оспы домашней птицы, вирус оспы енотов, вирус оспы свиней и т.д.), вирус герпеса и ретровирус. Другие векторы, которые могут быть использованы в изобретении, включают векторы для применения в бактериях, которые включают pQE70, pQE60 и pQE-9, векторы pBluescript, векторы Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5. Среди предпочтительных эукариотных векторов находятся pFastBac1, pWINEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 и pSG, pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL. Другие подходящие векторы должны быть вполне очевидные специалисту в данной области техники. В одном осуществлении указанный вектор, который включает нуклеотиды, кодирующие структурные гены вируса птичьего, пандемического и/или сезонного гриппа, включая HA, M1 и/или NA, представляет собой pFastBac. В другом осуществлении указанный вектор, который включает вставку, которая состоит из нуклеотидов, кодирующих структурные гены вируса птичьего, пандемического и/или сезонного гриппа, включая HA, M1 и NA, представляет собой pFastBac.

Затем рекомбинантный вектор может быть трансфецирован, инфицирован или трансформирован в подходящую клетку-хозяин. Таким образом, в изобретении предлагаются клетки-хозяева, которые включают вектор (или векторы), которые содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют HA, M1 и/или NA, и позволяют экспрессироваться HA, M1 и/или NA в указанной клетке-хозяине в условиях, которые позволяют образовываться VLPs.

В одном осуществлении рекомбинантные конструкции, упомянутые выше, могут быть использованы для трансфекции, инфицирования или трансформации и могут экспрессировать белки вируса гриппа HA, M1 и NA в эукариотных клетках и/или прокариотных клетках. Среди эукариотных клеток клетками-хозяевами являются дрожжи, насекомые, птицы, растения, *C. elegans* (или нематода) и клетки-хозяева млекопитающих. Не ограничивающими примерами клеток насекомых являются клетки *Spodoptera frugiperda* (Sf), например, Sf9, Sf21, клетки *Trichoplusia ni*, например, клетки High Five и клетки *Drosophila* S2. Примерами клеток-хозяев грибов (включая дрожжи) являются *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), штаммы *Candida*, включая *C. albicans* и *C. glabrata*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Pichia pastoris* и *Yarrowia lipolytica*. Примерами клеток млекопитающих являются клетки COS, клетки почек детенышей хомячков, L клетки мыши, клетки LNCaP, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки эмбриональной почки человека (HEK) и клетки африканской зеленой марышки, клетки CV1, клетки HeLa, клетки MDCK, клетки Vero и Hep-2. Могут быть также использованы ооциты *Xenopus laevis* или другие клетки, происходящие от амфибий. Прокариотные клетки-хозяева включают бактериальные клетки, например *E. coli*, *B. subtilis* и микобактерии.

Векторы, например векторы, включающие полинуклеотиды HA, NA и/или M1, могут быть трансфецированы в клетки-хозяева в соответствии с методами, хорошо известными в данной области техники. Например, введение нуклеиновых кислот в эукариотные клетки может представлять собой копреципитацию, электропорацию,

микроинъекцию, липофекцию и трансфекцию с применением полиаминных трансфекционных реагентов. В одном осуществлении указанный вектор представляет собой рекомбинантный бакуловирус. В другом осуществлении указанный рекомбинантный бакуловирус трансфецируют в эукариотную клетку. В предпочтительном осуществлении указанная клетка представляет собой клетку насекомого. В другом осуществлении указанная клетка насекомого представляет собой клетку Sf9.

В другом осуществлении указанные вектор и/или клетка-хозяин включают нуклеотиды, которые кодируют белок НА вируса птичьего, пандемического и/или сезонного гриппа, выбранные из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 и H16. В другом осуществлении указанные вектор и/или клетки-хозяева включают нуклеотиды, которые кодируют белок NA, выбранный из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 и N9. В другом осуществлении указанные вектор и/или клетка-хозяин включают НА, М1 и/или NA вируса гриппа. В другом осуществлении указанные вектор и/или клетка-хозяин состоят по существу из НА, М1 и/или NA. В дополнительном осуществлении указанные вектор и/или клетка-хозяин состоят из белка вируса гриппа, включающего НА, М1 и NA. Эти вектор и/или клетка-хозяин содержат НА, NA и М1 и могут содержать дополнительные клеточные составляющие, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительных белков вируса гриппа (отличных от фрагментов М1, НА и/или NA). В другом осуществлении указанные нуклеотиды кодируют НА и/или NA, которые проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно при экспрессии на поверхности VLPs.

В этом изобретении предлагаются также конструкты и способы, которые должны увеличить эффективность продукции VLPs. Например, удаление сайтов расщепления из белков для увеличения экспрессии белков (см. выше). Другой способ включает добавление лидирующих последовательностей к белку НА, NA и/или М1 для более эффективного транспорта. Например, гетерологичная сигнальная последовательность может быть соединена с белком вируса гриппа НА, NA и/или М1.

В одном осуществлении сигнальная последовательность может происходить от гена клетки насекомого и соединяться с белком НА вируса гриппа (для экспрессии в клетках насекомых). В другом осуществлении сигнальный пептид представляет собой сигнальную последовательность хитиназы, которая эффективно работает в бакуловирусных экспрессионных системах. В другом осуществлении лидирующие последовательности, взаимозаменяемые между белками вируса гриппа, могут обеспечить улучшенный транспорт белков. Например, было показано, что гемагглютинин H5 менее эффективен в отношении транспорта на поверхность частиц. Гемагглютинин H9, однако, направленно доставляется на поверхность и интегрируется на поверхности более эффективно. Таким образом, в одном осуществлении лидирующая последовательность H9 гибридизуется с белком H5.

Другим способом увеличения эффективности продукции VLP является оптимизация кодонов нуклеотидов, которые кодируют белки НА, NA и/или М1, для конкретного клеточного типа. Например, кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты для экспрессии в клетке Sf9 (см. патентную публикацию США 2005/0118191, включенную здесь в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей).

Примеры последовательностей с оптимизированными кодонами для клеток Sf9 раскрыты ниже (например, SEQ ID 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54). В одном осуществлении

последовательность нуклеиновой кислоты с оптимизированными кодонами белка вируса гриппа соответствует, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% любой SEQ ID Nos. 42, 44, 46, 48, 50, 52 и 54.

В изобретении предлагаются также способы получения VLPs, причем указанные способы включают экспрессию белков вируса птичьего, пандемического и/или сезонного гриппа в условиях, которые дают возможность образоваться VLP. В зависимости от экспрессионной системы и выбранной клетки-хозяина VLPs продуцируются растущими клетками-хозяевами, трансформированными экспрессионным вектором в условиях, при которых рекомбинантные белки экспрессируются, а VLPs образуются. Отбор подходящих условий выращивания находится в компетенции специалиста или работника с навыками в данной области техники.

Способы выращивания клеток, сконструированных для продукции VLPs изобретения, включают, но не ограничиваются этим, способы суспензионной, суспензионной с подпиткой, проточной и перфузионной культур. Клеточная культура обозначает рост и размножение клеток в биореакторе (ферментационной камере), где клетки размножаются и экспрессируют белок (например, рекомбинантные белки) для очистки и выделения. Обычно клеточная культура выращивается в стерильных условиях при контролируемой температуре и атмосферных условиях в биореакторе. Биореактор представляет собой камеру, применяемую для культивирования клеток, в которой могут быть прослежены условия среды, такие как температура, атмосфера, перемешивание и/или pH. В другом осуществлении указанный биореактор представляет собой предварительно стерилизованный пластиковый мешок (например, Cellbag®, Wave Biotech, Bridgewater, NJ). В другом осуществлении указанные предварительно стерилизованные пластиковые мешки представляют собой мешки от приблизительно 50 л до 1000 л.

VLPs затем выделяют с применением способов, которые предохраняют их целостность, таких как с помощью центрифугирования в градиенте, например, хлорида цезия, сахарозы и йодиксанола, а также стандартных способов очистки, включающих, например, ионообменную и гель-фильтрационную хроматографию.

Последующее является примером того, как VLPs изобретения могут быть получены, выделены и очищены. Обычно VLPs получают из рекомбинантных клеточных линий, сконструированных для создания VLP, где указанные клетки выращивают в клеточной культуре (см. выше). Продукция VLPs может осуществляться по схеме, проиллюстрированной на фиг. 26. Специалист в данной области техники должен понимать, что существуют дополнительные методы, которые могут быть использованы для создания и очистки VLPs изобретения, таким образом, изобретение не ограничивается описанным методом.

Продукция VLPs изобретения может начинаться высеванием клеток Sf9 (неинфицированных) во встряхиваемые сосуды, позволяя клеткам распространяться и увеличиваться в масштабе по мере роста и размножения клеток (например, от 125-мл сосуда до 50 л мешка Wave). Среда, применяемая для выращивания клеток, составляется для подходящей клеточной линии (предпочтительны среды, свободные от сыворотки, например среда для насекомых ExCell-420, JRH). Затем указанные клетки инфицируются рекомбинантным бакуловирусом при наиболее эффективной множественности инфицирования (например, от приблизительно 1 до приблизительно 3 единиц, образующих бляшки на клетку). Как только инфекция возникает, белки вируса гриппа HA, NA и M1 экспрессируются в вирусном геноме,

самособираются в VLPs и секретируются из клеток приблизительно через от 24 до 72 часов после инфицирования. Обычно инфицирование наиболее эффективно, когда клетки находятся в середине логарифмической фазы роста ($4-8 \times 10^6$ клеток/мл) и жизнеспособны, по меньшей мере, на приблизительно 90%.

VLPs изобретения могут быть собраны приблизительно через от 48 до 96 часов после инфицирования, когда уровни VLPs в среде клеточной культуры находятся приблизительно на максимуме, но до экстенсивного клеточного лизиса. Плотность и жизнеспособность клеток Sf9 во время сбора может составлять от приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл до приблизительно $1,5 \times 10^6$ клеток/мл с жизнеспособностью, по меньшей мере, 20%, как свидетельствует тест по исключению красителя. Затем среда удаляется и очищается. NaCl может быть добавлен к среде до концентрации от приблизительно 0,4 до приблизительно 1,0 М, предпочтительно до приблизительно 0,5 М для избегания агрегации VLPs. Удаление клеток и клеточных остатков из среды клеточной культуры, содержащей VLPs изобретения, может быть осуществлено с помощью тангенциальной проточной фильтрации (TFF) с однократным использованием предварительно стерилизованного картриджа с фильтром из полого волокна 0,5 или 1,00 мкм или сходного устройства.

Затем VLPs в очищенной культуральной среде могут быть сконцентрированы с помощью ультрафильтрации с применением одноразового предварительно стерилизованного картриджа из полого волокна с ограничением молекулярной массы 500000. Концентрированные VLPs могут быть отфильтрованы с помощью диализа против 10 объемов забуференного физиологического раствора (ЗФР), содержащего 0,5 М NaCl для удаления остаточных компонентов среды.

Концентрированные, отфильтрованные с помощью диализа VLPs могут быть дополнительно очищены в ступенчатом градиенте сахарозы от 20% до 60% в буфере ЗФР с 0,5 М NaCl при pH 7,2 при центрифугировании при $6500 \times g$ в течение 18 часов при от приблизительно 4°C до приблизительно 10°C . Обычно VLPs должны образовывать отличительную видимую полосу между от приблизительно 30% до приблизительно 40% сахарозы или на границе раздела (в от 20% до 60% ступенчатом градиенте), которая может быть собрана из градиента и сохранена. Этот продукт может быть разведен до содержания 200 мМ NaCl в препарате для следующей стадии процесса очистки. Этот продукт содержит VLPs и может содержать интактные бакуловирусные частицы.

Дополнительная очистка VLPs может быть достигнута с помощью ионообменной хроматографии или центрифугирования через подушку из 44% изопикнической сахарозы. При анионообменной хроматографии образец с градиента сахарозы (см. выше) наносится на колонку, содержащую среду с анионом (например, Matrix Fractogel EMD TMAE), и элюируется через градиент соли (от приблизительно 0,2 М до приблизительно 1,0 М NaCl), что может отделить VLP от других загрязнений (например, бакуловируса и ДНК/РНК). В случае метода с подушкой сахарозы образец, включающий VLPs, добавляют к подушке 44% сахарозы и центрифугируют в течение приблизительно 18 часов при 30000 g . VLPs образуют полосу на верхушке 44% сахарозы, в то время как бакуловирус преципитирует на дно, а другие загрязняющие белки остаются в слое 0% сахарозы наверху. Пик или полоса VLP собирается.

Интактный бакуловирус может быть инактивирован, если это желательно. Инактивация может быть осуществлена с помощью химических методов, например,

формалина или β -пропиллактона (BPL). Удаление и/или инактивация интактного бакуловируса может быть также в значительной степени осуществлена с помощью применения селективной преципитации и хроматографических методов, известных в данной области техники, как проиллюстрировано выше. Способы инактивации

5 включают инкубацию образца, содержащего VLPs, в 0,2% BPL в течение 3 часов при приблизительно от 25°C до приблизительно 27°C. Бакуловирс может быть также инактивирован с помощью инкубации образца, содержащего VLPs, в 0,05% BPL при 4°C в течение 3 дней, затем при 37°C в течение одного часа.

10 После стадии инактивации/удаления продукт, включающий VLPs, можно пропустить через другую стадию фильтрации с помощью диализа для удаления любого реагента со стадии инактивации и/или любой остаточной сахарозы и для помещения VLPs в желаемый буфер (например, 3ФР). Раствор, включающий VLPs, может быть стерилизован с помощью способов, известных в данной области

15 техники (например, стерильной фильтрации), и сохранен в холодильнике или морозильнике.

Указанные выше способы могут быть осуществлены в различных масштабах. Например, в Т-образных колбах, качалках, вращающихся флаконах до

20 биореакторов промышленных размеров. Биореакторы могут включать либо резервуар из нержавеющей стали, либо предварительно стерилизованный пластиковый мешок (например, систему, продаваемую Wave Biotech, Bridgewater, NJ). Специалист в данной области техники должен знать что наиболее желательно для его целей.

25 Расширение и получение бакуловирусных экспрессионных векторов и инфицирование клеток рекомбинантным бакуловирусом для продукции рекомбинантных VLPs вируса гриппа может быть осуществлено в клетках насекомых, например клетках насекомых Sf9, как описано ранее. В

30 предпочтительном осуществлении клетки представляют собой SF9, инфицированные рекомбинантным бакуловирусом, сконструированным для продукции VLPs вируса гриппа.

Фармацевтические или вакцинные составы и введение

35 Применяемые здесь фармацевтические составы содержат фармацевтически приемлемый носитель, включая любой подходящий разбавитель или наполнитель, который включает любой фармацевтический агент, который сам не индуцирует индукцию иммунного ответа, вредного для позвоночного, получающего композицию, и который может вводиться без чрезмерной токсичности, и VLP

40 изобретения. Применяемый здесь термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный федеральным правительством, или правительством штата, или фармакопеей США, европейской фармакопеей или другой широко известной фармакопеей для применения у позвоночных и более конкретно у человека. Эти композиции могут быть пригодны в качестве вакцины и/или антигенных композиций

45 для индукции защитного иммунного ответа у позвоночного.

Указанные фармацевтические составы изобретения включают VLPs, включающие белок M1, HA и/или NA вируса гриппа и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Фармацевтически приемлемые носители включают, но не

50 ограничиваются этим, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глицерин, стерильный изотонический водный буфер и их сочетания. Всестороннее обсуждение фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и других наполнителей представлено в Remington's Pharmaceutical

Sciences (Mack Pub. Co. N.J., текущее издание). Состав должен подходить к способу введения. В предпочтительном осуществлении состав подходит для введения человеку, предпочтительно является стерильным, не содержащим частиц и/или непирогенным.

Композиция, если это желательно, может также содержать минорные количества увлажняющих или эмульгирующих агентов или доводящих pH буфера агентов. Композиция может представлять собой твердую форму, такую как лиофилизированный порошок, подходящий для воссоздания, жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетку, пилюлю, капсулу, состав для постоянного высвобождения или порошок. Пероральный состав может включать стандартные носители, такие как фармацевтического качества манит, лактоза, крахмал, стеарат магния, натриевая соль сахараина, целлюлоза, карбонат магния и т.д.

В изобретении также предлагается фармацевтическая упаковка или набор, включающий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами составов вакцины изобретения. В предпочтительном осуществлении набор включает два контейнера, один содержащий VLPs и другой содержащий адъювант. В сочетании с таким(и) контейнером(ами) может быть представлено уведомление в форме предписаний правительственного органа, регулирующего производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, причем уведомление отражает одобрение органа на производство, применение или продажу для введения человеку.

В изобретении также предполагается, что состав VLP будет упакован в герметически запаянный контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества композиции. В одном осуществлении композиция VLP предоставляется в виде жидкости, в другом осуществлении в виде сухого, стерильного, лиофилизованного порошка или свободного от воды концентрата в герметически запаянном контейнере, и он может быть воссоздан, например, с помощью воды или физиологического раствора до подходящей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно композиция VLP предлагается в виде сухого, стерильного, лиофилизованного порошка в герметически запаянном контейнере в единице лекарственной формы, составляющей предпочтительно приблизительно 1 мкг, приблизительно 5 мкг, приблизительно 10 мкг, приблизительно 20 мкг, приблизительно 25 мкг, приблизительно 30 мкг, приблизительно 50 мкг, приблизительно 100 мкг, приблизительно 125 мкг, приблизительно 150 мкг или приблизительно 200 мкг. Альтернативно, единица лекарственной формы композиции VLP составляет менее приблизительно 1 мкг (например, приблизительно 0,08 мкг, приблизительно 0,04 мкг; приблизительно 0,2 мкг, приблизительно 0,4 мкг, приблизительно 0,8 мкг, приблизительно 0,5 мкг или менее, приблизительно 0,25 мкг или менее или приблизительно 0,1 мкг или менее) или более приблизительно 125 мкг (например, приблизительно 150 мкг или более, приблизительно 250 мкг или более или приблизительно 500 мкг или более). Эти дозы могут быть измерены в виде суммарных VLPs или в виде мкг НА. Композиция VLP должна вводиться в пределах приблизительно 12 часов, предпочтительно в пределах приблизительно 6 часов, в пределах приблизительно 5 часов, в пределах приблизительно 3 часов или в пределах приблизительно 1 часа после воссоздания из лиофилизованного порошка.

В альтернативном осуществлении композиция VLP предлагается в жидкой форме в герметически запаянном контейнере с указанием количества и концентрации

композиции VLP. Предпочтительно жидкая форма композиции VLP поставляется в герметически запаянном контейнере в концентрации, по меньшей мере, приблизительно 50 мкг/мл, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 100 мкг/мл, по меньшей мере, приблизительно 200 мкг/мл, по меньшей мере, приблизительно 500 мкг/мл или, по меньшей мере, приблизительно 1 мг/мл.

Обычно VLPs вируса гриппа изобретения вводят в эффективном количестве или размере (как определено выше), достаточном для стимуляции иммунного ответа против одного или более штаммов вируса гриппа. Предпочтительно введение VLP изобретения вызывает стойкий иммунитет против, по меньшей мере, одного вируса гриппа. Обычно доза может быть доведена в пределах данного диапазона, основываясь на возрасте, физическом состоянии, массе тела, поле, диете, времени введения и других клинических факторах. Профилактический вакцинный состав вводят системно, например, путем подкожной или внутримышечной инъекции с применением иглы и шприца или безыгольного устройства для введения. Альтернативно, вакцинный состав вводят интраназально либо по каплям, либо в виде аэрозоля из крупных частиц (более чем приблизительно 10 микрон), либо в виде спрея в верхние дыхательные пути. Несмотря на то что любой из указанных выше путей доставки ведет к иммунному ответу, интраназальное введение предоставляет дополнительное преимущество, вызывая иммунитет в слизистой, являющейся входными воротами для вируса гриппа.

Таким образом, изобретение также включает способ составления вакцины или антигенной композиции, которая индуцирует стойкий иммунитет в отношении инфицирования вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного его симптома у субъекта, включающий добавление к указанному составу эффективной дозы VLP вируса гриппа.

Несмотря на то что стимуляция стойкого иммунитета одной дозой предпочтительна, для достижения желаемого эффекта могут быть введены дополнительные дозы тем же самым или отличным путем. У новорожденных и детей, например, могут требоваться множественные введения для индукции достаточных уровней иммунитета. Введение может продолжаться с интервалами в течение всего детства, так как необходимо поддерживать достаточные уровни защиты от инфицирования вирусом гриппа. Сходно, взрослым, которые особенно восприимчивы к повторной или тяжелой инфекции вирусом гриппа, такие как, например, работники здравоохранения, работники дневного ухода, члены семьи с маленькими детьми, пожилые люди и индивидуумы с нарушенной функцией сердца и легких, может требоваться множественная иммунизация для установления и/или поддержания защитных иммунных ответов. Уровни индуцированного иммунитета могут быть прослежены, например, с помощью измерения количеств нейтрализующих секретируемых и сывороточных антител, и дозировки доводят или вакцинации повторяют, как это необходимо для индукции и поддержания желаемых уровней защиты.

Таким образом, в одном осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфицированию вирусом гриппа или, по меньшей мере, к одному его симптому у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP включает белки HA, NA и M1. В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфицированию вирусом гриппа или, по меньшей мере, к одному его симптому у субъекта включает введение, по меньшей

мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит по существу из HA, NA и M1. Указанные VLPs могут включать дополнительные вирусные белки и/или белковые загрязнения в ничтожных концентрациях. В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфицированию вирусом гриппа или, по меньшей мере, к одному его симптому у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит из HA, NA и M1. В другом осуществлении указанные HA, NA и M1 вируса гриппа происходят от вируса сезонного гриппа и/или вируса птичьего гриппа. В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфицированию вирусом гриппа или, по меньшей мере, к одному его симптому у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, включающей белки вируса гриппа, где указанные белки вируса гриппа состоят из белков HA, NA и M1. Эти VLPs содержат HA, NA и M1 и могут содержать дополнительные клеточные составляющие, такие как клеточные белки, бакуловиральные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительных белков вируса гриппа (отличных от фрагментов M1, HA и/или NA). В другом осуществлении указанный HA и/или NA проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно. В другом осуществлении указанный субъект представляет собой млекопитающее. В другом осуществлении указанное млекопитающее является человеком. В другом осуществлении способ включает индукцию стойкого иммунитета к инфицированию вирусом гриппа или, по меньшей мере, к одному его симптому с помощью введения указанного состава в однократной дозе. В другом осуществлении способ включает индукцию стойкого иммунитета к инфицированию вирусом гриппа или, по меньшей мере, к одному его симптому с помощью введения указанного состава в множественных дозах.

Способы введения композиции, включающей VLPs (вакцины и/или антигенных составов), включают, но не ограничиваются этим, парентеральное введение (например, внутримышечное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и мукозное (например, интраназальное и пероральное или пути через легкие, или с помощью суппозитория). В конкретном осуществлении композиции настоящего изобретения вводят внутримышечно, внутривенно, подкожно, трансдермально или интратрансдермально. Композиции могут быть введены с помощью любого традиционного способа, например путем инфузии или болюсного введения, путем всасывания через эпителиальную или слизисто-кожную выстилку (например, слизистую полости рта, ободочную кишку, конъюнктиву, носоглотку, ротовую часть глотки, влагалище, уретру, мочевой пузырь и слизистую кишечника и т.д.), и могут вводиться совместно с другими биологически активными агентами. В некоторых осуществлениях интраназальный путь или другие пути введения через слизистые композиции, включающей VLPs изобретения, могут индуцировать антительный или другой иммунный ответ, который существенно выше, чем при других путях введения. В другом осуществлении интраназальный путь или другие пути введения через слизистые композиции, включающей VLPs изобретения, могут индуцировать антительный или другой иммунный ответ, который будет индуцировать перекрестную защиту против других штаммов вирусов гриппа. Введение может быть системным или местным.

В еще одном осуществлении вакцину и/или антигенный состав вводят таким способом, чтобы мишенями были слизистые ткани для того, чтобы индуцировать иммунный ответ в месте иммунизации. Например, слизистые ткани, такие как

кишечник, связанный с лимфоидной тканью (GALT), могут представлять собой мишени для иммунизации при применении перорального введения композиций, которые содержат адъюванты с конкретными свойствами, направленными на слизистую мишень. Дополнительные слизистые ткани, такие как носоглоточная лимфоидная ткань (NALT) и связанная с бронхами лимфоидная ткань (BALT), также могут представлять собой мишени.

Вакцины и/или антигенные составы изобретения можно также вводить по схеме дозировки, например первоначальное введение вакцинной композиции с последующими бустерными введениями. В конкретных осуществлениях вторая доза композиции вводится куда угодно от двух недель до одного года, предпочтительно от приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5 до приблизительно 6 месяцев после первоначального введения. Дополнительно после второй дозы может быть введена третья доза и от приблизительно трех месяцев до приблизительно двух лет или даже дольше, предпочтительно от приблизительно 4, приблизительно 5, или приблизительно 6 месяцев, или приблизительно 7 месяцев до приблизительно одного года после первоначального введения. Третья доза может быть необязательно введена, когда в сыворотке и/или моче или в секретах слизистых субъекта после второй дозы не определяются или определяются низкие уровни специфических иммуноглобулинов. В предпочтительном осуществлении вторую дозу вводят приблизительно через один месяц после первого введения, а третью дозу вводят приблизительно через шесть месяцев после первого введения. В другом осуществлении вторую дозу вводят приблизительно через шесть месяцев после первого введения.

В другом осуществлении указанную VLP изобретения можно вводить в виде части сочетанной терапии. Например, VLPs изобретения могут быть составлены с другими иммуногенными композициями и/или противовирусными агентами (например, амантадином, римантадином, занамивиром и остелтамивиром).

Доза фармацевтического состава может быть легко определена опытным специалистом, например, путем первоначального выявления доз, эффективных в индукции профилактического или терапевтического иммунного ответа, например измерением титра специфичных в отношении вируса иммуноглобулинов в сыворотке или измерением ингибирующего отношения антител в образцах сыворотки или образцах мочи или секретах слизистых. Указанные дозы могут быть определены на основании исследований на животных. Неограничивающий перечень животных, используемых для изучения вируса гриппа, включает морскую свинку, сирийского хомячка, шиншиллу, ежа, курицу, крысу, мышь и хорька. Большинство животных не являются природными хозяевами вируса гриппа, но, тем не менее, могут быть использованы для изучения разных аспектов заболевания. Например, любому из указанных выше животных можно ввести изучаемую вакцину, например VLPs изобретения, для частичной характеристики индуцируемого иммунного ответа и/или определения того, продуцируются ли какие-либо нейтрализующие антитела.

Например, многие исследования были проведены на мышинной модели, поскольку мышь благодаря малому размеру и низкой стоимости дают возможность ученым проводить более широкомасштабные исследования. Тем не менее, малый размер мышь усложняет также наблюдение любых клинических проявлений заболевания, и мышь не служит предсказательной моделью для заболевания у человека.

Для изучения различных аспектов инфекции вирусом гриппа человека и хода ее развития интенсивно использовали хорьков. Развитие многих современных

концепций иммунитета к вирусу гриппа было бы невозможно без использования хорька (Maher et al., 2004). Было показано, что хорьки являются хорошей моделью для изучения гриппа по нескольким причинам: инфекция гриппа у хорька очень сходна с таковой у человека в отношении клинических проявлений, патогенеза и иммунной реакции; вирус гриппа типа А и В человека является природной инфекцией хорька, что предоставляет возможность исследовать полностью контролируемую популяцию, в которой можно наблюдать взаимодействие передачи инфекции, болезни и вариации последовательности аминокислот в гликопротеинах вируса гриппа; и хорьки имеют другие физические особенности, которые делают их идеальной моделью для расшифровки проявлений заболевания. Например, хорьки и люди проявляют очень сходные клинические признаки инфекции гриппа, которые, видимо, зависят от возраста хозяина, штамма вируса, окружающих условий, степени вторичной бактериальной инфекции и многих других параметров. Таким образом, специалисту в данной области техники проще перенести корреляцию между эффективностью вакцины гриппа и режимом введения дозы с модели хорька на человека по сравнению с мышью или любой другой моделью, описанной выше.

Кроме того, опытным специалистом могут быть проведены клинические испытания на человеке для определения предпочтительной эффективной дозы для людей. Такие клинические испытания являются обычными и хорошо известны в данной области техники. Конкретная доза для применения обычно также зависит от пути введения. Эффективные дозы могут быть рассчитаны путем экстраполяции на основании кривых доза-ответ, полученных в системах тестирования *in vitro* или на животных.

Как также хорошо известно в данной области техники, иммуногенность композиции частиц может быть увеличена путем применения неспецифических стимуляторов иммунного ответа, известных как адъюванты. Адъюванты использовались в эксперименте для стимуляции генерализованного повышения иммунитета против неизвестных антигенов (например, патент США № 4877611). В протоколах иммунизации адъюванты использовали для стимуляции ответов в течение многих лет, и в этом качестве адъюванты хорошо известны специалисту в данной области техники. Некоторые адъюванты влияют на путь презентации антигенов. Например, иммунный ответ увеличивается, когда белковые антигены осаждают квасцами. Эмульгирование антигенов также продлевает презентацию антигена. Включение любого адъюванта, описанного в Vogel et al. "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)", включенной здесь в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей, предусматривается объемом данного изобретения.

В качестве иллюстрации, адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (неспецифический стимулятор иммунного ответа, содержащий убитую *Mycobacterium tuberculosis*), неполные адъюванты Фрейнда и адъювант гидроксида алюминия. Другие адъюванты включают GMCSF, BCG, гидроксид алюминия, соединения MDP, такие как *thur*-MDP, *por*-MDP, CGP (MTP-PE), липид А и монофосфорил-липид А (MPL). Рассматривается также RIBI, который содержит три компонента, экстрагированных из бактерий, MPL, трегалозы димиколат (TDM) и скелет клеточной стенки (CWS) в 2% эмульсии сквален/твин 80. Могут быть также использованы MF-59, Novasomes®, антигены МНС.

В одном осуществлении изобретения адъювант представляет собой липидную частицу с несколькими слоями, от двух до десяти двойных слоев, организованных в форме по существу сферических оболочек, разделенных водными слоями,

окружающими большую аморфную центральную полость, свободную от двойных липидных слоев. Липидные частицы с несколькими слоями могут стимулировать иммунный ответ несколькими путями, в качестве неспецифических стимуляторов, в качестве носителей антигена, в качестве носителей дополнительных адъювантов и их сочетаний. Липидные частицы с несколькими слоями действуют в качестве неспецифических иммуностимуляторов когда, например, вакцину готовят смешиванием антигена с предварительно полученными везикулами, так что антиген остается снаружи везикул. При инкапсулировании антигена в центральную полость везикулы последняя действует и как иммуностимулятор, и как носитель антигена. В другом осуществлении везикулы исходно изготавливают из нефосфолипидных везикул. В другом осуществлении везикулы представляют собой Novasomes. Novasomes® являются нефосфолипидными везикулами с несколькими слоями в диапазоне от приблизительно 100 нм до приблизительно 500 нм. Они включают Brij 72, холестерин, олеиновую кислоту и сквален. Было показано, что Novasomes являются эффективным адъювантом для антигенов гриппа (см. патенты США 5629021, 6387373 и 4911928, включенные здесь в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей).

В одном аспекте адъювантное действие достигается применением агента, такого как квасцы, используемого в растворе от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,1% в забуференном фосфатом солевом растворе. Альтернативно, VLPs могут быть получены в виде смеси с синтетическими полимерами сахаров (Carborol®), используемой в форме приблизительно 0,25% раствора. Некоторые адъюванты, например определенные органические молекулы, полученные из бактерий, действуют на хозяина, а не на антиген. Примером служит мурамиловый дипептид (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин [MDP]), бактериальный пептидогликан. В других осуществлениях с VLPs изобретения могут быть использованы гемоцианины и гемоэритрины. В некоторых осуществлениях предпочтительным является применение гемоцианина из моллюска фиссуреллия (KLH), хотя могут использоваться гемоцианины и гемоэритрины других моллюсков и членистоногих.

Могут использоваться также различные полисахаридные адъюванты. Например, было описано применение различных полисахаридных адъювантов пневмококка для стимуляции ответа антител у мышей (Yin et al., 1989). Следует использовать указанные дозы, которые вызывают оптимальный ответ или которые по крайней мере не вызывают супрессии (Yin et al., 1989). Особенно предпочтительны такие полиаминовые разновидности полисахаридов, как хитин и хитозан, включая деацетилованный хитин. В другом осуществлении применяют липофильное дисахарид-трипептидное производное мурамилового дипептида, которое используют, как описано, в искусственных липосомах, образуемых из фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина.

Еще одну группу адъювантов для использования с VLPs изобретения образуют амфипатические и поверхностно-активные агенты, например сапонин и такие производные, как QS21 (Cambridge Biotech). Могут также использоваться неионные блок-сополимерные поверхностно-активные агенты (Rabinovich et al., 1994). Другой пригодной группой адъювантов являются олигонуклеотиды (Yamamoto et al., 1988). Другими адъювантами, которые могут быть использованы в некоторых осуществлениях настоящего изобретения, являются Quil A и лентинен.

Другой группой адъювантов являются детоксицированные эндотоксины, такие

как очищенный детоксицированный эндотоксин патента США № 4866034. Такие очищенные детоксицированные эндотоксины эффективны в получении адьювантного ответа у позвоночных. Разумеется, детоксицированные эндотоксины могут быть соединены с другими адьювантами с получением мультиадьювантного состава. Например, сочетание детоксицированных эндотоксинов с трегалозы димиколатом, как описано в патенте США № 4435386, рассматривается как особенно перспективное. Предусматриваются также сочетания детоксицированных эндотоксинов с трегалозы димиколатом и эндотоксичными гликолипидами (патент США № 4505899), а также сочетание детоксицированных эндотоксинов со скелетом клеточной стенки (CWS) или CWS с трегалозы димиколатом, как описано в патентах США № 4436727, 4436728 и 4505900. Ожидается, что сочетание только CWS и трегалозы димиколата, без детоксицированных эндотоксинов, также может быть пригодно, как описано в патенте США № 4520019.

Специалистам в данной области техники должны быть знакомы разные типы адьювантов, которые можно соединять с вакцинами по данному изобретению, и они наряду с прочими включают алкиллизофосфолипиды (ALP); BCG и биотин (включая биотинилированные производные). Некоторыми адьювантами, особо предусматриваемыми для применения, служат теиховые кислоты из грам-положительных клеток. Они включают липотейховые кислоты (LTA), рибитолтейховые кислоты (RTA) и глицеролтейховую кислоту (GTA). В связи с изобретением могут быть также использованы активные формы их синтетических аналогов (Takada et al., 1995).

Различные адьюванты, даже те, которые обычно не используются у человека, могут, тем не менее, использоваться у других позвоночных, у которых, например, желательно увеличить уровень антител или затем получить активированные Т-клетки. Токсичность или другие неблагоприятные эффекты, которые могут возникать либо за счет адьюванта, либо за счет клеток, например, как это может иметь место при использовании необлученных опухолевых клеток, в данных обстоятельствах не имеют значения.

Другой способ индукции иммунного ответа может сопровождаться составлением VLPs изобретения с «иммуностимуляторами». Последние представляют собой собственные химические посредники организма (цитокины), повышающие ответ иммунной системы. Иммуностимуляторы включают, но не ограничиваются этим, различные цитокины, лимфокины и хемокины с иммуностимулирующей, иммунопонтецирующей и провоспалительной активностями, такие как интерлейкины (например, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-12, ИЛ-13); факторы роста (например, колониестимулирующий фактор (CSF) гранулоцитов-макрофагов (GM); 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 VLPs гриппа, или можно вводить отдельно. Для получения иммуностимулирующего эффекта можно вводить либо белок, либо экспрессионный вектор, кодирующий белок.

Способ стимуляции иммунного ответа против гриппа

VLPs изобретения пригодны для получения композиций, которые стимулируют иммунный ответ, обеспечивающий иммунитет или стойкий иммунитет к вирусам гриппа. В иммунитет к инфекции и заболеванию гриппом могут вносить вклад и слизистый, и клеточный иммунитет. Антитела, секретируемые местно в верхних

дыхательных путях, служат главным фактором резистентности к природной инфекции. В защите верхних дыхательных путей участвует секретируемый иммуноглобулин А (sIgA), а в защите нижних дыхательных путей участвует сывороточный IgG. Индуцируемый инфекцией иммунный ответ защищает от повторной инфекции тем же вирусом или антигенно сходным вирусным штаммом. Вирус гриппа подвержен частым и непредсказуемым изменениям; поэтому после естественной инфекции эффективный период защиты, обеспечиваемый иммунитетом хозяина, может составлять лишь несколько лет в отношении штаммов вируса, циркулирующих в сообществе.

VLPs изобретения могут индуцировать стойкий иммунитет у позвоночного (например, человека) при введении указанному позвоночному. Стойкий иммунитет возникает в результате иммунного ответа против VLP гриппа изобретения, который защищает от инфекции гриппом, или улучшает защиту, или, по меньшей мере, подавляет симптомы инфекции вирусом гриппа у указанного позвоночного. В некоторых случаях при инфицировании указанного позвоночного указанная инфекция может протекать асимптоматично. Ответ может быть не полностью защитным ответом. В этом случае, если указанное позвоночное инфицировано вирусом гриппа, позвоночное должно страдать от подавленных симптомов или от симптомов на протяжении более короткого периода времени по сравнению с неиммунизированным позвоночным.

В одном осуществлении изобретение включает способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа. В другом осуществлении указанная индукция стойкого иммунитета снижает продолжительность симптомов гриппа. В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP включает белки HA, NA и M1 гриппа. В другом осуществлении VLP гриппа включает белки гриппа, где указанные белки гриппа состоят из белков HA, NA и M1. Данные VLPs содержат HA, NA и M1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительные белки гриппа (отличные от фрагментов M1, HA и/или NA). В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит по существу из HA, NA и M1 гриппа. Указанные VLPs могут включать дополнительные белки гриппа и/или белковые загрязнения в незначительных концентрациях. В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит из HA, NA и M1 гриппа. В другом осуществлении HA и/или NA проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно. В другом осуществлении указанным субъектом является млекопитающее. В другом осуществлении указанным млекопитающим является человек. В еще одном осуществлении указанную VLP составляют с адъювантом или иммуностимулятором.

Недавно были предприняты совместные усилия для создания вакцины против птичьего гриппа, который потенциально способен создать пандемию. Это

обусловлено тем, что ряд вирусов птичьего гриппа преодолел видовой барьер и прямо инфицирует человека, вызывая заболевание и в некоторых случаях смерть. Этими вирусами были H5N1, H9N2 и H7N7 (Cox et al., 2004). В недавнем исследовании была оценена возможность применения инактивированного вируса H5N1 в качестве вакцины. Состав вакцины был сходен с лицензированными инактивированными вакцинами, лицензируемыми в настоящее время для продажи. Исследование привело к заключению, что применение инактивированного вируса H5N1 не индуцирует иммунного ответа у человека, однако вводимая доза была очень высокой (90 мкг птичьего гриппа по сравнению с 15 мкг лицензированной вакцины) (Treanor et al., 2006). Такое большое количество антигена птичьего гриппа не применяется в кампании вакцинации во всем мире. Как показано ниже, VLPs изобретения индуцируют иммунный ответ у позвоночного при введении указанному позвоночному.

Таким образом, изобретение охватывает способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP птичьего гриппа. В другом осуществлении указанная индукция стойкого иммунитета снижает продолжительность симптомов гриппа. В другом осуществлении указанная индукция иммунитета состоит во введении, по меньшей мере, 0,2 мкг птичьего НА в VLPs изобретения. В другом осуществлении указанная индукция иммунитета состоит во введении от приблизительно 0,2 мкг птичьего НА до приблизительно 15 мкг птичьего НА в VLPs изобретения. Введение может производиться в виде одной или более доз, но преимущественно может производиться в виде однократной дозы. В другом осуществлении птичий НА указанной VLP берет начало от птичьего гриппа H5N1.

В другом осуществлении изобретение включает способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вирусом птичьего гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP птичьего гриппа, где указанная VLP включает НА, NA и M1 птичьего гриппа. В другом осуществлении указанная VLP птичьего гриппа включает белки птичьего гриппа, где указанные белки птичьего гриппа состоят из белков НА, NA и M1. Данные VLPs содержат НА, NA и M1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительные белки гриппа (отличные от фрагментов M1, НА и/или NA). В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вирусом птичьего гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP птичьего гриппа, где указанная VLP состоит по существу из НА, NA и M1 птичьего гриппа. Указанные VLPs могут включать дополнительные белки гриппа и/или белковые загрязнения в незначительных концентрациях. В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вирусом гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит из НА, NA и M1 птичьего гриппа. В другом осуществлении указанные НА и NA птичьего гриппа относятся к H5N1 соответственно. В другом осуществлении указанные НА и NA птичьего гриппа относятся к H9N2 соответственно. В другом осуществлении указанные НА и NA птичьего гриппа относятся к H7N7 соответственно. В другом осуществлении указанные НА и NA птичьего гриппа

проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно. В другом осуществлении указанный субъект представляет собой млекопитающее. В другом осуществлении указанное млекопитающее является человеком. В еще одном осуществлении указанная VLP составлена с адъювантом или иммуностимулятором.

В другом осуществлении указанные VLPs птичьего гриппа обычно индуцируют иммунный ответ у позвоночного, который возрастает приблизительно в 2 раза, приблизительно в 4 раза, приблизительно в 8 раз, приблизительно в 16 раз, приблизительно в 32 раза, приблизительно в 64 раза, приблизительно в 128 раз (или более) сильнее, чем при применении сходных антигенов птичьего гриппа, составленных сходно с лицензированными инактивированными вакцинами, лицензируемыми в настоящее время для продажи. Существующие составы включают вакцины цельного инактивированного вируса (например, инактивированного формальдегидом), расщепленного вируса (химически разрушенного) или субъединиц (очищенного гликопротеина). Способы определения эффективности вакцины известны и широко применяются в данной области техники. Например, для определения эффективности вакцины птичьей VLP по сравнению с антигенами птичьего гриппа, составленными сходно с лицензированными инактивированными вакцинами, лицензируемыми в настоящее время для продажи, могут быть проведены тесты микронейтрализации и тесты ингибирования гемагглютинации. В одном осуществлении указанное повышение эффективности реализуется при введении позвоночному приблизительно 0,2 мкг, приблизительно 0,4 мкг, приблизительно 0,6 мкг, приблизительно 0,8 мкг, приблизительно 1 мкг, приблизительно 2 мкг, приблизительно 3 мкг, приблизительно 4 мкг, приблизительно 5 мкг, приблизительно 6 мкг, приблизительно 7 мкг, приблизительно 9 мкг, приблизительно 10 мкг, приблизительно 15 мкг, приблизительно 20 мкг, приблизительно 25 мкг, приблизительно 30 мкг, приблизительно 35 мкг, 40 мкг, приблизительно 45 мкг, приблизительно 50 мкг или более VLPs и антигена, составленного сходно с инактивированными вакцинами, лицензируемыми в настоящее время для продажи (т.е. эквивалентных количеств НА и/или NA в VLP и НА и/или NA, составленных сходно с лицензированными инактивированными вакцинами, и/или другого антигена). Количество может быть измерено в соответствии с содержанием НА. Например, 1 мкг VLP изобретения представляет собой приблизительно 1 мкг НА в растворе VLPs, включающих НА, или может быть измерено по массе VLPs.

