



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 479 589** (13) **C2**

(51) МПК

C07K 14/11 (2006.01)

C12N 15/44 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009119597/10, 26.10.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.10.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

27.10.2006 US 60/863,142

24.10.2007 US 11/923,326

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2010 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 20.04.2013 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: CN 1748795 A, 22.03.2006. WO 2006113214
A2, 26.10.2006. WO 2005107797 A1, 17.11.2005.
RU 2283139 C1, 10.09.2006.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 27.05.2009

(86) Заявка РСТ:
US 2007/082699 (26.10.2007)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/052173 (02.05.2008)

Адрес для переписки:

101000, Москва, М. Златоустинский пер., д.
10, кв. 15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов. И.А.
Веселицкой, рег. № 0011

(72) Автор(ы):

ВОН Эрик М. (US),
ГОНСАЛЕС-ЭРНАНДЕС Паулино-
Карлос (MX),
ДЭММГЕН Юрген (DE)

(73) Патентообладатель(и):

БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА, ИНК. (US)

(54) НОВЫЕ БЕЛКИ Н5, КОДИРУЮЩИЕ ИХ МОЛЕКУЛЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ВЕКТОРЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Раскрыты белок гемагглютинаина вируса гриппа, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая такой белок, вакцина для лечения или предупреждения инфекций, которые опосредуются вирусом гриппа, набор, а также способы получения белка и вакцин. Белок

гемагглютинаина Н5 вируса гриппа характеризуется тем, что в положении 223 серии замещен аспарагином, а в положение 328 встроена вторая лизин. Модифицированный белок имеет повышенные иммуногенные свойства. Изобретение может быть использовано в медицине. 7 н. 7 з.п. ф-лы, 6 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/11 (2006.01)*C12N 15/44* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*A61K 39/145* (2006.01)*C12P 21/00* (2006.01)*A61P 31/14* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009119597/10, 26.10.2007**(24) Effective date for property rights:
26.10.2007

Priority:

(30) Convention priority:

27.10.2006 US 60/863,142**24.10.2007 US 11/923,326**(43) Application published: **10.12.2010 Bull. 34**(45) Date of publication: **20.04.2013 Bull. 11**(85) Commencement of national phase: **27.05.2009**

(86) PCT application:

US 2007/082699 (26.10.2007)

(87) PCT publication:

WO 2008/052173 (02.05.2008)

Mail address:

**101000, Moskva, M. Zlatoustinskij per., d. 10,
kv. 15, "EVROMARKPAT", pat.pov. I.A.
Veselitskoj, reg. № 0011**

(72) Inventor(s):

VON Ehrik M. (US),**GONSALES-EhRNANDES Paulino-Karlos
(MX),****DEhMMGEN Jorgen (DE)**

(73) Proprietor(s):

**BERINGER INGEL'KhAJM VETMEDIKA, INK.
(US)****(54) NEW PROTEINS H5, MOLECULES OF NUCLEIC ACIDS THAT CODE THEM AND VECTORS, AND THEIR APPLICATION IN MEDICINE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: protein of flu virus hemagglutinin is disclosed, as well as a molecule of nucleic acid, which codes such protein, a vaccine for treatment or prevention of infections, which are mediated by a flu virus, a set and also methods to produce protein and vaccines. The protein of hemagglutinin H5 of the flu

virus is characterised by the fact that in the position 223 of the series it is substituted with asparagine, and the second lysine is built into the position 328.

EFFECT: modified protein has improved immunogenic properties.

14 cl, 1 tbl, 4 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины, предпочтительно к области инфекционных болезней. В частности, настоящее изобретение относится к белкам вируса гриппа, нуклеиновым кислотам и векторам, которые кодируют указанные белки, и к вакцинам против гриппа. Более конкретно настоящее изобретение относится к применению любых из указанных белков, молекул нуклеиновых кислот, векторов или вакцин для лечения и предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гриппа, а также для предупреждения внутри- и межвидовой передачи вируса гриппа.

Предпосылки создания изобретения

Инфекция, вызываемая вирусом гриппа, остается важной для животных и человека инфекцией. Грипп вызывается вирусами, которые претерпевают постоянные антигенные изменения/модификации и которые имеют животное резервуар. В результате этого в будущем могут возникать новые эпидемии и пандемии и трудно достичь искоренения заболевания. Вирусы гриппа хорошо известны в данной области и описаны более подробно у P. Palese, Nature Medicine, т.10, №.12, декабрь 2004 г., сс.82-86 и в дополнительных указанных в этой публикации ссылках. В целом, геном вируса гриппа А состоит из одноцепочечных сегментов, и на поверхности вирусных частиц присутствуют два основных гликопротеина: гемагглютинин (H) и нейраминидаза (N). В результате того, что имеется по меньшей мере 16 различных подтипов гемагглютинина (H1-H16) и 9 различных подтипов нейраминидаз (N1-N9), существует значительная антигенная вариабельность между вирусами гриппа.

Продemonстрировано, что вирус гриппа типа H5N1, т.е. вирус чумы домашней птицы (Fowl Plague) заражает домашнюю птицу, свиней и человека. Вирусы могут передаваться также непосредственно от различных видов птиц человеку (Claas и др., Lancet, 351, 1998, с.472; Suarez и др., J. Virol. 72, 1998, с.6678; Subbarao и др., Science, 279, 1998, с.393; Shortridge, Vaccine, 17 (приложение 1), 1999, сс.26-29). Известны клинические случаи, когда смертность людей достигала примерно 50%.

В течение последнего десятилетия свиньи стали важным переносчиком при пандемиях гриппа. Свиньи, верблюды и тюлени, предпочтительно свиньи, могут служить в качестве «камеры для смешения» для вирусов птичьего гриппа и поэтому представляют собой потенциальный фактор риска, позволяющий преодолевать видовые барьеры от домашней птицы, являющейся природным резервуаром вирусов гриппа, к млекопитающим. Это происходит, как правило, путем двойного заражения чувствительных животных, например свиней, как свойственным для млекопитающих (свиным), так и птичьим вирусом гриппа. Такое двойное заражение может приводить к возникновению новых рекомбинантных вирусов, которые могут вызывать человеческие или свиные пандемии. Однако согласно современным данным рекомбинация существующих штаммов вируса птичьего гриппа H5 и вирусов гриппа млекопитающих не привела к получению обладающих высокой вирулентностью рекомбинантов. С другой стороны, вирус птичьего гриппа может заражать свиней и в результате спонтанных мутаций может адаптироваться к организму свиней. Критический барьер может быть преодолен, если вирус приобретет способность к горизонтальному пути передачи в популяции свиней (или других млекопитающих).

Тем не менее, большая часть свиней в Юго-Восточной Азии оказались зараженной штаммом птичьего вируса гриппа (H5), источником которого оказались соседние птичники. До тех пор пока указанные инфекции являются доклиническими, их можно диагностировать только лабораторными методами, и поэтому они часто остаются незамеченными. Существует высокий риск, что такие свиньи, имеющие заражение на

доклиническом уровне, могут служить в качестве благоприятного организма для адаптации вируса к системе млекопитающих, что приводит к распространению вируса в популяции свиней, а также может приводить к заражению человека.

5 Современные вакцины против гриппа представляют собой субъединичную вакцину (Babai и др., *Vaccine*, 17(9-10), 1999, сс.1223-1238; Crawford и др., *Vaccine*, 17(18), 1999, сс.2265-2274; Johansson и др., *Vaccine*, 17(15-16), 1999, сс.2073-2080), ослабленную вакцину (Horimoto и др., *Vaccine*, 22(17-18), 2004, сс.2244-2247), ДНК-вакцину (Watabe и др., *Vaccine*, 19(31), 2001, сс.4434-4444) и инактивированную вакцину
10 против гриппа (Cao и др., *Vaccine*, 10(4), 1992, сс.238-242), причем последняя нашла наиболее широкое применение в промышленности (Lipatov и др., *J Virol*, 78(17), 2004, сс.8951-8959).

Субъединичные вакцины, рекомбинантные гемагглютинин и нейраминидаза (Babai и др., *Vaccine*, 17(9-10), 1999, сс.1223-1238; Crawford и др., *Vaccine*, 17(18), 1999, сс.2265-
15 2274; Johansson и др., *Vaccine*, 17(15-16), 1999, сс.2073-2080) могут являться важной альтернативной инактивированной вакцине, хотя они не нашли в настоящее время применения в качестве имеющихся в продаже вакцин. Очевидно, что получение таких вакцин является более безопасным, чем получение инактивированной вакцины. Кроме
20 того, субъединичные вакцины не вызывают гуморальный иммунный ответ на существующие в организме белки вируса гриппа, и поэтому они позволяют отличать вакцинированных и инфицированных животных (Crawford и др., *Vaccine*, 17(18), 1999, сс.2265-2274).

Белок гемагглютинина представляет собой связывающийся с рецептором и слитый с
25 мембраной гликопротеин вируса гриппа, и он является мишенью для нейтрализующих инфекционность антител. Полный белок гемагглютинина (НА) из H5N1 состоит из 568 аминокислот, имеет молекулярную массу 56 кДа. Молекула НА состоит из субъединиц НА1 и НА2, при этом субъединица НА1 опосредует первоначальный контакт с
30 клеточной мембраной, а НА2 ответственна за слияние с мембраной (Chizmadzhev, *Bioelectrochemistry*, 63(1-2), 2004, сс.129-136).

Системы бакуловирус/клетка насекомого применяли для экспрессии генов гемагглютинина, выделенных из подтипов птичьего гриппа (Babai и др., *Vaccine*, 17(9-
10), 1999, сс.1223-1238; Crawford и др., *Vaccine*, 17(18), 1999, сс.2265-2274; Johansson и
35 др., *Vaccine*, 17(15-16), 1999, сс.2073-2080); Nwe и др., *BMC Microbiology*, 6(16), 2006, doi: 10.1186/1471-2180-6-16). Однако указанные рекомбинантные белки, вероятно, в некоторых случаях могут не обладать защитным действием или обладают лишь невысокой эффективностью в отношении некоторых видов (Treanor и др., *Vaccine*, 19,
40 2001, сс.1732-1737).

Таким образом, существует необходимость в повышении доступности улучшенных вакцин и новых подходов вакцинации для обеспечения борьбы с гриппом и оказания положительного воздействия на вирусную нагрузку при заболевании.

Описание изобретения

45 Перед описанием вариантов осуществления настоящего изобретения следует отметить, что в контексте настоящего описания и в прилагаемой формулы изобретения при упоминании единственного числа подразумевает также и множественное число, если из контекста ясно не следует иное. Так, например, ссылка
50 на «препарат» относится к множеству указанных препаратов; ссылка на «носитель» относится к одному или нескольким носителям или их эквивалентам, известным специалистам в данной области, и т.д. Если не указано иное, то все технические и научные понятия имеют значения, общеизвестные специалистам в области, к которой

относится настоящее изобретение. Все приведенные диапазоны и значения могут отличаться на 1-5%, если специально не указано иное или если иное не известно специалистам в данной области, таким образом, понятие «примерно» исключено из описания. Хотя для применения на практике или оценки настоящего изобретения можно применять любые методы и материалы, подобные или эквивалентные приведенным в настоящем описании, в нем представлены предпочтительные методы, устройства и материалы. Все упомянутые публикации включены в настоящее описание в качестве ссылки с целью описания или раскрытия субстанций, эксципиентов, носителей и методологий, описанных в публикациях, которые можно применять в связи с изобретением. Ничто в настоящем описании не должно рассматриваться как допущение того, что изобретение не имеет права включать задним числом такое описание посредством ссылки на предшествующее изобретение.

Решение указанной выше технической проблемы предложено в описании и вариантах осуществления изобретения, объем которых представлен в формуле изобретения.

Белки вирусов гриппа и кодирующие их молекулы нуклеиновых кислот

Настоящее изобретение относится к белку H5 вируса гриппа, где белок H5 имеет аминокислоту 223N и модификацию 328K+, при этом нумерация аминокислотных положений белка H5 соответствует нумерации аминокислотных положений в приведенной в качестве примера SEQ ID NO:1, и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка H5 встроен второй лизин (K+).

Предпочтительно указанный белок H5 и любой другой белок H5, предлагаемый в изобретении, представляет собой выделенный белок H5. При создании изобретения неожиданно было установлено, что белки H5, которые имеют указанные выше модификации, обладают более высокой антигенностью по сравнению с белками H5, которые не имеют соответствующих аминокислот в положениях 223 и 328/329.

Понятие «гемагглютинин 5 (H5)», или «H5 вируса птичьего гриппа», или «белок H5» в контексте настоящего описания относится, но, не ограничиваясь только ими, к любому встречающемуся в естественных условиях белку H5 и любым модифицированным формам белка H5, включая любой делеционный, несущий замену и/или инсерционный мутант белка H5, где указанные белки H5 имеют аминокислоту 223N и модификацию 328K+.