Сезонные вакцины гриппа вводят людям ежегодно для снижения количества случаев гриппа каждый год. В настоящее время имеются два подтипа гриппа А и грипп В, циркулирующие в Соединенных Штатах. Поэтому существующие вакцины являются трехвалентными для обеспечения защиты от циркулирующих в настоящее время штаммов. Ежегодно отдельный штамм или вариация вируса гриппа изменяется. Поэтому почти во все годы производят и вводят новую композицию вакцины. Инактивированные вакцины производят размножением вируса в яйцах с эмбрионами кур. Собирают жидкость аллантоиса, вирус концентрируют и очищают и затем инактивируют. Таким образом, существующие лицензированные вакцины вируса гриппа могут содержать следовые количества остаточных белков яйца, и, следовательно, их не следует вводить лицам с анафилактической гиперчувствительностью к яйцам. Кроме того, должно быть организовано снабжение яйцами, а штаммы для получения вакцины должны отбираться за месяцы

до следующего сезона гриппа, что ограничивает гибкость данного подхода и часто приводит к задержкам и дефициту в получении и распространении. Кроме того, некоторые штаммы гриппа плохо реплицируются в яйцах с эмбрионами кур, что может ограничивать штаммы гриппа, которые можно выращивать и составлять в вакцины.

Как отмечалось выше, для получения VLP изобретения не требуется яиц. Эти VLPs получают с помощью системы клеточной культуры. Таким образом, изобретение охватывает способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы сезонной VLP гриппа. Как обсуждалось выше, термин сезонный вирус гриппа относится к штаммам вируса гриппа, для которых было выявлено прохождение через популяцию людей в данный сезон гриппа по данным эпидемиологических обследований Национальных центров гриппа во всем мире. Указанные исследования и некоторые выделенные вирусы гриппа присылаются для детального изучения в одну из четырех поверочных лабораторий Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), одна из которых располагается в Центрах контроля и профилактики болезней (CDC) в Атланте. В этих лабораториях проверяется, насколько хорошо антитела, полученные против существующей вакцины, взаимодействуют с циркулирующим вирусом и новыми вирусами гриппа. Эта информация, наряду с информацией об активности гриппа, обобщается и представляется наблюдательному комитету Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США и заседанию ВОЗ. На этих заседаниях производится отбор трех вирусов (двух подтипов вируса А и одного вируса В) для вакцин наступающих осени и зимы. Отбор производится в феврале для северного полушария и в сентябре для южного полушария. Обычно один или два из трех вирусных штаммов изменяются каждый год. В другом осуществлении указанная индукция стойкого иммунитета снижает продолжительность симптомов гриппа.

В другом осуществлении изобретение включает способ индукции стойкого иммунитета к сезонной инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы сезонной VLP гриппа, где указанная VLP включает сезонные НА, NA и М1 гриппа. В другом осуществлении указанная сезонная VLP гриппа включает сезонные белки гриппа, где указанные белки гриппа состоят из белков НА, NA и М1. Данные VLPs содержат НА, NA и М1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительные белки гриппа (отличные от фрагментов М1, НА и/или NA). В другом осуществлении указанный способ индукции стойкого иммунитета к сезонной инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы сезонной VLP гриппа, где указанная VLP состоит по существу из сезонных НА, NA и М1 гриппа. Указанные VLPs могут включать дополнительные белки гриппа и/или белковые загрязнения в незначительных концентрациях. В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит из сезонных НА, NA и М1 гриппа. В другом осуществлении указанные НА и/или NA птичьего гриппа проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно. В другом осуществлении указанный субъект является

млекопитающим. В другом осуществлении указанное млекопитающее является человеком. В другом осуществлении указанную VLP составляют с адьювантом или иммуностимулятором.

Обычно сезонные VLPs гриппа изобретения вводят в количестве, достаточном для стимуляции стойкого иммунитета в отношении одного или более штаммов сезонного вируса гриппа. В одном осуществлении VLPs смешивают с другими VLPs, включающими белки разных подтипов гриппа (перечисленных выше). В другом осуществлении состав представляет собой трехвалентный состав, который включает смесь VLPs с сезонными белками НА и/или NA гриппа из, по меньшей мере, двух подтипов гриппа А и/или, по меньшей мере, одного подтипа В. В другом осуществлении указанный подтип В получают тем же способом, что и описанный выше. В другом осуществлении многовалентный состав включает одну или более VLP изобретения, как описано выше.

В другом осуществлении VLPs изобретения (птичьих или сезонных VLPs) могут вызывать иммунный ответ, который должен обеспечивать защиту от более чем одного штамма вируса гриппа. Данная перекрестная защита позвоночного с помощью VLP гриппа, сконструированной из конкретного штамма конкретной подгруппы, может индуцировать перекрестную защиту от вируса гриппа различных штаммов и/или подгрупп. Представленные ниже примеры показывают, что VLPs изобретения способны индуцировать перекрестное взаимодействие с разными штаммами и/или подгруппами.

Гуморальная иммунная система вырабатывает антитела против различных антигенов гриппа, среди которых антитело, специфичное в отношении НА, является наиболее важным для нейтрализации вируса и тем самым предотвращения заболевания. Специфичные в отношении NA антитела менее эффективны в предотвращении инфекции, но они подавляют высвобождение вируса из инфицированных клеток. Слизистые ткани служат главными воротами для проникновения многих патогенов, включая грипп, и иммунная система слизистой обеспечивает первую линию защиты от инфекции, наряду с врожденным иммунитетом. SIgA и в определенной мере IgM являются основными нейтрализующими антителами, направленными против патогенов слизистой, предотвращающими вход патогена, и могут действовать внутриклеточно, ингибируя репликацию вируса. Назальные секреты содержат нейтрализующие антитела, особенно в отношении НА и NA гриппа, которые преимущественно относятся к изотипу IgA и образуются местно. Во время первичной инфекции все три основные класса Ig (IgG, IgA и IgM), специфичные в отношении НА, могут быть выявлены с помощью связанного с ферментом иммуносорбентного анализа в назальных смывах, хотя IgA и IgM выявляются чаще, чем IgG. И IgA, и в определенной мере - IgM активно секретируются местно, в то время как IgG имеет сывороточное происхождение. У субъектов с местным ответом IgA наблюдается также ответ IgA сыворотки. Местный ответ IgA, стимулированный естественной инфекцией, длится, по меньшей мере, 3-5 месяцев, и специфичные в отношении гриппа, коммитированные с IgA клетки памяти можно выявить локально. IgA также представляет собой преобладающий изотип Ig в местных секретах после вторичной инфекции, и ответ IgA выявляется в сыворотке после инфекции. Наличие местно продуцируемых нейтрализующих антител, индуцируемых живой вирусной вакциной, коррелирует с устойчивостью к инфекции и заболеванию после провоцирующего введения вируса дикого типа.

Устойчивость к инфекции гриппа или заболеванию коррелирует с уровнем местного и/или сывороточного антитела против HA и NA. Сывороточные антитела против HA служат наиболее часто измеряемым коррелятом защиты от гриппа (Cox et al., 1999). Ответ защитного сывороточного антитела (титр ингибирования гемагглютинации (HI) ≥ 40) может быть определен у приблизительно 80% субъектов после естественной инфекции гриппа. В-клетки, продуцирующие Ig всех трех основных классов, находятся в периферической крови здоровых субъектов (Cox et al., 1994) и индивидуумов, подвергшихся инфекции гриппа. У человека антитела сыворотки важны и для защиты от инфекции гриппа, и для выздоровления. Уровень сывороточного антитела против HA и NA у человека может коррелировать с устойчивостью к заболеванию после экспериментальной инфекции и естественной инфекции. Во время первичной инфекции Ig трех основных классов могут быть обнаружены в пределах 10-14 дней. Уровни IgA и IgM достигают пика через 2 недели, после чего начинают снижаться, тогда как уровень IgG достигает максимума через 4-6 недель. В то время, как IgG и IgM доминируют в первичном ответе, IgG и IgA преобладают во вторичном иммунном ответе.

Таким образом, изобретением охватывается способ индукции значительного защитного ответа антител на инфекцию вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа. В другом осуществлении указанная индукция значительного защитного ответа антител снижает продолжительность симптомов гриппа. В другом осуществлении способ индукции значительного защитного ответа антител на инфекцию вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP включает белки гриппа HA, NA и M1.

В другом осуществлении изобретение включает способ индукции значительного защитного ответа антител на инфекцию вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит по существу из HA, NA и M1 гриппа. Указанные VLPs могут включать дополнительные белки гриппа и/или белковые загрязнения в незначительных концентрациях. В другом осуществлении указанная VLP гриппа включает белки гриппа, где указанные белки гриппа состоят из белков HA, NA и M1. Эти VLPs содержат HA, NA и M1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительные белки гриппа (отличные от фрагментов M1, HA и/или NA). В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит из HA, NA и M1 гриппа. В другом осуществлении указанные HA, NA и M1 гриппа берут начало от сезонного гриппа и/или птичьего гриппа. В другом осуществлении указанные HA и/или NA проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно. В другом осуществлении указанным субъектом является млекопитающее. В другом осуществлении указанным млекопитающим является человек. В еще одном осуществлении указанную VLP составляют с адъювантом или иммуностимулятором.

Используемый здесь термин «антитело» обозначает белок, включающий один или более полипептидов, в значительной мере или частично кодируемых генами

иммуноглобулинов или фрагментами генов иммуноглобулинов. Выявленные гены иммуноглобулинов включают гены каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю константной области, а также огромное количество генов вариабельной области иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, которые в свою очередь определяют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Типичная иммуноглобулиновая (антительная) структурная единица включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну «легкую» (приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет вариабельную область из от приблизительно 100 до 110 или более аминокислот, являющейся главной детерминантой узнавания антигена. Антитела существуют в виде интактных иммуноглобулинов или в виде ряда хорошо охарактеризованных фрагментов, получаемых гидролизом с помощью различных пептидаз.

Клеточный иммунитет также важен для излечения от инфекции гриппа и может предотвращать связанные с гриппом осложнения. Специфичные в отношении гриппа лимфоциты были обнаружены в крови и секретах нижних дыхательных путей инфицированных субъектов. Цитолиз инфицированных гриппом клеток опосредуется CTLs вместе со специфичными в отношении гриппа антителами и комплементом. Первичный цитотоксичный ответ выявляется в крови через 6-14 дней и исчезает к 21 дню у инфицированных или вакцинированных индивидуумов (Ennis et al., 1981). Специфичные в отношении гриппа CTLs проявляют перекрестную специфичность в культурах *in vitro*; так, они лизируют клетки, инфицированные тем же типом гриппа, но не другими типами (например, вирусом гриппа А, но не вирусом гриппа В). Были выделены CTLs, которые узнают внутренние негликозилированные белки, М, NP и PB2 (Fleischer et al., 1985). Ответ CTL является перекрестным для штаммов вируса А (Gerhard et al., 2001) и важен для сведения распространения вируса до минимума в сочетании с антителом (Nguyen et al., 2001).

Клеточный иммунитет также важен для излечения от инфекции гриппа и может предотвращать связанные с гриппом осложнения. Специфичные в отношении гриппа лимфоциты были обнаружены в крови и секретах нижних дыхательных путей инфицированных субъектов. Цитолиз инфицированных гриппом клеток опосредуется CTLs вместе со специфичными в отношении гриппа антителами и комплементом. Первичный цитотоксичный ответ выявляется в крови через 6-14 дней и исчезает к 21 дню у инфицированных или вакцинированных индивидуумов (Ennis et al., 1981). Специфичные в отношении гриппа CTLs проявляют перекрестную специфичность в культурах *in vitro*; так, они лизируют клетки, инфицированные тем же типом гриппа, но не другими типами (например, вирусом гриппа А, но не вирусом гриппа В). Были выделены CTLs, которые узнают внутренние негликозилированные белки, М, NP и PB2 (Fleischer et al., 1985). Ответ CTL является перекрестным для штаммов вируса А (Gerhard et al., 2001) и важен для сведения распространения вируса до минимума в сочетании с антителом (Nguyen et al., 2001).

Таким образом, изобретение охватывает способ индукции значительного защитного клеточного иммунного ответа на инфекцию вируса гриппа или, по меньшей мере, одного ее симптома у субъекта, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа. В другом осуществлении способ индукции стойкого иммунитета к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере,

одного ее симптома у субъекта, включает введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы VLP гриппа, где указанная VLP состоит из HA, NA и M1 гриппа. В другом осуществлении указанная VLP гриппа включает белки гриппа, где указанные белки гриппа состоят из белков HA, NA и M1. Данные VLPs содержат HA, NA и M1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительные белки гриппа (отличные от фрагментов M1, HA и/или NA). В другом осуществлении указанные HA, NA и M1 гриппа берут начало от сезонного и/или птичьего вируса гриппа. В другом осуществлении указанные HA и/или NA проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно. В другом осуществлении указанным субъектом является млекопитающее. В другом осуществлении указанным млекопитающим является человек. В еще одном осуществлении указанную VLP составляют с адъювантом или иммуностимулятором.

Как упоминалось выше, VLPs изобретения (например, птичьего и/или сезонного гриппа) предотвращают или снижают, по меньшей мере, один симптом инфекции гриппа у субъекта. Симптомы гриппа хорошо известны в данной области техники. Они включают лихорадку, миалгию, головную боль, тяжелое недомогание, непродуктивный кашель, фарингит, потерю массы и ринит. Таким образом, способ изобретения включает предотвращение или снижение, по меньшей мере, одного симптома, связанного с инфекцией вируса гриппа. Снижение симптома может быть определено субъективно или объективно, например самооценкой субъекта, оценкой врача или проведением подходящего теста или измерения (например, температуры тела), включая, например, оценку качества жизни, замедление развития инфекции гриппа или дополнительных симптомов, снижение тяжести симптомов гриппа или подходящие тесты (например, титр антител и/или тест активации Т-клеток). Объективная оценка включает оценку и животного, и человека.

Основной стратегией, поддерживаемой Наблюдательным комитетом по практике иммунизации (ACIP), в контроле гриппа служила вакцинация лиц с риском серьезных осложнений гриппа, в частности людей старше 65 лет. Ежегодные эпидемии гриппа, однако, не ослабевают и являются значительным бременем для здоровья и финансов общества (Glaser et al., 1996). За последние 20 лет (1976-1999) произошел значительный рост связанной с гриппом смертности по всем причинам. С 1990 по 1999 ежегодное количество смертей, связанных с гриппом по всем причинам, превысило 50000 (Thompson et al., 2003). Несмотря на увеличение охвата вакциной людей ≥ 65 лет до 65% за последнее десятилетие, соответствующего снижения связанной с гриппом смертности по всем причинам не наблюдалось.

Таким образом, другой стратегией профилактики и контроля гриппа является всеобщая вакцинация здоровых детей и индивидуумов. У детей имеется высокая степень инфекции, требующей медицинского вмешательства заболеваемости и госпитализации из-за гриппа (Neuzil et al., 2000). Дети играют важную роль в распространении гриппа в школах, семьях и сообществах. Вакцинирование существующими вакцинами гриппа приблизительно 80% школьников в сообществе снизило респираторные заболевания у взрослых и избыточную смертность у пожилых (Reichert et al., 2001). Эта концепция известна как иммунитет сообщества или «иммунитет населения» и, как считается, играет важную роль в защите сообщества от болезни. Поскольку у вакцинированных людей имеются антитела, которые нейтрализуют вирус гриппа, имеется гораздо меньшая вероятность того,

что они передают вирус другим людям. Таким образом, даже невакцинированные люди (и люди, вакцинация которых ослабла или чьи вакцины не являются полностью эффективными) часто могут быть защищены иммунитетом населения благодаря тому, что окружающие их вакцинированные люди не болеют. Эффективность иммунитета населения растет с увеличением процента вакцинированных людей. Полагают, что для достижения иммунитета населения приблизительно 95% людей в сообществе должны быть защищены вакциной. Неиммунизированные люди увеличивают вероятность того, что они или другие люди заболеют.

Таким образом, изобретение охватывает способ индукции стойкого защитного иммунитета к инфекции вируса гриппа в популяции или сообществе для снижения случаев инфекции вируса гриппа у индивидуумов с ослабленным иммунитетом или невакцинированных индивидуумов путем введения VLPs изобретения популяции в сообществе. В одном осуществлении большинство детей школьного возраста иммунизируют против вируса гриппа введением VLPs изобретения. В другом осуществлении большинство здоровых индивидуумов в сообществе иммунизируют против вируса гриппа введением VLPs изобретения. В другом осуществлении VLPs изобретения составляют часть стратегии «динамической вакцинации». Динамическая вакцинация представляет собой постоянное получение низкоэффективной вакцины, которая связана с появляющимся пандемическим штаммом, но которая из-за антигенного дрейфа не способна обеспечить полную защиту у млекопитающего (см. Germann et al., 2006). Из-за неопределенности относительно будущей идентичности пандемического штамма практически невозможно запастись хорошо соответствующим пандемическим штаммом. Однако вакцинация плохо соответствующей, но потенциально эффективной вакциной может замедлить распространение пандемического вируса и/или снизить тяжесть симптомов пандемического штамма вируса гриппа.

Изобретением также охватывается вакцина, включающая VLP гриппа, где указанная вакцина индуцирует стойкий иммунитет к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного из ее симптомов при введении субъекту. В другом осуществлении указанная индукция стойкого иммунитета снижает продолжительность симптомов гриппа. В другом осуществлении указанная вакцина, индуцирующая стойкий иммунитет к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного из ее симптомов у субъекта, включает VLP, которая включает белки HA, NA и M1 гриппа. В другом осуществлении указанная вакцина, индуцирующая стойкий иммунитет к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного из ее симптомов у субъекта, включает VLP, которая состоит по существу из белков HA, NA и M1 гриппа. Указанные VLPs могут включать дополнительные белки гриппа и/или белковые загрязнения в незначительных концентрациях. В другом осуществлении указанная вакцина, индуцирующая стойкий иммунитет к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного из ее симптомов у субъекта, включает VLP, которая состоит из белков HA, NA и M1 гриппа. В другом осуществлении указанная вакцина, индуцирующая стойкий иммунитет к инфекции вируса гриппа или, по меньшей мере, одного из ее симптомов у субъекта, включает VLP, включающую белки гриппа, где указанные белки гриппа состоят из белков HA, NA и M1. Эти VLPs содержат HA, NA и M1 и могут содержать дополнительные клеточные компоненты, такие как клеточные белки, бакуловирусные белки, липиды, углеводы и т.д., но не содержат дополнительные белки гриппа (отличные от фрагментов M1, HA и/или NA). В другом осуществлении указанные белки HA, NA и M1 гриппа берут начало от

птичьего и/или сезонного вируса гриппа. В другом осуществлении НА и/или NA проявляют гемагглютининовую активность и/или нейраминидазную активность соответственно. В другом осуществлении указанным субъектом является

5 млекопитающее. В другом осуществлении указанным млекопитающим является человек. В еще одном осуществлении указанную VLP составляют с адъювантом или иммуностимулятором. В другом осуществлении указанную вакцину вводят

млекопитающему. В еще одном осуществлении указанным млекопитающим является человек.

10 Данное изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует толковать как ограничивающие. Содержимое всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитированных в настоящей заявке, а также фигуры и перечень последовательностей включены здесь в качестве ссылки.

ПРИМЕРЫ

15 Пример 1

Вещества и способы

Гены НА, NA и M1 вируса A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) экспрессировали в клетках *Spodoptera frugiperda* (линия клеток Sf-9S; ATCC PTA-4047) с использованием

20 бакуловирусной бакмидной экспрессионной системы. Гены НА, NA и M1 синтезировали обратной транскрипцией и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием РНК, выделенной из вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (фиг. 1, 2 и 3). Для обратной транскрипции и ПЦР использовали

олигонуклеотидные праймеры, специфичные для генов НА, NA и M1 вируса птичьего

25 гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (таблица 1). Копии кДНК этих генов исходно клонировали в бактериальный субклонирующий вектор, pCR2.1ТОРО. Из полученных трех плазмид на основе pCR2.1ТОРО гены НА, NA и M1 вставляли

ниже AcMNPV полигедриновых промоторов в бакуловирусный переносящий

30 вектор, pFastBac1 (InVitrogen), что дало три плазмиды на основе pFastBac1: pNA, pNA и pM1, экспрессирующие эти гены вируса гриппа, соответственно. Затем была сконструирована единая плазида pHAM на основе pFastBac1, кодирующая гены

и НА, и M1, каждый из которых расположен ниже отдельного полигедринового промотора (фиг. 4). Была определена нуклеотидная последовательность гена NA с

35 прилегающими 5'- и 3'-областями в плазмиде pNA (SEQ ID NO: 1) (фиг. 1). Одновременно были также определены нуклеотидные последовательности генов НА и M1 с прилегающими областями с использованием плазмиды pHAM (SEQ ID NOS:2 и 3) (фиг. 2 и 3). Наконец, рестрикционный фрагмент ДНК из плазмиды pHAM,

40 который кодирует обе экспрессионные кассеты НА и M1, клонировали в плазмиду pNA. Это дало плазмиду pNAHAM, кодирующую гены НА, NA и M1 вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (фиг. 4).

Плазмиду pNAHAM использовали для конструирования рекомбинантного бакуловируса, содержащего интегрированные в геном гены НА, NA и M1 вируса

45 гриппа, каждый из которых расположен ниже отдельного бакуловирусного полигедринового промотора. Инфекция пермиссивных клеток Sf-9S насекомого полученным рекомбинантным бакуловирусом приводила к совместной экспрессии этих трех генов гриппа в каждой клетке Sf-9S, инфицированной таким

50 рекомбинантным бакуловирусом.

Продукты экспрессии инфицированных клеток Sf-9S характеризовали через 72 часа после инфекции (с помощью анализа ДДС-Na-ПАГЭ, окраска белка кумасси синим, и анализа вестерн-иммуноблоттингом с использованием антител,

специфичных в отношении НА и М1 (фиг. 5). Анализ вестерн-иммуноблоттингом проводили с использованием кроличьего антитела, выработанного против вируса гриппа типа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (CDC, Atlanta, Ga., США), или мышиногo моноклонального антитела против белка М1 гриппа (Serotec, UK). Белки НА, NA и М1

5 ожидаемой молекулярной массы (64 кДа, 60 кДа и 31 кДа соответственно) были выявлены с помощью анализа вестерн-иммуноблоттингом. По сравнению с количеством белка НА, определяемым при данном анализе, белок NA проявлял меньшее взаимодействие с сывороткой кролика против вируса гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). Объяснения количества определяемого белка NA включали

10 более низкий уровень экспрессии белка NA в клетках Sf-9S, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом, по сравнению с белком НА, более слабое взаимодействие NA с сывороткой в денатурирующих условиях пор анализе вестерн-иммуноблоттингом (из-за удаления важных эпитопов при гель-электрофорезе

15 мембранного связывания), более низкую avidность NA-антитело по сравнению с НА-антитело или меньшую представленность NA-антител в сыворотке.

Культуральную среду от клеток Sf-9S, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом, экспрессирующим белки НА, NA и М1 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), также зондировали на белки гриппа. Осветленные культуральные супернатанты подвергали ультрацентрифугированию при 27000 об/мин для концентрирования высокомолекулярных белковых комплексов вируса гриппа, таких как субвирусные частицы, VLP, комплексы VLP и, возможно, другие частицы самосборки,

20 составленные из белков гриппа НА, NA и М1. Осажденные белковые продукты ресуспендировали в забуференном фосфатом солевом растворе (ЗФР, pH 7,2) и дополнительно очищали ультрацентрифугированием на прерывистых ступенчатых градиентах 20-60% сахарозы. Фракции из сахарозных градиентов собирали и анализировали с помощью ДДС-Na-ПАГЭ анализа, анализа вестерн-иммуноблоттингом и электронной микроскопии.

30

Белки НА и М1 гриппа ожидаемой молекулярной массы были выявлены в многочисленных фракциях градиента плотности сахарозы с помощью окраски кумасси синим и анализа вестерн-иммуноблоттингом (фиг. 6, таблица 1). Это позволило предположить, что белки вируса гриппа из инфицированных клеток Sf-9S агрегируют в высокомолекулярные комплексы, такие как капсомеры, субвирусные частицы, VLP и/или комплексы VLP. Белки NA, хотя и не постоянно, выявлялись с помощью окраски кумасси синим и анализа вестерн-иммуноблоттингом, что, вероятно, было обусловлено неспособностью антисыворотки кролика против

35 гриппа распознавать денатурированный белок NA при анализе вестерн-иммуноблоттингом, но они постоянно выявлялись при анализе ферментативной нейраминидазной активности (фиг. 10).

40

Таблица 1	
Фракция#*	Титр
1	<1:5001
3	<1:500
5	1:500
7	1:1000
9	1:2000
11	1:2000
12	1:4000
14	1:500
16	<1:500

3ФР**	<1:500
A/Shangdong/9/93	<1:1000
*Фракция из градиента сахарозы 20-60%	
**Отрицательный контроль	
***Положительный контроль	

5

	Вирус	Штамм	Ген	Праймер ОТ-ПЦР	SEQ ID No		
10	Тип А	(H3N2) Sydney/5/97	Гемагглютинин (HA)	Прямой	5'-A <u>GCATCCATG</u> AAGACTATCATTGCTTTGAG-3'	13	
				Обратный	5'-A <u>GGTACC</u> TCAAATGCAAATGTTGCACCTAATG-3'	14	
			Нейраминидаза (NA)	Прямой	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAGAAG GAGATAGAACC ATG AATCCAAATCAAAAGATAATAAC-3'	15	
				Обратный	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTCCCTATAT AGGCATGAGATTGATGTCCGC-3'	16	
			Матрикс (M1)	Прямой	5'-AAA <u>GAATTC</u> ATG AGTCTTCTAACCGAGGTGAAACGTA-3'	17	
				Обратный	5'-AAA <u>TTCGAA</u> TTACTCCAGCTCTATGCTGACAAAATGAC-3'	18	
15			M2	Прямой	5'-A <u>GAATC</u> ATG AGTCTTCTAACCGAGGTGGAACGCCT ATCAGAAACGAATGGGGTGC-3'	19	
				Обратный	5'-AAA <u>TTCGAA</u> TTACTCCAGCTCTATGCTGACAAAATGAC-3'	20	
				Нуклеопротеин (NP)	Прямой	5'-A <u>GAATTC</u> ATG GCGTCCCAAGGCACCAACG-3'	21
					Обратный	5'-A <u>GCGGCCGCTT</u> AATTGTCTACTCTCTGCAATTGTCTCCGAA GAAATAAG-3'	22
20	Тип В	Harbin	Гемагглютинин (HA)	Прямой	5'-A <u>GAATTC</u> ATG AAGGCAATAATTGTAATACTCATGG-3'	23	
				Обратный	5'-A <u>GCGGCCGCTT</u> ATAGACAGATGGAGCAAGAAACATTGTC TCTGGAGA-3'	24	
			Нейраминидаза (NA)	Прямой	5'-A <u>GAATT</u> CATG CTACCTTCAACTATACAAACG-3'	25	
				Обратный	5'-A <u>GCGGCCGCTT</u> ACAGAGCCATATCAACACCTGTGACAGTGG-3'	26	

25 Наличие высокомолекулярных VLPs было подтверждено хроматографией геле-
 30 фильтрацией. Аликвоту из фракций градиента плотности сахарозы, содержащую
 белки вируса гриппа, наносили на колонку сефарозы VL-4B для фракционирования
 по массе. Колонку калибровали декстраном синим 2000, декстраном желтым и
 витамином B12 (Amersham Pharmacia) с кажущимися молекулярными массами 2000000,
 20000 и 1357 дальтон соответственно и определяли свободный объем колонки. Как и
 35 ожидалось, высокомолекулярные белки вируса гриппа двигались в свободном
 объеме колонки, что служило характерной чертой макромолекулярных белков,
 таких как вирусные частицы. Фракции анализировали с помощью анализа вестерн-
 иммуноблоттингом для определения белков гриппа и бакуловируса. Например,
 белки M1 выявлялись во фракциях свободного объема, которые также содержали
 бакуловирусные белки (фиг. 7).

Морфологию VLPs и белков гриппа во фракциях градиента сахарозы выясняли с
 40 помощью электронной микроскопии. Для негативно окрашиваемой электронной
 микроскопии белки гриппа из двух фракций градиента плотности сахарозы
 фиксировали 2% глутаральдегидом в 3ФР, pH 7,2. Электронно-микроскопическое
 обследование негативно окрашенных образцов выявило наличие
 макромолекулярных белковых комплексов или VLPs в обеих фракциях. Эти VLPs
 45 имели разные размеры, включая диаметры приблизительно 60 и 80 нм, и
 морфологию (сферы). Были выявлены более крупные комплексы частиц обоого типа,
 а также частицы в форме палочек (фиг. 8). Все наблюдавшиеся макромолекулярные
 структуры имели выступы (пепломеры) на своей поверхности, что характерно для
 50 вирусов гриппа. Поскольку размер и вид частиц 80 нм были сходны с частицами
 вируса гриппа дикого типа, эти структуры, видимо, представляют собой VLPs,
 которые имеют отдельные черты сходства с частицами вируса гриппа дикого типа,
 включая сходство геометрии частиц, архитектуры, триангуляционного числа,

симметрии и других свойств. Меньшие частицы приблизительно 60 нм могут представлять собой субвирусные частицы, которые отличаются от VLPs и морфологически, и структурно. Сходный феномен рекомбинантных макромолекулярных белков разного размера и морфологии сообщался также для других вирусов. Например, рекомбинантный антиген основы (HBsAg) вируса гепатита В образует частицы разного размера, которые имеют разную архитектуру и триангуляционное число $T=4$ и $T=3$ соответственно (Crowther et al., 1994).

Для характеристики функциональных свойств очищенных образцов VLPs A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) образцы тестировали анализом гемагглютинации (фиг. 9) и анализом ферментативной нейраминидазной активности (фиг. 10). Для анализа гемагглютинации 2-кратные разведения очищенных VLPs гриппа смешивали с 0,6% эритроцитами морской свинки и инкубировали при 4°C в течение 1 час или 16 час. Степень гемагглютинации оценивали визуально и определяли и фиксировали наибольшее разведение рекомбинантных белков гриппа, способное к агглютинации эритроцитов (фиг. 9). И вновь, многие фракции градиента плотности сахарозы проявляли гемагглютинирующую активность, что позволяет предполагать наличие множественных макромолекулярных и мономерных форм белков гриппа. Наибольший измеренный титр составлял 1:4000. В контрольном эксперименте вирус гриппа дикого типа A/Shangdong проявлял титр 1:2000. Тест гемагглютинации показал, что рекомбинантные VLPs, состоящие из белков HA, NA и M1 вируса A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), являются функционально активными. Это позволяет предполагать, что сборка, конформация и укладка белковых субъединиц HA в VLPs сходны или идентичны таковым в вирусе гриппа дикого типа.

Кроме того, был произведен анализ фермента нейраминидазы в образцах очищенных VLPs H9N2. Величину нейраминидазной активности во фракциях градиента плотности сахарозы определяли с применением фетуина в качестве субстрата. В нейраминидажном тесте для измерения используется высвобождаемая сиаловая кислота, отщепляемая от молекул субстрата нейраминидазой. Для остановки ферментативной реакции использовали арсенитный реагент. Количество высвобожденной сиаловой кислоты определяли химически с помощью тиобарбитуровой кислоты, которая дает розовую окраску, пропорциональную количеству свободной сиаловой кислоты. Уровень окраски (хромофора) измеряли спектрофотометрически при длине волны 549 нм. С помощью этого способа была показана нейраминидазная активность во фракциях сахарозного градиента, содержащих VLPs гриппа (фиг. 10). Как и ожидалось, активность наблюдалась в нескольких фракциях с пиками в двух фракциях. В качестве положительного контроля использовали вирус гриппа дикого типа. Вирус гриппа дикого типа проявлял нейраминидазную ферментативную активность, сопоставимую с таковой очищенных VLPs гриппа. Эти данные подтвердили результаты с HA в отношении конформации белка и позволили предположить, что очищенные VLPs вируса гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) функционально сходны с вирусом гриппа дикого типа.

Результаты приведенных выше анализов и тестов показали, что экспрессия белков HA, NA и M1 гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) достаточна для самосборки и транспорта VLPs из инфицированных бакуловирусом клеток насекомого. Поскольку эти VLPs гриппа представляли собой самособираемые структурные белки гриппа и проявляли функциональные и биохимические свойства, сходные с таковыми вируса гриппа дикого типа, эти VLPs гриппа сохраняли важные элементы

конформации структуры, включая поверхностные эпитопы, требующиеся для эффективных вакцин гриппа.

Пример 2

ОТ-ПЦР Клонирование генов вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99

Целью настоящего изобретения служит предложение синтетических последовательностей нуклеиновых кислот, способных направлять получение рекомбинантных белков вируса гриппа. Такие синтетические последовательности нуклеиновых кислот были получены с помощью способов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением природной геномной РНК вируса гриппа, выделенной из вируса. В контексте данной заявки последовательность нуклеиновой кислоты относится к РНК, ДНК, кДНК или любому их синтетическому варианту, которые кодируют белок.

Вирус птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) был предоставлен д-ром K. Subbarao (Centers for Disease Control, Atlanta, Ga., США). Вирусную геномную РНК выделяли способом кислой фенольной экстракции РНК в условиях требований биологической безопасности 3 уровня (BSL3) CDC с использованием реагента тризола LS (Invitrogen, Carlsbad, Calif. США). Молекулы кДНК вирусных мРНК получали обратной транскрипцией с использованием обратной транскриптазы MuLV (Invitrogen) и ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных для белков HA, NA и M1, и ДНК-полимеразы Taq I (Invitrogen) (таблица 1). Фрагменты ПЦР клонировали в бактериальный субклонировующий вектор pCR2.1TOPO (Invitrogen) между сайтами EcoRI, что дало три рекомбинантные плазмиды, содержащие клоны кДНК HA, NA и M1.

Пример 3

ОТ-ПЦР Клонирование генов вируса гриппа человека A/Sydney/5/94 (H3N2)

Вирус гриппа A/Sydney/5/97 (H3N2) был получен от д-ра M. Massare (Novavax, Inc., Rockville, Md.). Вирусную геномную РНК выделяли способом кислой фенольной экстракции РНК в условиях требований BSL2 в Novavax, Inc. с использованием реагента тризола LS (Invitrogen). Молекулы кДНК вирусных мРНК получали обратной транскрипцией и ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных для белков HA, NA, M1, M2 и NP (таблица 1). Фрагменты ПЦР клонировали в бактериальный субклонировующий вектор pCR2.1TOPO (Invitrogen) между сайтами EcoRI, что дало пять рекомбинантных плазмид, содержащих клоны кДНК HA, NA, M1, M2 и NP.

Пример 4

Клонирование кДНК вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 в бакуловирусные переносящие векторы

Из плазмид на основе pCR2.1TOPO гены HA, NA и M1 субклонировали в бакуловирусный переносящий вектор pFastBac1 (Invitrogen) в полигедронном локусе и сайтах присоединения Tn7 и ниже бакуловирусного полигедринового промотора и выше последовательности сигнала полиаденилирования. Вирусные гены лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы. Для гена HA фрагмент ДНК BamHI-KpnI из pCR2.1TOPO-HA вставляли в плазмидную ДНК pFastBac1, гидролизованную BamHI-KpnI. Для гена NA фрагмент ДНК EcoRI из pCR2.1TOPO-NA вставляли в плазмидную ДНК pFastBac1, гидролизованную EcoRI. Для гена M1 фрагмент ДНК EcoRI из pCR2.1TOPO-M1 вставляли в плазмидную ДНК pFastBac1, гидролизованную EcoRI. Компетентные бактерии E. coli DH5α (Invitrogen) трансформировали с помощью этих реакций лигирования ДНК, получали

трансформированные колонии и бактериальные клоны выделяли. Полученные плазмиды на основе pFastBac1, pFastBac1-NA, pFastBac1-NA и pFastBac1-M1, характеризовали картированием ферментами рестрикции на агарозных гелях (фиг. 4А). Нуклеотидные последовательности клонированных генов, представленные на 5 фиг. 1-3, определяли с помощью автоматизированного секвенирования ДНК. Анализ последовательности ДНК показал, что клонированные гены гриппа NA, NA и M1 идентичны последовательностям этих генов, опубликованным ранее [гены NA, NA и M1 гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (номера регистрации GenBank AJ404629, 10 AJ404626 и AJ278646 соответственно)].

Пример 5

Клонирование кДНК вируса гриппа A/Sydney/5/97 в бакуловирусные переносящие векторы

Из плазмид на основе pCR2.1ТОРО гены NA, NA, M1, M2 и NP субклонировали в 15 бакуловирусный переносящий вектор pFastBac1 в полигедронном локусе и сайтах присоединения Tn7 и ниже бакуловирусного полигедринового промотора и выше последовательности сигнала полиаденилирования. Вирусные гены лигировали с помощью Т4 ДНК-лигазы. Для гена NA фрагмент ДНК BamHI-KpnI из pCR2.1ТОРО-hNA3 вставляли в плазмидную ДНК pFastBac1, гидролизованную BamHI-KpnI. Для 20 гена NA фрагмент ДНК EcoRI из pCR2.1ТОРО-hNA вставляли в плазмидную ДНК pFastBac1, гидролизованную EcoRI. Для гена M1 фрагмент ДНК EcoRI из pCR2.1ТОРО-hM1 вставляли в плазмидную ДНК pFastBac1, гидролизованную EcoRI. Для гена M2 фрагмент ДНК EcoRI из pCR2.1ТОРО-hM2 25 вставляли в плазмидную ДНК pFastBac1, гидролизованную EcoRI. Для гена NP фрагмент ДНК EcoRI из pCR2.1ТОРО-hNP вставляли в плазмидную ДНК pFastBac1, гидролизованную EcoRI. Компетентные бактерии E. coli DH5α трансформировали с помощью этих реакций лигирования ДНК, получали трансформированные колонии и бактериальные клоны выделяли. Полученные плазмиды на основе pFastBac1, 30 pFastBac1-hNA3, pFastBac1-hNA2, pFastBac1-hM1, pFastBac1-hM2 и pFastBac1-hNP характеризовали картированием ферментами рестрикции на агарозных гелях. Нуклеотидные последовательности клонированных генов определяли с помощью автоматизированного секвенирования ДНК. Анализ последовательности ДНК 35 показал, что клонированные гены гриппа NA, NA, M1, M2 и NP идентичны последовательностям этих генов, опубликованным ранее.

Пример 6

Клонирование мультигенных бакуловирусных переносящих векторов, кодирующих множественные гены вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 40

Для конструирования бакмидных переносящих векторов на основе pFastBac1, экспрессирующих множество генов вируса гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), сначала фрагмент ДНК SnaBI-HpaI из плазмиды pFastBac1-M1, содержащей ген M1, клонировали в сайт HpaI pFastBac1-NA. Это дало плазмиду pFastBac1-NAМ, 45 кодирующую гены и NA, и M1 в независимых экспрессионных кассетах и экспрессируемых под контролем отдельных полигедриновых промоторов.

Наконец, фрагмент ДНК SnaBI-AvrII из pFastBac1-NAМ, содержащий экспрессионные кассеты NA и M1, переносили в плазмидную ДНК pFastBac1-NA, гидролизованную HpaI-AvrII. Это дало плазмиду pFastBac1-NAНАМ, кодирующую 50 три независимые экспрессионные кассеты для экспрессии генов гриппа NA, NA и M1 и экспрессируемых под контролем отдельных полигедриновых промоторов (фиг. 4В).

В другом примере ген H3 из pFastBac1-hNA3 (см. пример 5) клонировали

в pFastBac1-NAHAM в качестве четвертого гена вируса гриппа для экспрессии и получения гетеротипичных VLPs гриппа.

Пример 7

Получение мультигенного рекомбинантного бакуловируса, кодирующего

5 гены HA, NA и M1 вируса птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 в клетках насекомого

Полученный мультигенный бакмидный переносимый вектор pFastBac1-NAHAM использовали для получения мультигенного рекомбинантного бакуловируса, кодирующего гены HA, NA и M1 птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), для

10 экспрессии в клетках насекомого. Рекомбинантные бакмидные ДНК получали сайт-специфичной рекомбинацией на последовательностях ДНК присоединения полигедрина и Tn7 между ДНК pFastBac1-NAHAM и AcMNPС бакуловирусного генома, укрывшегося в компетентных клетках E. coli DH10BAC (Invitrogen) (фиг. 4B). Рекомбинантную бакмидную ДНК выделяли мини-препаративным способом для

15 плазмидной ДНК и трансфецировали в клетки Sf-9s с помощью катионного липида CELLFECTIN (Invitrogen). После трансфекции рекомбинантные бакуловирусы выделяли, бляшки очищали и амплифицировали в клетках Sf-9S насекомого. Запасы вируса получали в клетках Sf-9S насекомого и характеризовали

20 на предмет экспрессии продуктов генов HA, NA и M1 вируса птичьего гриппа. Полученный Рекомбинантный бакуловирус был обозначен как bNAHAM-H9N2.

Пример 8

Экспрессия рекомбинантных белков птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 в клетках насекомого

25 Клетки Sf-9S насекомого, поддерживаемые в виде суспензионных культур во встряхиваемых сосудах при 28°C в бессывороточной среде (HyQ SFM, HyClone, Ogden, Utah), инфицировали при плотности клеток 2×10^6 клеток/мл рекомбинантным бакуловирусом bNAHAM-H9N2 при кратности инфекции (MOI) 3 pfu (фаг-образующие единицы)/клетку. Вирусная инфекция продолжалась 72 час для

30 обеспечения экспрессии белков гриппа. Экспрессия белков HA и M1 птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) в инфицированных клетках насекомого была подтверждена с помощью анализов ДДС-ПАГЭ и вестерн-иммуноблоттинга. Анализ ДДС-ПАГЭ проводили на гелях NuPAGE (Invitrogen) с 4-12% линейным градиентом в

35 восстанавливающих и денатурирующих условиях. Первичными антителами при анализе вестерн-иммуноблоттингом служила поликлональная антисыворотка кролика против птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), полученная из CDC, и моноклональная мышьяная антисыворотка против белка M1 гриппа (Serotec, UK).

40 Вторичным антителом для анализа вестерн-иммуноблоттингом служила щелочная фосфатаза, конъюгированная с IgG антисыворотки козы, полученной против IgG мыши (H+L) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md., США). Результаты этих анализов (фиг. 5) показали, что белки HA и M1 экспрессируются в инфицированных бакуловирусом клетках насекомого.

Пример 9

Очистка рекомбинантных вирусоподобных частиц птичьего гриппа H9N2 и макромолекулярных белковых комплексов

50 Культуральные супернатанты (200 мл) из клеток Sf-9S насекомого, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bNAHAM-H9N2, которые экспрессируют продукты генов HA, NA и M1 птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), собирали низкоскоростным центрифугированием. Культуральные супернатанты осветляли центрифугированием на высокоскоростной

центрифуге Sorval RC-5B в течение 1 час при 10000g и 4°C с использованием ротора GS-3. Вирус и VLPs выделяли из осветленных культуральных супернатантов центрифугированием на ультрацентрифуге Sorval OTD-65 в течение 3 час при 27000

об/мин при 4°C с использованием качающегося бакет-ротора Sorval TH-641. Вирусный осадок ресуспендировали в 1 мл ЗФР (pH 7,2), наносили на ступенчатый прерывистый 20-60% (масс./об.) градиент сахарозы и разделяли центрифугированием на ультрацентрифуге Sorval OTD-65 в течение 16 час при 27000 об/мин при 4°C с использованием Sorval TH-641. Фракции (0,5 мл) собирали с верха градиента сахарозы.

Белки гриппа во фракциях градиента сахарозы анализировали с помощью анализов ДДС-ПАГЭ и вестерн-иммуноблоттинга, как описано выше в примере 6. Белки HA и M1 были обнаружены в одних и тех же фракциях градиента сахарозы (фиг. 6), как показано с помощью анализа вестерн-иммуноблоттингом, что позволило предположить, что белки HA и M1 связаны в виде макромолекулярных белковых комплексов. Кроме того, белки HA и M1 были обнаружены во фракциях вдоль всего градиента сахарозы, что позволяет предполагать, что эти рекомбинантные вирусные белки связаны с макромолекулярными белковыми комплексами различной плотности и состава.

Пример 10

Анализ рекомбинантных VLPs и белков птичьего гриппа H9N2 хроматографией гель-фильтрацией

Белковые макромолекулы, такие как VLPs, и мономерные белки движутся по-разному на хроматографических колонках при гель-фильтрации или исключении по размеру на основании размера массы и формы. Для определения того, являлись ли рекомбинантные белки гриппа из фракций градиента сахарозы мономерными белками или макромолекулярными белковыми комплексами, такими как VLPs, готовили хроматографическую колонку (7×140 мм) с заполненной смолой объемом 14 мл, сефарозой CL-4B (Amersham). Исключающий объем колонки уравнивали ЗФР и колонку калибровали декстраном синим 2000, декстраном желтым и витамином B12 (Amersham Pharmacia) с кажущимися молекулярными массами 2000000, 20000 и 1357 дальтон соответственно для определения свободного объема колонки. Декстран синий 2000 элюировался с колонки также в свободном объеме (фракция 6 мл). Как и ожидалось, рекомбинантные белковые комплексы гриппа элюировались с колонки в свободном объеме (фракция 6 мл). Этот результат был характерен для макромолекулярного белкового комплекса, такого как VLPs. Вирусные белки во фракциях с колонки выявляли анализом вестерн-иммуноблоттинга, как описано выше в примере 6. Белки M1 выявлялись во фракциях свободного объема (фиг. 7). Как и ожидалось, бакуловирусные белки также находились в свободном объеме.

Пример 11

Электронная микроскопия рекомбинантных VLPs гриппа

Для определения того, имеют ли макромолекулярные белковые комплексы, выделенные с градиента сахарозы и содержащие белки птичьего гриппа, морфологию, сходную с таковой вирионов гриппа, была проведена оценка электронной микроскопией негативно окрашенных образцов. Рекомбинантные белковые комплексы птичьего гриппа A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) концентрировали и очищали из культуральных супернатантов ультрацентрифугированием на ступенчатых градиентах сахарозы, как описано в примере 7. Аликвоты фракций

градиента сахарозы обрабатывали 2% глутаральдегидом в ЗФР, pH 7,2, абсорбировали на свежеполученных пластиковых покрытых углем решетках и промывали дистиллированной водой. Образцы окрашивали 2% фосфовольфрамом натрия, pH 6,5, и обследовали с помощью электронного микроскопа с проходящим пучком (Philips). Электронные микроснимки негативно окрашенных образцов рекомбинантных белковых комплексов птичьего гриппа H9N2 из двух фракций градиента сахарозы показали наличие сферических и частиц в форме палочек (фиг. 8). Частицы имели разный размер (60 и 80 нм) и морфологию. Были выявлены также более крупные комплексы обоих типов частиц, а также частицы в форме палочек (фиг. 8). Все наблюдавшиеся структуры белковых комплексов имели подобные шипам выступы на своей поверхности, напоминающие пепломеры HA и NA вируса гриппа. Поскольку размер и вид частиц 80 нм были сходны с частицами вируса гриппа дикого типа, эти структуры, видимо, представляют собой VLPs гриппа, покрытые оболочкой. Меньшие частицы приблизительно 60 нм могут представлять собой субвирусные частицы, которые отличаются от указанных выше VLPs и морфологически, и структурно.

Пример 12

Анализ функциональных свойств белков гриппа тестом гемагглютинации. Для определения того, обладают ли очищенные VLPs и белки гриппа функциональной активностью, такой как гемагглютинирующая и нейраминидазная активность, которые характерны для вируса гриппа, очищенные VLPs и белки гриппа тестировали анализом гемагглютинации и нейраминидазной активности.

Для анализа гемагглютинации готовили ряд 2-кратных разведений фракций градиента сахарозы, содержащих VLPs гриппа или контрольный вирус типа А дикого типа. Затем их смешивали с 0,6% эритроцитами морской свинки в ЗФР (pH 7,2) и инкубировали при 4°C в течение от 1 до 16 час. В качестве отрицательного контроля использовали ЗФР. Степень гемагглютинации определяли визуально и определяли наибольшее разведение фракции, способное агглютинировать эритроциты крови морской свинки (фиг. 9). Наибольший титр агглютинации, наблюдавшийся для очищенных VLPs и белков гриппа, равнялся 1:400, что превышало титр, проявляемый контрольным гриппом дикого типа, который составлял 1:2000.

Пример 13

Анализ функциональных свойств белков гриппа анализом нейраминидазы. Величину нейраминидазной активности в содержащих VLP гриппа фракциях градиента сахарозы определяли анализом нейраминидазы. В данном тесте NA (фермент) действовала на субстрат (фетуин) и высвобождала сиаловую кислоту. Для прекращения активности фермента добавляли арсенитный реагент. Количество выделенной сиаловой кислоты определяли химически с помощью тиобарбитуровой кислоты, которая давала розовую окраску, пропорциональную свободной сиаловой кислоте. Уровень окраски (хромофора) измеряли на спектрофотометре при длине волны 594 нм. Результаты, представленные на фиг. 8, показали, что значительное количество сиаловой кислоты образуется содержащими VLP фракциями градиента сахарозы и что эти фракции соответствуют фракциям, проявляющим гемагглютинирующую активность.

Пример 14

Иммунизация мышей BALB/c функциональными гомотипичными рекомбинантными VLPs гриппа H9N2

Иммуногенность рекомбинантных VLPs гриппа выясняли иммунизацией мышей с последующим вестерн-блот анализом иммунной сыворотки. Рекомбинантные VLPs (1 мкг/инъекция), состоящие из белков HA, NA и M1 вируса птичьего гриппа типа A/Honk Kong/1073/99 и очищенные на градиентах сахарозы, инокулировали подкожно в область дельтовидной мышцы десяти (10) самок мыши BALB/c на 0 и 28 дни (фиг. 11). В качестве отрицательного контроля сходным образом вводили 3ФР (pH 7,2) пяти (5) мышам. У мышей брали кровь из надглазничной полости в 1 день (предварительный отбор крови), 27 день (первичный отбор крови) и 54 день (вторичный отбор крови). Сыворотку получали из образцов крови после свертывания в течение ночи и центрифугирования.

Для анализа вестерн-блоттингом 200 нг инаktivированного вируса птичьего гриппа типа A H9N2 или адаптированного к холоду вируса птичьего гриппа типа A H9N2, а также предварительно окрашенные белковые стандарты See Blue Plus 2 (InVitrogen) денатурировали (95°C, 5 мин) и подвергали электрофорезу в восстанавливающих условиях (10 mM β-меркаптоэтанол) на 4-12% градиентных полиакриламидных гелях NuPAGE (InVitrogen) в буфере MES при 172 вольтах до исчезновения красителя-свидетеля бромфенолового синего. Для белковых гелей белки после электрофореза визуализировали окрашиванием коллоидным реагентом кумасси синего (InVitrogen). Белки переносили из геля на нитроцеллюлозные мембраны в метаноле с помощью стандартной процедуры вестерн-блоттинга. Сыворотку от иммунизированных VLP мышей и кроликов, иммунизированных инаktivированным вирусом птичьего гриппа H9N2 (сыворотка положительного контроля), разбавляли 1:25 и 1:100 соответственно в растворе 3ФР (pH 7,2) и использовали в качестве первичного антитела. Мембраны со связанным белком, которые блокировали 5% казеином, вводили во взаимодействие с первичной антисывороткой в течение 60 минут при комнатной температуре при постоянном встряхивании. После отмывки мембран от первичного антитела забуференным фосфатом солевым раствором их вводили во взаимодействие с раствором, содержащим твин 20, вторичную антисыворотку [конъюгат антимишиного IgG козы-щелочная фосфатаза (1:10000) или конъюгат антикроличьего IgG козы-щелочная фосфатаза (1:10000)], в течение 60 минут. После отмывки мембран от вторичного антитела забуференным фосфатом солевым раствором, содержащим твин 20, связывающие антитело белки на мембранах визуализировали проявлением хромогенным субстратом, таким как NBT/BCIP (InVitrogen).

Результаты анализа вестерн-блоттингом (фиг. 12) заключались в том, что белки с молекулярными массами, сходными с вирусными белками HA и M1 (75 и 30 кДа соответственно), связывались с сывороткой положительного контроля (фиг. 12 В) и сывороткой мышей, иммунизированных рекомбинантными VLPs гриппа H9N2 (фиг. 9А). Эти результаты показали, что рекомбинантные VLPs гриппа H9N2 являются сами по себе иммуногенными у мышей при данном пути введения.

Пример 15

Иммуногенность VLP Kong/1073/99 (H9N2) и исследование провоцирующего введения у мышей BALB/c

Мышей BALB/c иммунизировали VLPs H9N2 (1 мкг HA или 10 мкг HA/доза) без или со 100 мкг адъюванта Novasome на 0 и 21 день и провоцировали гомологичным инфекционным вирусом IN на 57 день. У мышей брали кровь в 0, 27 и 57 дни и сыворотку анализировали на антитела против HA в тесте ингибирования гемагглютинации (HI) с использованием RBCs индейки и с помощью ИФА.

Результаты этого исследования показаны с фиг. 13 по фиг. 16.

Высокие титры антител против H9N2 индуцировались после однократной иммунизации (первичной) вакциной VLP H9N2 без Novasome или с ним и при дозе VLPs 10 мкг, содержащей 1 мкг НА (фиг. 13). Титры специфических антител

увеличивались приблизительно на полпорядка после бустерной иммунизации.

После иммунизации и поддерживающего введения 1 мкг НА в форме VLPs H9N2 уровни HI сыворотки приблизительно соответствовали или превышали уровни, обычно считающиеся защитными ($\log 2=5$) у всех животных (фиг. 14, нижняя левая часть). VLPs H9N2, составленные с адъювантом Novasome, увеличивали ответ

приблизительно в 2 раза после первичной иммунизации и приблизительно в 4 раза после бустерного введения (фиг. 14, нижняя правая часть). Очищенная гемагглютининовая субъединица H9N2 также индуцировала защитный уровень HI антител после поддерживающего введения, и Novasomes вновь повышали ответ антител приблизительно в 2 раза после первичной и в 4 раза после поддерживающей иммунизации (фиг. 14, верхние части). Уровень HI антител, индуцированных 10 мкг НА, вводимого в виде субъединицы вакцины, был эквивалентен 1 мкг НА, вводимого в форме VLP. Кроме того, снижение массы было значительно меньшим у мышей, иммунизированных VLPs H9N2 плюс адъювант, по сравнению с невакцинированными контрольными животными (фиг. 15). Не было статистического отличия между снижением массы в группах, иммунизированных VLPs H9N2 и VLPs H9N2 плюс адъювант Novasome.

Кроме того, титры вируса в легких на 3 и 5 дни после провоцирующего введения вируса H9N2 были значительно снижены у мышей, иммунизированных VLPs H9N2 (фиг. 16). На 3 день, когда титры вируса гриппа достигают максимума в тканях легких, у мышей, иммунизированных VLPs H9N2 плюс Novasomes®, происходило значительно большее снижение титра вируса по сравнению с мышами, иммунизированными только VLPs, и невакцинированными контрольными мышами.

Пример 16

Иммуногенность VLP A/Fujian/411/2002 (H3N2) и перекрестное взаимодействие между несколькими штаммами гриппа

Мышей BALB/c иммунизировали VLPs A/Fujian/411/2002 (3,0, 0,6, 0,12 и 0,24 мкг НА/доза), дважды IM и IN. У мышей брали кровь в 0 и 35 дни. Сыворотку затем анализировали на антитела против НА в тесте ингибирования гемагглютинации (HI) с использованием RBCs индейки и на антитела против гриппа с помощью ИФА. Результаты этого исследования показаны на фиг. 17A, 17B и 17C. Эти результаты показывают, что иммунный ответ увеличивался и IM, и IN против НА и NA.

Пример 17

Определение изотипов IgG у мышей после инокуляции VLPs H3N2

Мышей инокулировали VLPs внутримышечно и интраназально. Через 5 недель получали сыворотку и анализировали на изотипы IgG.

Сыворотку тестировали в планшетах, покрытых очищенным НА (Protein Sciences) A/Wyoming/3/2003, с помощью ИФА. Последовательные пятикратные разведения сыворотки добавляли в лунки и планшеты инкубировали. Затем добавляли биотинилированные Ig козы против мыши или против IgG1 мыши, против IgG2a мыши, против IgG2b мыши и против IgG3 мыши. После этого в лунки добавляли стрептавидин-пероксидазу. Выявлялись связанные конъюгаты. Результаты иллюстрируются на фиг. 18A и B. Эти результаты показывают, что IgG2a являются наиболее представленным изотипом у мыши при иммунном ответе против VLPs.

Пример 18

Исследование ранжирования дозы VLP A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) у крыс SD

Крыс SD (n=6 на дозу) иммунизировали на 0 и 21 дни очищенными VLPs A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), разбавленными 3ФР при нейтральном pH до 0,12, 0,6, 3,0 и 15 мкг НА или только 3ФР. У животных отбирали образцы крови на 0, 21, 35 и 49 дни и сыворотку анализировали в тесте ингибирования гемагглютинации (HI) для выявления функциональных антител, способных ингибировать связывающую функцию НА. Дозировка основывалась на содержании НА, измеренном с помощью ДДС-ПАГЭ, и сканирующей денситометрии очищенных VLPs H9N2. Результаты определения титров в тесте ингибирования гемагглютинации показаны на фиг. 19. Однократная доза 0,6 мкг НА VLPs H9N2 или две дозы 0,12 мкг НА вызывали защитные уровни HI антител у крыс. Эти данные показывают, что меньшее количество НА может индуцировать защитный ответ, когда указанный НА является частью VLP.

Пример 19

Иммуногенность VLP Kong/1073/99 (H9N2)

Мышей BALB/c иммунизировали VLPs H9N2 (0,12, 0,6 мкг/доза) со 100 мкг Novasome или квасцового адъюванта или без них на 0 и 21 дни и подвергали провоцирующей инфекции гомологичным вирусом IN на 57 день. Мышей также иммунизировали 3,0 и 15,0 мкг НА/доза (без адъюванта). У мышей брали кровь на 0, 21, 35 и 49 дни и сыворотку анализировали на антитела против НА в тесте ингибирования гемагглютинации (HI) с использованием RBCs индейки и ИФА гриппа. Результаты этого исследования показаны на фиг. 20А и В.

Результаты показывают, что более сильный в целом иммунный ответ наблюдается при введении VLPs с адъювантом. Однако защитный ответ вызывался 0,12 мкг НА/доза на 3 неделе по сравнению с VLPs, составленными с квасцами и VLPs без адъюванта. Кроме того, на 7 неделе VLPs, включающие Novasomes, обеспечивали титр HI приблизительно на 2 порядка выше по сравнению с VLP с квасцами. Величина ответа была сходной с таковой при введении VLPs при 3,0 и 15,0 мкг НА/доза без адъюванта. Эти результаты показывают, что Novasomes обеспечивают более сильный ответ по сравнению с квасцами. Кроме того, защитный иммунный ответ может быть достигнут при количестве VLPs, в 25 раз меньшем, когда указанные VLPs вводят в составе, включающем Novasomes.

Кроме того, по данным с 0,6 мкг НА/доза состав с Novasome вызывал приблизительно на 1,5 порядка больший ответ по сравнению с квасцами. Иммунные ответы были сходны по величине с таковыми VLPs, вводимыми при 3,0 и 15,0 мкг НА/доза без адъюванта. Эти результаты показывают, что с адъювантом требуется введение приблизительно в 5 раз меньшего количества VLPs для достижения защитного ответа.

Кроме того, на фиг. 20В показан титр HI VLPs H9N2 при применении разных составов Novasomes. В эксперименте использовали следующие формулы:

Группа 1: VLP H9N2 (0,1 мкг) (n=5)

Группа 2: VLP H9N2 (0,1 мкг) с неразбавленным DCW (n=5)

Группа 3: VLP H9N2 (0,1 мкг) с DCW 1:3) (n=5)

Группа 4: VLP H9N2 (0,1 мкг) с DCW 1:9) (n=5)

Группа 5: VLP H9N2 (0,1 мкг) с DCW 1:27) (n=5)

Группа 6: VLP H9N2 (0,1 мкг) с NVAX 1) (n=5)

Группа 7: VLP H9N2 (0,1 мкг) с NVAX 2) (n=5)

Группа 8: VLP H9N2 (0,1 мкг) с NVAX 3) (n=5)

Группа 9: VLP H9N2 (0,1 мкг) с NVAX 4) (n=5)

Группа 10: VLP H9N2 (0,1 мкг) с NVAX 5) (n=5)

Группа 11: VLP H9N2 (0,1 мкг) с квасцами-ОН) (n=5)

Группа 12: VLP H9N2 (0,1 мкг) с CpG) (n=5)

Группа 13: ЗФР (0,6 мкг) (n=5)

Группа 14: H3 VLPs (0,6 мкг) (n=5)

Группа 15: H5 VLPs (0,6 мкг) (n=8)

-H9: (лот #11005)

-DCW: Novasomes (лот #121505-2, полиоксиэтилен-2-цетиловый эфир, холестерин, сверхчистое соевое масло и цетилпридиния хлорид)

-NVAX 1: B35P83, MF-59 реплика (сквален, полисорбат и span)

-NVAX 2: B35P87 (соевое масло, brij, холестерин, плуроник F-68)

-NVAX 3: B35P88 (соевое масло, brij, холестерин, плуроник F-68 и полиэтиленмин)

-NVAX 4: B31P60 (сквален, brij, холестерин, олеиновая кислота)

-NVAX 5: B31P63 (соевое масло, глицерилмоностеарат, холестерин, полисорбат)

-CpG: (лот #1026004)

-H5: (лот #22406)

На фиг. 21 показана кривая доза-ответ для VLP H9N2. Эти данные показывают, что доза VLPs в количестве 0,6 мкг НА/доза является минимальной для вызова защитного иммунного ответа у мышей через 3 недели.

Пример 20

Вещества и способы для исследований на хорьках

Хорьков получали из Triple F Farms (FFF, Sayre, PA). Все приобретенные хорьки имели титр HAI менее 10 гемагглютининовых единиц. Приблизительно за два дня до вакцинации животным имплантировали температурный датчик (BioMedic Data Systems, Inc.). Животных (6 животных/группа) вакцинировали в 0 день либо (1) ЗФР (отрицательный контроль, группа один), (2) VLPs гриппа H3N2 с 15 мкг H3 (группа 2), (3) VLPs гриппа H3N2 с 3 мкг H3 (группа 2), (4) VLPs гриппа H3N2 с 0,6 мкг H3 (группа 3), (5) VLPs гриппа H3N2 с 0,12 мкг H3 (группа 5) или гH3НА с 15 мкг (группа 6). На 21 день животным вводили бустерную вакцину. У животных брали кровь в 0 день (до вакцинации), на 21 день (до введения бустерной вакцины) и 42 день. Животных обследовали на клинические признаки неблагоприятных эффектов вакцины раз в неделю на протяжении периода исследования. Сходные исследования проводили с другими VLPs гриппа.

Уровень HAI в сыворотке хорьков

Сыворотку хорьков получали от FFF, обрабатывали разрушающим рецептор ферментом (RDE) и анализировали в тесте ингибирования гемагглютинации (HAI) с помощью стандартных процедур (Kendal et al. (1982)). Все отобранные для исследования хорьки были негативными (HAI=10) в отношении предсуществующих антител к циркулирующему в данный момент вирусу гриппа человека (A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A panama/2007/99 (H3N2), A/Wellington/01/04 (H2N3) и B/Sichuan/379/99 и H5N1).

Хорьки

Приблизительно 8-месячных, не контактировавших с гриппом, кастрированных и опущенных самцов хорьков Fitch (*Mustela putorius furo*) приобретали в FFF. Животных содержали в клетках из нержавеющей стали для кроликов (Shor-line, KS), содержащих санитарную подложку из стружек для лабораторных животных (P.J.

Murphy Forest Products, NJ). Хорьков кормили диетой Teklad Global Ferret Diet (Harlan Teklad, WI) и давали свежую воду по желанию. Поддоны заменяли три раза в неделю и клетки чистили раз в две недели.

Вакцинирование и отбор крови у хорьков

5 Вакцину, VLPs гриппа H3N2 или VLPs гриппа H9N2 и контроли, например, rH3NA (A/Wyoming/3/2003) и ЗФР (отрицательный контроль), хранили при 4°C перед применением. В большинстве исследований шесть групп хорьков (N-6/группа) вакцинировали внутримышечно вакциной любой концентрации или контролем в
10 объеме 0,5 мл.

Перед сбором крови и вакцинацией животных анестезировали внутримышечным введением во внутреннюю часть бедра раствора катамина (25 мг/кг), атропина (0,05 мг/кг) и ксилазина (2,0 мг/кг), "КАХ". В анестезированном состоянии хорьков
15 укладывали на спину и отбирали кровь (объемом от 0,5 до 1,0 мл) из верхней поллой вены с помощью иглы размера 23 1", соединенной с туберкулиновым шприцем на 1 см³. Кровь переносили в пробирку, содержащую сепаратор сыворотки и активатор свертывания, и давали свернуться при комнатной температуре. Пробирки центрифугировали, сыворотку отделяли и замораживали при -80°C. Кровь отбирали
20 до вакцинации (день 0), до введения бустерной дозы (день 21) и на 42 день и анализировали в тесте HAI.

Наблюдение за хорьками

Температуру измеряли еженедельно приблизительно в одно и то же время на протяжении всего периода исследования. Величины до вакцинации усредняли для
25 получения исходной температуры для каждого хорька. Изменение температуры (в градусах по Фаренгейту) рассчитывали для каждой временной точки для каждого животного. Хорьков обследовали еженедельно на предмет клинических признаков неблагоприятных эффектов вакцины, включая температуру, снижение массы,
30 снижение активности, носовые выделения, чихание и диарею. Для оценки уровня активности использовали систему оценки на основе, описанной Reuman et al. (1989), где 0 = бодрость и веселость; 1 = бодрость и веселость только при стимуляции; 2 = бодрость, но не веселость при стимуляции; 3 = ни бодрость, ни веселость при стимуляции. На основании показателей для каждой группы животных рассчитывали
35 относительный индекс неактивности как $\Sigma(\text{день } 0 - \text{день } 42)[\text{показатель активности} + 1] / \Sigma(\text{день } 0 - \text{день } 42)$, где n равно общему количеству наблюдений. Величину 1 прибавляли к каждому показателю с тем, чтобы показатель «0» можно было разделить на знаменатель, что дает величину индекса 1,0.

Получение сыворотки

Сыворотки обычно имели низкий уровень неспецифических ингибиторов гемагглютинации. Для инактивации этих неспецифических ингибиторов сыворотки обрабатывали (RDE) перед тестированием. Вкратце, три части RDE добавляли к
45 одной части сыворотки и инкубировали в течение ночи при 37°C. RDE инактивировали инкубацией при 56°C в течение приблизительно 30 минут. После инактивации RDE к образцу добавляли ЗФР до конечного разведения сыворотки 1:10 (RDE-Tx). Разбавленные RDE-Tx сыворотки хранили при 4°C перед тестированием (в течение 7 дней) или хранили при -20°C.

Получение эритроцитов индейки

50 Вирусы гриппа человека связываются с рецепторами сиаловой кислоты, содержащими α связи N-ацетилнейраминовой кислоты и 2,6-галактозы. Вирусы птичьего гриппа связываются с рецепторами сиаловой кислоты, содержащими N-

ацетилнейраминовой кислоты α 2,3-галактозу (α 2,3 связи), и экспрессируют и α 2,3, и α 2,6 связи. Эритроциты индеек (TRBC) используют для анализа HAI, поскольку A/Fujian является вирусом человека. TRBCs разбавляют ЗФР до получения суспензии 0,5% об/об. Клетки хранят при 4°C и используют в течение 72 часов после

Анализ HAI

Анализ HAI был адаптирован из руководства CDC по лабораторному наблюдению за гриппом (Kendal et al. (1982) Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, включенного здесь в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей). RDE-Тх сыворотки последовательно двукратно разбавляли в v-образных планшетах для микротитрования. В каждую лунку добавляли равный объем разбавленного вируса, разбавленного до приблизительно 8 HAU/50 мкл. Планшеты закрывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут с последующим добавлением 0,5% TRBC. Планшеты перемешивали встряхиванием, закрывали и TRBC давали осесть в течение 30 минут при комнатной температуре. Титр HAI определяли как величину, обратную разбавлению для последнего ряда, который содержал неагглютинирующие TRBC. В каждый планшет включали положительные и отрицательные контроли сыворотки.

Пример 21

Исследование по подбору дозы VLP A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) у хорьков. Для оценки титра антител и HI после инокуляции VLPs H9N2 использовали хорьков, серологически негативных в отношении ингибирования гемагглютинации для вирусов гриппа. У хорьков брали кровь на 0 и 21 дни и сыворотку анализировали на антитела против HA с помощью теста ингибирования гемагглютинации (HI) с использованием RBCs индеек и на антитела против гриппа с помощью ИФА. Результаты иллюстрированы на фиг. 22. Эти результаты показывают титры HI, соответствующие защитному уровню антител при дозах VLP 1,5 и 15 мкг.

Пример 21

Вакцинация хорьков VLPs H3N2

Хорьков вакцинировали на 0 день и давали им бустерную инъекцию на 21 день VLPs разных штаммов H3N2 в разных дозах (дозы HA 0,12, 0,6, 3,0, 15,0 мкг). В качестве положительного контроля служил гH3NA в дозе 15 мкг, а в качестве отрицательного контроля - только ЗФР. Сыворотки, как описано выше, получали от хорьков на 0 день перед вакцинацией, на 21 день (перед бустерным введением) и на 42 день. Образцы сыворотки анализировали в тесте HI для определения того, имелся ли иммунный ответ против VLPs. Эти результаты иллюстрированы на фиг. 23. Эти данные показывают, что VLPs H3N2 при введении хорькам действительно индуцируют иммунный ответ. Таким образом, VLPs H3N2 являются иммуногенными у хорьков.

Пример 22

ОТ-ПЦР и клонирование генов HA, NA и M1 вируса гриппа A/Indonesia/5/05 (H5N1)

Вирусную РНК монофилетического таксона 2 вируса гриппа A/Indonesia/5/05 (H5N1) экстрагировали с помощью тризола LS (Invitrogen, Carlsbad, CA) в условиях защиты BSL-3. Обратную транскрипцию (ОТ) и ПЦР проводили на экстрагированной вирусной РНК с использованием одноступенчатой системы ОТ-

ПЦР (Invitrogen) со специфичными для генов олигонуклеотидными праймерами. Использовали следующие пары праймеров для синтеза генов гемагглютинаина (НА), нейраминидазы (NA) и матрикса (M1) H5N1 соответственно:

5'-AACGGTCCGATGGAGAAAATAGTGCTTCTTC-3' (SEQ ID. 4) и
 5'-AAAGCTTTTAAATGCAAATCTGCATTGTAACG-3' (SEQ ID. 5) (НА);
 5'-AACGGTCCGATGAATCCAAATCAGAAGATAAT-3' (SEQ ID. 6) и
 5'-AAAGCTTCTACTTGTCAATGGTGAATGGCAAC-3' (SEQ ID. 7) (NA); и
 5'-AACGGTCCGATGAGTCTTCTAACCGAGGTC-3' (SEQ ID. 8) и
 5'-AAAGCTTTCACTTGAATCGCTGCATCTGCAC-3' (SEQ ID. 9) (M1) (кодоны ATG подчеркнуты).

После ОТ-ПЦР фрагменты кДНК, содержащие гены НА, NA и M1 гриппа с молекулярными массами 1,7, 1,4 и 0,7 т.п.н. соответственно, клонировали в вектор pCR2.1-ТОРО (Invitrogen). Нуклеотидные последовательности генов НА, NA и M1 определяли секвенированием ДНК. Сходной стратегии придерживались при клонировании монофилетического таксона 1 вируса гриппа H5N1 из Vietnam/1203/2003.

Пример 23

Получение рекомбинантных бакуловирусов, включающих H5N1

Ген НА клонировали в виде фрагмента ДНК RsrII-HindIII (1,7 т.п.н.) ниже AcMNPV полигедринового промотора в бакмидный переносящий вектор (Invitrogen), гидролизованный RsrII и HindIII. Сходным образом, гены NA и M1 клонировали в виде фрагментов ДНК EcoRI-HindIII (1,4 и 0,8 т.п.н. соответственно) в гидролизованную EcoRI-HindIII плазмидную ДНК pFastBac1. Три полученные бакуловирусные переносящие плазмиды рНА, рNA и рM1, содержащие гены НА, NA и M1 гриппа A/Indonesia/5/05 (H5N1) соответственно, использовали для получения рекомбинантных бакмид.

Бакмиды получали сайт-специфичной гомологичной рекомбинацией с последующей трансформацией содержащими гены гриппа бакмидными переносящими Плазмидами компетентных клеток E. coli DH10Bac, которые содержали AcMNPV бакуловирусный геном (Invitrogen). Рекомбинантной бакмидной ДНК трансфецировали клетки Sf9 насекомого.

Нуклеотидные последовательности генов НА, NA и M1 A/Indonesia/5/05 НА (SEQ ID. 10)

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGC
 ATTGGTTACCATGCAAAACAATTCACAGAGCAGGTTGACACAAATCATGGAAAAGAACGTT
 ACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACACGGGAAGCTCTGCGATCTA
 GATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAAC
 CCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAAT
 CCAACCAATGACCTCTGTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTA
 5 TTGAGCAGAATAAACCAATTTTGAGAAAAATCAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGAT
 CTGAAGCCTCATCAGGAGTGAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTT
 AGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCACAAATAAAGAAAAGCTAC
 AATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGAATTCAACCATCTAATGATGCG
 GCAGAGCAGACAGGCCTATATCAAAACCCACACCTATATTTCCATTGGGACATCAACA
 CTAAACCAAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGA
 AGGATGGAGTTCCTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAAT
 10 GGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATT
 ATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCG
 ATAACTCTAGTATGCCATTGCCAATCCACACATACACCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAA
 TATGTGAAATCAAAACAGATTAGTCCCTTGCAACAGGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAG
 AGCAGAGAAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTATAGAGGGAGGATGG
 CAGGGGAATGGTAGATGGTGGTATGGGTACCAACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTAC
 GGTGCGAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCA
 ATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTGGGAAGGGAATTTAATACTTAGAA
 15 AGGAGAATAGAGAATTTAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTAT
 AATGCCGAACCTCTGGTTCTCATGGAATAAGGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAAAT
 GTTAAGAACCCTATACGCAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAGGAGCTGGGT
 AACGGTTGTTTCGAGTTCTATCAAAATGTGATAATGAATGTATGGAAGTATAAGAAAC
 GGAACGTACAACATATCCGCGAGTATTCAGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAATAAGT
 GGGGTAAAATTTGGAATCAATAGGAACCTACCAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCG
 AGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGA
 TCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA

NA (SEQ ID. 11)

ATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATTTGGATCAATCTGTATGGTAATTGGAATAGTT
 AGCTTAAATGTTACAAATTTGGGAACATGATCTCAATATGGGTGAGTCATTCAATTCAGACA
 GGGAAATCAACACCAAGCTGAATCAATCAGCAATACTAACCCTCTTACTGAGAAAGCTGTG
 GCTTCAGTAACATTAGCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCATTAGAGGATGGGCTGTACAC
 25 AGTAAGGACAACAATAAAGGATCGGTTCCAAGGGGATGTGTTTGTATTAGAGAGCCG
 TTCAATCTAGTCTCCCACTGGAATGCAGAATTTCTCTTGACTCAGGAGCCTTGCTG
 AATGACAAGCACTCCAACGGGACTGTCAAAGACAGAAAGCCCTCACAGAACATTAATGAGT
 TGTCTGTGGGTGAGGCTCCCTCTCCATATAACTCAAGGTTGAGTCTGTTGCTTGGTCA
 GCAAGTGCTTGCCATGATGGCCAGGTTGGTTGACAATTTGGAATTTCTGGCCAGACAAT
 GAGGCTGTGGCTGTATTGAAATACAATGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGG
 AACACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGCTCTTGCTTTACT
 GTAATGACTGATGGACCAAGTGTGGGCGGCGATCATATAGATCTTCAAAATGGAAAAA
 30 GGAAAGTGGTCAAATCAGTCGAATTTGGATGCTCCTAATATCACTATGAGGAATGCTCC
 GTTATCTCTGCTGCGCGGCAATCACATGTGTTTGACGGGATAATTGGCATGGCTCAAAT
 AGGCCATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCAGTGGA
 GTTTTCGGAGACAATCCACGCCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGCCCGATGTCCCT
 AACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTCATTTAAATACGGCAATGGTGTTTGGATCGGG
 AGAACCAAAAGCACTAATTCAGGAGCGGCTTTGAATGATTTGGGATCCAAATGGGTGG
 ACTGGAACGGACAGTAGCTTTTCAGTGAACAAGATATAGTAGCAATAACTGATTGGTCA
 35 GGATATAGCGGGAGTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGATTAGATTGCATAAGACCT
 TGTCTCTGGGTGAGTTAATCAGAGGGCGGCCAAAGAGAGACAAATTTGGACTAGTGGG
 AGCAGCATATCTTTTGTGGTGTAAATAGTGACACTGTGAGTTGGTCTTGGCCAGACGGT
 GCTGAGTTGCCATTACCATTTGACAAGTAG

M1 (SEQ ID. 12)

ATGAGTCTTCTAACCAGAGTGCAAAACGTACGTTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTC
 AAAGCCGAGATCGCGCAGAAACTTGAAGATGTCTTTGCAGGAAGAACACCGATCTCGAG
 40 GCTCTCATGGAGTGGCTGAAGACAAGACCAATCTGTCACTCTGACTAAAGGGATTTTG
 GGATTTGTATTCACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCT
 CAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGATCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATAT
 AAGAAGCTGAAAAGAGAAATAACATTCATGGGGCTAAAGAGGTTTCACTCAGCTACTCA
 ACCGGTGCACCTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGACTACG
 GAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTCAACAGCATCGG
 TCTCACAGGCAGATGGCAACTATCACCACCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTG
 CTGGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAAGCAGCGAGCG
 45 GAAGCCATGGAGGTGCTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTTGA
 ACTATCTTAACCTAGTGTGCTGAGAGATAATCTTGAAGAAATTTGCAGGCCCTAC
 CAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA

Один клонированный ген НА, рНА5, содержал две нуклеотидные замены, nt#1172 и nt#1508 (в диком типе) по сравнению с последовательностью гена НА дикого типа. Сходной стратегии придерживались при конструировании и создании монофилетического таксона 1 вируса гриппа H5N1 из VLPs Vietnam/1203/2003 (см. ниже). Далее приведено выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей рНА5.

```

wt      1 .....ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAG 31 seq id 10
          |||
pHA5   51 ATTCGCCCTTAACGGTCCGATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAG 100 seq id 56
          |||
          32 TCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTGTCATTGGTTACCATGCAAACAAT 81
          |||
          101 TCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTGTCATTGGTTACCATGCAAACAAT 150
5       82 TCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACA 131
          |||
          151 TCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACA 200
          |||
          132 TGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAG 181
          |||
          201 TGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAG 250
182     ATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGGCTC 231
          |||
10      251 ATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGGCTC 300
          |||
          232 CTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTA 281
          |||
          301 CTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTA 350
          |||
          282 CATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTT 331
          |||
          351 CATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTT 400
          |||
15      332 TCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTT 381
          |||
          401 TCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTT 450
          |||
          382 GAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTC 431
          |||
          451 GAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTC 500
          |||
          432 ATCAGGAGTGAAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTA 481
          |||
20      501 ATCAGGAGTGAAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTA 550
          |||
          482 GAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCAACAATAAAG 531
          |||
          551 GAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCAACAATAAAG 600
          |||
          532 AAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGAAT 581
          |||
25      601 AAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGAAT 650
          |||
          582 TCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAA 631
          |||
          651 TCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAA 700
          |||
          632 CCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACAGAGATTGGTACCA 681
          |||
          701 CCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACAGAGATTGGTACCA 750
          |||
30      682 AAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGAAGGATGGAGTT 731
          |||
          751 AAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGAAGGATGGAGTT 800
          |||
          732 CTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATG 781
          |||
          801 CTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATG 850
          |||
          782 GAAATTTTCATTGCTCCAGAAATATGCATACAAATTTGTCAAGAAAGGGGAC 831
          |||
35      851 GAAATTTTCATTGCTCCAGAAATATGCATACAAATTTGTCAAGAAAGGGGAC 900
          |||
          832 TCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAAGTCAACACCAAGTG 881
          |||
          901 TCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAAGTCAACACCAAGTG 950
          |||
          882 TCAAACTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATAC 931
          |||
40      951 TCAAACTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATAC 1000
          |||

```

```

    932 ACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTA 981
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1001 ACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTA 1050

    982 GTCCTTGCAACAGGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAA 1031
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
5 1051 GTCCTTGCAACAGGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAA 1100

    1032 AAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGC 1081
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
    1101 AAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGC 1150

10 1082 AGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGG 1131
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
    1151 AGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGG 1200

    1132 AGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGT 1181
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
15 1201 AGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATGGATGGAGT 1250

    1182 CACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGG 1231
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
    1251 CACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGG 1300

    1232 CCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAAC 1281
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
20 1301 CCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAAC 1350

    1282 AAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAAC 1331
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
    1351 AAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAAC 1400

25 1332 TCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATG 1381
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
    1401 TCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATG 1450

    1382 TTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAG 1431
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
30 1451 TTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAG 1500

    1432 GAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATG 1481
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
    1501 GAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATG 1550

    1482 TATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACATATCCGCAGTATTCAGAAG 1531
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
35 1551 TATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACATATCCGCAGTATTCAGAAG 1600

    1532 AAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATA 1581
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
    1601 AAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATA 1650

40 1582 GGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGC 1631
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
    1651 GGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGC 1700

    1632 ACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGAT 1681
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
45 1701 ACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGAT 1750

    1682 CGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAA..... 1707
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1751 CGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAAGCTTTAAGGGCGAATTCAGCA 1800

```

Выравнивание аминокислотной последовательности гемагглютинаина

```

pHA5  1 MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILE 50 seq id 57
      |||
wt     1 MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILE 50 seq id 58
      |||
      51 KTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKAN 100
      |||
5      51 KTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKAN 100
      |||
      101 PTNDLCYPGSGFNDYEELKHLISRINHFEEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSA 150
      |||
      101 PTNDLCYPGSGFNDYEELKHLISRINHFEEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSA 150
      |||
      151 CPYLGSPSFRRNVVWLIIKNSTYPTIKKSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA 200
      |||
      151 CPYLGSPSFRRNVVWLIIKNSTYPTIKKSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA 200
      |||
      201 AEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVLPKIAATRSKVNGQSGRMEFFWTILK 250
      |||
      201 AEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVLPKIAATRSKVNGQSGRMEFFWTILK 250
      |||
      15 251 PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA 300
      |||
      251 PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA 300
      |||
      301 INSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFG 350
      |||
      20 301 INSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFG 350
      |||
      351 AIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAMDGVNTKNVNS 400
      |||
      351 AIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAMDGVNTKNVNS 400
      |||
      25 401 IIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMEN 450
      |||
      401 IIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMEN 450
      |||
      451 ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNARELNGCGFEFYHKCDNECMESIRN 500
      |||
      451 ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNARELNGCGFEFYHKCDNECMESIRN 500
      |||
      30 501 GTCNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMA 550
      |||
      501 GTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMA 550
      |||
      551 GLSLWMCSNGSLQCRICI . 568
      |||
      35 551 GLSLWMCSNGSLQCRICI* 569

```

Пример 26

Получение генов HA, NA и M1 гриппа A/Indonesia/5/05, оптимизированных для эффективной экспрессии в клетках Sf9

Следующие полипептиды были получены на основе оптимизированных по кодонам нуклеотидов, соответствующих гену HA Indonesia/5/05 (см. пример 31). Оптимизированные по кодонам нуклеотиды были сконструированы и получены (Geneart GMBH, Regensburg, ФРГ) в соответствии со способами, раскрытыми в публикации патента США 2005/0118191, включенной здесь в качестве ссылки во всей своей полноте и для всех целей. Последовательности нуклеиновой кислоты см. в примере 31.

Vac2-hac-opt (немодифицированная а.к. последовательность) (SEQ ID 27)

MEKIVLLLA I VSLVKS DQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLC DL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
 PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAP EYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
 5 INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
 AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
 IIDKMNTQFE AVGREFNLE RRIENLNKKM EDGF LDVW TY NAELLVLMEN
 ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRD NAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
 GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
 GLSLWMCSNG SLQCRICI*

10 Vac2-hac-spc-opt (модифицированная, сигнальный пептид из хитиназы, подчеркнут) (SEQ ID 28)

Mplykl lnlwlvavsnai p DQICIGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLC DL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
 PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 15 AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAP EYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
 INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
 AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
 IIDKMNTQFE AVGREFNLE RRIENLNKKM EDGF LDVW TY NAELLVLMEN
 ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRD NAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
 GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
 20 GLSLWMCSNG SLQCRICI*

Vac2-hac-sph9-opt (модифицированная, сигнальный пептид из H9, подчеркнут) (SEQ ID 29)

METISLITIL LVVTASNA DQICIGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLC DL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
 PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 25 CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAP EYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
 INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
 AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
 IIDKMNTQFE AVGREFNLE RRIENLNKKM EDGF LDVW TY NAELLVLMEN
 30 ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRD NAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
 GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
 GLSLWMCSNG SLQCRICI*

Vac2-hac-cs-opt (модифицированная по сайту расщепления) (SEQ ID 30)

MEKIVLLLA I VSLVKS DQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLC DL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
 PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 35 CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAP EYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
 INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE S---RGLFG
 AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
 IIDKMNTQFE AVGREFNLE RRIENLNKKM EDGF LDVW TY NAELLVLMEN
 40 ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRD NAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
 GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
 GLSLWMCSNG SLQCRICI*

Синтезировали также следующие полипептиды, соответствующие немодифицированным, оптимизированным по кодонам генам NA и M1.