Нумерация аминокислотных положений белка H5 в контексте настоящего описания в качестве примера представлена в SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:1 обозначает аминокислотную последовательность гемагглютинаина штамма duck/China/E319-2/03 (утиный/Китай/E319-2/03), но в ней отсутствует аминоконцевой сигнальный пептид. Другими словами, при ссылке на аминокислоту в положении 223 (аминокислота 223) подразумевается аминокислотный остаток, который соответствует аминокислоте 223 SEQ ID NO:1. Однако этот не означает, что белки H5, предлагаемые в изобретении, имеют аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO:1. Это обозначает только то, что соответствующие аминокислотные остатки белков H5, предлагаемых в изобретении, представляют собой именно указанный аминокислотный остаток. В данном случае аминокислота 223 должна представлять собой серин (S). Например, понятия «223N» или «155N» означают, что аминокислота в положениях 223 и 155 соответственно (нумерация согласно аминокислотным положениям в SEQ ID NO:1) должна представлять собой аминокислоту аспарагин (N). Другими словами, если ссылка сделана на «белок H5, имеющий аминокислоту 223N», это означает, что аминокислота в молекуле H5 в аминокислотном положении 223

(нумерация согласно аминокислотным положениям в SEQ ID NO:1), которая в норме представляет собой серин, заменена на аспарагин (N). Понятие «328K+» или «модификация 328K+» означает, что в аминокислотное положение 328 белка H5 (нумерация согласно аминокислотным положениям в SEQ ID NO:1) встроены второй лизин (K+). В том случае, когда встречающиеся в естественных условиях аминокислоты в положениях 328 и 329 аминокислотной последовательности представляют собой лизин-лизин, то дополнительный лизин (K) не может быть встроены. Однако в большинстве известных последовательностей H5 в положениях 328 и 329 присутствуют аминокислоты лизин-аргинин. В любом случае понятие «модификация 328K+» означает, что второй лизин (K) может быть встроены между лизином в положении 328 и аргинином в положении 329. В результате модифицированная последовательность должна считываться как лизин-лизин-аргинин (KKR).

Таким образом, настоящее изобретение относится к белку H5 и любым модифицированным формам белка H5, включая делеционный, полученный в результате замены и/или инсерционный мутант белка H5, где указанные белки H5 имеют аминокислоту 223N и модификацию 328K+, где нумерация аминокислотных положений белка H5 соответствует нумерации аминокислотных положений в представленной в качестве примера в SEQ ID NO:1 и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка H5 встроены второй лизин (K+). Очевидно, что любой из белков H5, представленных в настоящем изобретении, является антигенным, т.е. обладает антигенными свойствами при оценке с помощью стандартного для вирусов гриппа теста торможения гемагглютинации.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является любая часть белка H5, т.е. любой пептидный фрагмент, который обладает антигенными свойствами при оценке с помощью стандартного для вирусов гриппа теста торможения гемагглютинации, несущий по меньшей мере аминокислоту 223N и модификацию 328K+, где нумерация аминокислотных положений белка H5 соответствует нумерации аминокислотных положений в представленной в качестве примера в SEQ ID NO:1 и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка H5 встроены второй лизин (K+).

Белок H5 обладает антигенными свойствами, если он ингибирует (тормозит) гемагглютинацию при оценке с помощью стандартного теста торможения гемагглютинации, который описан, например, в примере 2. Как правило, указанный антигенный фрагмент белка H5 содержит 200, 180, 160, 150, 140, 130, 120, 110 или предпочтительно 105 смежных аминокислот аминокислотной последовательности, соответствующей белку H5, как он описан выше, модифицированному или немодифицированному, который обладает антигенными свойствами при оценке с помощью стандартного теста торможения гемагглютинации, который описан, например, в примере 2. Стандартный тест торможения гемагглютинации, например, описан также с дополнительными ссылками у Stephenson и др., Virus Research т.103, 2004, сс.91-95. Однако следует понимать, что описанный в примере 2 HI-тест представляет собой соответствующий эталонный анализ, который можно применять в сочетании со всеми объектами изобретения, которые представлены в настоящем описании.

В целом, HI-тест осуществляли для выявления присутствия HA-специфических антител. Гетерологичный вирус H5N2-подтипа A/chicken/Mexico/232/94 (А/куриный/Мехико/232/94) применяли в концентрации, соответствующей четырем

гемагглютинирующим единицам [4 НА-единиц] в HI-тесте. В титрационных микропланшетах с U-образным дном последовательно смешивали серийные двукратные разведения в ЗФР с равными объемами (25 мкл) содержащего 4 НА-единицы вируса и инкубировали при комнатной температуре (примерно 25°C) в течение 30 мин. Куриные эритроциты в концентрации 0,5% в ЗФР добавляли в лунки, содержащие сыворотку-вирус, и инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Определяли HI-титры в виде обратных величин наибольших разведений сыворотки, при которых обнаружено торможение гемагглютинации.

Следует отметить, что Haesebrouck и Pensaert, 1986, установили, что «может существовать корреляция между HI-титрами в отношении контрольного заражения вирусом и защиты от контрольного заражения». Haesebrouck и Pensaert, 1986, определили также, что свиньи, у которых HI-титры составляли ≥ 40 , были «полностью устойчивы к контрольному заражению и в их дыхательных путях не происходила репликация вирусов при контрольном заражении». Таким образом, достижение при вакцинации свиней HI-титров ≥ 40 должно коррелировать с защитой животных (F. Haesebrouck и M.B. Pensaert, 1986, «Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunized with an inactivated influenza H IN 1 vaccine», Veterinary Microbiology, 11, 1986, сс.239-249).

Можно предположить, что эквивалентные или по меньшей мере близкие эквивалентным HI-титры H5 должны также приводить к полной иммунной защите свиней от вируса птичьего гриппа. Более низкие титры приводят по меньшей мере к сероконверсии у вакцинированных животных и в результате этого к частичной иммунной защите указанных животных, что может также резко снижать риск пандемий.

Кроме того, антигенный фрагмент белка H5, предлагаемый в изобретении, включает, но, не ограничиваясь только ими, делеционные мутанты белка H5, которые содержат:

I. по меньшей мере 35, 30, 25, 20, 18, 15, 13, 10, 9 или наиболее предпочтительно 8 смежных аминокислот аминокислотной последовательности, которые окружают и включают аминокислоту 223N; и

II. по меньшей мере 35, 30, 25, 20, 18, 15, 13, 10, 9 или наиболее предпочтительно 8 смежных аминокислот аминокислотной последовательности, которые окружают и включают аминокислотную модификацию 328K+; и

III. при этом любой из указанных антигенных фрагментов белка H5 опосредует торможение гемагглютинации при оценке с помощью стандартного теста торможения гемагглютинации, описанного в примере 2.

Предпочтительно аминокислоты, окружающие аминокислоту 223N и/или 328K+, соответствуют указанным в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:4.