Vac2-naj-opt (нейраминидаза) (SEQ ID 31)

45 MNPNQKIITI GSICMVGIV SLMLQIGNMI SIWVSHSIQT GNQHQAESIS
 NTNPLTEKAV ASVTLAGNSS LCPIRGWAVH SKDNNIRIGS KGDVFVIREP
 FISCSHLECR TFFLTQGALL NDKHSNGTVK DRSPHRTLMS CPVGEAPSPY
 NSRFESVAWS ASACHDGT SW LTIGISGPDN EAVAVLYKNG IITDTIKSWR
 NNILRTQESE CACVNGSCFT VMTDGPSDQ ASYKIFKMEK GKVVKSVELD
 APNYHYECS CYPDAGETC VCRDNWHGSN RPWVSEFNQNL EYQIGYICSG
 VFGDNPRPND GTGSCGPMS NGAYGVKGFS FKYGNVWIG RTKSTNSRSG
 50 FEMIWDPNGW TGTDSSESVK QDIVAITDWS GYSGSFVQHP ELTG LDCIRP
 CFWVELIRGR PKESTIWTSG SSISFCGVNS DTVSWSWPDG AELPFTIDK*

Vac2-mc-opt (матрикс) (SEQ ID 32)

MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQKLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
 ILSPLTKGIL GFVFTLTVPs ERGLQRRRFV QNALNGNGDP NNMDRAVKLY
 KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EVAFGGLVCAT
 CEQIADSQHR SHRQMATITN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
 EAMEVANQAR QMVQAMRTIG THENSSAGLR DNLEENLQAY QKRMGVQMQR
 EK*

5 Синтетические, оптимизированные по кодонам гены HA, NA и M1
 субклонировали в переносящую плазмиду pFastBac1 с использованием сайтов BamHI
 и HindIII, как описано выше. Рекомбинантные бакмиды для экспрессии
 синтетических генов HA, NA и M1 в клетках Sf9 получают, как описано выше, с
 10 использованием штамма E.coli DH10Bac (Invitrogen).

Пример 24

Клонирование вируса гриппа монофилетического таксона 1 A/Viet Nam/1203/04
 (H5N1) с помощью ОТ-ПЦР

15 Гены HA, NA и M1 клонировали с помощью ОТ-ПЦР по способу, описанному
 выше. Показанные ниже последовательности представляют собой сравнение
 опубликованных генов и клонированных генов.

Ген HA для монофилетического таксона 1 A/Viet Nam/1203/04 (H5N1)

Верхняя строка: ген HA с рег. № AY818135 (SEQ ID 36)

20 Нижняя строка: ген HA A/Vietnam/1203/04 (H5N1) по Novavax (SEQ ID 37)

25

30

35

40

45

50

1ATGGAGAAAA 10
 |||||
 301 AGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTAGGCGCGCCATGGAGAAAA 350
 11 TAGTGCTTCTTTTGGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTG 60
 |||||
 5 351 TAGTGCTTCTTTTGGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTG 400
 61 ATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGA 110
 |||||
 401 ATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGA 450
 10 111 AAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGAAACACA 160
 |||||
 451 AAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGAAACACA 500
 161 ACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGAT 210
 |||||
 15 501 ACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGAT 550
 211 TGTAGCGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAATTCAT 260
 |||||
 551 TGTAGCGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAATTCAT 600
 261 CAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATG 310
 |||||
 20 601 CAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATG 650
 311 ACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTA 360
 |||||
 651 ACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTA 700
 25 361 TTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTC 410
 |||||
 701 TTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTC 750
 411 TTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACC 460
 |||||
 30 751 TTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACC 800
 461 AGGGAAAGTCCTCCTTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAC 510
 |||||
 801 AGGGAAAGTCCTCCTTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAC 850
 35 511 AGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGA 560
 |||||

40

45

50

851 AGTACATACCCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGA 900
561 TCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGA 610
| | | | |
901 TCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGA 950

5 611 CAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACA 660
| | | | |
951 CAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACA 1000

661 CTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGG 710
| | | | |
10 1001 CTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGG 1050

711 GCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAGCCGAATGATG 760
| | | | |
1051 GCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAGCCGAATGATG 1100

15 761 CAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATAC 810
| | | | |
1101 CAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATAC 1150

811 AAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATA 860
| | | | |
20 1151 AAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATA 1200

861 TGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTA 910
| | | | |
1201 TGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTA 1250

911 GCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATTGGGGAAATGCCCCAAA 960
| | | | |
25 1251 GCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATTGGGGAAATGCCCCAAA 1300

961 TATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGCCC 1010
| | | | |
1301 TATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGCCC 1350

30 1011 TCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAG 1060
| | | | |
1351 TCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAG 1400

1061 GTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTAC 1110
| | | | |
35 1401 GTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTAC 1450

1111 CACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCAC 1160
| | | | |
1451 CACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCAC 1500

1161 TCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACA 1210
| | | | |
40 1501 TCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACA 1550

1211 AAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACTTAGAA 1260
| | | | |
1551 AAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACTTAGAA 1600

45 1261 AGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTTAGATGT 1310

1601 AGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCCCTAGATGT 1650
 1311 CTGGACTTATAATGCTGAACCTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTC 1360
 |||
 1651 CTGGACTTATAATGCTGAACCTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTC 1700
 5 1361 TAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTA 1410
 |||
 1701 TAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTA 1750
 1411 CAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTA 1460
 |||
 10 1751 CAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTA 1800
 1461 TCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAATGGAACGTATG 1510
 |||
 1801 TCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAATGGAACGTATG 1850
 1511 ACTACCCGCGAGTATTCAGAAGAAGCGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGT 1560
 |||
 1851 ACTACCCGCGAGTATTCAGAAGAAGCGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGT 1900
 1561 GGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATACTGTCAATTTATTC 1610
 |||
 20 1901 GGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATACTGTCAATTTATTC 1950
 1611 TACAGTGGCGAGTTCCTTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCT 1660
 |||
 1951 TACAGTGGCGAGTTCCTTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCT 2000
 1661 TATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA... 1707
 25 |||
 2001 TATGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGCG 2050

Сравнение генов NA

Ген NA для монофилетического таксона 1 A/Viet Nam/1203/04 (H5N1) (SEQ ID 39)
 H5N1naLANL ISDN 38704 x NA_Vietl203_Lark (NVAX) (SEQ ID 38)

30 1ATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGGATCAATCTGTATG 45
 |||
 451 CCGGGATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGGATCAATCTGTATG 500
 46 GTAACCTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAAT 95
 |||
 35 501 GTAACCTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAAT 550
 96 ATGGGTCAGTCATTCAATTCACACAGGGAATCAACACCAATCTGAACCAA 145
 |||
 551 ATGGGTCAGTCATTCAATTCACACAGGGAATCAACACCAATCTGAACCAA 600
 146 TCAGCAATACTAATTTTCTTACTGAGAAAGCTGTGGCTTCAGTAAAATTA 195
 |||
 40 601 TCAGCAATACTAATTTTCTTACTGAGAAAGCTGTGGCTTCAGTAAAATTA 650
 196 GCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCATTAACGGATGGGCTGTATACAGTAA 245

45

50

```

|||||
651 GCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCATTAACGGATGGGCTGTATACAGTAA 700
      .
246 GGACAACAGTATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTTGTATAAGAG 295
      .
5 701 GGACAACAGTATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTTGTATAAGAG 750
      .
296 AGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGAATGCAGAACTTTCTTTTGGACT 345
      .
751 AGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGAATGCAGAACTTTCTTTTGGACT 800
      .
10 346 CAGGGAGCCTTGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGACTGTCAAAGACAG 395
      .
801 CAGGGAGCCTCGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGACTGTCAAAGACAG 850
      .
396 AAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCC 445
      .
15 851 AAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCC 900
      .
446 CATATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGCCAT 495
      .
901 CATATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGCCAT 950
      .
496 GATGGCACCAGTTGGTTGACGATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGC 545
      .
20 951 GATGGCACCAGTTGGTTGACGATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGC 1000
      .
546 TGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTT 595
      .
1001 TGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTT 1050
      .
25 596 GGAGGAACAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAAT 645
      .
1051 GGAGGAACAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAAT 1100
      .
646 GGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTGACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATC 695
      .
30 1101 GGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTGACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATC 1150
      .
696 ACATAAGATCTTCAAAATGGAAAAAGGGAAAGTGGTTAAATCAGTCGAAT 745
      .
1151 ACATAAGATCTTCAAAATGGAAAAAGGGAAAGTGGTTAAATCAGTCGAAT 1200
      .
746 TGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTAATGCC 795
      .
35 1201 TGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTAATGCC 1250
      .
796 GGAGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCGGCC 845
      .
40 1251 GGAGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCGGCC 1300
      .
846 ATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCA 895
      .
1301 ATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCA 1350
      .
896 GTGGAGTTTTTCGGAGACAATCCACGCCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGT 945
      .
45 1351 GTGGAGTTTTTCGGAGACAATCCACGCCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGT 1400
      .
946 GGTCCGGTGTCTCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTCATTTAA 995

```

50

```

|||||
1401 GGTCCGGTGTCTCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTTCATTAA 1450
      .
996 ATACGGCAATGGTGTCTGGATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATTCCAGGA 1045
      |||||
5 1451 ATACGGCAATGGTGTCTGGATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATTCCAGGA 1500
      .
1046 GCGGCTTTGAAATGATTGGGATCCAAATGGGTGGACTGAAACGGACAGT 1095
      |||||
1501 GCGGCTTTGAAATGATTGGGATCCAAATGGGTGGACTGAAACGGACAGT 1550
      .
1096 AGCTTTTCAGTGAAACAAGATATCGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATA 1145
10 1551 AGCTTTTCAGTGAAACAAGATATCGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATA 1600
      .
1146 TAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGACTAGATTGCATAA 1195
      |||||
1601 TAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGACTAGATTGCATAA 1650
      .
15 1196 GACCTTGTTTCTGGGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCCAAAGAGAGCACA 1245
      |||||
1651 GACCTTGTTTCTGGGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCCAAAGAGAGCACA 1700
      .
1246 ATTTGGACTAGTGGGAGCAGCATATCTTTTTGTGGTGTAATAGTGACAC 1295
      |||||
20 1701 ATTTGGACTAGTGGGAGCAGCATATCTTTTTGTGGTGTAATAGTGACAC 1750
      .
1296 TGTGGGTTGGTCTTGCCAGACGGTGCCGAGTTGCCATTACCATTTGACA 1345
      |||||
1751 TGTGGGTTGGTCTTGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTACCATTTGACA 1800
      .
1346 AGTAG..... 1350
25 |||||
1801 AGTAGGGGCCCTCGAGTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTAC 1850

```

Сравнение генов M1

Ген M1 для монофилетического таксона 1 A/Viet Nam/1203/04 (H5N1) (SEQ ID 40)
H5N1m1LAN1 ISDN38704 x M1_Viet1203_Lark (NVAX) (SEQ ID 41)

```

30 1 .....ATGAGTCTTCTAACCG 16
      |||||
301 ATATCTGCAGAATTCGCCCTTAGAATTCGACGTCATGAGTCTTCTAACCG 350
      .
17 AGGTGCAAACGTACGTTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCC 66
      |||||
35 351 AGGTGCAAACGTACGTTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCC 400
      .
67 GAGATCGCACAGAACTTGAAGATGTCTTTGCAGGAAAGAACACCGATCT 116
      |||||
401 GAGATCGCACAGAACTTGAAGATGTCTTTGCAGGAAAGAACACCGATCT 450
      .
117 CGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACCTCTGA 166
      |||||
40 451 CGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACCTCTGA 500
      .
167 CTAAGGGGATTTTGGGATTTGTATTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGA 216
      |||||

```

45

50

501 CTAAAGGGATTTTGGGATTTGTATTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGA 550
 217 GGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGA 266
 ||
 551 GGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGA 600
 5 267 TCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAG 316
 ||
 601 TCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAG 650
 317 AAATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTGCGACTCAGCTACTCAACCGGT 366
 ||
 10 651 AAATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTGCGACTCAGCTACTCAACCGGT 700
 367 GCACTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGAC 416
 ||
 701 GCACTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGAC 750
 417 TACGGAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAG 466
 ||
 15 751 TACGGAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAG 800
 467 ATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCAACTATCACCAACCCACTA 516
 ||
 801 ATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCAACTATCACCAACCCACTA 850
 20 517 ATCAGACATGAGAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACAGCTAAGGCTAT 566
 ||
 851 ATCAGACATGAGAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACAGCTAAGGCTAT 900
 567 GGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGATCG 616
 ||
 25 901 GGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGATCG 950
 617 CTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTGGGACTCAT 666
 ||
 951 CTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTGGGACTCAT 1000
 667 CCTAACTCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAAAATTGTCAGGC 716
 ||
 30 1001 CCTAACTCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAAAATTGTCAGGC 1050
 717 CTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA
 ||
 1051 CTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA

35 Все последовательности клонировали и анализировали в соответствии со способами, раскрытыми выше.

Пример 25

Получение генов НА, НА и М1 монофилетического таксона 1 гриппа H5N1 A/Viet Nam/1203/04, оптимизированных для эффективной экспрессии в клетках Sf9

40 Из оптимизированных по кодонам нуклеотидов, соответствующих A/Viet Nam/1203/04, были получены следующие полипептиды. Нуклеотиды были сконструированы и синтезированы (Geneart GMBH, Regensburg, ФРГ), как раскрыто выше (см. пример 24).

45 VN1203-ha-cs-opt (модифицированная по сайту расщепления, подчеркнуто) (SEQ ID 33)

MEKIVLLFAIVSLVKSDDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDFFINVPFWSYIVEKANPA
 NDLCYPGDFNDYEELKHLISRINHFEKTIQIIPKNSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIIKKNNAYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISVGT
 50 STLNRQLVPKIATRSKVNQNGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPFYAYKIVKKG
 DSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLR
 NSPQRET----RGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSFYAADKESTQKAID
 GVTNKNVSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMEN
 ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
 SEEARLKREISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNGLSLQCRI
 CI*

VN1203-ha-spc-opt (модифицированный сигнальный пептид, подчеркнуто) (SEQ ID 34)

Mplykllnlvwlwlvavsnaip DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
AQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPMCMDEFINVPWSYIVEKANPA
NDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQTIPKNSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFF
RNVVWLKKNNAIPTIKRSYNNNTQEDLLVWGIHHNPDAAEQTRLYQNPTTYISVGT
STLNQRLVPKIATRISKVNGQNGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG
DSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLTGLR
NSPQRERRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMEN
ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
SEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNNGSLQCRI
CI*

VN1203-ha-sph9-opt (сигнальный пептид и сайт расщепления затенены) (SEQ ID 35)

METISLITIL LVVTASNA DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
AQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPMCMDEFINVPWSYIVEKANPA
NDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQTIPKNSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFF
RNVVWLKKNNAIPTIKRSYNNNTQEDLLVWGIHHNPDAAEQTRLYQNPTTYISVGT
STLNQRLVPKIATRISKVNGQNGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG
DSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLTGLR
NSPQRERRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMEN
ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
SEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNNGSLQCRI
CI*

Пример 26

Иммуногенность VLP H5N1 Vietnam/1203/2003 (предельно низкие дозы)

Мышей BALB/C иммунизировали внутримышечно и интраназально VLPs H5N1 при очень низких дозах VLPs (0,2, 0,04, 0,008, 0,0016 мкг НА/доза). У мышей брали кровь на 0, 21 и 35 дни. Мыши получали бустерную дозу на 21 день. Сыворотку анализировали на антитела против НА в тесте ингибирования гемагглютинации (HI) с использованием RBCs индейки и вируса гриппа с помощью ИФА. Результаты этого исследования показаны на фиг. 24 и 25.

Результаты показывают, что значительный общий иммунный ответ наблюдался при введении VLPs внутримышечно в очень низких дозах. Величина ответа была сходна с контролем в дозе 3,0 и 0,6 мкг НА. Эти данные позволяют видеть истинную зависимость ответа от дозы и показывают, что ответ антител на 0,2 мкг VLP выше, чем на 3,0 мкг белка гНА. Хотя ответ на интраназальное введение не был столь же сильным, доза VLPs 0,2 мкг НА все же индуцировала значительный ответ. Титр ИФА с дозой 0,2 мкг в этом эксперименте сходен с таковым при дозе 0,12 мкг вакцины VLP H3N2 в предшествующих экспериментах, см. выше.

Пример 27

Исследования с провоцирующим введением

После инокуляции мышей BALB/c VLPs в концентрациях 3 мкг, 0,6 мкг, 0,12 мкг и 0,02 мкг VLPs H3N2 внутримышечно и интраназально (суммарная доза НА) мышам производили провоцирующее введение вируса гриппа A/Aichi/268x31. Результаты этого исследования показаны на фиг. 27 и 28. Эти данные показывают снижение массы у всех вакцинированных животных, однако животные, вакцинированные 3,0 мкг и 0,12 мкг VLPs, выздоравливали быстрее, чем другие животные, и при внутримышечной, и при интраназальной вакцинации. Интраназальные дозы обеспечивали повышенную защиту.

Пример 29

Исследования с провоцирующим введением (хорьки)

В этом исследовании хорьков вакцинировали VLPs H9N2. В исследовании с провоцирующим введением было использовано всего 18 хорьков: 6 с ложной вакцинацией, 6 вакцинированных средней дозой (1,5 мкг) и 6 вакцинированных высокой дозой (15 мкг) внутримышечно. Затем хорькам производили

провоцирующее введение 10^6 EID₅₀ A/НК/1073/99 интраназально. Собирали назальные смывы на 1, 3, 5 и 7 дни. Вирус в назальных смывах всех животных титровали на 3, 5 и 7 дни. Эти данные представлены в таблице 2 и на фиг. 29. Эти данные показывают, что к 7 дню в назальных смывах всех вакцинированных животных вирус не определялся, в то время как в группе с ложной вакцинацией имелись выявляемые титры вируса.

Таблица 2

Титры вируса дикого типа (log 10/мл) у хорьков после провоцирующего введения вируса

Группа: контроль с ложной вакцинацией плацебо (n=6)

Хорек	День 3	День 5	День 7
4512	7	5,5	3,5
4524	6,5	6,75	1,98
4525	7,5	6,5	6,75
4526	7,5	7,25	3,5
4527	6,75	7,25	2,5
4528	7,5	6,25	2,75
Среднее	7,125	6,583333	3,496667
Ст. откл.	0,44017	0,66458	1,699137

Группа: низкая доза

Хорек	День 3	День 5	День 7
3916	6,75	2,75	1,5
3917	7,5	5,5	1,5
3918	7,5	6,5	1,5
3919	5,5	3	1,5
3920	6,75	2,25	1,5
3921	6,5	3,5	1,5
Среднее	6,75	3,916667	1,5
Ст. откл.	0,74162	1,693123	0

Группа: высокая доза

Хорек	День 3	День 5	День 7
3922	6,5	2,75	1,5
3923	6,25	3,75	1,5
3924	5,75	1,5	1,5
3925	6,5	4,75	1,5
3926	6,25	3,5	1,5
3927	5,75	1,5	1,5
Среднее	6,166667	2,958333	1,5
Ст. откл.	0,341565	1,298236	0

Пример 30

Исследования внутримышечной и интраназальной инокуляции у мышей

Мышей инокулировали VLPs A/Fujian/411/2002 (H3N2) в концентрациях 3 мкг, 0,6 мкг, 0,12 мкг или 0,024 мкг (общая доза НА) внутримышечно или интраназально на 0 день и через 3 недели производили бустерное введение. Контрольных мышей инокулировали инактивированным формалином A/Wyoming (Fujian-подобный вакцинный штамм) или ЗФР. От инокулированных мышей получали сыворотки через 0, 3, 5 и 8 недель. Собранные сыворотки анализировали на антитела против НА

в тесте ингибирования гемагглютинации (НИ) для антител против гриппа с помощью ИФА. Анализ проводили с использованием A/Fujian/411/2002, A/Panama/2007/99, A/Wyoming/3/03 и A/New York/55/2004 штаммов вируса гриппа H3N2. Результаты этого исследования показаны на фиг. 30А-Н. Эти данные показывают, что VLPs H3N2

индуцировали антитела против исходных штаммов A/Fujian/411/2002 вируса гриппа и против других штаммов H3N2. Эти данные также показывают, что титры у интраназально инокулированных мышей увеличиваются позже, чем у мышей, инокулированных внутримышечно. Однако после приблизительно 8 недель интраназальные титры выше внутримышечных титров. Кроме того, титры к инактивированному вирусному антигену, по-видимому, сопоставимы с таковыми к VLP при эквивалентных дозах после внутримышечной инокуляции. Однако инактивированный антиген, видимо, не является столь же иммуногенным после интраназальной инокуляции и не оказывает столь же широкую защиту после интраназальной инокуляции.

Пример 31

Получение генов HA, NA и M1 монофилетического таксона 2 гриппа H5N1, оптимизированных для эффективной экспрессии в клетках Sf9

Были сконструированы и синтезированы (Geneart GMBH, Regensburg, ФРГ), как раскрыто выше, следующие оптимизированные нуклеотиды и полипептиды, соответствующие HA, NA и M1 вирусов H5N1 монофилетического таксона 2 A A/Indonesia/5/05, A/Bar headed goose/Qinghai/1A/2005 и A/Anhui/1/2005.

Оптимизированные нуклеотиды и полипептиды перечислены ниже. Для получения VLPs A/Anhui HA можно экспрессировать с A/Indonesia NA и M1. Для VLPs, включающих A/Quinghai HA и NA, ген M1 A/Indonesia можно экспрессировать совместно с A/Quinghai HA и NA.

A/INDONESIA/5/05

Оптимизированный HA A/INDONESIA (стартовый и стоп-кодона подчеркнуты) (SEQ ID 42)

```
GGTACCGGATCCGCCACCATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCTATCGTGTCCTGGTG
AAGTCCGACACAGATCTGCATCGGTACACGCTAACAACTCCACCGAGCAGGTGGACACC
ATCATGGAGAAGAACGTCACCGTGACCCACGCTCAGGACATCTCGAAAAGACCCACAAC
GGCAAGCTGTGCGACCTGGACGGTGTCAAGCCCTGATCCTGCGTGACTGCTCCGTGGCT
GGTTGGCTGCTGGGTAAACCCATGTGCGACGAGTTTCATCAACGTGCCCGAGTGGTCCTAC
ATCGTGGAGAAGGCTAACCCACCAACGACCTGTGCTACCCCGGTTCTTCAACGACTAC
GAGGAGCTGAAGCAGCTGCTGCTCCGATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCC
AAGTCTCTTGGTCCGACACGAGGCTTCTCCGCTGCTCTCTCCGCTTGCCCTACCTG
GGTTCCCTCTCTCTCTCCGTAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACTCCACCTACCCC
ACCATCAAGAAGTCTTACCAACCAACCAACAGGAGGACCTGCTGGTCTGTGGGGTATC
CACCACCCCAACGACGCTGCCGAGCAGACCCGCTCTGTACCAGAACCCACCACTACATC
TCCATCGGCACCTCCACCTGAACCAAGCTGTGGTGCCCAAGATCGCTACCCGTTCCAAG
GTGAACGGCCAGTCCGGTGTGATGGAGTTCTTCTGGACCATCCTGAAGCCTAACGACGCT
ATCAACTTCGAGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTACGCTTACAAGATCGTGAAG
AAGGGCGACTCCGGTATCATGAAGTCCGAGCTGGAGTACGGTAACCTGCAACCAAGTGC
CAGACCCCAATGGGTGCTATCAACTCTCTCATGCCCTTCCACAACATCCACCCCTGACC
ATCGGCGAGTGCCCAAGTACGTGAAGTCCAACCGTCTGGTGCTGGCTACCGGTCTGCGT
```

```
AACTCCCCCAGCGCGAGTCCCGTCTGTAAGAAGCGTGGTCTGTTCGGCGCTATCGCTGGT
TTCATCGAGGGCGGTGGCAGGGCATGGTGGACGGATGGTACGGTTACCACCACTCTAAC
GAGCAGGGTTCCGGTTACGCTGCTGACAAGGAGTCCACCCAGAAGGCTATCGACGGCGTC
ACCAACAAGGTGAACCTCATCTCGACAAGATGAACACCCAGTTCCGAGGCTGTGGGTCTG
GAGTCAACAACCTCGAGCGTCTGATCGAGAACCTGAACAAGAGATGGAGGACGGTTTC
CTGGACGTGTGGACCTACAACGCCGAGCTGCTGGTGTGATGGAGAACGAGCGTACCCCTG
GACTTCCACGACTCCAACGTGAAGAACCTGTACGACAAGGTCCGCCTGCAGCTGCGTGAC
AACGCTAAGGAGCTGGGTAACGGTGTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGGCACAACGAGTGC
ATGGAGTCCATCCGTAACGGCACTTCAACTACCCCAAGTACTCCGAGGAGGCTCGTCTG
AAGCGTGAGGAGATCTCCGGCGTGAAGCTCGAGTCCATCGGAACCTACCAGATCTGTCC
ATCTACTCCACCGTGGGTCTCTCTCTGGCTCTGGCTATCATGATGGCTGGTCTGTCCCTG
TGGATGTGCTCAACGGTCTCCCTGCAGTGCCGCTATCTGCATCTAATGAAGCTTGAGCTC
```

Белковая последовательность HA A/INDONESIA (SEQ ID 43)

MEKIVLLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
 PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAPYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
 INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNNRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
 AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
 IIDKMNTQFE AVGREFNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
 ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDNAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
 GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
 GLSLWMCNSG SLQCRICI

Оптимизированный НА A/INDONESIA (с удаленным сайтом расщепления)
 (стартовый и стоп-кодона подчеркнуты) (SEQ ID 44)

GGATCCGCCACCATGGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCTATCGTGTCCTGGTGAAGTCC
 GACCAGATCTGCATCGGTTACCACGCTAACAACTCCACCGAGCAGGTGGACACCATCATG
 GAGAAGAACGTACCGTGACCCACGCTCAGGACATCCTCGAAAAGACCCACAACGGCAAG
 CTGTGCGACCTGGACGGTGTCAAGCCCCTGATCCTGCGTGACTGCTCCGTGGCTGGTTGG
 CTGCTGGGTAAACCCATGTGCGACGAGTTCATCAACGTGCCGAGTGCTCCTACATCGTG
 GAGAAGGCTAACCCACCAACGACCTGTGCTACCCCGGTTCTTCAACGACTACGAGGAG
 CTGAAGCACCTGCTGTCCCGTATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCCAAGTCC
 TCTTGGTCCGACACGAGGCTTCTCTCGGTGTCTCTCCGCTTGCCCTACCTGGGTTC
 CCTCTCTTCTCCGTAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACTCCACCTACCCACCATC
 AAGAAGTCTTACAACAACACCAACAGGAGGACCTGCTGGTCTGTGGGGTATCCACCAC
 CCCAACGACGCTGCCGAGCAGACCCGCTCTGTACCAGAACCCACCTACATCTCCATC
 GGCACCTCCACCTGAACAGCGTCTGGTGCCCAAGATCGCTACCCGTTCCAAGGTGAAC
 GGCCAGTCCGGTCTGATGGAGTTCTTCTGGACCATCCTGAAGCCTAACGACGCTATCAAC
 TTCGAGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTACGCTTACAAGATCGTGAAGAGGGC
 GACTCCGCTATCATGAAGTCCGAGCTGGAGTACGGTAACGCAACACCAAGTCCAGACC
 CCCATGGGTGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATCCACCCCTGACCATCGGC
 GAGTGCCCCAAGTACGTGAAGTCCAACCGTCTGGTGTGCTGGCTACCGGTCTGCGTAACTCC
 CCCCAGCGCGAGTCCCGTGGTCTGTTCGGCGCTATCGCTGGTTTCATCGAGGGCGGTTGG
 CAGGGCATGGTGGACGGATGGTACGGTTACCACCACTCTAACGAGCAGGGTTCCGGTTAC
 GCTGCTGACAAGGAGTCCACCCAGAGGCTATCGACGGCGTCACCAACAAGGTGAAGTCC
 ATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGAGGCTGTGGGTCTGAGTTCAACAACCTCGAG
 CGTCGTATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGACGGTTTCTGGACGTGTGGACCTAC
 AACGCCGAGTCTGGTGTGCTGATGGAGAACGAGCGTACCCTGGACTTCCACGACTCCAAC
 GTGAAGAACCTGTACGACAAGGTCCGCTGCGCTGCGTGACAACGCTAAGGAGCTGGGT
 AACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGGCACAACGAGTGCATGGAGTCCATCCGTAAC
 GGCACCTACAATACCCCCAGTACTCCGAGGAGGCTCGTCTGAAGCGTGAGGAGATCTCC
 GGCGTGAAGCTCGAGTCCATCGGAACCTACCAGATCCTGTCCATCTACTCCACCGTGGCT
 TCCTCCCTGGCTCTGGCTATCATGATGGCTGGTCTGCTCCCTGTGGATGTGCTCCAACGGT
 TCCCTGCAGTGCCGATCTGCATCTAAATGAAAGCTT

Белковая последовательность НА A/INDONESIA (SEQ ID 45)

MEKIVLLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
 PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAPYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
 INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNNRLVLA TGLRNSPQRE SRGLFGAIAAG
 FIEGGWQGMV DGWYGYHHSN EQSGSYAADK ESTQKAIDGV TNKVNSIIDK
 MNTQFEAVGR EFNLEERRIE NLNKKMEDGF LDVWTYNAEL LVLNENERTL
 DFHDSNVKNL YDKVRLQLRD NAKELGNGCF EYHKCDNEC MESIRNGTYN
 YPQYSEEARL KREEISGVKL ESIGTYQILS IYSTVASSLA LAIMMAGLSL
 WMCNSGSLQC RIC

Оптимизированный НА A/INDONESIA (стартовый и стоп-кодона подчеркнуты)
 (SEQ ID 46)

GGTACCGGATCCGCCACCATGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCGGCTCCATCTGC
 ATGGTGATCGGTATCGTGTCCTGATGCTGCAGATCGGTAACATGATCTCCATCTGGGTG
 TCCCACTCCATCCAGACCGGTAACCAGCACCAGGCTGAGTCCATCTCCAACACCAACCCC
 CTGACCGAGAAGGCTGTGGCTTCCGTGACCCTGGCTGGTAACCTCCCTGTGCCCCATC
 CGTGGTTGGGCTGTGCACTCCAAGGACAACAACATCCGCATCGGTTCCAAGGGTGACGTG
 5 TTGGTGATCCGTGAGCCCTTCATCTCCTGCTCCACCTCGAGTGCCGTACCTTCTCCTG
 ACCCAAGGTGCTCTGCTGAACGACAAGCACTCCAACGGCACCCTGAAGGACCGTTCCCC
 CACCGTACCCTGATGTCTGCCCCGTGGGCGAGGCTCCCTCCCCCTACAACCTCCCGTTTC
 GAGTCCGTGGCTTGGTCCGCTTCCGCTTGCCACGACGGCACCTCTTGGCTGACCATCGGT
 ATCTCCGGTCCCGACAACGAGGCTGTGCTGTGTGAAGTACACGGCATCATCACCAGAC
 ACCATCAAGTCTTGGCGTAACAACATCCTGCGTACCCAGGAGTCCGAGTGCGCTTGGCTG
 AACGGTTCCCTGCTTACCGTGATGACCGACGGTCCCTCCGACGGCCAGGCTTCTTACAAG
 10 ATCTTCAAGATGGAGAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTGGAGCTGGACGCTCCCAACTAC
 CACTACGAGGAGTGCTCTTGCTACCCCGACGCTGGCGAGATCACCTGCGTGTGCCGTGAC
 AACTGGCACGGTTCCAACCGTCCCTGGGTGTCTTCAACCAGAACCTCGAGTACCAGATC
 GGTACATCTGTCCGGCGTGTTCGGTGACAACCCCGTCCCAACGACGGAACCGGTTCC
 TGGCGTCCCATGTCCCCCAACGGTGCTTACGGTGTCAGGGCTTCTCCTTCAAGTACGGT
 AACGGTGCTCGGATCGGTCGTACCAAGTCCACCACTCCCGTCCGGTTTCGAGATGATC
 TGGGACCCCAACGGTTGGACCGGCACCGACTCTTCTTCTCCGTGAAGCAGGACATCGTG
 15 GCTATCACCGACTGGTCCGGTTACTCCGGTTCCTTCGTGCAGCACCCCGAGCTGACCGGT
 CTGGACTGCATTGCTCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATCCGTGGTCTCCCAAGGAGTCC
 ACCATCTGGACCTCCGGCTCCTCCATCTCTTTCTGCGGTGTGAACCTCCGACACCGTGTCC
 TGGTCTTGGCCCCGACGGTGCCGAGCTGCCCTTACCATCGACAAGTAAATGAAAGCTTGAG
 CTC

Белковая последовательность NA A/INDONESIA (SEQ ID 47)

MNPNQKIITI GSICMVGIV SLMLQIGNMI SIWVSHSIQT GNQHQAESIS
 NTNPLTEKAV ASVTLAGNSS LCPIRGWAVH SKDNNIRIGS KGDVVFVIREP
 FISCSHLECR TEFLTQGALL NDKHSNGTVK DRSPHRTLMS CPVGEAPSPY
 NSRFESVAWS ASACHDGTSW LTIGISGPDN EAVAVLKYNIG IITDTIKSWR
 NNILRTQESE CACVNGSCFT VMTDGPDSGQ ASYKIFKMEK GKVVKSVELD
 APNYHYEES CYPDAGEITC VCRDNWHGSN RPWVSFNQNL EYQIGYICSG
 25 VFGDNPRPND GTGSCGPMSP NGAYGVKGF SFKYNGVWIG RTKSTNSRSG
 FEMIWDPNWG TGTDSFSVK QDIVAITDWS GYSGSFVQHP ELTGLDCIRP
 CFWVELIRGR PKESTIWTSG SSISFCGVNS DTVSWSWPDG AELPFTIDK

Оптимизированный M1 A/INDONESIA (SEQ ID 48)

GGTACCGGATCCGCCACCATGTCCTGCTGACCGAGGTGGAGACCTACGTGCTGTCCATC
 ATCCCTCCGGTCTCTGAAGGCTGAGATCGCTCAGAAGCTCGAGGACGTTTTTCGCTGGC
 30 AAGAACACCGACCTCGAGGCTCTGATGGAGTGGCTCAAGACCCGTCCCATCCTGTCCCC
 CTGACCAAGGGTATCCTGGGTTTCGTGTTACCTGACCGTGCCCTCCGAGCGTGGTCTG
 CAGCGTCTGCTTTCGTGCGAAGCGCTCTGAACGGTAACGGTGACCCCAACAACATGGAC
 CGTGCTGTGAAGCTGTACAAGAAGCTGAAGCGCGAGATCACCTTCCACGGTGCTAAGGAG
 GTGTCCTGTCTTACTCCACCGGTGCTCTGGCTAGCTGCATGGGCCTGATCTACAACCGT
 ATGGGCACCGTGACCAACGAGGTGGCTTCCGGTCTGGTCTGCGCTACCTGCGAGCAGATC
 GCTGACTCCCAGCACCGTTCCACCGTCAGATGGCTACCATCACCAACCCCTGATCCGT
 35 CACGAGAACCGTATGGTGCTGGCTTCCACCAACCGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCTGGT
 TCCTCCGAGCAGGCTGCTGAGGCCATGGAGGTGGCCAACGAGGCTCGTCAGATGGTGCAG
 GCTATGCGTACCATCGGCACCCACCCCAACTCCTCCGCTGGTCTGCGTGACAACCTGCTC
 GAGAACCTGCAGGCTTACCAGAAGCGTATGGGAGTCCAGATGCAGCGCTTCAAGTAAATGA
 AAGCTTGAGCTC

Белковая последовательность M1 A/INDONESIA (SEQ ID 49)

MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQKLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
 ILSPLTKGIL GFVFTLTVP S ERGLQRRRFV QNALNGNGDP NNMDRAVKLY
 KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EVAFGLVQAT
 CEQIADSQHR SHRQMATITN FLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
 EAMEVANQAR QMVQAMRTIG THPNSSAGLR DNLLLENLQAY QKRMGVQMQR
 FK

A/Anhui/1/2005

Оптимизированный HA A/Anhui (стартовый и стоп-кодона подчеркнуты) (SEQ ID 50)

GGTACCGGATCCCTCGAGATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCTATCGTGTCCTGGTG
 AAGTCCGACCAGATCTGCATCGGTACCACGCTAACAACCTCCACCGAGCAGGTGGACACC
 ATCATGGAGAAGAAGCTACCGTGACCCACGCTCAGGACATCCTGGAAAAGACCCACAAC
 GGCAAGCTGTGCGACCTGGACGGTGTCGAAGCCCCGTGATCCTGCGTGACTGCTCCGTGGCT
 GGTGGCTGCTGGGTAACCCCATGTGCGACGAGTTTCATCAACGTGCCCCGAGTGGTCCCTAC
 5 ATCGTGAGAGAAGGCTAACCCCGCTAACGACCTGTGCTACCCCGGTAACCTTCAACGACTAC
 GAGGAGCTGAAGCACCTGCTGTCCCGTATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCC
 AAGTCTCTTGGTCCGACCACGAGGCTTCTCCGGTGTCTCCTCCGCTTGCCCATACAG
 GGCACCCCATCTTTCTTCCGTAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACAACACCTACCCC
 ACCATCAAGCGTTCTTACAACAACACCAACCAGGAGGACCTGCTGATCCTGTGGGGTATC
 CACCACTCCAACGACGCTGCCGAGCAGACCAAGCTGTACCAGAACCCACCACTACATC
 10 TCCGTGGGCACCTCCACCTGAACCAGCGCTCTGGTGCCCAAGATCGCTACCCGTTCCAAG
 GTGAACGGCCAGTCCGGTCTGATGGACTTCTTCTGGACCATCCTGAAGCCTAACGACGCT
 ATCAACTTCGAGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTACGCTTACAAGATCGTGAAG
 AAGGGCGACTCCGCTATCGTCAAGTCCGAGGTGGAGTACGGTAACGCAACACCAAGTGC
 CAGACCCCCATCGGTGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATCCACCCCTGACC
 ATCGGCGAGTGCCCCAAGTACGTGAAGTCCAACAAGCTGGTGTGGCTACCGGTCTGCGT
 AACTCCCCCTGCGTGAGCGTGGTCTGTTCGGCGCTATCGCTGGTTTCATCGAGGGCGGT
 15 TGGCAGGCATGGTGGACGGTTGGTACGGTTACCACCACAGCAACGAGCAGGGTTCCGGT
 TACGCTGCTGACAAGGAGTCCACCCAGAAGGCTATCGACGGCGTCACCAACAAGGTGAAC
 TCCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGAGGCTGTGGGTCGTGAGTTCAACAACCTG
 GAGCGTCTATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGACGGTTTCCTGGACGTGTGGACC
 TACAACGCCGAGCTGCTGGTGGTGTGATGGAGAACGAGCGTACCCTGGACTTCCACGACTCT
 AACGTGAAGAACCTGTACGACAAGGTCCGCCTGCAGCTGCGTGACAACGCTAAGGAGCTG
 GGTAAACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGGCACAACGAGTGCATGGAGTCCGTGCGT
 20 AACGGCACCTACGACTACCCCACTACTCCGAGGAGGCTCGTCTGAAGCGTGAGGAGATC
 TCCGGCGTGAAGCTGGAGTCCATCGGCACCTACCAGATCCTGTCCATCTACTCCACCGTG
 GCTTCCTCCCTGGCTCTGGCTATCATGGTGGCTGGTCTGTCCCTGTGGATGTGCTCCAAC
 GGTTCCTGCGAGTGCCGTATCTGCATCTAATAATGAGGCGCGCCAAGCTTGAGCTC

Белковая последовательность HA A/Anhui (SEQ ID 51)

25 MEKIVLLLA I VSLVKSQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
 PANDLCYPGN FNDYEELKHL LSRINHFKEI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 CPYQGTSPFF RNVVWLKKN NTYPTIKRSY NNTNQEDLLI LWGIHHSNDA
 AEQTKLYQNP TTYISVGTST LNQLRVPKIA TRSKVNGQSG RMDFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAPYAY KIVKKGDSAI VKSEVEYGNC NTKCQTPIGA
 30 INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNNKLVA TGLRNSPLRE RGLFGAIAGF
 IEGGWQGMVD GWYGYHHSNE QSGYAADKE STQKAIDGVT NKVNSIIDKM
 NTQFEAVGRE FNNLERRIEN LNKKMEDGFL DVWTYNAELL VLMENERTLD
 FHDSNVKNLY DKVRLQLRDN AKELGNGCFE FYHKCDNECM ESVRNGTYDY
 PQYSEEARLK REEISGVKLE SIGTYQILSI YSTVASSLAL AIMVAGLSLW
 MCSNGSLQCR ICI

35 A/Bar headed goose/Qinghai/1A/2005

Оптимизированный HA A/Qinghai (стартовый и стоп-кодона подчеркнуты) (SEQ ID 52)

40

45

50

CGGGCGCGGAGCGGCCGATGGAGAAGATCGTGCTGCTGGCTATCGTGTCTCTGGTCAAGTCCGACCAGATCTGCA
 TCGGTTACCACGCTAACAACTCCACCGAGCAGGTGGACACCATCATGGAGAAGAACGTCACCGTGACCCACGCTCAGGA
 CATCCTCGAAAAAGCCACAAACGGCAAGCTGTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCCCTGATCCTCGGTGACTGCTCCGTG
 GCTGGTTGGCTGCTGGGTAACCCCATGTGCGACGAGTTCTCTCAACGTGCCCGAGTGGTCTACATCGTGGAGAAGATCA
 ACCCGCTAACGACCTGTGCTACCCCGGTAACCTCAACGACTACGAGGAGCTGAAGCACCTGCTGTCCCGTATCAACCA
 CTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCCAAGTCTCTGGTCCGACACGAGGCTTCTCCGGTGTCTCCTCCGTTGCCCA
 TACCAGGGCCGTCTTCTCTCTCCGCAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACAACGCCTACCCACCATCAAGCGTT
 CCTACAACAACCAACCAGGAGGACCTGCTGGTCTGTGGGGTATCCACCACCCCAACGACGCTGCCGAGCAGACCCG
 TCTGTACCAGAACCCACCACCTACATCTCCGTGGGCACCTTACCCTGAACCAGCGTCTGGTGCCCAAGATCGCTACC
 CGTTCCAAGGTGAACGGCCAGTCCGGTCTGATGGAGTTCTTCTGGACCATCTGAAGCCTAACGACGCTATCAACTTCG
 AGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGAACGCTTACAAGATCGTGAAGAAGGGCGACTCCACCATCATGAAGTCCGA
 GCTGGAGTACGGCAACTGCAACACTAAGTGCCAGACCCCCATCGGTGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATC
 CACCCCTGACTATCGGCGAGTGCCCCAAGTACGTGAAGTCCAACCGTCTGGTGTGGCTACCGGTCTGCGTAACTCCC
 CCCAGATCGAGACTCGTGGTCTGTTCGGCGCTATCGCTGGTTTCATCGAGGGCGGTTGGCAGGGCATGGTGGACGGTTG
 GTACGGTTACCACCACTCTAACGAGCAGGGTTCGGTTACGCTGCTGACAAGGAGTCTACCCAGAAGGCTATCGACGGC
 GTCACCAACAAGGTGAACCTCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGAGGCTGTGGGTCTGAGTTCAACAACCTCG
 AACGTCGTATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGACGGTTCTGGACGCTGTGGACCTACAACGCCGAGCTGCTGGT
 GCTGATGGAGAACGAGCGTACCCTGGACTTCCACGACTCCAAGCTGAAGAACCTGTACGACAAGGTCCGCCCTGCAGCTG
 CGTGACAACGCTAAGGAGCTGGGTAACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACCGTTGCGACAACGAGTGCATGGAGTCCGTGC
 GTAACGGCACCTACGACTACCCCAAGTACTCCGAGGAGGCTCGTCTGAAGCGTGAGGAGATCTCCGGTGTCAAGCTCGA
 ATCCATCGGAACCTACCAGATCTGTCCATCTACTCCACCGTGGCTTCTCCTCCCTGGCTCTGGCTATCATGGTGGCTGGT
 CTGTCCCTGTGGATGTGCTCCAACGGTTCCCTGCAGTGGCGTATCTGCATCTAAATAAGAGGCGCGCAAGCTGTGCGA

Белковая последовательность HA A/Qinghai (SEQ ID 53)

MEKIVLLLA I VSLVKS DQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLC DL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFLNVP EWSYIVEKIN
 PANDLCYPGN FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 CPYQGRSSFF RNVVWLKKN NAYPTIKRSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 AEQTRLYQNP TTYISVGTST LNQRLLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAPENAY KIVKKGDSTI MKSELEYGNC NTKCQTPIGA
 INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSRLVLA TGLRNSPQIE TRGLFGAIAG
 FIEGGWQGMV DGYWGYHHSN EQSGYAADK ESTQKAIDGV TNKVNIIIDK
 MNTQFEAVGR EFNNLERRIE NLNKKMEDGF LDVWVTYNAEL LVL MENERTL
 DFHDSNVKNL YDKVRLQLRD NAKELGNGCF EFYHRC DNEC MESVRNGTYD
 YPQYSEEARL KREIISGVKL ESIGTYQILS IYSTVASSLA LAIMVAGLSL
 WMCSNGSLQC RIC I

Оптимизированный NA A/Qinghai (стартовый и стоп-кодоны подчеркнуты) (SEQ ID 54)

ACCGTCCCACCATCGGGCGGGATCCCTCGAGATGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCGGCTCCATCTGCATGGT
 GATCGGTATCGTGTCCCTGATGCTGCAGATCGGTAACATGATCTCCATCTGGGTGTCCCACTCCATCCAGACCGGTAAC
 CAGCGTCAGGCCGAGCCCATCTCCAACACCAAGTTCTCTACCGAGAAGGCTGTGGCTTCCGTGACCCCTGGCTGGTAAC
 CCTCCCTGTGCCCCATCTCCGGTTGGGCTGTGTACTCCAAGGACAACCTCCATCCGTATCGGTTCCCGTGGTGACGTGTT
 CGTGATCCGTGAGCCCTTCTATCTCTGCTCCACCTCGAATGCCGTACCTTCTTCTGACCCAGGGTGTCTGTCTGAAC
 GACAAGCACTCCAACGGCACCGTGAAGGACCGTTCACCCCAACCGTACCCTGATGTCTGCCCCGTGGGCGAGGCTCCCT
 CCCCCATAAATCCCGTTTCGAGTCCGTGGCTTGGTCCGCTTCCGCTTGCCACGACGGCACCTCTTGGCTGACCATCGG
 TATCTCCGGTCCCGACAACGGTGTGTGGCTGTGCTGAAGTACAACGGCATCATCACCAGACCATCAAGTCTTGGCGT
 AACAACATCTTGGTACCCAAAGATCCGAGTGCCTTGGCTGAACGGTTCCTGCTTACCGTGATGACCGACGGTCCCT
 CCAACGGCCAGGCTTCTACAAGATCTTCAAGATGGAGAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTGGAGCTGGACGCTCCCAA
 CTACCACTACGAGGAGTGTCTTGTCTACCCGACGCTGGCGAGATCACTGCGTGTGCCGTGACAACCTGGCACGGTTCC
 AACCGTCCCTGGGTGTCTTCAACCAGAACCTCGAATACCAGATCGGTTACATCTGCTCCGGCGTGTTCGGTGACAACC
 CCCGTCCCAACGACGGAACCGGTTCTGCGGTCCCGTGTCCCCAACGGTGCTTACGGTGTCAAGGGCTTCTCCTTCAA
 GTACGGTAACGGTGTCTGGATCGGTCTGACCAAGTCCACCAACTCCCGCTCCGGTTTCGAGATGATCTGGGACCCCAAC
 GGTGGACCGGCACCGACTCTTCTTCTCCGTGAAGCAGGACATCGTGGCTATCACCAGCTGGTCCGGTTACTCCGGTT
 CCTTCGTGCAGCACCCGAGCTGACCGGTCTGGACTGTATCCGTCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATCCGTGGTCTGCTC
 CAAGGAGTCCACCATCTGGACCTCCGGCTCCTCATCTCTTCTGCGGTGTGAACCTCCGACACCGTGTCTGCTGCTGG
 CCCGACGGTGCCGAGCTGCCCTTACCATCGACAAGTAAATAATGAATCGATTGTGCGAGAAGTACTAGAGGATCATAAT

Белковая последовательность NA A/Qinghai (SEQ ID 55)

MNPNQKIITI GSICMVGIV SLMLQIGNMI SIWVSHSIQT GNQRQAEPI S
 NTKFLTEKAV ASVTLAGNSS LCPISGWAVY SKDNSIRIGS RGDV FVIREP
 FISCSHLECR TFFLTQGALL NDKHSNGTVK DRSPHRTLMS CPVGEAPSPY
 NSRFESVAWS ASACHDGT SW LTIGISGPDN GAVAVLK YNG IITDTIKSWR
 NNILRTQESE CACVNGSCFT VMTDGPSNGQ ASYKIFKMEK GKVVKSVELD
 APNYHYECS CYPDAGEITC VCRDNWHGSN RPWVSFNQNL EYQIGYICSG
 VFGDNPRPND GTGSCGPVSP NGAYGVKGFS FKYGNVWIG RTKSTNSRSG
 FEMIWDPNGW TGT DSSFSVK QDIVAITDWS GYSGSFVQHP ELTG LDCIRP
 CFWVELIRGR PKESTIWTSG SSISFCGVNS DTVSWSWPDG AELPFTIDK

Следующие ссылки включены здесь в качестве ссылок:

The following references are incorporated herein by reference:

5 Berglund, P., Flecton, M. N., Smerdon, C., and Lilestrom, P. (1999). Immunization with recombinant Semliki Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine* 17, 497-507.

10 Cox, J. C., and Coulter, A. R. (1997). Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248-256.

15 Crawford, J., Wilkinson, B., Vosnesensky, A., Smith, G., Garcia, M., Stone, H., and Perdue, M. L. (1999). Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17, 2265-2274.

20 Crowther R A, Xiselev N A, Boncher B, Berriman J A, Borisova G P, Osc V, Pumpens P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 17, 943-50.

25 Gomez-Puertas, P., Mena, L., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E., and Portela, A. (1999). Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J. Gen. Virol.* 80, 1635-1645.

30 Johansson, B. E. (1999). Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine. *Vaccine* 17, 2073-2080.

35 Lakey, D. L., Treanor, J. J., Betts, B. F., Smith, G. F., Thompson, J., Samiella, E., Reed, G., Wilkinson, B. E., and Wright, P. E. (1996) Recombinant baculovirus influenza A hemagglutinin vaccines are well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 174, 838-841.

Latham, T., and Galarza, J. M. (2001). Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* 75, 6154-6165.

5

Mena, I., Vivo, A., Perez, E., and Portela, A (1996). Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza-like particles obtained from recombinant plasmids. *J. Virol.* 70, 5016-5024.

10

Murphy, B. R., and Webster, R. G. (1996). Orthomyxoviruses. In "Virology" (D. M. K. B. N. Fields, P. M. Howley, Eds.) Vol. 1, pp. 1397-1445. Lippincott-Raven, Philadelphia.

15

Neumann, G., Watanabe, T., and Kawaoka, Y. (2000). Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J. Virol.* 74, 547-551.

20

Olsen, C. W., McGregor, M. W., Dybdahl-Sissoko, N., Schram, B. R., Nelson, K. M., Lunn, D. P., Macklin, M. D., and Swain, W. F. (1997). Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccine* 15, 1149-1156.

25

Peiris, J. S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R. G., and Shortridge, K. F. (2001). Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southwestern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 75, 9679-9686.

30

Pumpens, P., and Grens, E. (2003). Artificial genes for chimeric virus-like particles. In: "Artificial DNA" (Khudyakov, Y. E. and Fields, H. A., Eds.) pp. 249-327. CRC Press, New York.

35

Pushko, P., Parker, M., Ludwig, G. V., Davis, N. L., Johnston, R. E., and Smith, J. F. (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239, 389-401.

40

Slepishkin, V. A., Katz, J. M., Black, R. A., Gamble, W. C., Rota, P. A., and Cox, N. J. (1995). Protection of mice against influenza A virus challenged by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine* 13, 1399-1402.

45

Treanor, J. J., Betts, R. F., Smith, G. E., Anderson, E. L., Hackett, C. S., Wilkinson, B. E., Belshe, R. B., and Powers, D. C. (1996). Evaluation of a recombinant hemagglutinin expressed in insect cells as an influenza vaccine in young and elderly adults. *J. Infect. Dis.* 173, 1467-1470.

50

Tsuji, M., et al. (1998). Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *J. Virol.* 72, 6907-6910.

Ulmer, J. B., et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749.

Ulmer, J. B., et al. (1998). Protective CD4⁺ and CD8⁺T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J. Virol.* 72, 5648-5653.

Watanabe, T., Watanabe, S., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2002) Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.* 76, 767-773.

Zhou, X., et al. (1995). Generation of cytotoxic and humoral immune responses by non-replicative recombinant Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3009-3013.

Другие осуществления

Специалисты в данной области техники должны понимать или быть способными убедиться путем не более чем обычного экспериментирования, что возможно много эквивалентов описанных здесь конкретных осуществлений изобретения. Такие эквиваленты предназначены для охвата следующей формулой изобретения.

Формула изобретения

1. Вакцина, включающая VLP гриппа, где указанная VLP включает белки М1, НА и НА вируса гриппа, где указанная вакцина индуцирует стойкий иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека, восприимчивого к гриппу, и где белок М1 гриппа получен из штамма A/Indonesia/5/05 вируса гриппа.

2. Вакцина по п.1, где указанные белки НА и НА получают из вируса сезонного гриппа.

3. Вакцина по п.2, где указанный вирус сезонного гриппа является вирусом гриппа типа А.

4. Вакцина по п.2, где указанный вирус сезонного гриппа является вирусом гриппа типа В.

5. Вакцина по п.1, где указанные белки НА и НА получают из вируса птичьего гриппа.

6. Вакцина по п.5, где указанный вирус птичьего гриппа представляет собой H5N1.

7. Вакцина по п.5, где указанный вирус птичьего гриппа представляет собой H9N2.

8. Вакцина по п.1, где указанный белок М1 получают из штамма вируса гриппа, отличного от штамма вируса гриппа, из которого получают белки НА и НА.

9. Вакцина по п.1, где указанные белки НА и/или НА проявляют активность гемагглютинаина и/или активность нейраминидазы соответственно.

10. Вакцина по п.1, где указанную VLP гриппа готовят в виде состава с адьювантом или иммуностимулятором.

11. Вакцина по п.10, где указанный адьювант включает Novasomes®.

12. Вакцина по п.1, где указанный белок М1 содержит SEQ ID NO:49.

13. Вакцина, включающая VLP гриппа, где указанная VLP состоит, по существу, из

белков М1, НА и NA вируса гриппа, где указанная вакцина индуцирует стойкий иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека, восприимчивого к гриппу, и где белок М1 гриппа получен из штамма A/Indonesia/5/05 вируса гриппа.

14. Вакцина по п.13, где указанные белки НА и NA представляют собой белки НА и NA вируса сезонного гриппа.

15. Вакцина по п.13, где указанные белки НА и NA представляют собой белки НА и NA птичьего вируса гриппа.

16. Вакцина по п.13, где указанный белок М1 получают из штамма вируса гриппа, отличного от штамма вируса гриппа, из которого получают белки НА и NA.

17. Способ индукции стойкого иммунитета к инфицированию вирусом гриппа у человека, восприимчивого к гриппу, включающий введение, по меньшей мере, одной эффективной дозы вакцины по любому из пп.1-16.

18. Способ по п.17, где указанный способ включает введение человеку указанной VLP гриппа перорально, внутридермально, интраназально, внутримышечно, внутривенно или подкожно.

19. Применение VLP гриппа, где указанная VLP включает белки М1, НА и NA вируса гриппа для получения вакцины, где вакцина индуцирует стойкий иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека, восприимчивого к гриппу, и где белок М1 гриппа получен из штамма A/Indonesia/5/05 вируса гриппа.

20. Применение VLP гриппа, где указанная VLP состоит, по существу, из белков М1, НА и NA вируса гриппа для получения вакцины, где вакцина индуцирует стойкий иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека, восприимчивого к гриппу, и где белок М1 гриппа получен из штамма A/Indonesia/5/05 вируса гриппа.

21. Применение VLP гриппа, где указанная VLP состоит из белков М1, НА и NA вируса гриппа для получения вакцины, где вакцина индуцирует стойкий иммунитет к инфицированию вирусом гриппа у человека, восприимчивого к гриппу, и где белок М1 гриппа получен из штамма A/Indonesia/5/05 вируса гриппа.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Novavax, Inc.
 <120> функциональные вирусоподобные частицы гриппа (VLPs)
 <130> NOV-002/06WO
 <150> US 60/727,513
 <151> 2005-10-18
 <150> US 60/780,847
 <151> 2006-03-10
 <150> US 60/800,006
 <151> 2006-05-15
 <150> US 60/831,196
 <151> 2006-07-17
 <150> US 60/832,116
 <151> 2006-07-21
 <150> US 60/845,495
 <151> 2006-09-19
 <160> 58
 <170> Патент в версии 3.3
 <210> 1
 <211> 1404
 <212> ДНК
 <213> Вирус гриппа
 <400> 1
 atgaatccaa atcaaaagat aatagcactt ggctctgttt ctataactat tgcgacaata 60
 tgtttactca tgcagattgc catcttagca acgactatga cactacattt caatgaatgt 120
 accaaccat cgaacaatca agcagtgcc tgtgaaccaa tcataataga aaggaaacata 180
 acagagatag tgcatttgaa taatactacc atagagaagg aaagttgtcc taaagtagca 240
 gaatacaaga attggtcaaa accgcaatgt caaattacag ggttcgcccc tttctccaag 300
 gacaactcaa ttaggctttc tgcaggcggg gatatttggg tgacaagaga accttatgta 360
 tcgtgcgggtc ttggtaaatg ttaccaattt gcacttgggc agggaaccac tttgaacaac 420
 aaacactcaa atggcacaat acatgatagg agtccccata gaacctttt aatgaacgag 480
 ttgggtgttc catttcattt gggaaccaa caagtgtgca tagcatggtc cagctcaagc 540
 tgccatgatg ggaaggcatg gttacatgtt tgtgtcactg gggatgatag aaatgogact 600
 gctagcatca tttatgatgg gatgcttacc gacagtattg gttcatggtc taagaacatc 660
 ctcagaactc aggagtcaga atgcgtttgc atcaatggaa ctgttacagt agtaatgact 720
 gatggaagtg catcaggaag ggctgatact aaaatactat tcattagaga agggaaaatt 780
 gtccacattg gtccactgtc aggaagtgtc cagcatgtgg aggaatgtc ctgttaccoc 840

cggtatccag aagttagatg tgtttgcaga gacaattgga agggctccaa tagaccctg	900
ctatatataa atgtggcaga ttatagtgtt gattctagtt atgtgtgctc aggacttgtt	960
ggcgacacac caagaaatga cgatagctcc agcagcagta actgcaggga tcctaataac	1020
gagagagggg gccaggagt gaaagggtgg gctttgaca atggaaatga tgtttggatg	1080
ggacgaacaa tcaagaaaga ttgcgctctt ggttatgaga ctttcagggt cgttggttgt	1140
tggactacgg ctaattccaa gtcacaaata aataggcaag tcatagtga cagtataac	1200
tggtctgggt attctggtat attctctgtt gaaggaaaa cctgcatcaa cagggtgttt	1260
tatgtggagt tgataagagg gagaccacag gagaccagag tatggtggac ttcaaatagc	1320
atcattgtat tttgtggaac ttcaggtagc tatggaacag gctcatggcc cgatggagcg	1380
aatatcaatt tcatgtctat ataa	1404

<210> 2
 <211> 1683
 <212> ДНК
 <213> Вирус гриппа

<400> 2	
atggaaacaa tatcactaat aactatacta ctagtagtaa cagcaagcaa tgcagataaa	60
atctgcacgc gccaccagtc aacaaaactcc acagaaactg tggacaacgt aacagaaacc	120
aatgttcctg tgacacatgc caaagaattg ctccacacag agcataatgg aatgctgtgt	180
gcaacaagcc tgggacatcc cctcattcta gacacatgca ctattgaagg actagtctat	240
ggcaaccctt cttgtgacct gctgttggga ggaagagaat ggtcctacat cgtcgaaaga	300
tcatcagctg taaatggaac gtgttacctt gggaatgtag aaaacctaga ggaactcagg	360
acacttttta gttccgctag ttctaccaa agaattccaa tcttcccaga cacaacctgg	420
aatgtgactt acactggaac aagcagagca tgttcagggt cattctacag gagtatgaga	480
tggctgactc aaaagagcgg tttttacctt gttcaagacg cccaatacac aaataacagg	540
ggaaagagca ttcttttctg gtggggcata catcacccac ccacctatac cgagcaaaca	600
aatttgtaca taagaaacga cacaacaaca agcgtgacaa cagaagattt gaataggacc	660
ttcaaaccag tgatagggcc aaggccctt gtcaatggtc tgcagggaag aattgattat	720
tattggtcgg tactaaaacc aggccaaaca ttgcgagtac gatccaatgg gaatctaatt	780
gctccatggt atggacacgt tctttcagga gggagccatg gaagaatcct gaagactgat	840
ttaaaagggt gtaattgtgt agtgcaatgt cagactgaaa aagggtggctt aaacagtaca	900
ttgccattcc acaatatcag taaatatgca tttggaacct gcccacaaata tgtaagagtt	960
aatagtctca aactggcagt cggctcgagg aacgtgcctg ctagatcaag tagaggacta	1020
tttgagagca tagctggatt catagaagga ggttgccag gactagtcgc tggctgggat	1080
ggtttccagc attcaaatga tcaagggtt ggtatggctg cagataggga ttcaactcaa	1140

aaggcaattg ataaaataac atccaaggtg aataatatag tcgacaagat gaacaagcaa 1200
 tatgaaataa ttgatcatga attcagtgag gttgaaacta gactcaatat gatcaataat 1260
 aagattgatg accaaataca agacgtatgg gcatataatg cagaattgct agtactactt 1320
 gaaaatcaaa aaacactcga tgagcatgat gcgaacgtga acaatctata taacaagggtg 1380
 aagagggcac tgggctccaa tgctatggaa gatgggaaag gctgtttcga gctataccat 1440
 aaatgtgatg atcagtgcat ggaaacaatt cggaacggga cctataatag gagaaagtat 1500
 agagaggaat caagactaga aaggcagaaa atagagggggg ttaagctgga atctgaggga 1560
 acttacaaaa tcctcaccat ttattcgact gtgcctcat ctcttggtgt tgcaatgggg 1620
 tttgtgctt tcctgttctg ggccatgtcc aatggatctt gcagatgcaa catttgtata 1680
 taa 1683

<210> 3
 <211> 759
 <212> ДНК
 <213> Вирус гриппа

<400> 3
 atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcatcccatc aggcccccctc 60
 aaagccgaga tcgcgcagag acttgaggat gtttttgcag ggaagaacac agatcttgag 120
 gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa ggggatttta 180
 gggtttgtgt tcacgctcac cgtgccaggt gagcgaggac tgcagcgtag acgatttgtc 240
 caaaatgcc taaatgggaa tggagacca aacaacatgg acagggcagt taaactatac 300
 aagaagctga agagggaaat gacattccat ggagcaaagg aagttgcact cagtactca 360
 actggtgcgc ttgccagttg catgggtctc atatacaacc ggatgggaac agtgaccaca 420
 gaagtggctc ttggcctagt atgtgccact tgtgaacaga ttgctgatgc ccaacatcgg 480
 tcccacaggc agatggcgac taccaccaac ccactaatca ggcatgagaa cagaatggta 540
 ctagccagca ctacggctaa ggccatggag cagatggctg gatcaagtga gcaggcagca 600
 gaagccatgg aagtcgcaag tcaggctagg caaatggtgc aggctatgag gacaattggg 660
 actcacccta gttccagtgc aggtctaaaa gatgatctta ttgaaaattt gcaggcttac 720
 cagaaacgga tgggagtgca aatgcagaga ttcaagtga 759

<210> 4
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Вирус гриппа

<400> 4
 aacgggtccga tggagaaaat agtgccttctt c 31

<210>	5	
<211>	33	
<212>	ДНК	
<213>	Вирус гриппа	
<400>	5	
	aaagctttta aatgcaaatt ctgcattgta acg	33
<210>	6	
<211>	32	
<212>	ДНК	
<213>	Вирус гриппа	
<400>	6	
	aacgggtccga tgaatccaaa tcagaagata at	32
<210>	7	
<211>	32	
<212>	ДНК	
<213>	Вирус гриппа	
<400>	7	
	aaagcttcta cttgtcaatg gtgaatggca ac	32
<210>	8	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Вирус гриппа	
<400>	8	
	aacgggtccga tgagtottot aaccgaggtc	30
<210>	9	
<211>	31	
<212>	ДНК	
<213>	Вирус гриппа	
<400>	9	
	aaagctttca cttgaatcgc tgcattctgca c	31
<210>	10	
<211>	1707	
<212>	ДНК	
<213>	Вирус гриппа	
<400>	10	
	atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc	60
	attggtracc atgcaaaca ttcaacagag cagggttgaca caatcatgga aaagaacggt	120
	actgttacac atgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta	180
	gatggagtga agcctcta atttaagagat tgtagttag ctggatggct cctcgggaac	240
	ccaatgtgtg acgaattcat caatgtaccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat	300
	ccaaccaatg acctctgtta cccagggagt ttcaacgact atgaagaact gaaacacct	360

ttgagcagaa taaaccat	ttgagaaaatt caaatcatcc ccaaaagt	ttggtccgat	420
catgaagcct catcaggagt	gagctcagca tgtccatacc tgggaagtcc	ctcctttttt	480
agaaatgtgg tatggcttat	caaaaagaac agtacatacc caacaataaa	gaaaagctac	540
aataatacca accaagaaga	tcttttggta ctgtggggaa ttcaccatcc	taatgatgcg	600
gcagagcaga caaggctata	tcaaaaccca accacctata tttccattgg	gacatcaaca	660
ctaaaccaga gattgggtacc	aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg	gcaaagtgga	720
aggatggagt tcttctggac	aatttttaaaa cctaattgatg caatcaactt	cgagagtaat	780
ggaaatttca ttgctccaga	atatgcatac aaaattgtca agaaagggga	ctcagcaatt	840
atgaaaagtg aattggaata	tggttaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc	aatggggg	900
ataaactcta gtatgccatt	ccacaacata caccctctca ccatggggga	atgccccaaa	960
tatgtgaaat caaacagatt	agtccttgca acaggggtca gaaatagccc	tcaaagagag	1020
agcagaagaa aaaagagagg	actatttggga gctatagcag gttttataga	gggaggatgg	1080
cagggaatgg tagatggttg	gtatgggtac caccatagca atgagcaggg	gagtgggtac	1140
gctgcagaca aagaatccac	tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa	ggtcaactca	1200
atcattgaca aaatgaacac	tcagtttgag gccgttgga	gggaatttaa	1260
aggagaatag agaattttaa	caagaagatg gaagacgggt ttctagatgt	ctggacttat	1320
aatgccgaac ttctggttct	catggaaaat gagagaactc tagactttca	tgactcaa	1380
gttaagaacc totacgacaa	ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa	ggagctgggt	1440
aacggttggt togagttcta	tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag	tataagaa	1500
ggaacgtaca actatccgca	gtattcagaa gaagcaagat taaaaagaga	ggaaataagt	1560
ggggtaaaat tggaatcaat	aggaaacttac caaatactgt caatttattc	aacagtggcg	1620
agttccctag cactggcaat	catgatggct ggtctatctt tatggatgtg	ctccaatgga	1680
tcgttacaat gcagaatttg	catttaa		1707

<210> 11
 <211> 1350
 <212> ДНК
 <213> Вирус гриппа

<400> 11				
atgaatccaa atcagaagat	aataaccatt ggatcaatct gtatggtaat	tggaatagtt	60	
agcttaatgt tacaaattgg	gaacatgata tcaatatggg	tcagtcattc	aattcagaca	120
gggaatcaac accaagctga	atcaatcagc aatactaacc	ctcttactga	gaaagctgtg	180
gcttcagtaa cattagcggg	caattcatct ctttgcccca	ttagaggatg	ggctgtacac	240
agtaaggaca acaatataag	gatcgggtcc aagggggatg	tgtttgttat	tagagagccg	300
ttcatctcat gctcccaoct	ggaatgcaga actttcttct	tgactcaggg	agccttgctg	360

aatgacaagc actccaacgg gactgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt 420
 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctctccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca 480
 gcaagtgttt gccatgatgg caccagttgg ttgacaattg gaatttctgg ccagacaaat 540
 gaggtgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg 600
 aacaacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact 660
 gtaatgactg atggaccaag tgatgggcag gcatcatata agatcttcaa aatggaaaaa 720
 ggaaaagtgg tcaaatcagt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc 780
 tgttatcctg atgcccggga aatcacatgt gtttgcaggg ataattggca tggctcaaat 840
 aggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtggg 900
 gttttcggag acaatccacg cccaatgat ggaacaggta gttgtggccc gatgtccct 960
 aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ttggatcggg 1020
 agaacaaaa gcactaattc caggagcggc ttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg 1080
 actggaacgg acagtagctt ttcagtgaac caagatatag tagcaataac tgatttgtca 1140
 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gattagattg cataagacct 1200
 tgtttctggg ttgagttaat cagagggcgg ccaaagaga gcacaatttg gactagtggg 1260
 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtga gttggtcttg gccagacggg 1320
 gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag 1350

<210> 12
 <211> 759
 <212> ДНК
 <213> Вирус гриппа

<400> 12
 atgagtcttc taaccgaggt cgaacgtag gttctctcta tcatcccgtc agggccctc 60
 aaagccgaga tcgcgcagaa acttgaagat gtctttgcag gaaagaacac cgtctcgag 120
 gctctcatgg agtggctgaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggattttg 180
 ggatttgtat tcacgctcac cgtgccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgtttgtc 240
 cagaatgcc taaatggaaa tggagatcca aataatatgg atagggcagt taagctatat 300
 aagaagctga aaagagaaat aacattccat ggggctaaag aggtttcact cagctactca 360
 accggtgcac ttgccagttg catgggtctc atatacaaca ggatgggaac ggtgactacg 420
 gaagtggctt ttggcctagt gtgtgccact tgtgagcaga ttgcagattc acagcatcgg 480
 tctcacaggc agatggcaac taccaccaac ccactaatca ggcatgaaaa cagaatggtg 540
 ctggccagca ctacagctaa ggctatggag cagatggcgg gatcaagtga gcaggcagcg 600
 gaagccatgg aggtcgctaa tcaggctagg cagatggtgc aggcaatgag gacaattgga 660

actcatccta actctagtgc tggctctgaga gataatcttc ttgaaaattt gcaggcctac 720
cagaaacgaa tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtga 759

<210> 13
<211> 30
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 13
aggatccatg aagactatca ttgctttgag 30

<210> 14
<211> 32
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 14
aggtacctca aatgcaaagtg ttgcacctaa tg 32

<210> 15
<211> 72
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 15
ggcgacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt agaaggagat agaaccatga atccaaatca 60
aaagataata ac 72

<210> 16
<211> 57
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 16
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctatataggc atgagattga tgtccgc 57

<210> 17
<211> 38
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 17
aaagaattca tgagtcttct aaccgaggtc gaaacgta 38

<210> 18
<211> 38
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 18
aaattcgaat tactccagct ctatgctgac aaaatgac 38

<210> 19
<211> 57
<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 19
agaatcatga gtcttctaac cgaggtcgaa acgcctatca gaaacgaatg ggggtgc 57

<210> 20
<211> 38
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 20
aaattcgaat tactccagct ctatgctgac aaaatgac 38

<210> 21
<211> 30
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 21
agaattcatg gcgtcccaag gcaccaaacg 30

<210> 22
<211> 50
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 22
agcgcccgct taattgtcgt actcctctgc attgtctccg aagaaataag 50

<210> 23
<211> 35
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 23
agaattcatg aaggcaataa ttgtactact catgg 35

<210> 24
<211> 47
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 24
agcgcccgct tatagacaga tggagcaaga aacattgtct ctggaga 47

<210> 25
<211> 31
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 25
agaattcatg ctaccttcaa ctatacaaac g 31

<210> 26
<211> 40
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 26
agcggccgct tacagagcca tatcaacacc tgtgacagtg

40

<210> 27
<211> 568
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>
<223> Vac2-hac-opt

<400> 27

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 28
<211> 572
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>

<223> Vac2-hac-spc-opt

<400> 28

Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1 5 10 15

Asn Ala Ile Pro Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser
20 25 30

Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His
35 40 45

Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu
50 55 60

Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp
65 70 75 80

Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp

85	90	95
Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro		
100	105	110
Gly Ser Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile		
115	120	125
Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp		
130	135	140
His Glu Ala Ser Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser		
145	150	155
Pro Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr		
165	170	175
Tyr Pro Thr Ile Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu		
180	185	190
Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr		
195	200	205
Arg Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr		
210	215	220
Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn		
225	230	235
Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn		
245	250	255
Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr		
260	265	270
Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu		
275	280	285
Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala		
290	295	300
Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly		
305	310	315
Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly		
325	330	335

Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu
340 345 350

Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val
355 360 365

Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
370 375 380

Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn
385 390 395 400

Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val
405 410 415

Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys
420 425 430

Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
435 440 445

Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
450 455 460

Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala
465 470 475 480

Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn
485 490 495

Glu Cys Met Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr
500 505 510

Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu
515 520 525

Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala
530 535 540

Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met
545 550 555 560

Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565 570

<210> 29
<211> 570
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>

<223> Vac2-hac-sph9-opt

<400> 29

Met Glu Thr Ile Ser Leu Ile Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Ser
1 5 10 15

Asn Ala Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu
20 25 30

Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln
35 40 45

Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly
50 55 60

Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu
65 70 75 80

Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr
85 90 95

Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser
100 105 110

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His
115 120 125

Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu
130 135 140

Ala Ser Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser
145 150 155 160

Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro
165 170 175

Thr Ile Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu
195 200 205

Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn
210 215 220

Gln Arg Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln
225 230 235 240

Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala
 245 250 255
 Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr
 260 265 270
 Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu
 275 280 285
 Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn
 290 295 300
 Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320
 Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335
 Asn Ser Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly
 340 345 350
 Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly
 355 360 365
 Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala
 370 375 380
 Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val
 385 390 395 400
 Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg
 405 410 415
 Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met
 420 425 430
 Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val
 435 440 445
 Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys
 450 455 460
 Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu
 465 470 475 480
 Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys
 485 490 495

Met Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu
500 505 510

Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser
515 520 525

Ile Gly Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser
530 535 540

Leu Ala Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser
545 550 555 560

Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565 570

<210> 30
<211> 564
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>
<223> Vac2-hac-cs-opt

<400> 30

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335

Pro Gln Arg Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
 370 375 380

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
385 390 395 400

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
405 410 415

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
420 425 430

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
435 440 445

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
450 455 460

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
465 470 475 480

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Ile Arg Asn
485 490 495

Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
500 505 510

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile
515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
530 535 540

Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

<210> 31
<211> 449
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>
<223> Vac2-naj-opt

<400> 31

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
1 5 10 15

Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile
 20 25 30
 Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln His Gln Ala Glu Ser
 35 40 45
 Ile Ser Asn Thr Asn Pro Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser Val Thr
 50 55 60
 Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Arg Gly Trp Ala Val His
 65 70 75 80
 Ser Lys Asp Asn Asn Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val Phe Val
 85 90 95
 Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg Thr Phe
 100 105 110
 Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly Thr
 115 120 125
 Val Lys Asp Arg Ser Pro His Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val Gly
 130 135 140
 Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp Ser
 145 150 155 160
 Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile Ser
 165 170 175
 Gly Pro Asp Asn Glu Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly Ile Ile
 180 185 190
 Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu
 195 200 205
 Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met Thr Asp
 210 215 220
 Gly Pro Ser Asp Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe Lys Met Glu Lys
 225 230 235 240
 Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr His Tyr
 245 250 255
 Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys Val Cys
 260 265 270

Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe Asn Gln
275 280 285

Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe Gly Asp
290 295 300

Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Met Ser Pro
305 310 315 320

Asn Gly Ala Tyr Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly Asn Gly
325 330 335

Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu
340 345 350

Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp Ser Ser Phe Ser
355 360 365

Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly
370 375 380

Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile Arg Pro
385 390 395 400

Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Ser Thr Ile
405 410 415

Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser Asp Thr
420 425 430

Val Ser Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr Ile Asp
435 440 445

Lys

<210> 32
<211> 252
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>
<223> Vac2-mc-opt

<400> 32

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Lys Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
85 90 95

Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
100 105 110

Lys Glu Val Ser Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Ala Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Asn Gln
195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Asn
210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asn Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
245 250

<210> 33
<211> 564
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>

<223> VN1203-ha-cs-opt

<400> 33

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
 130 135 140

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
 370 375 380
 Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
 385 390 395 400
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 405 410 415
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
 420 425 430
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
 435 440 445
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
 450 455 460
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
 465 470 475 480
 Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
 485 490 495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
500 505 510

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile
515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
530 535 540

Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

<210> 34
<211> 572
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>
<223> VN1203-ha-spc-opt

<400> 34

Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1 5 10 15

Asn Ala Ile Pro Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser
20 25 30

Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His
35 40 45

Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu
50 55 60

Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp
65 70 75 80

Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp
85 90 95

Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro
100 105 110

Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile
115 120 125

Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Ser
130 135 140

His	Glu	Ala	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Ser	Ala	Cys	Pro	Tyr	Gln	Gly	Lys	145	150	155	160
Ser	Ser	Phe	Phe	Arg	Asn	Val	Val	Trp	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Asn	Ala	165	170	175	
Tyr	Pro	Thr	Ile	Lys	Arg	Ser	Tyr	Asn	Asn	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	180	185	190	
Leu	Val	Leu	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	195	200	205	
Arg	Leu	Tyr	Gln	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	210	215	220	
Leu	Asn	Gln	Arg	Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	225	230	235	240
Gly	Gln	Asn	Gly	Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	245	250	255	
Asp	Ala	Ile	Asn	Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	260	265	270	
Ala	Tyr	Lys	Ile	Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	275	280	285	
Leu	Glu	Tyr	Gly	Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	290	295	300	
Ile	Asn	Ser	Ser	Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	305	310	315	320
Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	325	330	335	
Leu	Arg	Asn	Ser	Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	340	345	350	
Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	355	360	365	
Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	370	375	380	
Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn				

385 390 395 400

Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val
405 410 415

Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys
420 425 430

Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
435 440 445

Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
450 455 460

Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala
465 470 475 480

Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn
485 490 495

Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr
500 505 510

Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu
515 520 525

Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala
530 535 540

Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met
545 550 555 560

Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565 570

<210> 35
<211> 570
<212> PRT
<213> Неизвестно

<220>
<223> VN1203-ha-sph9-opt

<400> 35

Met Glu Thr Ile Ser Leu Ile Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Ser
1 5 10 15

Asn Ala Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu
20 25 30

Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln
 35 40 45

Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly
 50 55 60

Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu
 65 70 75 80

Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr
 85 90 95

Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
 100 105 110

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His
 115 120 125

Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Ser His Glu
 130 135 140

Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser
 145 150 155 160

Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro
 165 170 175

Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val
 180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn
 210 215 220

Gln Arg Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln
 225 230 235 240

Asn Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala
 245 250 255

Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr
 260 265 270

Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu
 275 280 285

Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn
 290 295 300
 Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320
 Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335
 Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly
 340 345 350
 Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly
 355 360 365
 Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala
 370 375 380
 Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val
 385 390 395 400
 Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg
 405 410 415
 Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met
 420 425 430
 Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val
 435 440 445
 Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys
 450 455 460
 Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu
 465 470 475 480
 Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys
 485 490 495
 Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu
 500 505 510
 Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser
 515 520 525
 Ile Gly Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser
 530 535 540

Leu Ala Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser
 545 550 555 560

Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565 570

<210> 36

<211> 1707

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 36

```

atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc      60
attggttacc atgcaaaca ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt      120
actgttacac atgccaaga catactggaa aagaaacaca acgggaagct ctgcgatcta      180
gatggagtga agcctcta attgagagat tgtagcgtag ctggatggct cctcggaac      240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccc gaatggctctt acatagtgga gaaggccaat      300
ccagtcaatg acctctgtta ccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta      360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt      420
catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctctttttc      480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac      540
aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttcaccatcc taatgatgag      600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaacca accacctata tttccgttgg gacatcaaca      660
ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaagg gcaaagtgga      720
aggatggagt tcttctggac aattttaaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat      780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt      840
atgaaaagtg aattggaata tggttaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc aatgggggag      900
ataaactcta gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaaa      960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgag actgggctca gaaatagccc tcaaagagag     1020
agaagaagaa aaaagagagg attatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg     1080
cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac     1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg     1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttgga ggaatttaa caacttagaa     1260
aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat     1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat     1380
gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt     1440

```

aacggttggtt togagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaaag tgtaagaaat 1500
 ggaacgtatg actaccgcga gtattcagaa gaagcgagac taaaaagaga ggaaataagt 1560
 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caattttatto tacagtggcg 1620
 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatgga 1680
 tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 37

<211> 1750

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 37

agtgtgatgg atatctgcag aattcgccct taggcgcgcc atggagaaaa tagtgcttct 60
 ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc attggttacc atgcaaacia 120
 ctgcacagag caggttgaca caataatgga aaagaacggt actgttacac atgcccaaga 180
 catactggaa aagaaacaca acgggaagct ctgcgatcta gatggagtga agcctctaata 240
 tttgagagat tgtagcgtag ctggatggct cctcggaaac ccaatgtgtg acgaattcat 300
 caatgtgcgg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat ccagtcaatg acctctgtta 360
 cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta ttgagcagaa taaaccattt 420
 tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagtgc ttggtccagt catgaagcct cattaggggt 480
 gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctcttttttc agaaatgtgg tatggcttat 540
 caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac aataatacca accaagaaga 600
 tcttttggtg ctgtggggga ttcaccatcc taatgatgcg gcagagcaga caaagctcta 660
 tcaaaaocca accacctata tttccgttgg gacatcaaca ctaaaccaga gattgggtacc 720
 aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga aggatggagt tcttctggac 780
 aattttaaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat ggaaatttca ttgctccaga 840
 atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt atgaaaagtg aattggaata 900
 tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggag ataaactcta gcatgccatt 960
 ccacaatata caccctctca ccattgggga atgocccaaa tatgtgaaat caaacagatt 1020
 agtcttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag agaagaagaa aaaagagagg 1080
 attatttgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg cagggaatgg tagatggttg 1140
 gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac gctgcagaca aagaatccac 1200
 tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg atcattgaca aaatgaacac 1260
 tcagtttgag gccgttgga ggaatttaa caacttagaa aggagaatag agaatttaaa 1320
 caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat aatgctgaac ttctggttct 1380

catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat gtcaagaacc tttacgacaa 1440
 ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt aacggttggt tcgagttcta 1500
 tcataaatgt gataatgaat gtatggaaa gtaagaat ggaacgtatg actaccgca 1560
 gtattcagaa gaagcgagac taaaaagaga ggaaataagt ggagtaaaat tggaatcaat 1620
 aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg agttccctag cactggcaat 1680
 catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatggg tcgttacaat gcagaatttg 1740
 catttaagcg 1750

<210> 38

<211> 1350

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 38

atgaatccaa atcagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatagtt 60
 agcttaatgt tacaaattgg gaacatgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca 120
 gggaaatcaac accaatctga accaatcagc aataactaatt ttcttactga gaaagctgtg 180
 gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaacggatg ggctgtatac 240
 agtaaggaca acagtataag gatcgggtcc aagggggatg tgtttgttat aagagagccg 300
 ttcatctcat gctccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg 360
 aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc ctacagaaac attaatgagt 420
 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctcccatat aactcaagggt ttgagtctgt tgccttggtca 480
 gcaagtgctt gccatgatgg caccagtggg ttgacgattg gaatttctgg ccagacaaat 540
 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg 600
 aacaacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact 660
 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa 720
 gggaaagtgg ttaaatacgt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc 780
 tgttatccta atgccggaga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat 840
 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga 900
 gttttcggag acaatccacg cccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct 960
 aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatgggtg ctggatcggg 1020
 agaaccaaaa gcactaattc caggagcggc ttgaaatga ttgggatcc aatgggtgg 1080
 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca 1140
 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct 1200
 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg 1260
 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gctagaagggt 1320

gccgagttgc cattcaccat tgacaagtag 1350

<210> 39

<211> 1400

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 39

```

cogggatgaa tccaaatcag aagataataa ccatcggatc aatctgtatg gtaactggaa      60
tagttagctt aatgttaca attggaaca tgatctcaat atgggtcagt cattcaattc      120
acacagggaa tcaacaccaa totgaaccaa tcagcaatac taattttctt actgagaaag      180
ctgtggcttc agtaaaatta gcgggcaatt catctctttg ccccataac ggatgggctg      240
tatacagtaa ggacaacagt ataaggatcg gttccaaggg ggatgtgttt gttataagag      300
agccgttcat ctcatgctcc cacttggaaat gcagaacttt ctttttgact cagggagcct      360
cgctgaatga caagcactcc aatgggactg tcaaagacag aagccctcac agaacattaa      420
tgagttgtcc tgtgggtgag gctccctccc catataactc aaggtttgag tctgttgctt      480
ggtcagcaag tgcttgccat gatggcacca gttgggtgac gattggaatt totggcccag      540
acaatggggc tgtggctgta ttgaaataca atggcataat aacagacact atcaagagtt      600
ggaggaacaa catactgaga actcaagagt ctgaatgtgc atgtgtaa at ggctcttgct      660
ttactgtaat gactgacgga ccaagtaatg gtcaggcatc acataagatc ttcaaaatgg      720
aaaaagggaa agtggttaaa tcagtcgaat tggatgctcc taattatcac tatgaggaat      780
gctcctgtta tcctaatgcc ggagaaatca catgtgtgtg cagggataat tggcatggct      840
caaatcggcc atgggtatct ttcaatcaaa atttggagta tcaaatagga tatatatgca      900
gtggagtttt cggagacaat ccacgcccc aatgatggaac aggtagttgt ggtccggtgt      960
cctctaacgg ggcatatggg gtaaaagggt ttccatttaa atacggcaat ggtgtctgga     1020
tcgggagAAC caaaagcact aattccagga gcggctttga aatgatttg gatccaaatg     1080
ggtggactga aacggacagt agcttttcag tgaacaaga tatcgtagca ataactgatt     1140
ggtcaggata tagcgggagt tttgtccagc atccagaact gacaggacta gattgcataa     1200

gaccttgttt ctgggttgag ttgatcagag ggcggcccaa agagagcaca atttggacta     1260
gtgggagcag catatctttt tgtggtgtaa atagtgcac tgtgggttg tottggccag     1320
acgggtgctga gttgccattc accattgaca agtaggggcc ctgagtaag ggcgaattcc     1380
agcacactgg cggccgttac                                     1400