Кроме того, предпочтительные белки H5, предлагаемые в изобретении, представляют собой:

I. любой из указанных выше белков, имеющий аминокислоту 223N и модификацию 328K+;

II. любой из указанных выше белков, имеющий аминокислоту 94N/223N и модификацию 328K+;

III. любой белок H5 птичьего происхождения, имеющий аминокислоту 223N и модификацию 328K+, где под птичьим происхождением подразумевается, что последовательность H5 выведена из изолята вируса, который первоначально выделен из домашней птицы, зараженной вирусом птичьего гриппа типа 5; или

IV. любой; белок H5 птичьего происхождения, имеющий аминокислоты 94N/223N и

модификацию 328K+, где под птичьим происхождением подразумевается, что последовательность Н5 выведена из изолята вируса, который первоначально выделен из домашней птицы, зараженной вирусом птичьего гриппа типа 5; или

V. любой белок Н5 птичьего происхождения, имеющий аминокислоты 155N/223N и модификацию 328K+, где под птичьим происхождением подразумевается, что последовательность Н5 выведена из изолята вируса, который первоначально выделен из домашней птицы, зараженной вирусом птичьего гриппа типа 5; или

VI. любой белок Н5 птичьего происхождения, имеющий аминокислоты 120N/155N/223N и модификацию 328K+, где под птичьим происхождением подразумевается, что последовательность Н5 выведена из изолята вируса, который первоначально выделен из домашней птицы, зараженной вирусом птичьего гриппа типа 5; или

VII. любой белок Н5, имеющий модификации 94N/223N и модификацию 328K+; или

VIII. любой белок Н5, имеющий модификации 94N/155N/223N и модификацию 328K+; или

IX. любой белок Н5, имеющий модификации 94N/120N/155N/223N и модификацию 328K+; или

X. любой белок Н5, имеющий модификацию 223N, модификацию 328K+ и один или несколько следующих аминокислотных кластеров, выбранных из группы, включающей:

а. ак 93-95: GNF

б. ак 123-125: SDH

в. ак 128-130: SSG

г. ак 138-140: GSS

д. ак 226-228: MDF

е. ак 270-272: EVE

ж. ак 309-311: NKL; или

XI. любой белок Н5, имеющий аминокислоту 223N и модификацию 328K+ и один или несколько следующих аминокислотных кластеров, выбранных из группы, включающей:

а. ак 93-95: GNF

б. ак 128-130: SSG

в. ак 138-140: GSS; или

XII. любой белок Н5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

Кроме того, предпочтительные белки Н5, предлагаемые в изобретении, включают белки Н5, которые описаны у Hoffmann и др., PNAS, т.106, №.36, 6 сентября 2005 г., сс.12915-12920, где белки Н5 включают одну или несколько описанных выше модификаций, по меньшей мере аминокислоту 223N и модификацию 328K+, при этом нумерация аминокислотных положений белка Н5 соответствует нумерации аминокислотных положений, приведенной в качестве примера в SEQ ID NO:1, и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка Н5 встроена вторая лизин (K+). Содержание указанной публикации полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Кроме того, предпочтительные белки Н5, предлагаемые в изобретении, включают белки Н5, которые содержат пептид, который несет аминокислоту 223N и модификацию 328K+, при этом нумерация аминокислотных положений белка Н5 соответствует нумерации аминокислотных положений, приведенной в качестве примера в SEQ ID NO:1, и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное

положение 328 белка H5 встроен второй лизин (K+), и:

I. аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6; или

II. любой пептид, последовательность которого гомологична по меньшей мере на 85%, более предпочтительна последовательность которого гомологична по меньшей мере примерно на 90%, еще более предпочтительна последовательность которого гомологична по меньшей мере примерно на 95%, еще более предпочтительна последовательность которого гомологична по меньшей мере примерно на 97%, еще более предпочтительна последовательность которого гомологична по меньшей мере примерно на 98% и еще более предпочтительна последовательность которого гомологична по меньшей мере примерно на 99% полипептиду, описанному в подпункте I), который опосредует торможение гемагглютинации при оценке стандартным тестом торможения гемагглютинации, который описан выше; или

III. любой антигенный фрагмент полипептидов, представленных в подпунктах I) или II), который содержит по меньшей мере 35, 30, 25, 20, 18, 15, 13, 10, 9 или наиболее предпочтительно 8 смежных аминокислот любого из пептидов, представленных в подпунктах I) или II);

IV. любой из пептидов, представленных в подпунктах I), II) или III), имеющий аминокислоты 36T, 36K, 83A, 83T, 83D, 86A, 86V, 120N, 120S, 155N, 155S, 156A, 156T, 189R, 189K, 212K, 212R, 212E, 223N, 223N или 120N/155N;

V. любой из пептидов, представленных в подпунктах I), II), III) или IV), имеющий один или несколько следующих аминокислотных кластеров, выбранных из группы, включающей:

а. ак 93-95: GNF

б. ак 123-125: SDH

в. ак 128-130: SSG

г. ак 138-140: GSS

д. ак 226-228: MDF

е. ак 270-272: EVE

ж. ак 309-311: NKL; или

VI. любой из пептидов, представленных в подпунктах I), II), III) или IV), имеющий один или несколько следующих аминокислотных кластеров, выбранных из группы, включающей:

а. ак 93-95: GNF

б. ак 128-130: SSG

в. ак 138-140: GSS.

Определение «гомологии последовательностей» в контексте настоящего описания относится к методу определения сходства двух последовательностей. Для определения гомологии последовательностей две или большее количество последовательностей подвергают оптимальному выравниванию и при необходимости интродуцируют брешу. В отличие от оценки идентичности последовательностей при определении гомологии последовательностей консервативные аминокислотные замены считают удовлетворяющими условиям гомологии. Другими словами, для того чтобы полипептид или полинуклеотид имел 95% гомологию последовательности с референс-последовательностью, 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% аминокислотных остатков или нуклеотидов в референс-последовательности должны соответствовать или содержать консервативную замену на другую аминокислоту или

нуклеотид, или количество аминокислот или нуклеотидов, составляющее вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включая консервативные замены, в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Предпочтительно гомологичная последовательность содержит по меньшей мере участок, состоящий из 50, еще более предпочтительно из 100, еще более предпочтительно из 250, еще более предпочтительно из 500 нуклеотидов. При указанном сравнительном анализе первичной структуры гомологию последовательностей оценивают по типу «положение с положением», например, последовательности являются «гомологами» в конкретном положении, если в этом положении нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. Общее количество таких идентичных положений затем делят на общее количество нуклеотидов или аминокислотных остатков в референс-последовательности, получая % гомологии последовательностей. Гомологию последовательностей легко рассчитывать с помощью известных методов, включая, но, не ограничиваясь только ими, методы, описанные в *Computational Molecular Biology*, под ред. Lesk A. N., изд-во Oxford University Press, New York 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, под ред. Smith D.W., изд-во Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, часть I, под ред. Griffin A.M. и Griffin H. G., изд-во, Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge G., изд-во Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, под ред. Gribskov M. и Devereux J., изд-во M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo H. и Lipman D., *SIAM J. Applied Math.*, 48, 1988, с.1073, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Предпочтительные методы определения гомологии последовательностей созданы так, чтобы получать наибольшее соответствие между изучаемыми последовательностями. Методы определения гомологии последовательностей приведены в систему в доступных общественности компьютерных программах, которые позволяют определять идентичность последовательностей между данными последовательностями. Примерами таких программ являются, но, не ограничиваясь только ими, пакет программ GCG (Devereux J. и др., *Nucleic Acids Research*, 12(1), 1984, с.387), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul S.F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215, 1990, сс.403-410). Программа BLASTX является доступной общественности от фирмы NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul S. и др., NCVI NLM NIH Bethesda, MD.20894, Altschul S.F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215, 1990, сс.403-410), содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки). Эти программы позволяют осуществлять оптимальное выравнивание последовательностей, с помощью принимаемых по умолчанию значений, таких как вес бреши, для того чтобы получать наиболее высокий уровень гомологии последовательностей между исследуемой последовательностью и референс-последовательностью.