```

<210> 40

<211> 759

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 40
atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcatcccgtc aggccccctc 60
aaagccgaga tcgcacagaa acttgaagat gtctttgcag gaaagaacac cgatctcgag 120
gctctcatgg agtggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggattttg 180
ggatttgtat tcacgctcac cgtgccaggt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
cagaatgccc taaatggaaa tggagatcca aataatatgg atagggcagt taagctatat 300
aagaagctga aaagagaaat aacattccat ggggctaagg aggtcgcaact cagctactca 360
accggtgcac ttgccagttg catgggtctc atatacaaca ggatgggaac ggtgactacg 420
gaagtggctt ttggcctagt gtgtgccact tgtgagcaga ttgcagattc acagcatcgg 480
tctcacagac agatggcaac tatcaccaac ccactaatca gacatgagaa cagaatgggtg 540
ctggccagca ctacagctaa ggctatggag cagatggcgg gatcaagtga gcaggcagcg 600
gaagccatgg agatcgctaa tcaggctagg cagatgggtgc aggcaatgag gacaattggg 660
actcatccta actctagtgc tggctctgaga gataatcttc ttgaaaattt gcaggcctac 720
cagaaacgaa tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtga 759

<210> 41
<211> 793
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

<400> 41
atatctgcag aattcgccct tagaattcga cgtcatgagt cttctaaccg aggtcgaaac 60
gtacgttctc tctatcatcc cgtcaggccc cctcaaagcc gagatcgcac agaaacttga 120
agatgtcttt gcaggaaaga acaccgatct cgaggctctc atggagtggc taaagacaag 180
accaatcctg tcacctctga ctaaagggat tttgggattt gtattcacgc tcaccgtgcc 240
cagtgcgcga ggactgcagc gtagacgctt tgtccagaat gccctaaatg gaaatggaga 300
tccaaataat atggataggg cagttaagct atataagaag ctgaaaagag aaataacatt 360
ccatggggct aaggaggtcg cactcagcta ctcaaccggt gcacttgcca gttgcatggg 420
tctcatatac aacaggatgg gaacggtgac tacggaagtg gcttttggcc tagtgtgtgc 480
cacttgtgag cagattgcag attcacagca tcggtctcac agacagatgg caactatcac 540
caaccacta atcagacatg agaacagaat ggtgctggcc agcactacag ctaaggctat 600
ggagcagatg gcgggatcaa gtgagcaggc agcggaagcc atggagatcg ctaatcaggc 660
taggcagatg gtgcaggcaa tgaggacaat tgggactcat cctaactcta gtgctggtct 720
gagagataat cttcttgaaa atttgaggc ctaccagaaa cgaatgggag tgcagatgca 780
gcgattcaag tga 793

<210> 42
 <211> 1740
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Ген На гриппа, оптимизированный для экспрессии в экспрессионной
 системе клеток насекомого

<400> 42
 ggtaccggat cgcaccat ggagaagatc gtgctgctgc tggctatcgt gtccctgggtg 60
 aagtcgacc agatctgcat cggttaccac gctaacaact ccaccgagca ggtggacacc 120
 atcatggaga agaacgtcac cgtgacccac gctcaggaca tcctcgaaaa gaccacacaac 180
 ggcaagctgt gcgacctgga cgggtgcaag cccctgatcc tgcgtgactg ctccgtgggt 240
 ggttggctgc tgggtaaccc catgtgcgac gagttcatca acgtgcccg gtggtcctac 300
 atcgtggaga aggctaaccc caccaacgac ctgtgctacc ccggttcctt caacgactac 360
 gaggagctga agcacctgct gtcccgatc aaccacttcg agaagatcca gatcatcccc 420
 aagtcctctt ggtccgacca cgaggcttcc tcgggtgtct cctccgcttg cccctacctg 480
 ggttccccct ccttcttccg taacgtggtg tggctgatca agaagaactc cacctacccc 540
 accatcaaga agtcctacaa caacaccaac caggaggacc tgctggctct gtgggggtatc 600
 caccacccca acgacgctgc cgagcagacc cgtctgtacc agaaccacac cacctacatc 660
 tccatcgga cctccaccct gaaccagcgt ctggtgcccc agatcgctac ccgttccaag 720
 gtgaacggcc agtcggctcg tatggagttc ttctggacca tcctgaagcc taacgacgct 780
 atcaacttcg agtccaacgg caacttcacg gctcccgagt acgcttaca gatcgtgaag 840
 aagggcgact ccgctatcat gaagtccgag ctggagtacg gtaactgcaa caccaagtgc 900
 cagaccccca tgggtgctat caactcctcc atgcccttcc acaacatcca cccctgacc 960
 atcggcgagt gcccgaagta cgtgaagtcc aaccgtctgg tgctggctac cggctctcgt 1020
 aactcccccc agcgcgagtc ccgtcgtaag aagcgtggtc tgttcggcgc tatcgtcgtg 1080
 ttcatcgagg gcggttgga gggcatggtg gacggatggt acggttacca ccaactaac 1140
 gagcagggtt ccggttacgc tgctgacaag gagtcacccc agaaggctat cgacggcgtc 1200
 accaacaagg tgaactccat catcgacaag atgaacaccc agttcgaggc tgtgggtcgt 1260
 gagttcaaca acctcgagcg tcgtatcgag aacctgaaca agaagatgga ggacggtttc 1320
 ctggacgtgt ggacctacaa cgcgagctg ctggtgctga tggagaacga gcgtaccctg 1380
 gacttcacg actccaacgt gaagaacctg tacgacaagg tcgcctgca gctgcgtgac 1440
 aacgctaagg agctgggtaa cggttgcttc gagttctacc acaagtgcga caacgagtgc 1500
 atggagtcca tccgtaacgg cacctacaac tacccccagt actccgagga ggctcgtctg 1560
 aagcgtgagg agatctccg cgtgaagctc gagtccatcg gaacctacca gatcctgtcc 1620

atctactcca ccgtggcttc ctccctggct ctggctatca tgatggctgg tctgtccctg 1680

tggatgtgct ccaacgggtc cctgcagtgc cgtatctgca tctaataaaa gcttgagctc 1740

<210> 43

<211> 568

<212> PRT

<213> Вирус гриппа

<400> 43

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335

Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 44

<211> 1716

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Ген На гриппа, оптимизированный для экспрессии в экспрессионной системе клеток насекомого

<400> 44

```

ggatccgcaca ccatggagaa gatcgtgctg ctgctggcta tcgtgtccct ggtgaagtcc      60
gaccagatct gcatcggtta ccacgctaac aactccaccg agcaggtgga caccatcatg      120
gagaagaacg tcaccgtgac ccacgctcag gacatcctcg aaaagacca caacggcaag      180
ctgtgcgacc tggacgggtg caagcccctg atcctgctg actgctccgt ggtggttgg      240
ctgctgggta accccatgtg cgacgagttc atcaacgtgc ccgagtggtc ctacatcgtg      300
gagaaggcta accccacca cgaacctgtgc taccocgggt ccttcaacga ctacgaggag      360
ctgaagcacc tgctgtccc tatcaaccac ttcgagaaga tccagatcat cccaagtcc      420
tcttggtccg accacgaggc ttctctcgggt gtctctcccg cttgccccta cctgggttcc      480
ccctccttct tccgtaacgt ggtgtggctg atcaagaaga actccaccta cccaccatc      540
aagaagtcct acaacaacac caaccaggag gacctgctgg tctgtgggg taccaccac      600
cccaacgacg ctgccgagca gaccgtctg taccagaacc ccaccaccta catctccatc      660
ggcacctcca cctgaacca gcgtctggtg cccaagatcg ctaccggttc caaggtgaac      720
ggccagtcgg gtcgtatgga gttcttctgg accatcctga agcctaacga cgctatcaac      780

```

```

ttcgagtcca acggcaactt catcgctccc gactacgctt acaagatcgt gaagaagggc 840
gactccgcta tcatgaagtc cgagctggag tacggtaact gcaacaccaa gtgccagacc 900
cccatgggtg ctatcaactc ctccatgccc ttccacaaca tccaccccct gaccatcggc 960
gagtgcccc agtacgtgaa gtccaaccgt ctggtgctgg ctaccggtct gcgtaactcc 1020
ccccagcgcg agtcccgtag tctgttcggc gctatcgctg gtttcacga gggcggttgg 1080
cagggcatgg tggacggatg gtacggttac caccacteta acgagcaggg ttccggttac 1140
gctgctgaca aggagtcac ccagaaggct atcgacggcg tcaccaacaa ggtgaactcc 1200
atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gctgtgggtc gtgagttcaa caacctcgag 1260
cgtcgtatcg agaacctgaa caagaagatg gaggacgggt tcctggacgt gtggacctac 1320
aacgcgagc tgctggtgct gatggagaac gacggtaccc tggacttcca cgactccaac 1380
gtgaagaacc tgtaacgaaa ggtagcgctg cagctgcgtg acaacgctaa ggagctgggt 1440
aacggttgc togagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggagtc catccgtaac 1500
ggcacctaca actaccccc gtactccgag gaggtcgtc tgaagcgtga ggagatctcc 1560
ggcgtgaagc tcgagtcgat cggaacctac cagatcctgt ccatctactc caccgtggct 1620
tcctccctgg ctctggctat catgatggct ggtctgtccc tgtggatgtg ctccaacggt 1680
tcctgcagtg gcgtagctg catctaataa agctt 1716

```

<210> 45
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Вирус гриппа

<400> 45

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335

Pro Gln Arg Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
355 360 365

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
370 375 380

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
385 390 395 400

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
405 410 415

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
420 425 430

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
435 440 445

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
450 455 460

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
465 470 475 480

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Ile Arg Asn
485 490 495

Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
500 505 510

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile
515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
530 535 540

Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

<210> 46
<211> 1383
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Ген На гриппа, оптимизированный для экспрессии в экспрессионной
системе клеток насекомого

<400> 46
 ggtaccggat cgcaccat gaacccaac cagaagatca tcaccatcgg ctccatctgc 60
 atgggtgatcg gtatcgtgtc cctgatgctg cagatcggta acatgatctc catctgggtg 120
 tccactcca tccagaccgg taaccagcac caggctgagt ccactctcaa caccaacccc 180
 ctgaccgaga aggctgtggc ttccgtgacc ctggctggta actcctccct gtgccccatc 240
 cgtggttggg ctgtgcactc caaggacaac aacatccga tcggttccaa ggtgacgtg 300
 ttogtgatcc gtgagccctt catctcctgc tccacctcg agtgccgtac cttcttctg 360
 acccaaggtg ctctgctgaa cgacaagcac tocaacggca ccgtgaagga ccgttcccc 420
 caaccgtacc tgatgtcctg ccccggtggc gaggtccct cccctacaa ctcccgtttc 480
 gagtccgtgg cttggtccgc ttccgcttgc cagcagggca cctcttggct gaccatcgg 540
 atctccggtc ccgacaacga ggctgtcgt gtgctgaagt acaacggcat catcaccgac 600
 accatcaagt cctggcgtaa caacatcctg cgtaccaggt agtccgagt cgcttgctg 660
 aacggttctt gttcaccgt gatgaccgac ggtccctccg acggccaggc ttcctacaag 720
 atcttcaaga tggagaagg caaggtggtg aagtccgtgg agctggacgc tcccaactac 780
 cactacgagg agtgctcttg ctaccccgac gctggcgaga tcacctgct gtgccgtgac 840
 aactggcacg gttccaaccg tccctgggtg tcttcaacc agaacctga gtaccagatc 900
 ggttacatct gctccggcgt gttcggtgac aacccccgtc ccaacgacgg aaccggttcc 960
 tgcggtccca tgtccccaac cgggtgcttac ggtgtcaagg gcttctcctt caagtaagg 1020
 aacggtgtct ggatcggctg taccaagtcc accaactccc gctccggttt cgagatgatc 1080
 tgggacccca acggttggtg cggcacogac tcttcttct cgtgaagca ggacatcgtg 1140
 gctatcaccg actggctcgg ttactccggt tcttctgtgc agcaccgga gctgaccggt 1200
 ctggactgca ttcgtccctg cttctgggtg gagctgatcc gtggtcgtcc caaggagtcc 1260
 accatctgga cctccggtc ctccatctct ttctgcggtg tgaactccga caccgtgtcc 1320
 tggctctggc ccgacggtgc cgagctgcc ttcaccatcg acaagtaatg aaagcttgag 1380
 etc 1383

<210> 47
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Вирус гриппа

<400> 47

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
 1 5 10 15

Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile
 20 25 30

Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln His Gln Ala Glu Ser
 35 40 45
 Ile Ser Asn Thr Asn Pro Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser Val Thr
 50 55 60
 Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Arg Gly Trp Ala Val His
 65 70 75 80
 Ser Lys Asp Asn Asn Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val Phe Val
 85 90 95
 Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg Thr Phe
 100 105 110
 Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly Thr
 115 120 125
 Val Lys Asp Arg Ser Pro His Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val Gly
 130 135 140
 Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp Ser
 145 150 155 160
 Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile Ser
 165 170 175
 Gly Pro Asp Asn Glu Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly Ile Ile
 180 185 190
 Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu
 195 200 205
 Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met Thr Asp
 210 215 220
 Gly Pro Ser Asp Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe Lys Met Glu Lys
 225 230 235 240
 Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr His Tyr
 245 250 255
 Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys Val Cys
 260 265 270
 Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe Asn Gln
 275 280 285

Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe Gly Asp
 290 295 300

Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Met Ser Pro
 305 310 315 320

Asn Gly Ala Tyr Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly Asn Gly
 325 330 335

Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu
 340 345 350

Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp Ser Ser Phe Ser
 355 360 365

Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly
 370 375 380

Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile Arg Pro
 385 390 395 400

Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Ser Thr Ile
 405 410 415

Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser Asp Thr
 420 425 430

Val Ser Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr Ile Asp
 435 440 445

Lys

<210> 48
 <211> 792
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Ген М1 гриппа, оптимизированный для экспрессии в экспрессионной
 системе клеток насекомого

<400> 48
 ggtaccggat ccgccaccat gtcctgtctg accgaggtgg agacctacgt gctgtccatc 60
 atcccctccg gtcctctgaa ggctgagatc gtcagaagc tcgaggacgt tttcgctggc 120
 aagaacaccg acctcgaggc tctgatggag tggctcaaga cccgtcccat cctgtccccc 180
 ctgaccaagg gtatcctggg tttcgtgttc acctgaccg tgccctccga gcgtggtctg 240

cagcgtcgtc gtttcgtgca gaacgctctg aacggtaacg gtgaccccaa caacatggac 300
 cgtgctgtga agctgtacaa gaagctgaag cgcgagatca ccttccacgg tgctaaggag 360
 gtgtccctgt cctactccac cgggtgctctg gctagctgca tgggcctgat ctacaaccgt 420
 atgggcaccg tgaccaccga ggtggccttc ggtctggtct gcgctacctg cgagcagatc 480
 gctgactccc agcaccgttc ccaccgtcag atggctacca tcaccaaccc cctgatccgt 540
 cacgagaacc gtatggtgct ggcttcacc accgctaagg ctatggagca gatggctggt 600
 tcctccgagc aggtgctga ggccatggag gtggccaacc aggtcgtca gatggtgcag 660
 gctatgcgta ccacggcac ccacccaac tcctccgctg gtctgcgtga caacctgctc 720
 gagaacctgc aggttacca gaagcgtatg ggagtccaga tgcagcgctt caagtaatga 780
 aagcttgagc tc 792

<210> 49
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Вирус гриппа

<400> 49

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Lys Leu Glu Asp Val Phe
 20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
 35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
 50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
 65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
 85 90 95

Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
 100 105 110

Lys Glu Val Ser Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
 130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Ala Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Asn Gln
195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Asn
210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asn Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
245 250

<210> 50

<211> 1736

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Ген На гриппа, оптимизированный для экспрессии в экспрессионной системе клеток насекомого

<400> 50

```

ggtagcggat ccctcgagat ggagaagatc gtgctgctgc tggctatcgt gtccttggtg      60
aagtcgacc agatctgcat cggttaccac gctaacaact ccaccgagca ggtggacacc      120
atcatggaga agaacgtcac cgtgaccac gctcaggaca tcctggaaaa gaccacaaac      180
ggcaagctgt gcgacctgga cgggtgtcaag ccctgatcc tgcgtgactg ctccgtggct      240
ggttggtgc tgggtaaccc catgtgcgac gagttcatca acgtgcccga gtggtcctac      300
atcgtggaga aggctaaccc cgctaacgac ctgtgctacc ccggtaaact caacgactac      360
gaggagctga agcacctgct gtcccgatc aaccacttcg agaagatcca gatcatcccc      420
aagtcctctt ggtccgacca cgaggcttcc tccggtgtct cctccgcttg ccataaccag      480
ggcaccat ctttcttcg taacgtggtg tggctgatca agaagaacaa cacctacccc      540
accatcaagc gttcctacaa caacaccaac caggaggacc tgcgtatcct gtgggggtatc      600
caccactcca acgacgtgc cgagcagacc aagctgtacc agaaccac cacctacatc      660
tccgtgggca cctccacct gaaccagcgt ctggtgccc agatcgctac ccgttccaag      720
gtgaacggcc agtcgggtcg tatggacttc ttctggacca tctgaagcc taacgacgt      780

```

atcaacttcg agtccaacgg caacttcacg gctcccgagt acgcttacaa gatcgtgaag 840
aagggcgact ccgctatcgt caagtccgag gtggagtacg gtaactgcaa caccaagtgc 900
cagacccccca tcggtgctat caactcctcc atgcccctcc acaacatcca ccccctgacc 960
atcggcgagt gcccgaagta cgtgaagtcc aacaagctgg tgctggctac cggctctgct 1020
aactcccccc tgcgtgagcg tggctctgtc ggcgctatcg ctggtttcat cgagggcggt 1080
tggcagggca tgggtggacgg ttggtacggt taccaccaca gcaacgagca gggttccggt 1140
tacgctgctg acaaggagtc caccagaag gctatcgacg gcgtcaccaa caaggtgaac 1200
tccatcatcg acaagatgaa caccagttc gaggtctgtg gtcgtgagtt caacaacctg 1260
gagcgtcgta tcgagaacct gaacaagaag atggaggacg gtttctctgga cgtgtggacc 1320
tacaacgccg agctgctggt gctgatggag aacgagcgta ccctggactt ccacgactct 1380
aacgtgaaga acctgtacga caaggctccg ctgcagctgc gtgacaacgc taaggagctg 1440
ggtaacggtt gcttcgagtt ctaccacaag tgcgacaacg agtgcattga gtccgtgctg 1500
aacggcacct acgactaccc ccagtactcc gaggaggctc gtctgaagcg tgaggagatc 1560
tccggcgctga agctggagtc catcggcacc taccagatcc tgtccatcta ctccaccgtg 1620
gcttctctcc tggtctctggc tatcatggtg gctggtctgt ccctgtggat gtgctccaac 1680
ggttccctgc agtgccgtat ctgcatctaa taatgaggcg cgccaagctt gagctc 1736

<210> 51
<211> 563
<212> PRT
<213> Вирус гриппа

<400> 51

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Ser Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Val Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Leu Arg Glu Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
340 345 350

Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser
 355 360 365

Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys
 370 375 380

Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met
 385 390 395 400

Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg
 405 410 415

Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val
 420 425 430

Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr
 435 440 445

Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg
 450 455 460

Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu
 465 470 475 480

Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly
 485 490 495

Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu
 500 505 510

Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile Leu
 515 520 525

Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met Val
 530 535 540

Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg
 545 550 555 560

Ile Cys Ile

- <210> 52
- <211> 1738
- <212> ДНК
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Ген На гриппа, оптимизированный для экспрессии в экспрессионной системе клеток насекомого

<400>	52
cgggcgcgga gcggccgcat ggagaagatc gtgctgctgc tggctatcgt gtctctggtc	60
aagtccgacc agatctgcat cggttaccac gctaacaact ccaccgagca ggtggacacc	120
atcatggaga agaacgtcac cgtgacctac gctcaggaca tcctcgaaaa gaccacaaac	180
ggcaagctgt gcgacctgga cggcgtgaag cccctgatcc tgcgtgactg ctccgtggct	240
ggttggtgc tgggtaacco catgtgcgac gagttcctca acgtgccoga gtggctctac	300
atcgtggaga agatcaacco cgctaacgac ctgtgctacc ccggtaactt caacgactac	360
gaggagctga agcaactgct gtcccgtatc aaccacttcg agaagatcca gatcatcccc	420
aagtctctt ggtccgacca cgaggcttcc tccggtgtct cctccgcttg ccataaccag	480
ggccgttctt ccttcttccg caacgtgggtg tggtgatca agaagaacaa cgctacccc	540
accatcaagc gttcctacaa caacaccaac caggaggacc tgctggctct gtgggggtatc	600
caccacccca acgacgtgc cgagcagacc cgtctgtacc agaaccaccac cacctacatc	660
tccgtgggca cctctaccct gaaccagcgt ctggtgccc aagatcgctac ccgttccaag	720
gtgaacggcc agtccggtcg tatggagttc ttctggacca tcctgaagcc taacgacgct	780
atcaacttcg agtccaacgg caacttcac gctcccgaga acgcttacaa gatcgtgaag	840
aagggcgact ccaccatcat gaagtcgag ctggagtacg gcaactgcaa cactaagtgc	900
cagaccccca tcggtgctat caactcctcc atgcccttcc acaacatcca cccctgact	960
atcggcgagt gccccaagta cgtgaagtcc aaccgtctgg tgctggctac cggctcgcgt	1020
aactcccccc agatcgagac tcgtggtctg ttccggcgta tcgctggttt catcgagggc	1080
ggttggcagg gcatggtgga cggttggtac ggttaccacc actctaacga gcagggttcc	1140
ggttacgctg ctgacaagga gtctacccag aaggctatcg acggcgtcac caacaagggtg	1200
aactccatca tcgacaagat gaacacccag ttcgaggctg tgggtcgtga gttcaacaac	1260
ctcgaacgtc gtatcgagaa cctgaacaag aagatggagg acggtttcct ggacgtgtgg	1320
acctacaacg ccgagctgct ggtgctgatg gagaacgagc gtaccctgga cttccacgac	1380
tccaacgtga agaacctgta cgacaaggtc cgctgcagc tgcgtgacaa cgctaaggag	1440
ctgggtaacg gttgcttcga gttctaccac cgttgcgaca acgagtgcac ggagtccgtg	1500
cgtaacggca cctacgacta cccccagtac tccgaggagg ctcgtctgaa gcgtgaggag	1560
atctccggtg tcaagctcga atccatcgga acctaccaga tcctgtccat ctactccacc	1620
gtggcttct cctggctct ggctatcatg gtggctggtc tgtccctgtg gatgtgctcc	1680
aacggttccc tgcagtgccg tatctgcac taataatgag gcgcgccaa cttgtcga	1738

<210>	53
<211>	564
<212>	PRT

<213> Вирус гриппа

<400> 53

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ile Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Arg Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Ile Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
 370 375 380
 Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
 385 390 395 400
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 405 410 415
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
 420 425 430
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
 435 440 445
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
 450 455 460
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
 465 470 475 480
 Glu Phe Tyr His Arg Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
 485 490 495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
500 505 510

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile
515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
530 535 540

Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

<210> 54

<211> 1422

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Ген На гриппа, оптимизированный для экспрессии в экспрессионной системе клеток насекомого

<400> 54

```
accgtccac catcgggcgc ggatccctcg agatgaacc caaccagaag atcatcacca      60
tcggctccat ctgcatggtg atcgggtatcg tgtccctgat gctgcagatc ggtaacatga    120
tctccatctg ggtgtccac tccatccaga ccggtaacca gcgtcaggcc gagcccatct      180
ccaacaccaa gttcctcacc gagaaggctg tggcttcctg gacctggct ggtaactcct      240
ccctgtgcc catctccggt tgggtgtgt actccaagga caactccatc cgtatcggtt      300
cccggtgga cgtgttcgtg atccgtgagc cttcatctc ctgctccac ctogaatgcc      360
gtaccttctt cctgaccag ggtgctctgc tgaacgacaa gcactccaac ggcaccgtga      420
aggaccgttc cccccaccgt accctgatgt cctgccccgt gggcgaggct ccctccccct      480
acaactcccg ttctgagtc gtggcttggc ccgcttcgc ttgccacgac ggcaacctct      540
ggctgaccat cggtatctcc ggtcccgaca acggtgctgt ggctgtgctg aagtacaacg      600
gcatcatcac cgacaccatc aagtccctggc gtaacaacat cctgcgtacc caagagtccg      660
agtgcgcttg cgtgaacggt tctgcttca ccgtgatgac cgacggtccc tccaacggcc      720
aggcttcta caagatcttc aagatggaga agggcaagg ggtgaagtcc gtggagctgg      780
acgtcccaa ctaccactac gaggagtgt cttgtaccc cgacgtggc gagatcacct      840
gcgtgtgccg tgacaactgg cacggttcca accgtccctg ggtgtccttc aaccagaacc      900
togaatacca gatcgggttac atctgtcctg gcgtgttcgg tgacaacccc cgtcccaacg      960
acggaaccgg ttctgctggc cccgtgtccc ccaacggtgc ttacggtgtc aagggttct     1020
```

ccttcaagta cggtaacggt gtctggatcg gtcgtaccaa gtccaccaac tcccgtccg 1080
 gtttcgagat gatctgggac cccaacggtt ggaccggcac cgactcttcc ttctccgtga 1140
 agcaggacat cgtggctatc accgactggt cgggttactc cggttccttc gtgcagcacc 1200
 ccgagctgac cggctctggac tgtatccgtc cctgctttctg ggtggagctg atccgtggtc 1260
 gtcccaagga gtccaccatc tggacctccg gtcctcccat ctctttctgc ggtgtgaact 1320
 ccgacaccgt gtccctggctc tggcccgacg gtgccgagct gcccttcacc atcgacaagt 1380
 aataatgaat cgatttgtcg agaagtacta gaggatcata at 1422

<210> 55
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Вирус гриппа

<400> 55

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
1 5 10 15

Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile
20 25 30

Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln Arg Gln Ala Glu Pro
35 40 45

Ile Ser Asn Thr Lys Phe Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser Val Thr
50 55 60

Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly Trp Ala Val Tyr
65 70 75 80

Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly Asp Val Phe Val
85 90 95

Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg Thr Phe
100 105 110

Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly Thr
115 120 125

Val Lys Asp Arg Ser Pro His Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val Gly
130 135 140

Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp Ser
145 150 155 160

Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile Ser
165 170 175

Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly Ile Ile
 180 185 190

Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu
 195 200 205

Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met Thr Asp
 210 215 220

Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe Lys Met Glu Lys
 225 230 235 240

Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr His Tyr
 245 250 255

Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys Val Cys
 260 265 270

Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe Asn Gln
 275 280 285

Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe Gly Asp
 290 295 300

Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Val Ser Pro
 305 310 315 320

Asn Gly Ala Tyr Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly Asn Gly
 325 330 335

Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu
 340 345 350

Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp Ser Ser Phe Ser
 355 360 365

Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly
 370 375 380

Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile Arg Pro
 385 390 395 400

Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Ser Thr Ile
 405 410 415

Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser Asp Thr
 420 425 430

Val Ser Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr Ile Asp
435 440 445

Lys

<210> 56

<211> 1750

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 56

```
attcgccctt aacgggtccga tggagaaaat agtgcttctt cttgcaatag tcagtcttgt      60
taaaagtgat cagatttgca ttggttacca tgcaaacaat tcaacagagc aggttgacac      120
aatcatggaa aagaacgta ctgttacaca tgcccaagac atactggaaa agacacacaa      180
cgggaagctc tgcgatctag atggagttaa gcctctaatt ttaagagatt gtagtgtagc      240
tggtatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcatc aatgtaccgg aatggcttta      300
catagtggag aaggccaatc caaccaatga cctctgttac ccaggaggtt tcaacgacta      360
tgaagaactg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt gagaaaattc aaatcatccc      420
caaaagttct tgggccgatc atgaagcctc atcaggagtg agctcagcat gtccatacct      480
gggaagtccc tcctttttta gaaatgtggt atggcttata aaaaagaaca gtacataccc      540
aacaataaag aaaagctaca ataataccaa ccaagaagat cttttggtac tgtggggaat      600
tcaccatcct aatgatgcgg cagagcagac aaggctatat caaaacccaa ccacctatat      660
ttccattggg acatcaacac taaaccagag attggtacca aaaatagcta ctagatccaa      720
agtaaacggg caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca attttaaaac ctaatgatgc      780
aatcaacttc gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa tatgcataca aaattgtcaa      840
gaaaggggac tcagcaatta tgaaaagtga attggaatat ggtaactgca acaccaagtg      900
tcaaactcca atggggggcg taaactctag tatgccattc cacaacatac accctctcac      960
catcggggaa tgccccaat atgtgaaatc aaacagatta gtccttgcaa cagggctcag     1020
aaatagccct caaagagaga gcagaagaaa aaagagagga ctatttggag ctatagcagg     1080
ttttatagag ggaggatggc agggaatggt agatggttgg tatgggtacc accatagcaa     1140
tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatccact caaaaggcaa tggatggagt     1200
caccaataag gtcaactcaa tcattgacaa aatgaacact cagtttgagg ccgttggaaag     1260
ggaatttaat aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac aagaagatgg aagacggggtt     1320
tctagatgtc tggacttata atgccgaact tctggttctc atggaaaatg agagaactct     1380
agactttcat gactcaaatg ttaagaacct ctacgacaag gtccgactac agcttaggga     1440
```

taatgcaaag gagctgggta acggttggtt cgagttctat cacaaatgtg ataatgaatg 1500
tatggaaagt ataagaaacg gaacgtgcaa ctatccgcag tattcagaag aagcaagatt 1560
aaaaagagag gaaataagtg gggtaaaatt ggaatcaata ggaacttacc aaatactgtc 1620
aatttattca acagtggcga gttccctagc actggcaatc atgatgggtg gtctatcttt 1680
atggatgtgc tccaatggat cgttacaatg cagaatttgc atttaaaagc tttaagggcg 1740
aattccagca 1750

<210> 57
<211> 568
<212> PRT
<213> Вирус гриппа

<400> 57

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335

Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Met Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Ile Arg Asn Gly Thr Cys Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 58

<211> 568

<212> PRT

<213> Вирус гриппа

<400> 58

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val

85

90

95

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile

340	345	350
Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr 355 360 365		
Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys 370 375 380		
Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser 385 390 395 400		
Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe 405 410 415		
Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp 420 425 430		
Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met 435 440 445		
Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu 450 455 460		
Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly 465 470 475 480		
Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu 485 490 495		
Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala 500 505 510		
Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly 515 520 525		
Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala 530 535 540		
Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly 545 550 555 560		
Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile 565		

ATGAATCCAAATCAAAGATAATAGCACTTGGCTCTGTTTCTATAACTATTGCGACAATATG
 TTTACTCATGCAGATTGCCATCTTAGCAACGACTATGACACTACATTTCAATGAATGTACCA
 ACCCATCGAACAATCAAGCAGTGCCATGTGAACCAATCATAATAGAAAGGAACATAACAGAG
 ATAGTGCATTTGAATAATACTACCATAGAGAAGGAAAGTTGTCTAAAGTAGCAGAATACAA
 GAATTGGTCAAACCGCAATGTCAAATTACAGGGTTGCCCCCTTTCTCCAAGGACAACTCAA
 TTAGGCTTTCTGCAGGCGGGGATATTTGGGTGACAAGAGAACCTTATGTATCGTGCGGTCTT
 GGTAATGTTACCAATTTGCACTTGGGCAGGGAACCACTTTGAACAACAAACACTCAAATGG
 CACAATACATGATAGGAGTCCCCATAGAACCCTTTAATGAACGAGTTGGGTGTTCCATTTC
 ATTTGGGAACCAAACAAGTGTGCATAGCATGGTCCAGCTCAAGCTGCCATGATGGGAAGGCA
 TGGTTACATGTTTTGTGTCACTGGGGATGATAGAAATGCGACTGCTAGCATCATTTATGATGG
 GATGCTTACCAGACGATATTGGTTCATGGTCTAAGAACATCCTCAGAACTCAGGAGTCAGAAT
 GCGTTTGCATCAATGGAACCTGTACAGTAGTAATGACTGATGGAAGTGCATCAGGAAGGGCT
 GATACTAAATACTATTTCATTAGAGAAGGGAAAATTGTCCACATTGGTCCACTGTCAGGAAG
 TGCTCAGCATGTGGAGGAATGCTCCTGTTACCCCGGTATCCAGAAGTTAGATGTGTTTGCA
 GAGACAATTGGAAGGGCTCCAATAGACCCGTGCTATATATAAATGTGGCAGATTATAGTGTT
 GATTCTAGTTATGTGTGCTCAGGACTTGTGGCGACACACCAAGAAATGACGATAGCTCCAG
 CAGCAGTAACCTGCAGGGATCCTAATAACGAGAGAGGGGGCCAGGAGTGAAAGGGTGGGCT
 TTGACAATGGAAATGATGTTTGGATGGGACGAACAATCAAGAAAGATTGCGCTCTGGTTAT
 GAGACTTTCAGGGTCGTGGTGGTGGACTACGGCTAATTCAGTCACAAATAAATAGGCA
 AGTCATAGTTGACAGTGATAACTGGTCTGGGTATTCTGGTATATTCTCTGTTGAAGGAAAA
 CCTGCATCAACAGGTGTTTTTATGTGGAGTTGATAAGAGGGAGACCACAGGAGACCAGAGTA
 TGGTGGACTTCAAATAGCATCATTGTATTTTGTGGAACCTTCAGGTACCTATGGAACAGGCTC
 ATGGCCCGATGGAGCGAATATCAATTTTCATGTCTATATAA

Фиг. 1

ATGGAAACAATATCACTAATAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAAT
 CTGCATCGGCCACCAGTCAACAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATG
 TTCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCATAATGGAATGCTGTGTGCAACA
 AGCCTGGGACATCCCCTCATTTCTAGACACATGCACTATTGAAGGACTAGTCTATGGCAACCC
 TTCTTGTGACCTGCTGTGGGAGGAAGAGAATGGTCTACATCGTCGAAAGATCATCAGCTG
 TAAATGGAACGTGTTACCCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTTAGT
 TCCGCTAGTTCCCTACCAAAGAATCCAATCTTCCCAGACACAACCTGGAATGTGACTTACAC
 TGGAACAAGCAGAGCATGTTTCAGGTTCATTTCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTCAAAGA
 GCGGTTTTTACCCTGTTCAAGACGCCCCAATACACAAATAACAGGGGAAGAGCATTCTTTTC
 GTGTGGGGCATACATCACCCACCCACCTATACCGAGCAAAACAAATTTGTACATAAGAAACGA
 CACAACAACAAGCGTGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACCAGTGATAGGGCCAA
 GGCCCCCTTGTCAATGCTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTCCGTACTAAACCAGGC
 CAAACATTGCGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACGTCTTTTC
 AGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGCAAT
 GTCAGACTGAAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAAATATGCA
 TTTGGAACCTGCCCCAAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACCTGGCAGTCGGTCTGAGGAA
 CGTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTATAGAGGAGGTT
 GGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGGTATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTGGTATG
 GCTGCAGATAGGGATTCAACTCAAAGGCAATTGATAAAATAACATCCAAGGTGAATAATAT
 AGTCGACAAGATGAACAAGCAATATGAAATAATTGATCATGAATTCAGTGAGGTGAAACTA
 GACTCAATATGATCAATAATAAGATTGATGACCAATAACAAGACGTATGGGCATATAATGCA
 GAATTGCTAGTACTACTTGAATCAAAAAACACTCGATGAGCATGATGCGAACCTGAACAA
 TCTATATAACAAGGTGAAGAGGGCACTGGGCTCCAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTT
 TCGAGCTATACCATAAATGTGATGATCAGTGCATGGAAACAATTCGGAACGGGACCTATAAT
 AGGAGAAAGTATAGAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGA
 ATCTGAGGGAACCTTACAAATCCTCACCATTTATTCTGACTGTCGCCTCATCTCTGTGCTTG
 CAATGGGGTTTTGCTGCCCTTCTGTCTGGGCCATGTCCAATGGATCTTGAGATGCAACATT
 TGTATATAA

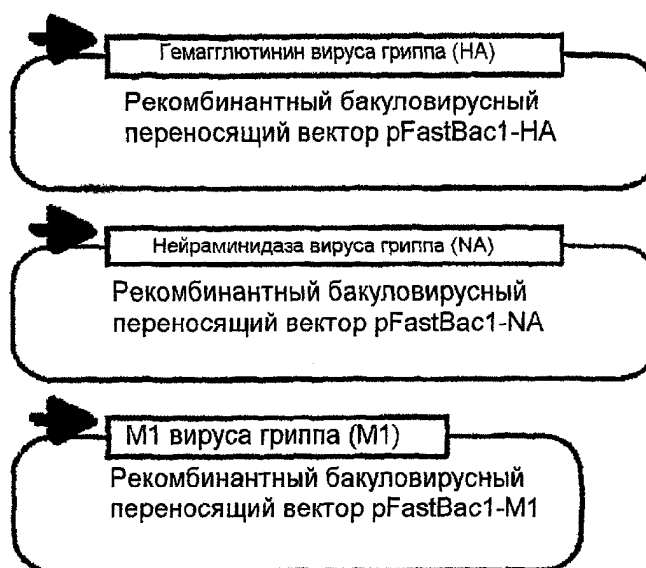
Фиг. 2

ATGAGTCTTCTAACCAGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCATCAGGCCCCCTCAA
 AGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAGGATGTTTTTGCAGGGAAGAACACAGATCTTGAGGCTC
 TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTT
 GTGTTACGCTCACCGTGGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGATTTGTCCAAAATGC
 CCTAAATGGGAATGGAGACCCAAACAACATGGACAGGGCAGTTAAACTATACAAGAAGCTGA
 AGAGGGAAATGACATTCCATGGAGCAAAGGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACTGGTGCCTT
 GCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACCGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGTGGCTCTTGG
 CCTAGTATGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATGCCCAACATCGGTCCACAGGCAGATGG
 CGACTACCACCAACCCACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTACTAGCCAGCACTACGGCT
 AAGGCCATGGAGCAGATGGCTGGATCAAGTGAGCAGGCAGCAGAAGCCATGGAAGTCGCAAG
 TCAGGCTAGGCCAAATGGTGCAGGCTATGAGGACAATTGGGACTCACCTAGTTCCAGTGCAG
 GTCTAAAAGATGATCTTATTGAAAATTTGCAGGCTTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATG
 CAGAGATTCAAGTGA

Фиг.3

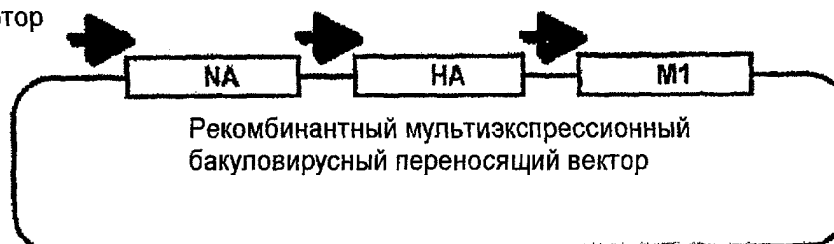
(A)

Полигедри-
новый
промотор

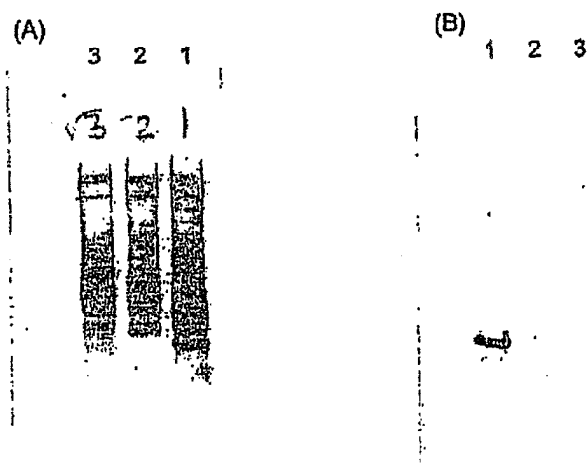


(B)