Кроме того, предпочтительные белки H5 включают белки H5, которые содержат указанную выше модификацию 328K+, и аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, или ее любой иммуногенный фрагмент:

Таблица 1

H5-антигены		Аминокислотные положения [#]									
Наименование последовательности	Основная последовательность	36	83	86	120	155	156	189	212	223	263
223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-
36T/223N/328K+	любой HA H5	T	-	-	-	-	-	-	-	N	-
36K/223N/328K+	любой HA H5	K	-	-	-	-	-	-	-	N	-
83A/223N/328K+	любой HA H5	-	A	-	-	-	-	-	-	N	-
83T/223N/328K+	любой HA H5	-	T	-	-	-	-	-	-	N	-
83D/223N/328K+	любой HA H5	-	D	-	-	-	-	-	-	N	-
86A/223N/328K+	любой HA H5	-	-	A	-	-	-	-	-	N	-
86V/223N/328K+	любой HA H5	-	-	V	-	-	-	-	-	N	-
120N/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	N	-	-	-	-	N	-
120S/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	S	-	-	-	-	N	-
155N/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	N	-	-	-	N	-
155S/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	S	-	-	-	N	-
156A/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	A	-	-	N	-
156T/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	T	-	-	N	-
189R/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	-	R	-	N	-
189K/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	-	K	-	N	-
212K/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	-	-	K	N	-
212R/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	-	-	R	N	-
212E/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	-	-	E	N	-
223N/263A/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	A
223N/263T/328K+	любой HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	T
120N/155N/223N/328K+	любой HA H5	-	-	-	N	N	-	-	-	N	-
A/утиный/Китай/Е319-2/03/328K+	AAR99628	T	A	A	S	D	A	R	K	N	A
A/утиный/Китай/Е319-2/03_223N/328K+	AAR99628	T	A	A	S	D	A	R	K	N	A

Наименование последовательности		Аминокислотные положения [#]									
Наименование последовательности	Основная последовательность	36	83	86	120	155	156	189	212	223	263
A/утиный/Китай/Е319-2/03_120N/223N/328K+	AAR99628	T	A	A	N	D	A	R	K	N	A
A/утиный/Китай/Е319-2/03_155N/223N/328K+	AAR99628	T	A	A	S	N	A	R	K	N	A
A/утиный/Китай/Е319-2/03_120N/155N/223N/328K+	AAR99628	T	A	A	S	N	N	R	K	N	A
HA/НК/213/03/328K+	AY518362	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A
HA/Вьетнам/1203/04		K	T	V	S	S	T	K	R	N	T
HA/Vietnam/1203/04_223N/328K+		K	T	V	S	S	T	K	R	N	T
HA/Вьетнам/3046/04_223N/328K+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T
HA/Вьетнам/3 062/04_223N/328K+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T
HA/куриный/Вьетнам/39/04_223N/328K+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T
HA/соколиный/НК-D0028/04_223N/328K+		T	A	A	S	S	A	K	E	N	A
HA/утиный/Сингапур/3/97_223N/328K+		T	D	V	S	N	A	K	E	N	A
HA/НК/156/97/328K+		T	A	A	S	S	A	K	E	N	T

[#] аминокислотные положения, представленные в таблице 1, соответствуют положениям, приведенным в качестве примера в SEQ ID NO:1. Другими словами, аминокислота 223 в таблице 1 соответствует аминокислоте 223 в последовательности SEQ ID NO:1.

- означает, что аминокислоты в этих положениях отличаются от представленных в референс-последовательности.

Кроме того, настоящее изобретение относится к белкам H5, которые имеют по меньшей мере аминокислоту 223N и модификацию 328K+, где нумерация аминокислотных положений белка H5 соответствует нумерации аминокислотных положений, приведенной в качестве примера в SEQ ID NO:1, и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка H5 встроен второй лизин (K+), и которые содержат:

I. пептид, включающий последовательности, которые имеют регистрационные номера NCBI: AAT65209, CAJ32556, ABC47656, CAF21874, CAF21870, AAC58998, AAC58997, AAC58996, AAC58994, AAC58993, AAC58992, AAC58991, AAC58990, AAC58995, AAS45134, AAN17270, AAN17269, AAN17268, AAN17267, AAN17266, AAN17265, AAN17264, AAN17263, AAN17262, AAN17261, AAN17260, AAN17259,

AAN17257, AAN17256, AAN17255, AAN17254, AAA43083, AAA43082, AAB19079,
 BAE48696, BAE48693, BAE48696, BAE48695, BAE48694, BAE48692, BAE48691,
 BAE48690, BAE48689, BAE48688, BAE48687, BAE48686, BAE48685, BAE48684,
 BAE48683, AAC58999, ABC72082, AAV91149, AAP71993, AAP71992, AAP71991,
 5 AAP71990, AAP71989, AAP72011, AAP72010, AAP72009, AAP72008, AAP72007,
 AAP72006, AAP72005, AAP72004, AAP72003, AAP72002, AAP72001, AAP72000,
 AAP71999, AAP71998, AAP71997, AAP71996, AAP71995, AAP71994. AAF99718,
 ABF58847, AAG38534, AAC32102, AAC32099, AAL75847, AAC32101, AAC32098,
 10 AAC32088, AAC32078, AAR99628, AAC32100, AAM49555, AAL75843, AAL75839,
 AAD13573, AAD13568, AAF04720, AAF04719, AAC34263, AAR16155, AAD13574,
 AAD13570, AAD13575, AAD13572, AAD13569, AAD13567, AAD13566, AAK57506,
 AAG01225, AAG01215, AAG01205, AAG01195 или ABD83813, модифицированные, как
 описано выше, это означает, что эти последовательности несут вышеуказанные
 15 модификации 223N и 328K+, которые не являются частью последовательностей дикого
 типа; или

II. любой пептид, последовательность которого гомологична по меньшей мере
 на 85%, более предпочтительна последовательность которого гомологична по
 20 меньшей мере примерно на 90%, еще более предпочтительна последовательность
 которого гомологична по меньшей мере примерно на 95%, еще более
 предпочтительна последовательность которого гомологична по меньшей мере
 примерно на 97%, еще более предпочтительна последовательность которого
 гомологична по меньшей мере примерно на 98% и еще более предпочтительна
 25 последовательность которого гомологична по меньшей мере примерно на 99%
 полипептиду, описанному в подпункте I), и который опосредует торможение
 гемагглютинации при оценке стандартным тестом торможения гемагглютинации,
 который описан выше;