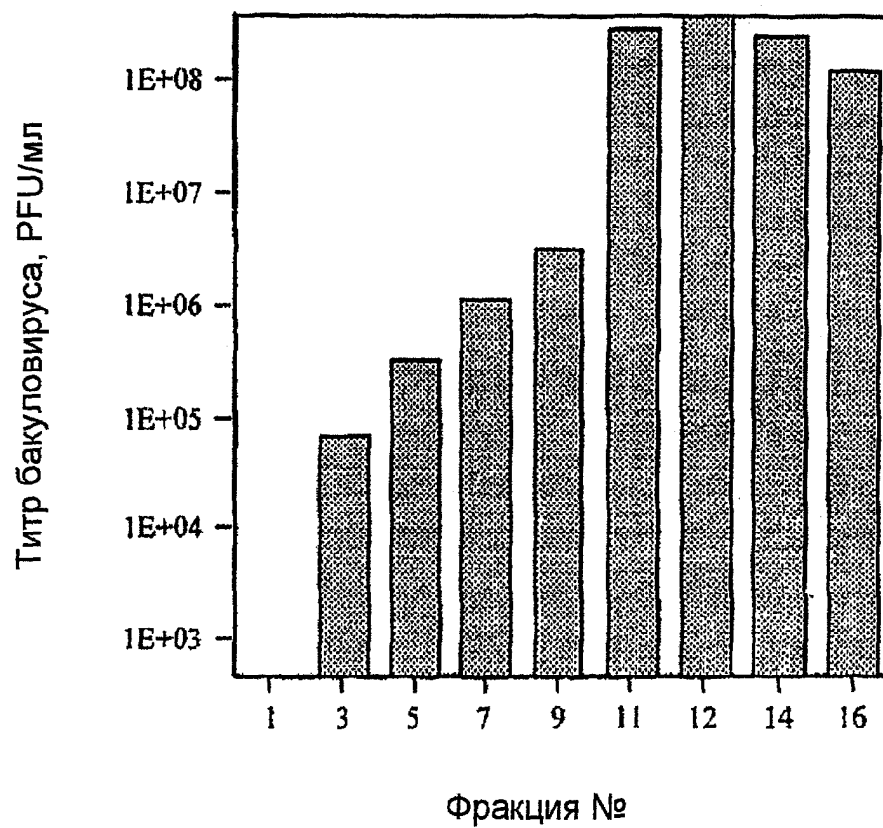
Полигедри-
новый
промотор



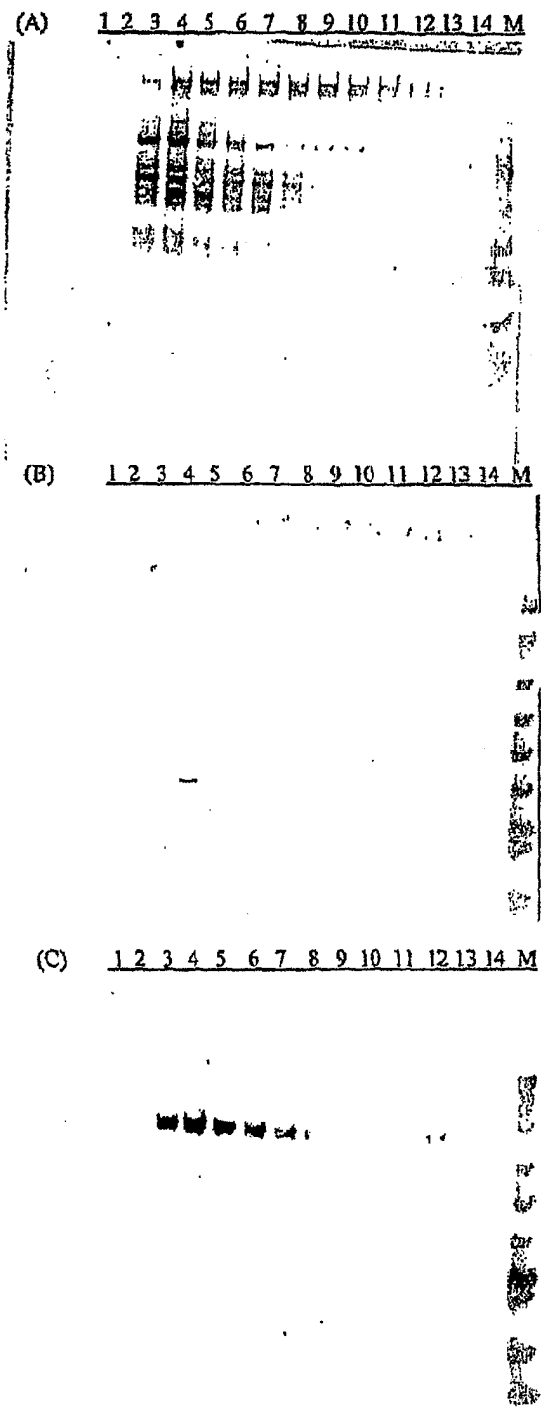
Фиг.4



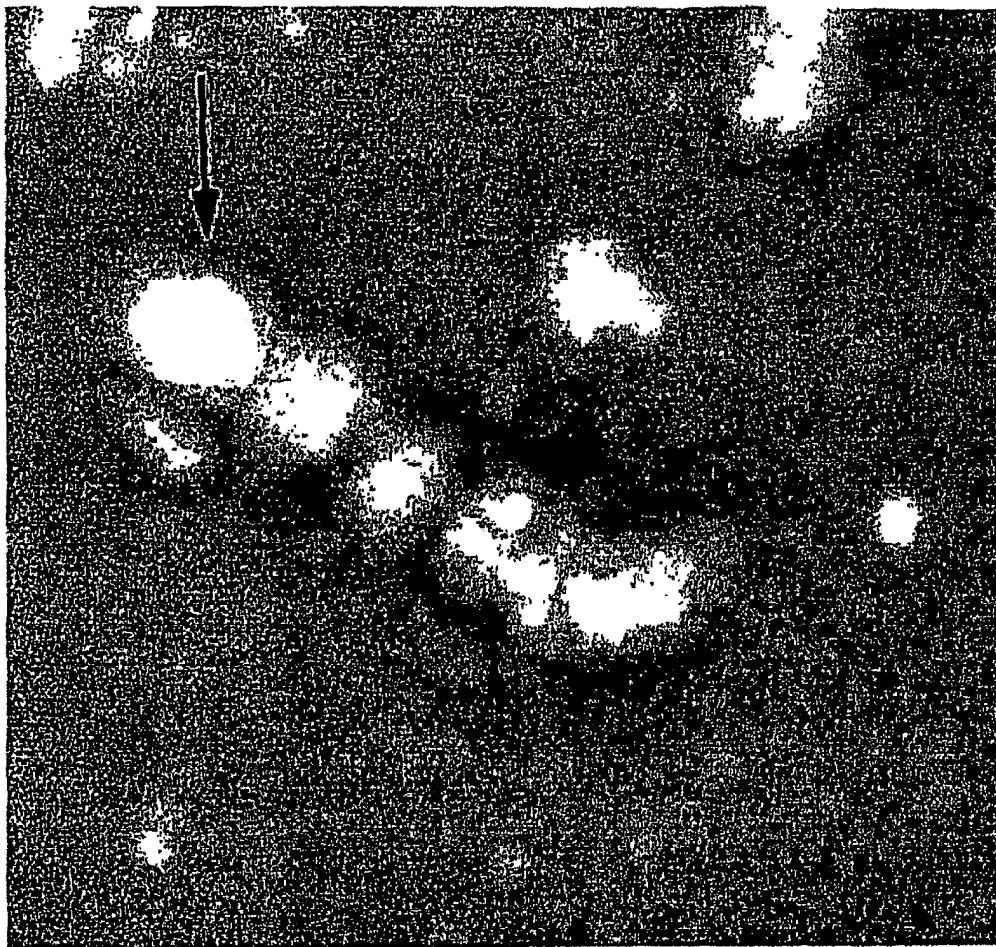
Фиг.5



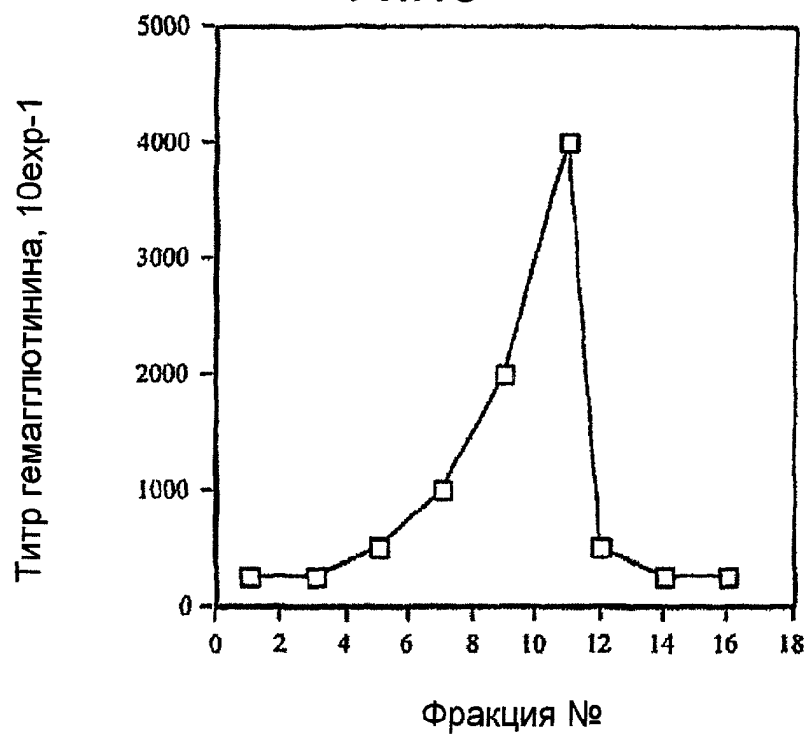
Фиг.6



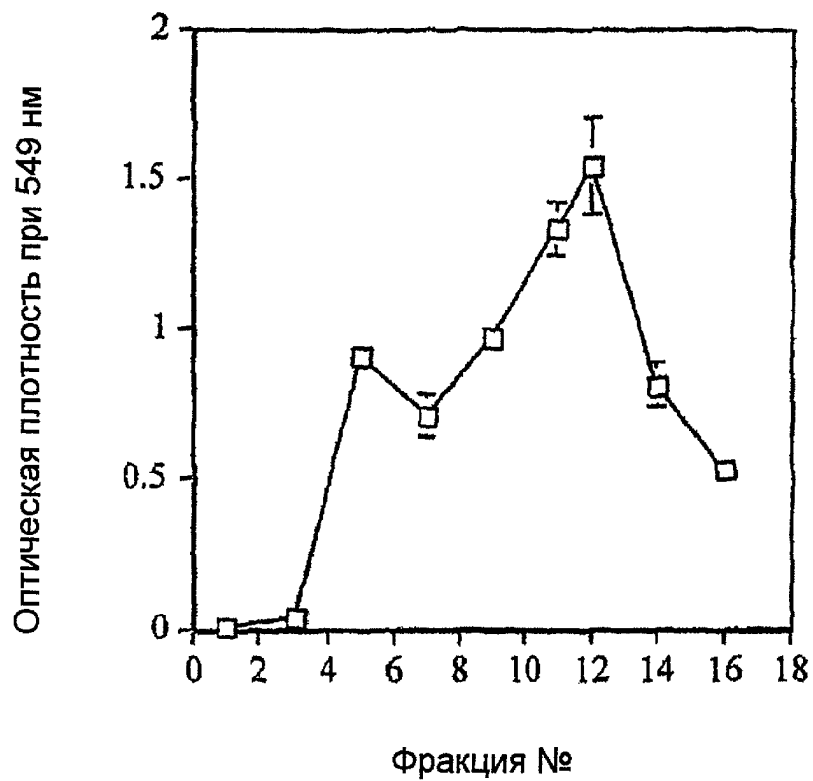
Фиг.7



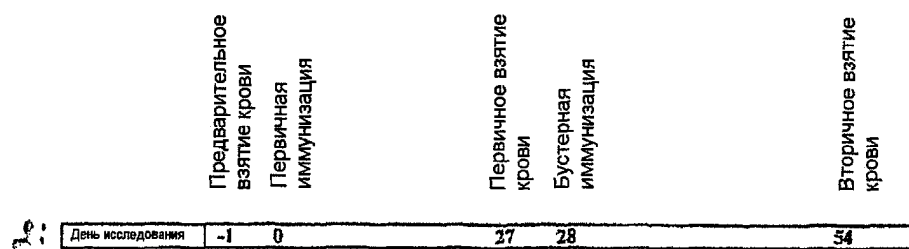
Фиг.8



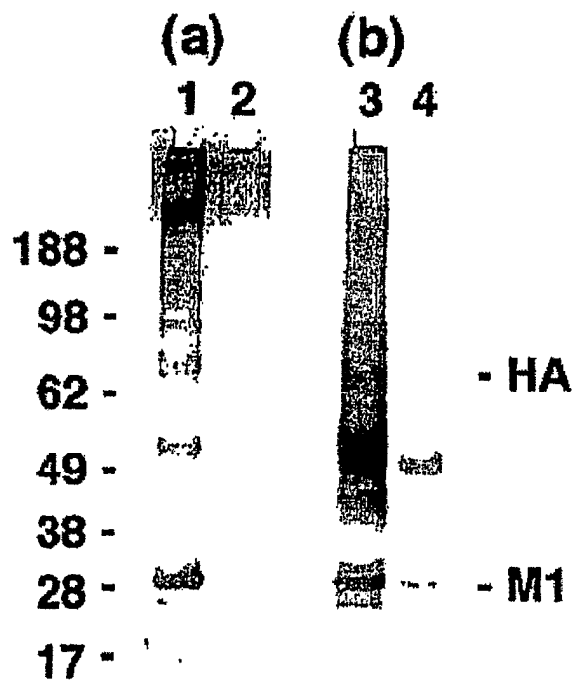
Фиг.9



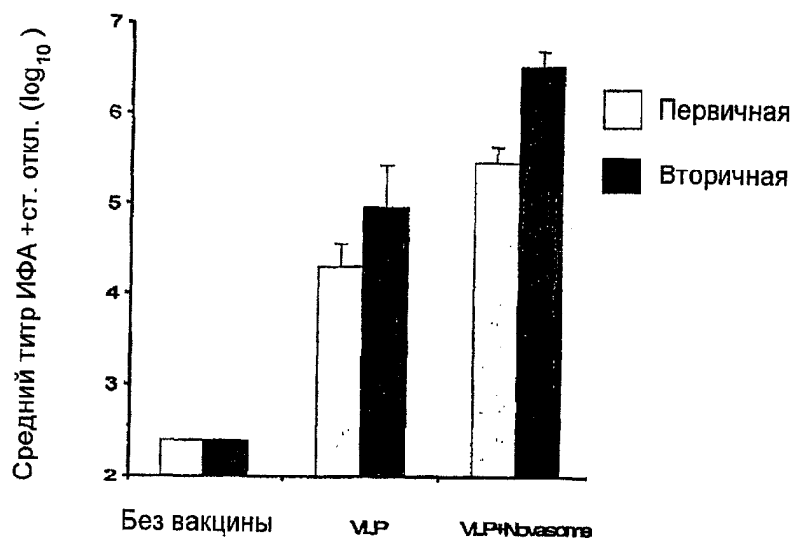
Фиг.10



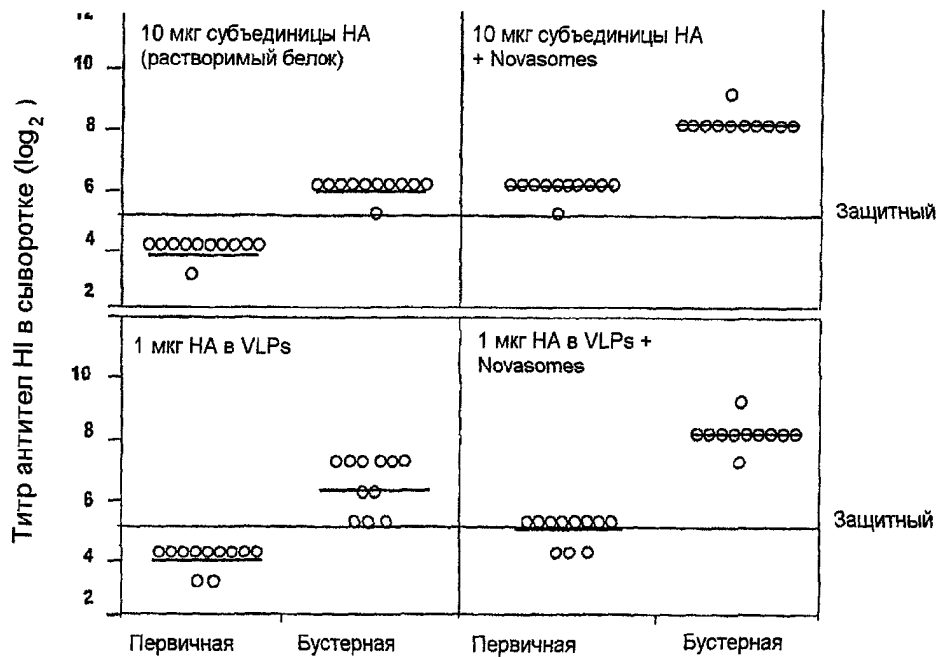
Фиг.11



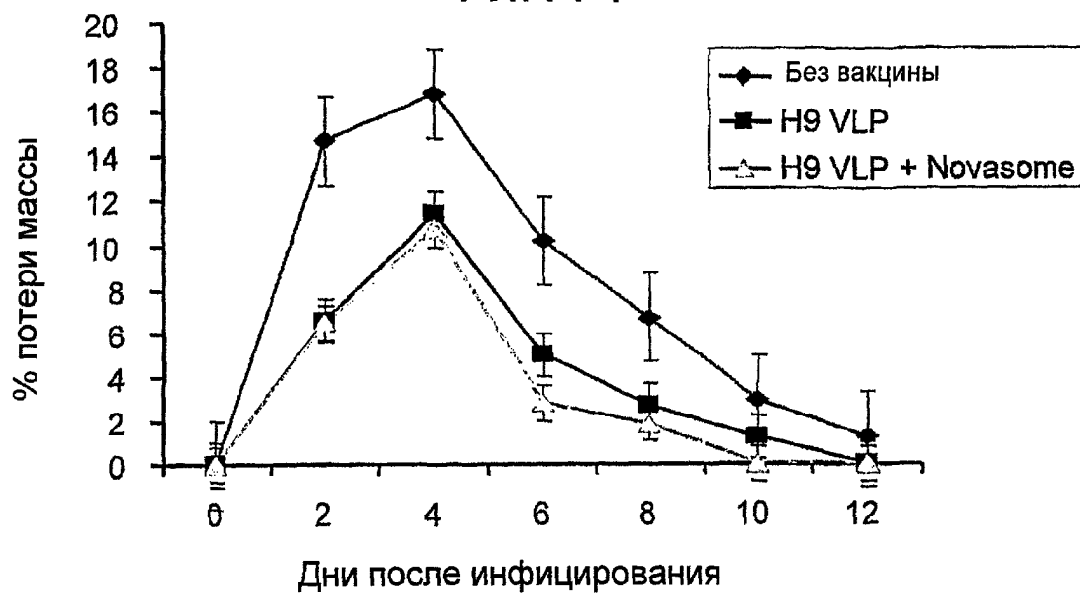
Фиг.12



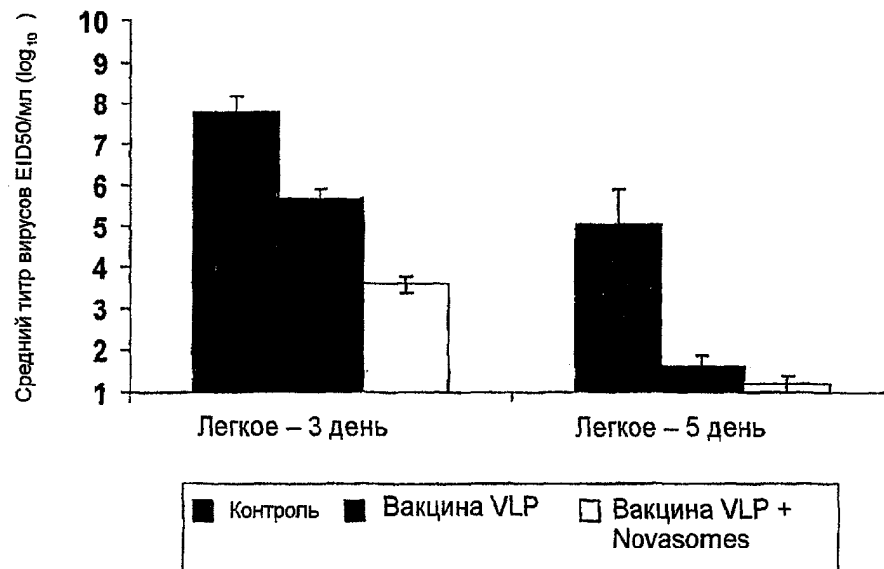
Фиг.13



Фиг.14

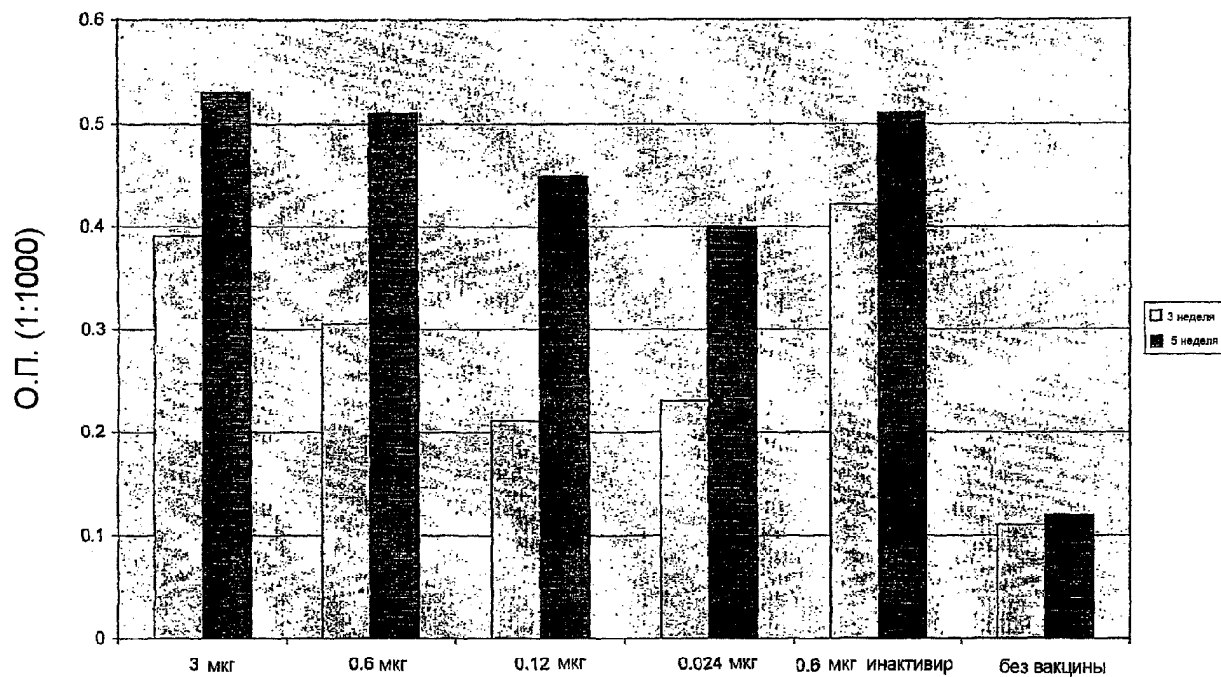


Фиг.15



Фиг.16

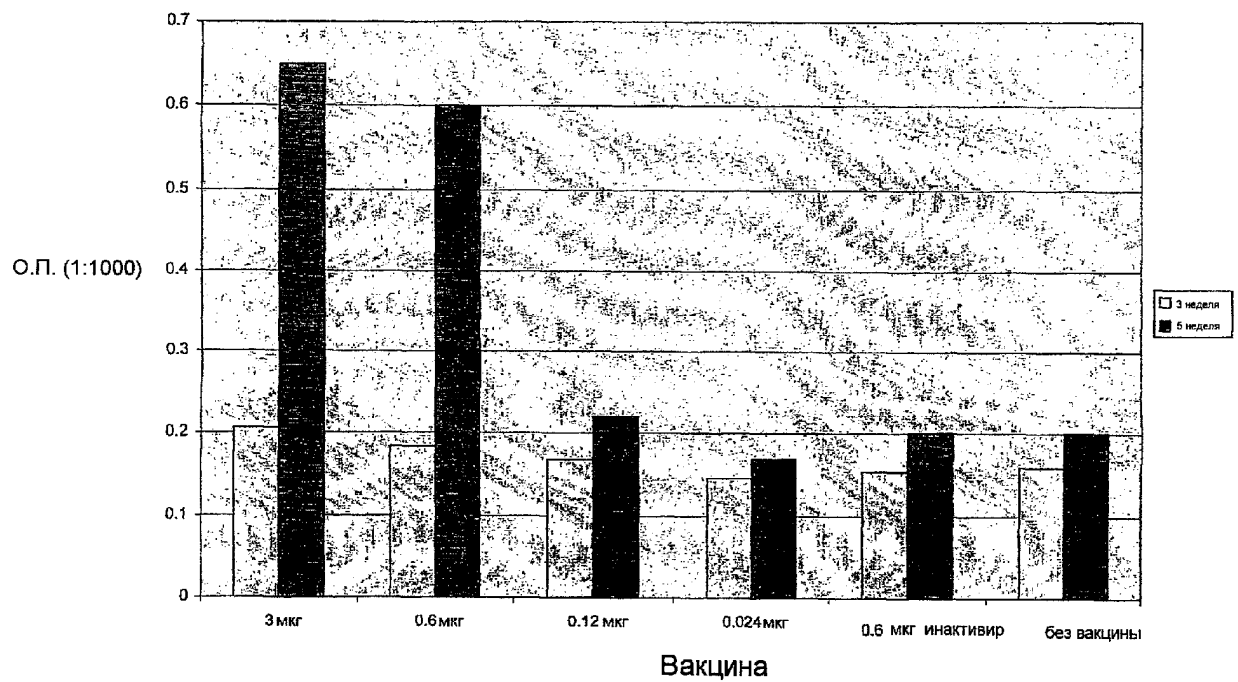
Антитела против HA – внутримышечно



Вакцина

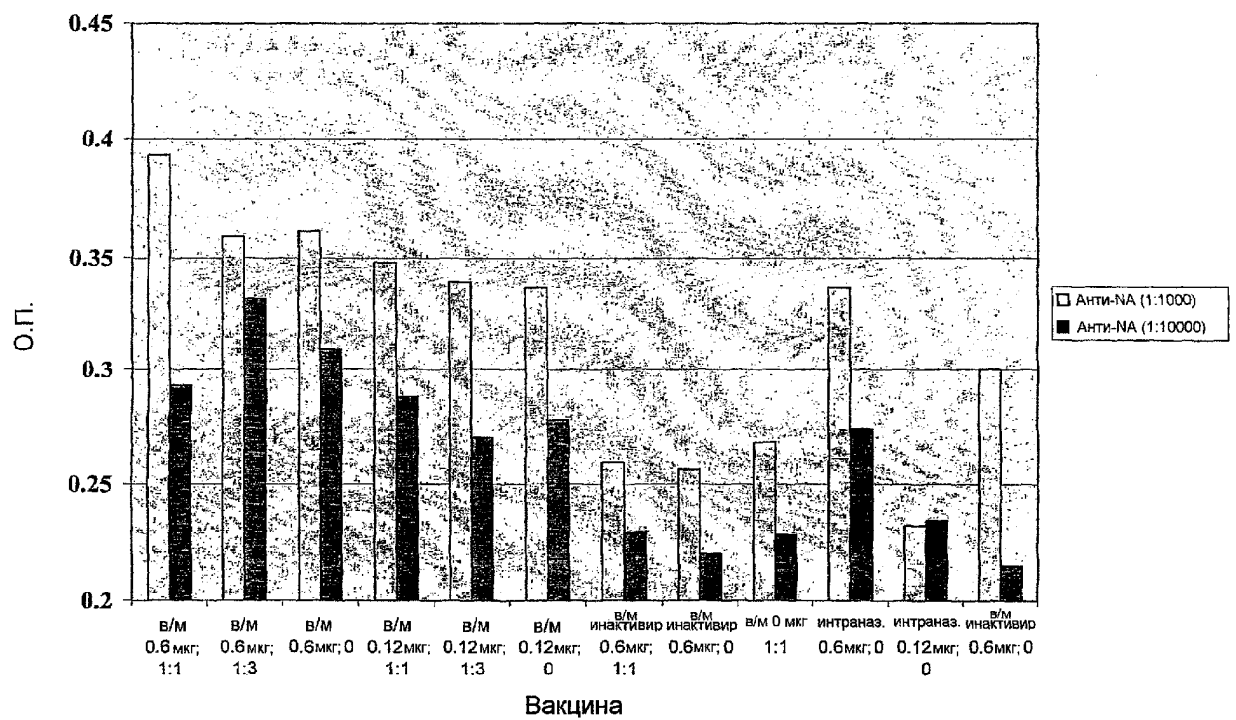
Фиг.17А

Антитела против НА – интраназально



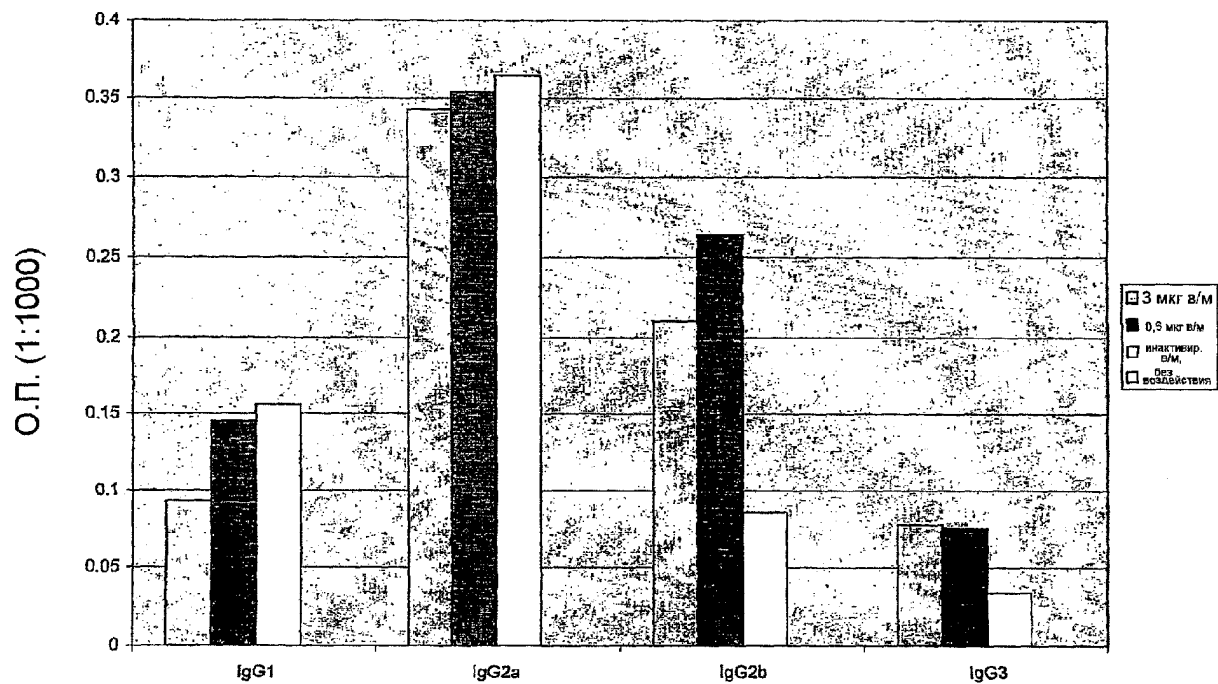
Фиг.17В

Исследование 1В-анти-NA, Fujian VLP (H3N2)



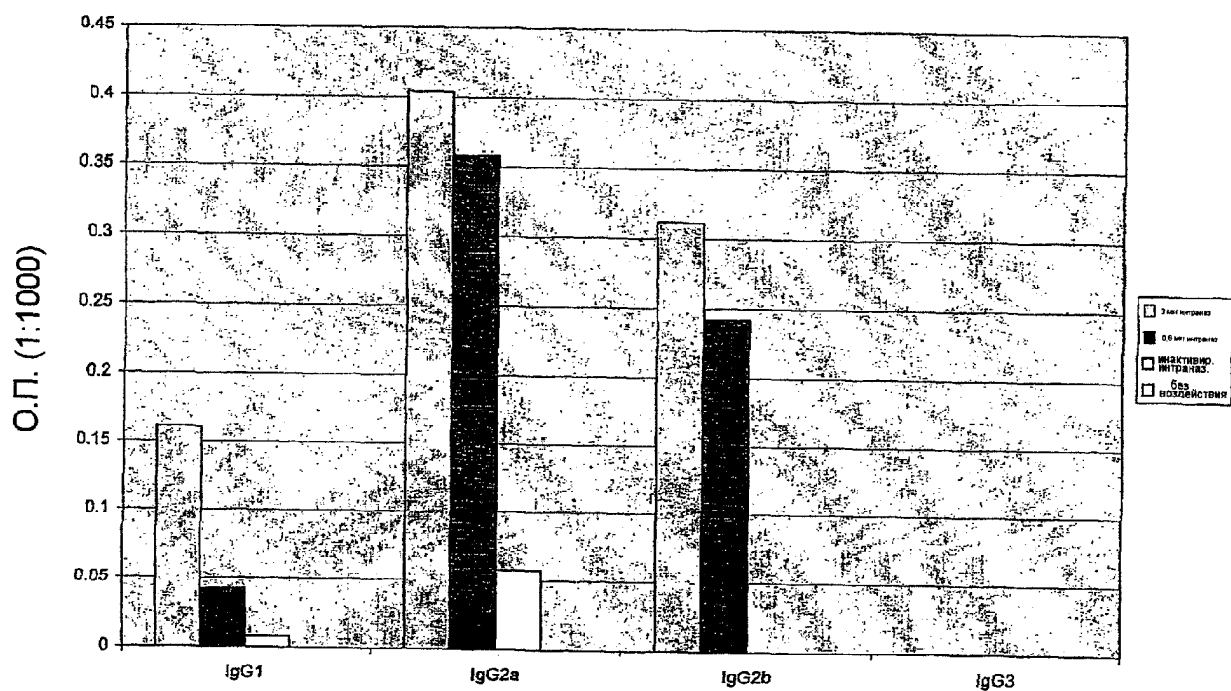
Фиг.17С

Изотип IgG – внутримышечно

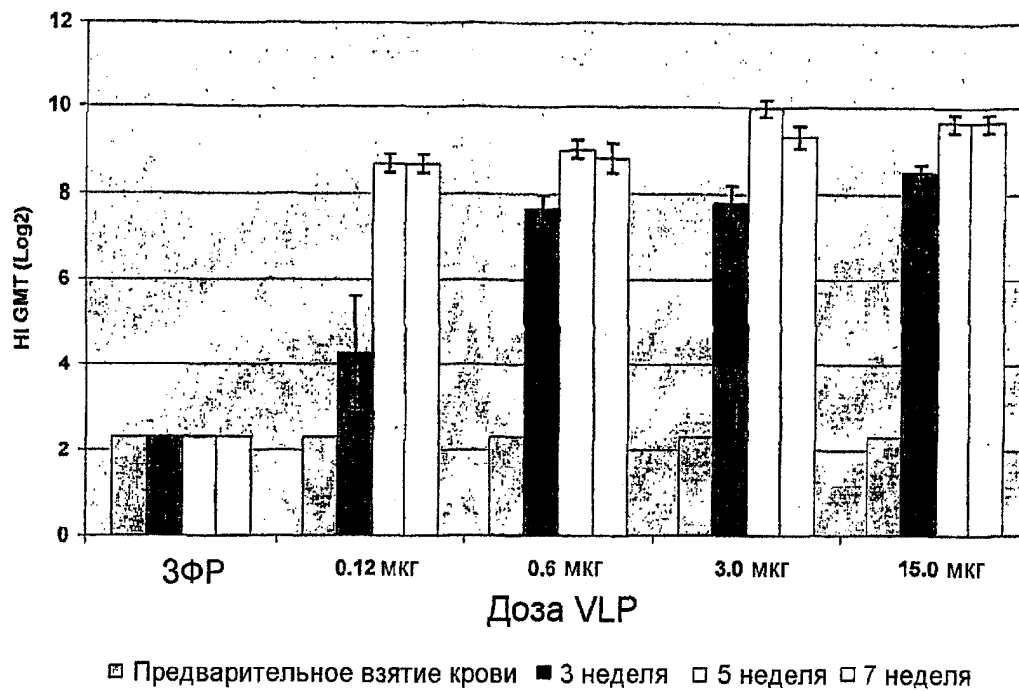


Фиг.18А

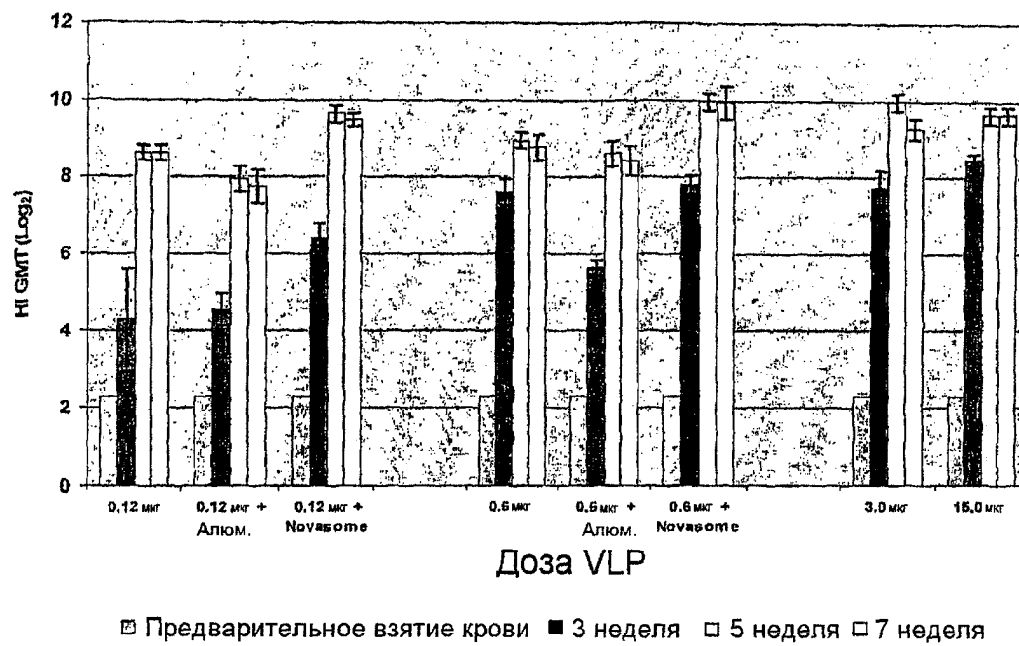
Изотип IgG – интраназально



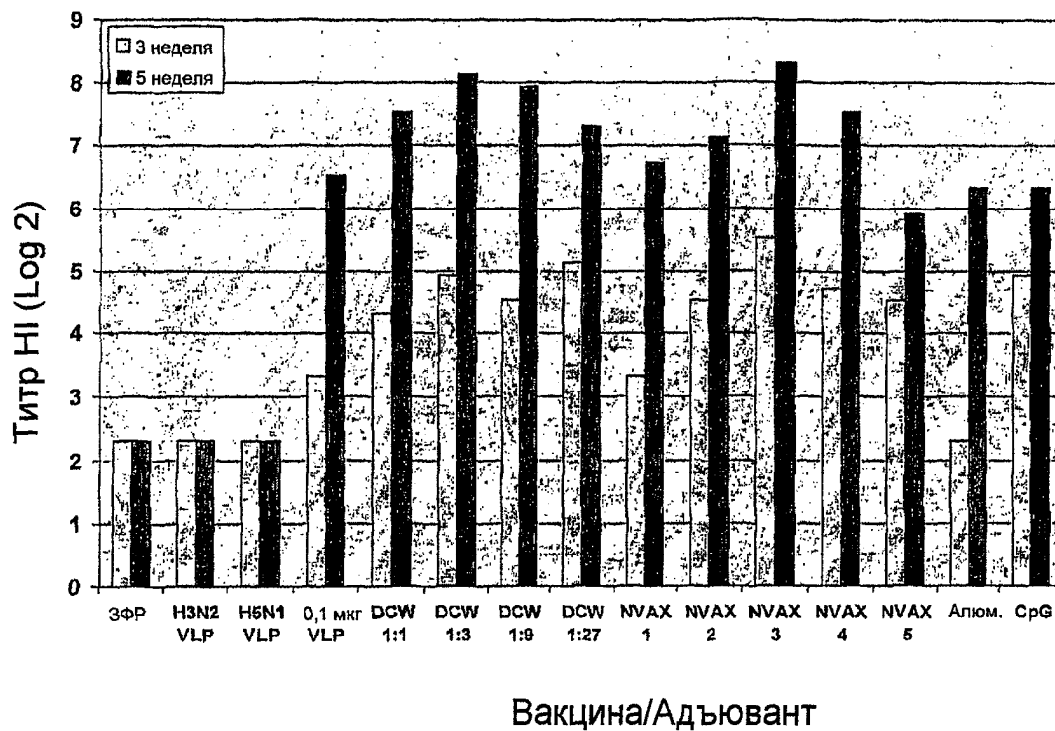
Фиг.18В



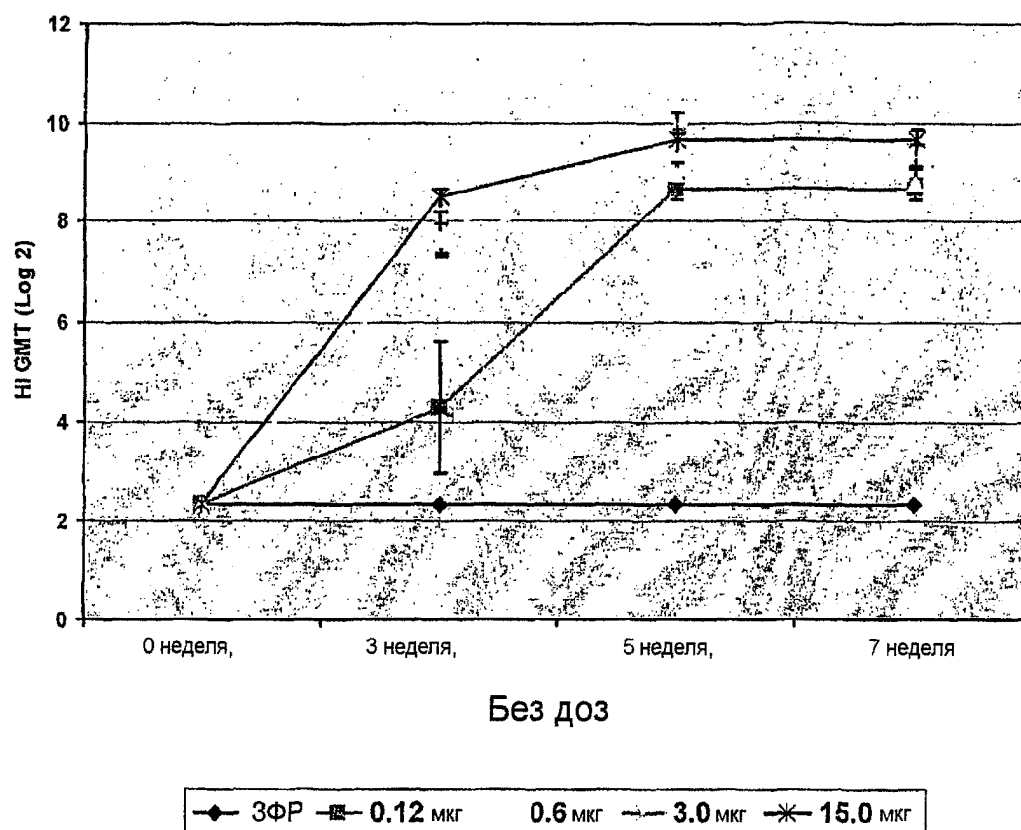
Фиг.19



Фиг.20А

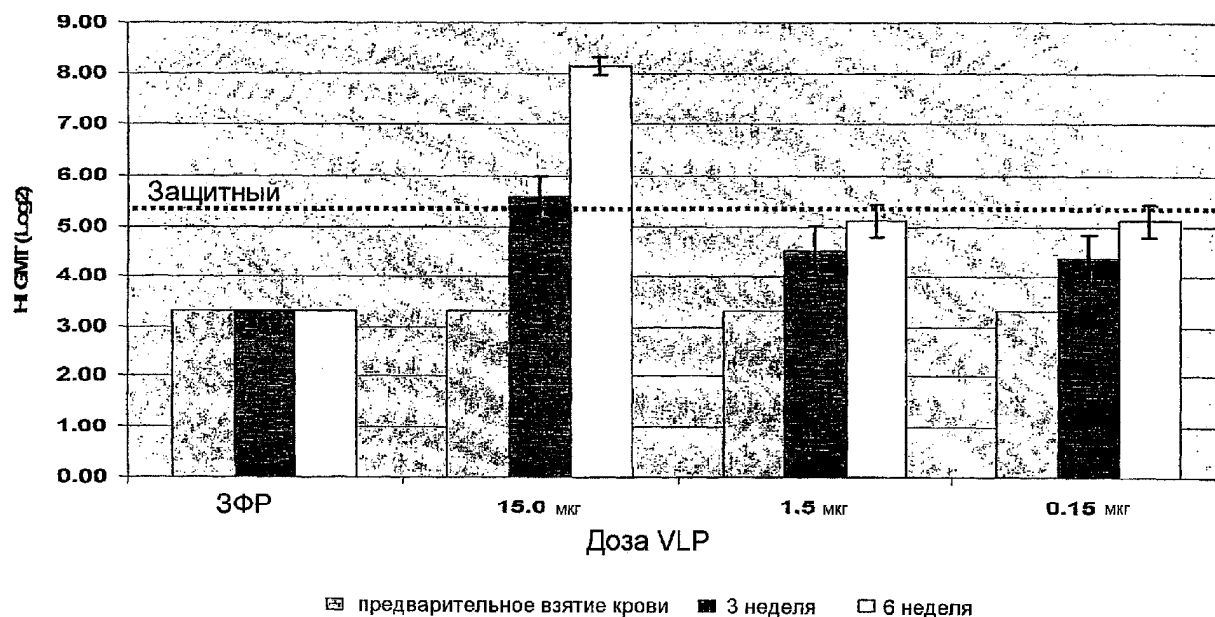


Фиг.20В



Фиг.21

Ответ хорьков на дозу VLP H9N2



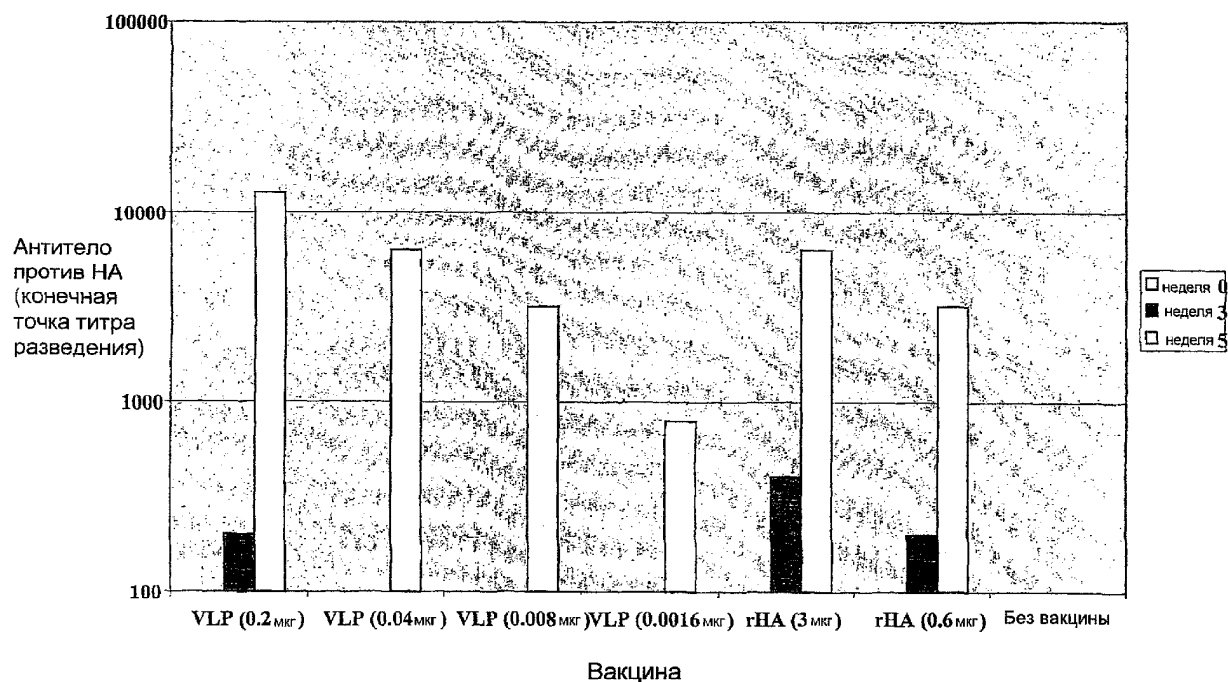
Фиг.22

Таблица X. Титры ингибирования гемагглютинаина – хорьки

Вакцина	<u>H3N2</u>				<u>H1N1</u>
	CA/04	Fuj/02	Well/01	Pan/99	NC/99
<u>Внутримышечное</u>					
VLP (15 мкг)	640	905	508	40	10
VLP (3 мкг)	160	640	226	57	10
VLP (0.6 мкг)	50	320	143	67	10
VLP (0.12 мкг)	10	184	70	50	10
гНА (15 мкг)	80	254	143	56	10
Ложное	10	10	10	10	10