30 III. любой из пептидов, представленных в подпунктах I) или II), имеющий
 аминокислоты 36T, 36K, 83A, 83T, 83D, 86A, 86V, 120N, 120S, 155N, 155S, 156A, 156T,
 189R, 189K, 212K, 212K, 212E, 263A, 263T или 120N/155N; или

IV. любой из пептидов, представленных в подпунктах I), II) или III), имеющий один
 или несколько следующих аминокислотных кластеров, выбранных из группы,
 35 включающей:

- а. ак93-95: GNF
- б. ак 123-125: SDH
- в. ак 128-130: SSG
- 40 г. ак 138-140: GSS
- д. ак 226-228: MDF
- е. ак 270-272: EVE
- ж. ак 309-311: NKL; или

V. любой из пептидов, представленных в подпунктах I), II), III) или IV), имеющий
 45 один или несколько следующих аминокислотных кластеров, выбранных из группы,
 включающей:

- а. ак 93-95: GNF
- б. ак 128-130: SSG
- 50 в. ак 138-140: GSS.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения являются также
 молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любой из белков H5, описанных
 выше. Предпочтительно указанные молекулы нуклеиновых кислот представляют

собой молекулы РНК, ДНК или ДНК-копии (кДНК). Таким образом, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекуле кДНК, кодирующей белок Н5 или любые модифицированные формы белка Н5, включая любой делеционный, несущий замену и/или инсерционный мутант белка Н5, где указанные белки Н5 имеют аминокислоту 223N и модификацию 328K+, при этом нумерация аминокислотных положений белка Н5 соответствует нумерации аминокислотных положений, приведенной в качестве примера в SEQ ID NO:1, и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка Н5 встроен второй лизин (K+).

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является также молекула нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекула кДНК, кодирующая любой фрагмент белка Н5, т.е. кодирующая любой пептидный фрагмент, который обладает антигенными свойствами при оценке с помощью стандартного теста торможения гемагглютинации, описанного выше, и который имеет по меньшей мере аминокислоту 223N и модификацию 328K+, при этом нумерация аминокислотных положений белка Н5 соответствует нумерации аминокислотных положений, приведенной в качестве примера в SEQ ID NO:1, и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка Н5 встроен второй лизин (K+). Как правило, такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют антигенный фрагмент белка Н5, содержат 600, 540, 480, 450, 420, 390, 360, 330 или наиболее предпочтительно 315 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, которая кодирует указанный выше белок Н5, модифицированный или немодифицированный, и который обладает антигенными свойствами при оценке с помощью стандартного теста торможения гемагглютинации, описанного выше.

Другие варианты антигенных фрагментов белка Н5 описаны выше. В компетенции специалиста в данной области находится конструирование любых указанных молекул нуклеиновых кислот, предпочтительно молекул кДНК, которые кодируют антигенный фрагмент белка Н5, описанный выше. Они включают также, но, не ограничиваясь только ими, конструирование молекул нуклеиновых кислот, предпочтительно молекул кДНК, которые кодируют описанные выше антигенные фрагменты белка Н5, в том числе делеционные мутанты белка Н5, которые содержат:

I. по меньшей мере 105, 90, 75, 60, 48, 45, 39, 30, 27 или наиболее предпочтительно 24 смежных кодирующих аминокислоту нуклеотидов нуклеотидной последовательности, которая окружает и включает кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислоту 223N; и

II. по меньшей мере 105, 90, 75, 60, 48, 45, 39, 30, 27 или наиболее предпочтительно 24 смежных кодирующих аминокислоту нуклеотидов нуклеотидной последовательности, которая окружает и включает кодирующую последовательность, которая кодирует модификацию 328K+; и

III. при этом, любой указанный антигенный фрагмент белка Н5 опосредует торможение гемагглютинации при оценке с помощью стандартного теста торможения гемагглютинации, который описан в примере 2.

Предпочтительными нуклеотидами, которые окружают нуклеотиды, которые кодируют аминокислоты 223N и/или 328K+, являются те нуклеотиды, которые кодируют SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:4.

Кроме того, предпочтительными молекулами нуклеиновых кислот, кодирующих белок Н5, предлагаемый в изобретении, являются:

I. любая из указанных выше молекул, которая кодирует аминокислоту 223N и

модификацию 328K+;

II. любая из указанных выше молекул, которая кодирует аминокислоту 94N/223N и модификацию 328K+;

5 III. любая из молекул нуклеиновых кислот птичьего происхождения, кодирующая аминокислоту 223N и модификацию 328K+, где под птичьим происхождением подразумевается, что последовательность H5 выведена из изолята вируса, который первоначально выделен из домашней птицы, зараженной вирусом птичьего гриппа типа 5; или

10 IV. любая из молекул нуклеиновых кислот птичьего происхождения, кодирующая аминокислоты 94N/223N и модификацию 328K+, где под птичьим происхождением подразумевается, что последовательность H5 выведена из изолята вируса, который первоначально выделен из домашней птицы, зараженной вирусом птичьего гриппа типа 5; или

15 V. любая из молекул нуклеиновых кислот птичьего происхождения, кодирующая аминокислоты 155N/223N и модификацию 328K+, где под птичьим происхождением подразумевается, что последовательность H5 выведена из изолята вируса, который первоначально выделен из домашней птицы, зараженной вирусом птичьего гриппа типа 5; или

20 VI. любая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок H5 птичьего происхождения, который имеет аминокислоты 120N/155N/223N и модификацию 328K+, где под птичьим происхождением подразумевается, что последовательность H5 выведена из изолята вируса, который первоначально выделен из домашней птицы, зараженной вирусом птичьего гриппа типа 5; или

VII. любая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок H5, который имеет модификации 94N/223N и модификацию 328K+; или

30 VIII. любая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок H5, который имеет модификации 94N/155N/223N и модификацию 328K+; или

IX. любая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок H5, который имеет модификации 94N/120N/155N/223N и модификацию 328K+; или

35 X. любая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок H5, который имеет модификации 223N, модификацию 328K+ и один или несколько следующих аминокислотных кластеров, выбранных из группы, включающей:

а. ак 93-95: GNF

б. ак 123-125: SDH

в. ак 128-130: SSG

40 г. ак 138-140: GSS

д. ак 226-228: MDF

е. ак 270-272: EVE

ж. ак 309-311: NKL; или

45 XI. любая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок H5, который имеет аминокислоту 223N, модификацию 328K+ и один или несколько следующих аминокислотных кластеров, выбранных из группы, включающей:

а. ак 93-95: GNF

б. ак 128-130: SSG

50 в. ак 138-140: GSS; или

XII. любая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок H5, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