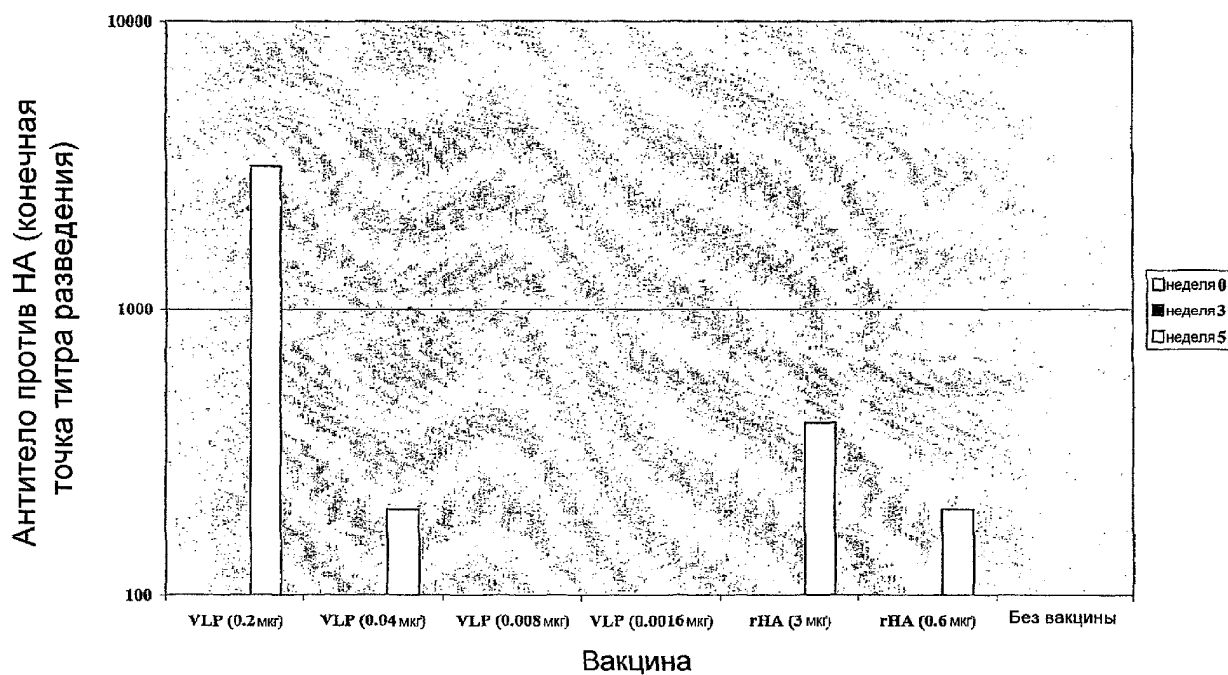
Фиг.23

Предельная экономия дозы
Внутримышечно - H5N1 Vietnam/1203/2003 VLP



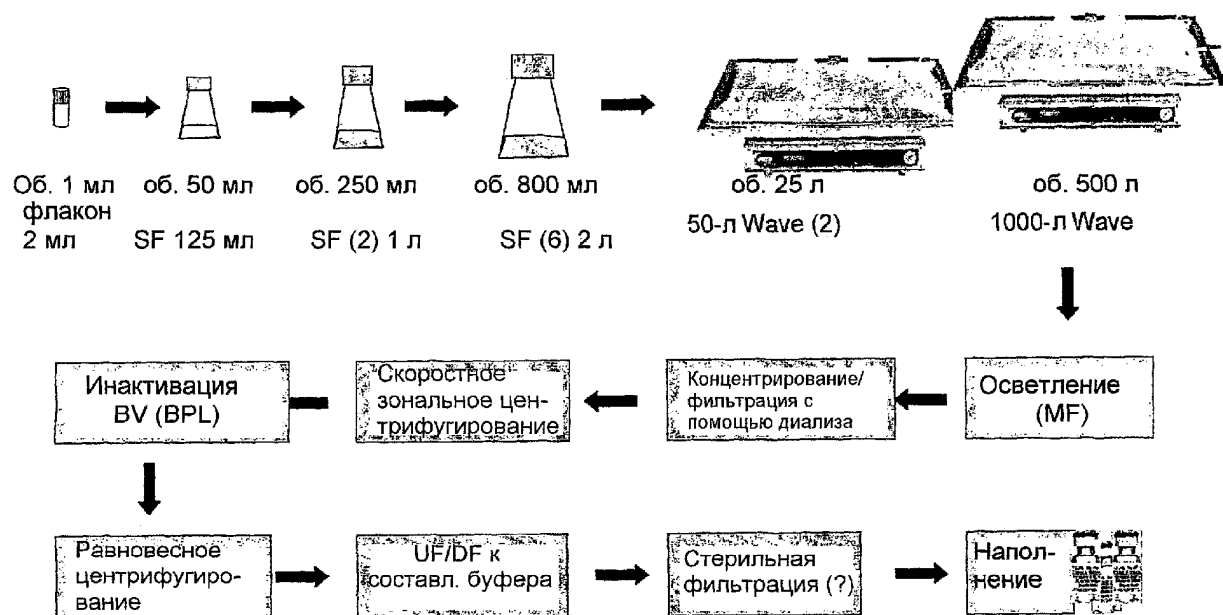
Фиг.24

Исследование 2А - Предельная экономия дозы
Интраназально - H5N1 Vietnam/1203/2005 VLP



Фиг.25

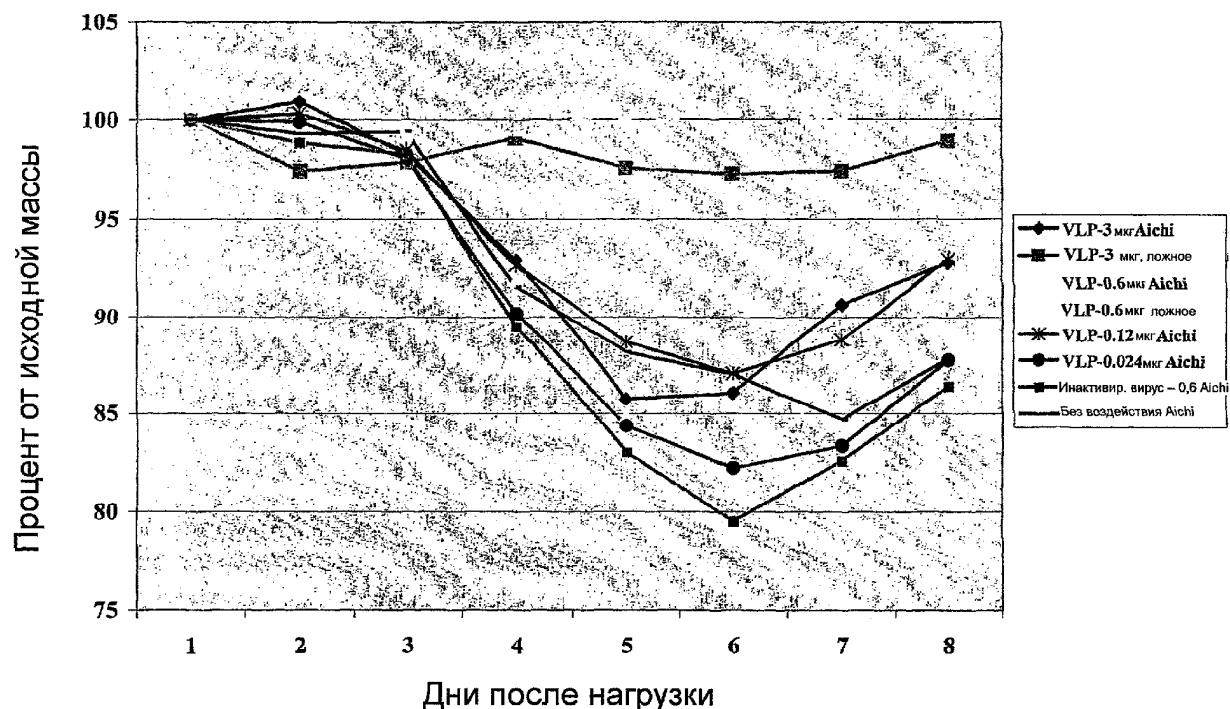
Портативный и одноразовый способ получения вакцины с VLP гриппа



Полный вышележащий процесс клеточного культивирования и нижележащие стадии операций направлены на то, чтобы быть портативными, одноразовыми и масштабируемыми с нагрузочной емкостью.

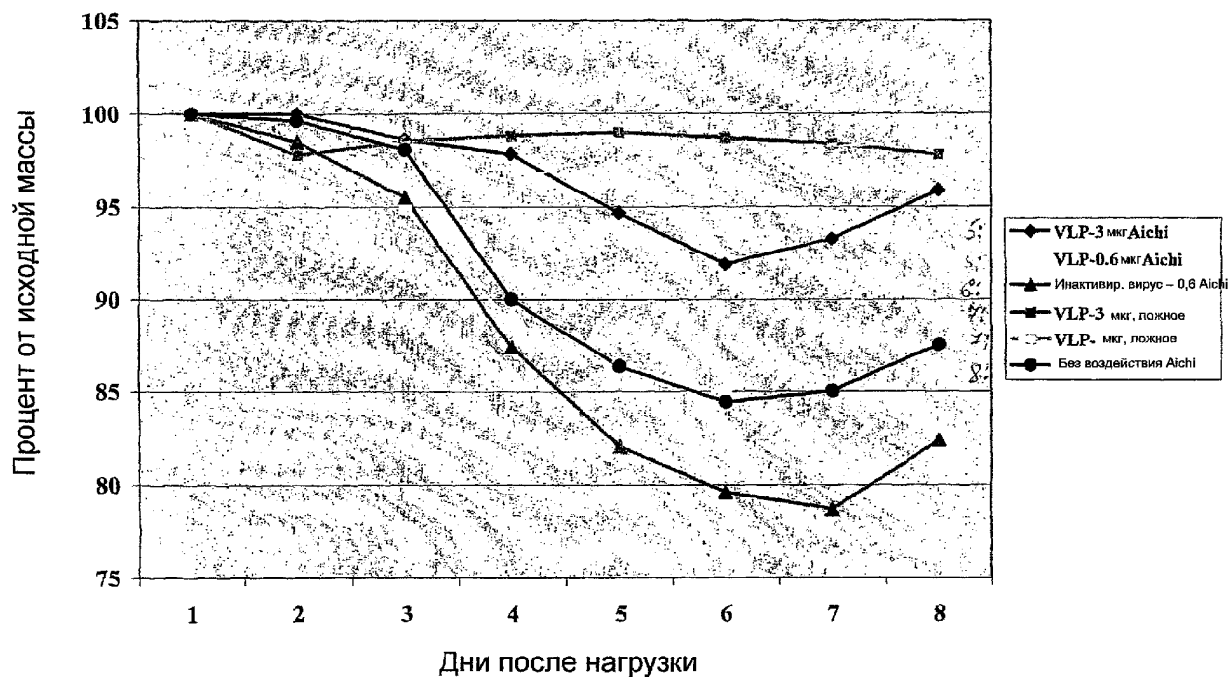
Фиг.26

Исследование 1A: Fujian (H3N2) VLP против инактивированного вируса: интраназальная нагрузка A/Aichi/2/68×31

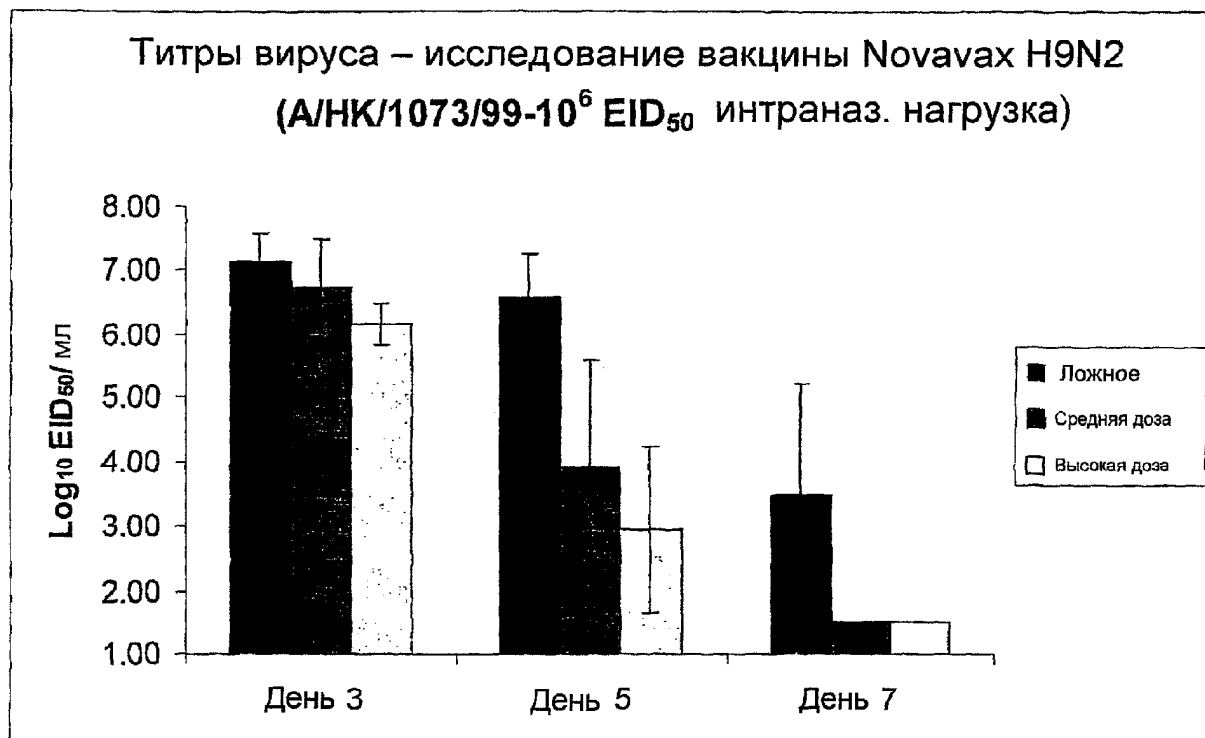


Фиг.27

Исследование 1А: Fujian (H3N2) VLP против инаktivированного вируса: интраназальная нагрузка A/Aichi/2/68×31

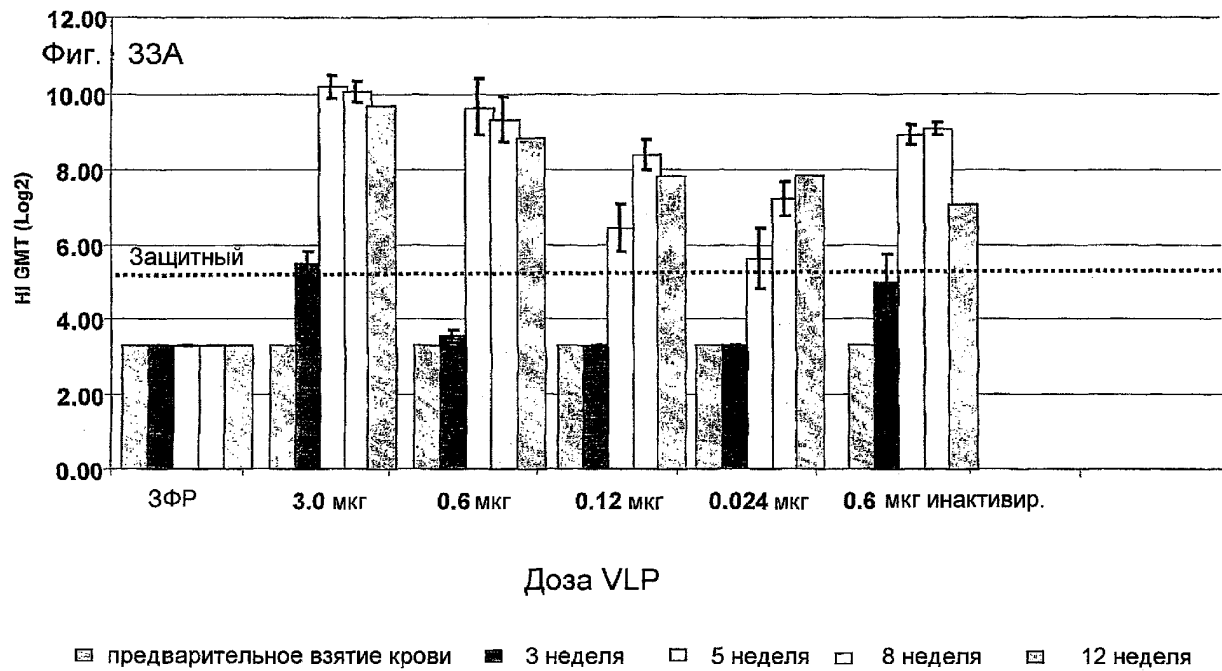


Фиг.28



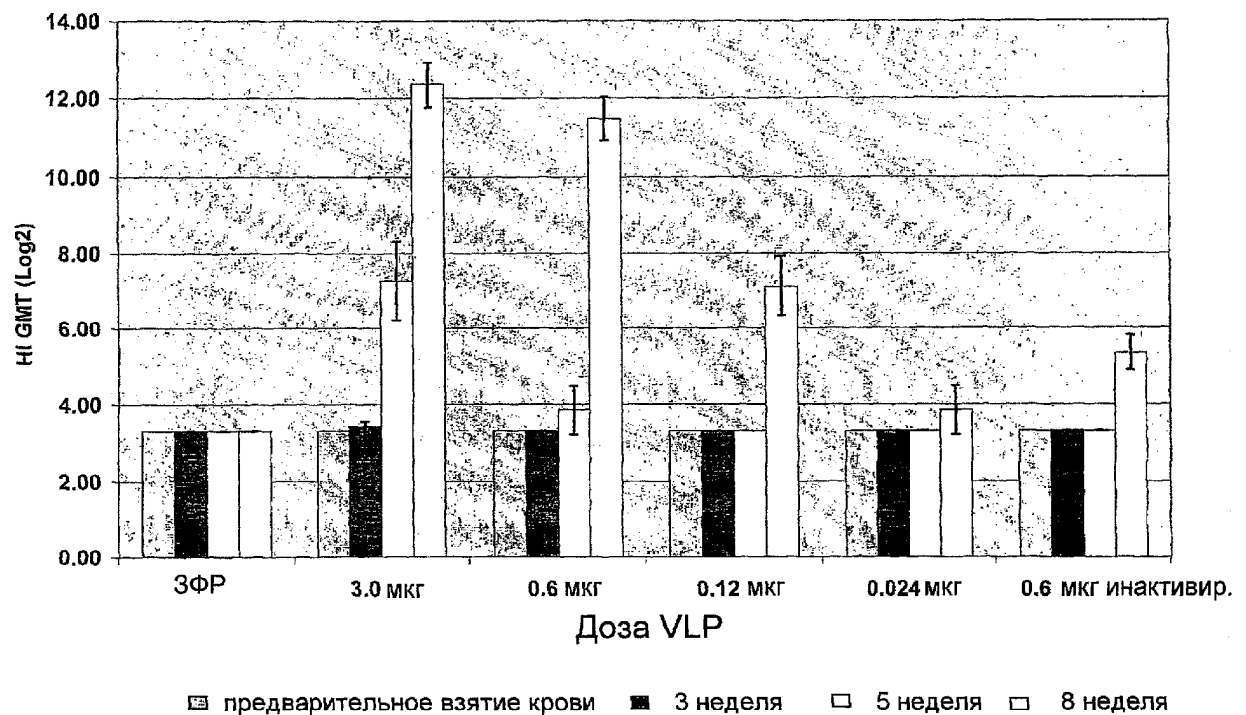
Фиг.29

Ответ на дозы H3N2 HAI – в/м – мышь A/Fujian/411/2002



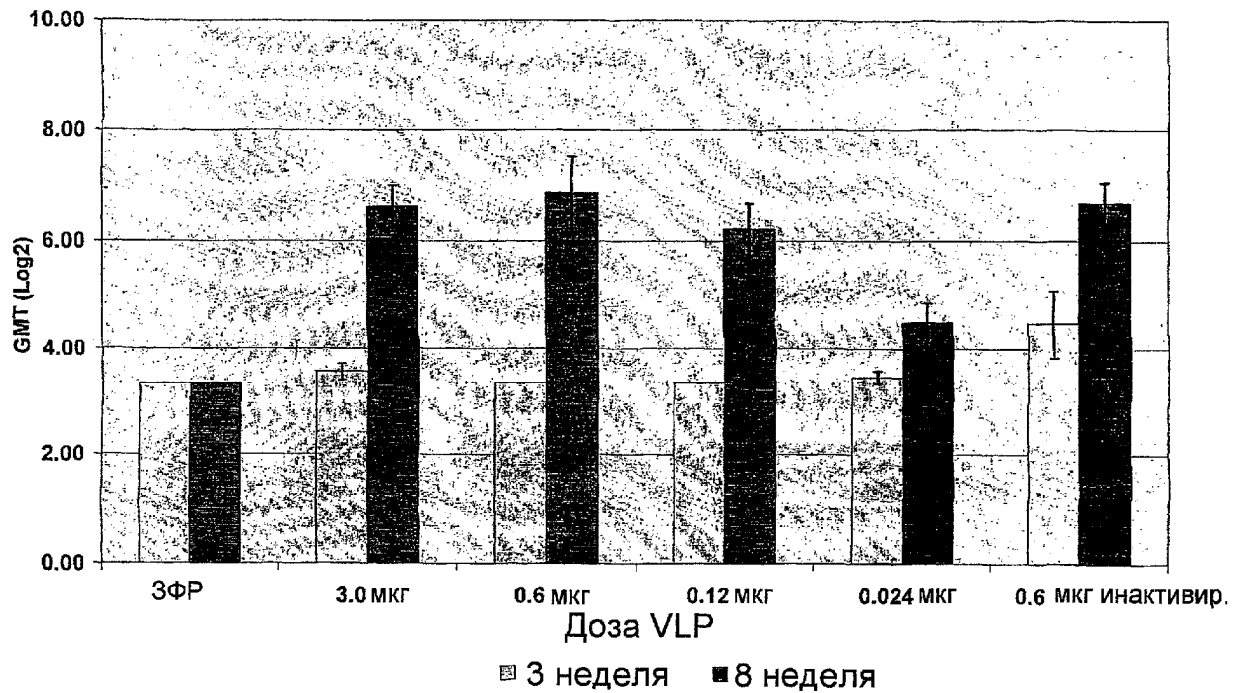
Фиг.30А

Титр HI в отношении A/Fujian/411/2002 (H3N2) после интраназальной инокуляции H3N2 VLPs



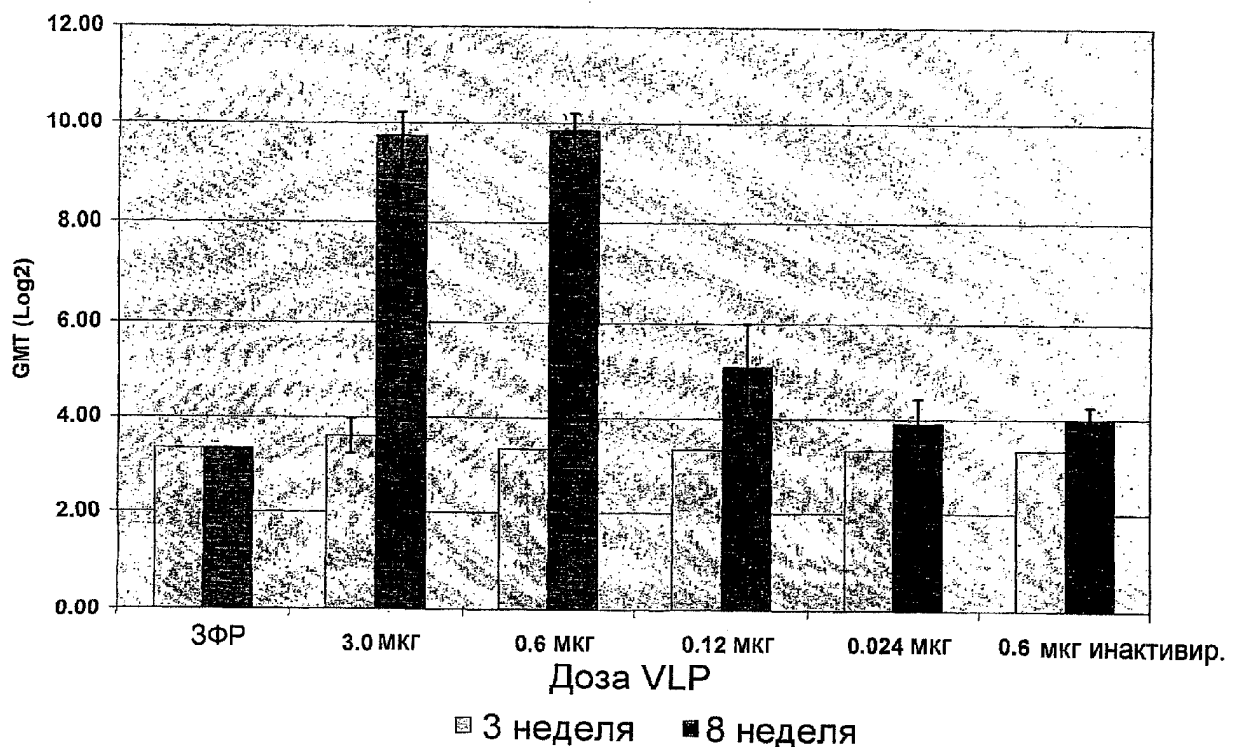
Фиг.30В

Титр HI в отношении A/Panama/2007/99 (H3N2) после внутримышечной инокуляции H3N2 VLPs



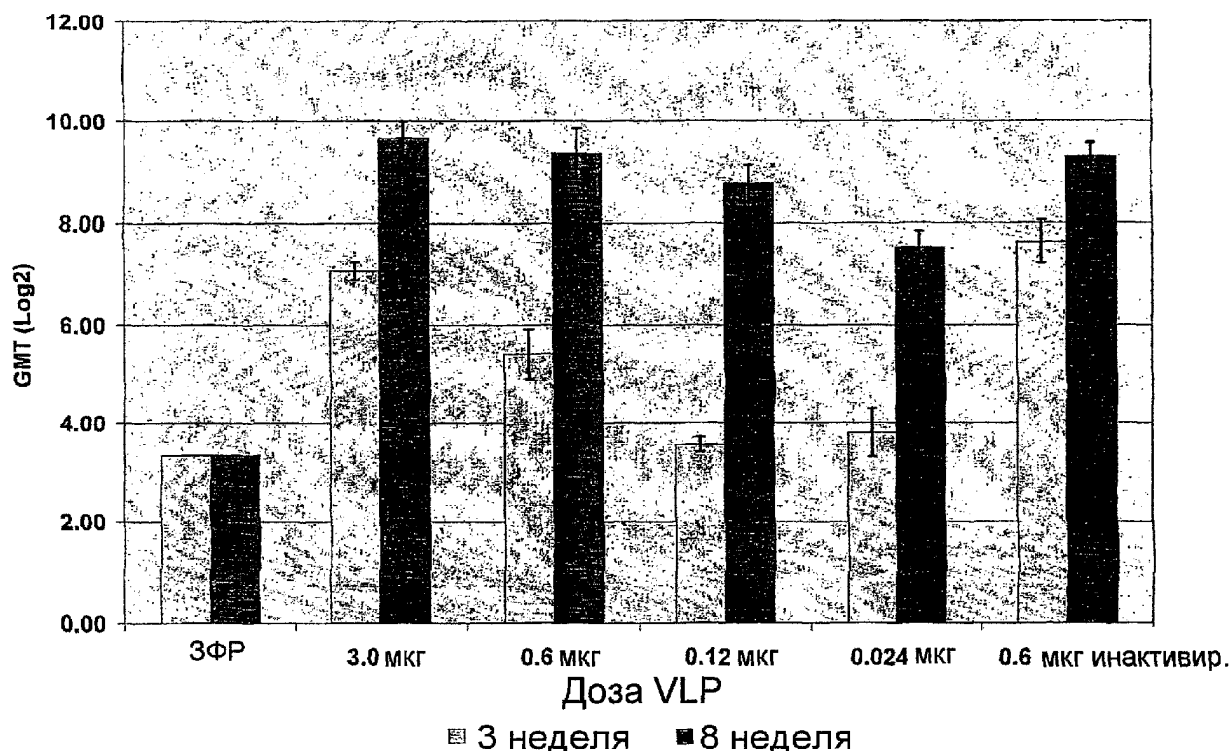
Фиг.30С

Титр HI в отношении A/Panama/2007/99 (H3N2) после интраназальной инокуляции H3N2 VLPs



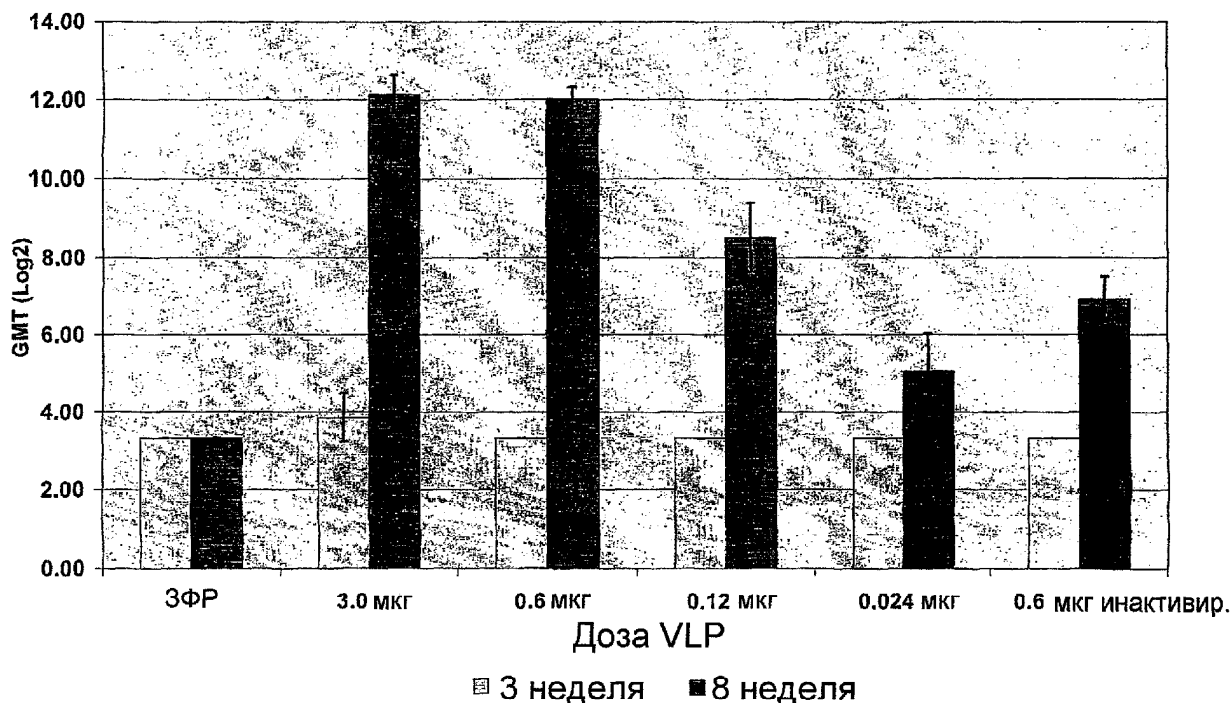
Фиг.30D

Титр HI в отношении A/Wyoming/3/03 (H3N2) после внутримышечной инокуляции H3N2 VLPs



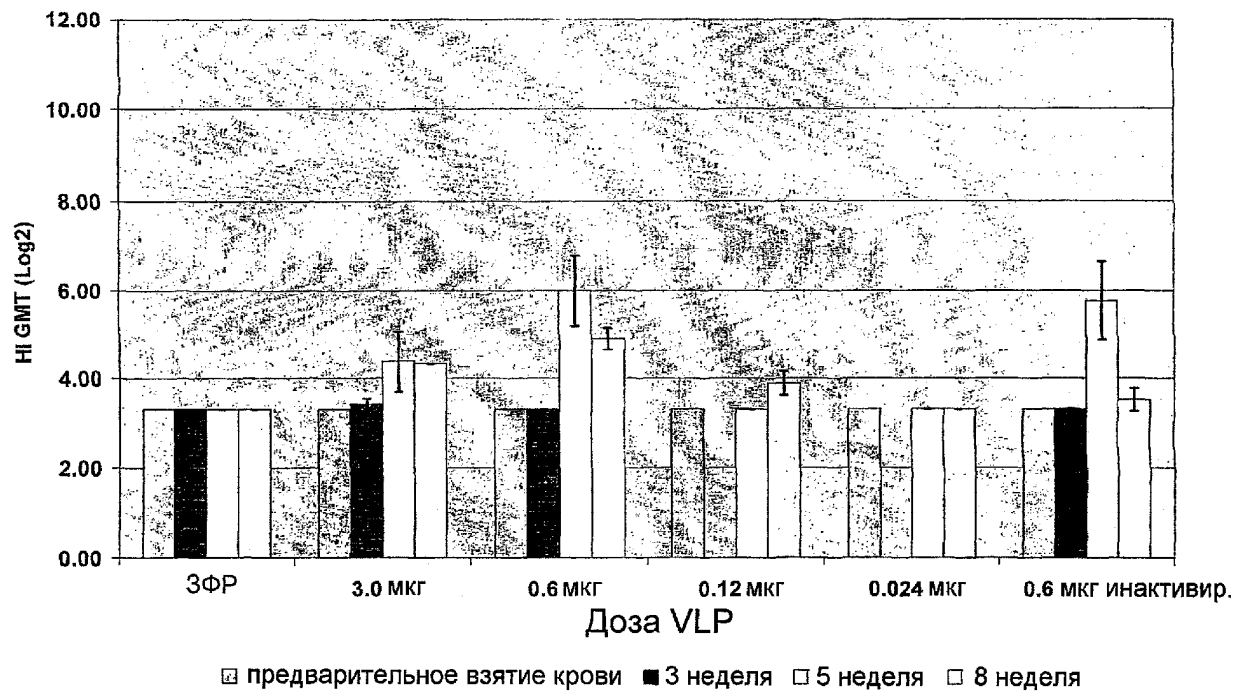
Фиг.30Е

Титр HI в отношении A/Wyoming/3/03 (H3N2) после интраназальной инокуляции H3N2 VLPs



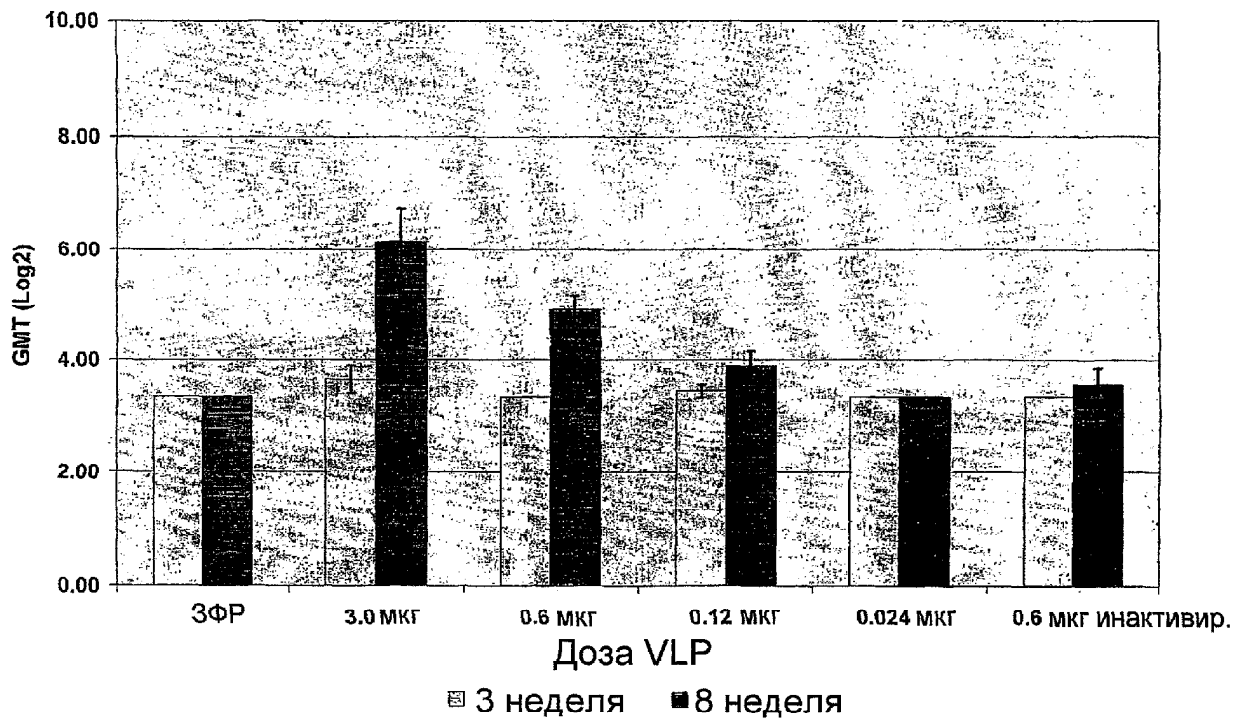
Фиг.30F

Титр HI в отношении A/New York/55/2004 (H3N2) после внутримышечной инокуляции H3N2 VLPs



Фиг.30G

Титр HI в отношении A/New York/55/2004 (H3N2) после интраназальной инокуляции H3N2 VLPs



Фиг.30H