Кроме того, предпочтительные белки H5, предлагаемые в изобретении, включают

белки Н5, которые описаны у Hoffmann и др., PNAS, т.106, №.36, 6 сентября 2005 г.,
 сс.12915-12920, где белки Н5 включают одну или несколько описанных выше
 модификаций, по меньшей мере аминокислоту 223N и модификацию 328K+, при этом
 нумерация аминокислотных положений белка Н5 соответствует нумерации
 5 аминокислотных положений, приведенной в качестве примера в SEQ ID NO:1, и где
 модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка Н5 встроен
 второй лизин (K+). Содержание указанной публикации полностью включено в
 настоящее описание в качестве ссылки. Таким образом, следующими вариантами
 10 осуществления настоящего изобретения является также молекула любой нуклеиновой
 кислоты, предпочтительно молекула кДНК, которая кодирует любой их белков,
 описанных у Hoffmann и др., PNAS, т.106, №.36, 6 сентября 2005 г., сс.12915-12920, где
 белки Н5 включают одну или несколько описанных выше модификаций, по меньшей
 15 мере аминокислоту 223N и модификацию 328K+, при этом нумерация аминокислотных
 положений белка Н5 соответствует нумерации аминокислотных положений,
 приведенной в качестве примера в SEQ ID NO:1, и где модификация 328K+ означает,
 что в аминокислотное положение 328 белка Н5 встроен второй лизин (K+).

Методы интродукции любой из указанных выше модификаций в нуклеотидную
 20 последовательность, включая кодирующую последовательность белка Н5 вируса
 гриппа, хорошо известны в данной области. Геномную последовательность полного
 вируса гриппа можно модифицировать согласно изобретению, например, с помощью
 методов, описанных в US 6951754, в том числе в дополнительных, приведенных в нем
 ссылках.

Кроме того, можно применять традиционные методы молекулярной биологии,
 микробиологии и рекомбинантной ДНК, известные в данной области, для
 модификации нуклеотидной последовательности, которая кодирует антиген,
 представленный в настоящем описании. Такие методы подробно описаны в
 30 литературе (см., например, Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-ое
 изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *DNA
 Cloning: A Practical Approach*, т. I и т. II, под ред. D. N. Glover, 1985; *Oligonucleotide
 Synthesis*, под ред. M. J. Gait, 1984; *Nucleic Acid Hybridization* под ред. B. D. Hames и S. J.
 Higgins, 1985; *Transcription And Translation*, под ред. B. D. Hames и S. J. Higgins, 1984;
 35 *Animal Cell Culture*, под ред. R. I. Freshney, 1986; *Immobilized Cells And Enzymes*, изд-
 во IRL Press, 1986; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning*, 1984, *Current Protocols
 in Molecular Biology*, под ред. F. M. Ausubel и др., изд-во, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является также
 40 вектор, который содержит любую из описанных выше молекул нуклеиновых кислот.
 Другими словами, настоящее изобретение относится к вектору, который включает
 кодирующую последовательность любого из представленных белков Н5 или его
 фрагмент, указанный выше. Предпочтительно вектор представляет собой
 экспрессионный вектор, который обеспечивает экспрессию любого из указанных
 45 выше белков Н5 или их фрагментов. Векторы, предлагаемые в изобретении,
 представляют собой векторы, пригодные для трансфекции или заражения клеток
 бактерий, дрожжей или животных *in vitro* или *in vivo*.

Векторы и методы создания и/или применения векторов (или рекомбинантов) для
 50 экспрессии могут быть такими же или аналогичными тем, которые описаны среди
 прочего в: US 4603112, 4769330, 5174993, 5505941, 5338683, 5494807, 4722848, 5942235,
 5364773, 5762938, 5770212, 5942235, 382425, публикациям PCT WO 94/16716, WO
 96/39491, WO 95/30018, Paoletti, «Applications of pox virus vectors to vaccination: An

update», PNAS USA 93, октябрь 1996 г., сс.11349-11353, Moss, «Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety», PNAS USA 93, октябрь 1996 г., сс.11341-11348, Smith и др., US 4745051, (рекомбинантный бакуловир), Methods in Molecular Biology 39, «Baculovirus Expression Protocols» под ред. Richardson C.D., 1995, изд-во Humana Press Inc., Smith и др., «Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector», Molecular and Cellular Biology, т.3, №.12, декабрь 1983 г., сс.2156-2165; Pennock и др., «Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector». Molecular and Cellular Biology Mar., т.4, №.3, 1984, сс.399-406; EPA 0370573, заявка на патент США 920197, зарегистрированная 16 октября 1986 г., публикация EP 265785, US 4769331 (рекомбинантный вирус герпеса простого), Roizman, «The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors», PNAS USA 93, октябрь 1996 г., сс.11307-11312, Andreansky и др., «The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors», PNAS USA 93, октябрь 1996 г., сс.11313-11318, Robertson и др., «Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes», PNAS USA 93, октябрь 1996 г., сс.11334-11340, Frolov и др., «Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications», PNAS USA 93, октябрь 1996 г., сс.11371-11377, Kitson и др., J.Virol. 65, 1991, сс.3068-3075,; US 5591439, 5552143, WO 98/00166, принятые заявки на патент США, сер. №№08/675556 и 08/675566, обе зарегистрированы 3 июля 1996 г. (рекомбинантный аденовирус), Grunhaus и др., 1992 «Adenovirus as cloning vectors». Seminars in Virology, т.3, 1993, сс.237-252, Ballay и др., EMBO Journal, т.4, сс.3861-65, Graham, Tibtech 8, апрель 1990, сс.85-87, Prevec и др., J. Gen Virol. 70, с.42434, PCT WO 91/11525, Feigner и др., J. Biol. Chem. 269, 1994, сс.2550-2561, Science, 259, 1993, сс.1745-1749 и McClements и др., «Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease», PNAS USA 93, октябрь 1996 г., сс.11414-11420, и US 5591639, 5589466 и 5580859, а также WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660, Tang и др., Nature и Furth и др., Analytical Biochemistry, relating to DNA expression vectors. Методы описаны также в WO 98/33510; Ju и др., Diabetologia, 41, 1998, сс.736-739 (лентивирусная система экспрессии); Sanford и др., US 4945050; Fischbachet и др, (фирма Intracel), WO 90/01543; Robinson и др., Seminars in Immunology т.9, 1997, сс.271-283, (системы на основе ДНК-вектора); Szoka и др., US (метод инсерции ДНК в живые клетки); McCormick и др., US 5677178 (применение цитопатических вирусов); и US 5928913 (векторы для введения гена) (см. также другие документы, процитированные в указанных выше).

Вирусный вектор выбирают, например, из вирусов герпеса свиней, такого как вирус, вызывающий болезнь Ауески, свиной аденовирус, поксивирус, прежде всего вирус коровьей оспы, вирус оспы птиц, вирус оспы канареек и вируса оспы свиней, а также ДНК-векторы (ДНК-плазмиды), и их целесообразно применять для воплощения изобретения на практике.

Способы получения белков H5, предлагаемых в настоящем изобретении

Другим объектом настоящего изобретения являются способы получения и/или выделения рекомбинантного белка H5 в значительных количествах путем: I) осуществления заражения чувствительных клеток в культуре рекомбинантным вирусным вектором, содержащим кодирующие H5 последовательности ДНК, при этом белок H5 экспрессируется с помощью рекомбинантного вирусного вектора, и II) последующего выделения белка H5 из клеточной культуры. Понятие «значительные количества» белка H5 относится к уровням, но не ограничиваясь только ими,

составляющим более примерно 20 мкг/мл клеточной культуры, предпочтительно более примерно 25 мкг/мл, еще более предпочтительно более примерно 30 мкг/мл, еще более предпочтительно более примерно 40 мкг/мл, еще более предпочтительно более примерно 50 мкг/мл, еще более предпочтительно более примерно 60 мкг/мл, еще более предпочтительно более примерно 80 мкг/мл, еще более предпочтительно более примерно 100 мкг/мл, еще более предпочтительно более примерно 150 мкг/мл, наиболее предпочтительно более примерно 190 мкг/мл.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения белок Н5 выделяют путем сбора цельных (т.е. интактных) SF+-клеток, экспрессирующих белок Н5.

Предпочтительными клетками являются клетки, чувствительные к заражению соответствующим рекомбинантным вирусным вектором, содержащим ДНК Н5 и экспрессирующим белок Н5. Предпочтительно клетки представляют собой клетки насекомых, и наиболее предпочтительно они представляют собой клетки насекомых, которые поступают в продажу под торговым знаком Sf+ (фирма Protein Sciences Corporation, Мериленд, шт.Коннектикут). В предпочтительных клеточных культурах количество клеток составляет примерно $0,3-2,0 \times 10^6$ клеток/мл, более предпочтительно примерно $0,35-1,9 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно примерно $0,4-1,8 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно примерно $0,45-1,7 \times 10^6$ клеток/мл и наиболее предпочтительно примерно $0,5-1,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Предпочтительными вирусными векторами являются бакуловирусы, такие как BaculoGold (фирма BD Biosciences Pharmingen, Сан-Диего, шт.Калифорния), при этом предусматривается, что клетками-продуцентами являются клетки насекомых. Хотя бакуловирусная система экспрессии является предпочтительной, специалистам в данной области должно быть очевидно, что для целей настоящего изобретения можно применять другие экспрессионные системы, в частности экспрессию Н5 можно осуществлять в супернатанте клеточной культуры. В указанных других экспрессионных системах может требоваться применение сигнальной последовательности для осуществления экспрессии Н5 в средах.

Специалистам в данной области известны также соответствующие питательные среды, при этом предпочтительными питательными средами являются бессывороточные среды для клеток насекомых, такие как Excell 420 (фирма JRN Biosciences, Inc., Ленекса, шт.Канзас) и т.п.

Рекомбинантный вирусный вектор, содержащий последовательности ДНК Н5, предпочтительно имеет множественность заражения (МОИ), составляющую примерно 0,03-1,5, более предпочтительно примерно 0,05-1,3, еще более предпочтительно примерно 0,09-1,1 и наиболее предпочтительно 0,1-1,0, когда его применяют для заражения чувствительных клеток. Предпочтительно указанные выше значения МОИ выражены в пересчете на 1 мл жидкой клеточной культуры.

Предпочтительно в предлагаемом в изобретении способе подразумевается, что заражают $0,35-1,9 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно примерно $0,4-1,8 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно примерно $0,45-1,7 \times 10^6$ клеток/мл и наиболее предпочтительно примерно $0,5-1,5 \times 10^6$ клеток/мл, рекомбинантным вирусным вектором, содержащим ДНК Н5 и экспрессирующим белок Н5, при МОИ (множественность заражения), составляющей примерно 0,03-1,5, более предпочтительно примерно 0,05-1,3, еще более предпочтительно примерно 0,09-1,1 и наиболее предпочтительно примерно 0,1-1,0.

Зараженные клетки затем инкубируют в течение периода времени, составляющего вплоть до 10 дней, более предпочтительно от 2 дней до примерно 10 дней, еще более предпочтительно от примерно 4 дней до примерно 9 дней и наиболее предпочтительно от примерно 5 дней до примерно 8 дней. Предпочтительные условия инкубации
 5 включают температуру примерно 22-32°C, более предпочтительно примерно 24-30°C, еще более предпочтительно примерно 25-29°C, еще более предпочтительно примерно 26-28°C и наиболее предпочтительно примерно 27°C. Предпочтительно в Sf+-клетках после инкубации оценивают характерные индуцируемые бакуловирусом
 10 изменения. Такая оценка может включать мониторинг тенденций клеточной плотности и снижения жизнеспособности во время периода после заражения. Было установлено, что пик вирусного титра обнаружен через 3-5 дней после заражения, а пик экспрессии белка Н5 в клетках выявлен между 5 и 8 днями и/или когда жизнеспособность клеток снижена до менее 10%.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является способ получения и/или выделения рекомбинантного белка Н5, предпочтительно в указанных выше количества, заключающийся в том, что I) осуществляют заражение
 15 определенного количества чувствительных клеток (см. выше) в культуре рекомбинантным вирусным вектором при указанном выше значении MOI, II) экспрессируют белок Н5 с помощью рекомбинантного вирусного вектора и III) затем выделяют белок Н5 из полученных клеток через 5-8 дней после заражения и/или когда жизнеспособность клеток снизится до менее 10%. Предпочтительно рекомбинантный
 20 вирусный вектор представляет собой рекомбинантный бакуловирус, содержащий кодирующие последовательности ДНК Н5, а клетки представляют собой Sf+-клетки. Кроме того, предпочтительно культуру периодически подвергают макроскопическому и микроскопическому обследованию для получения данных о загрязнении или атипичных изменениях клеточной морфологии в процессе периода после заражения.
 25 Любую культуру, содержащую какое-либо загрязнение, следует удалять.

Для выделения белка Н5, который можно применять в иммуногенной или иммунологической композиции, такой как вакцина, предпочтительным является включение стадии инактивации для инактивации вирусного вектора.

Понятие «иммуногенная или иммунологическая композиция» относится к
 35 композиции, предлагаемой в изобретении, которая содержит по меньшей мере один антиген, вызывающий иммунологический ответ в хозяине, такой как клеточный и/или гуморальный иммунный ответ на представляющую интерес композицию или вакцину. Как правило, «иммунологический ответ» включает, но не ограничиваясь только ими,
 40 одну или несколько следующих реакций: производство или активация антител, В-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток-супрессоров и/или цитотоксических Т-клеток и/или гамма-дельта-Т-клеток, специфических в отношении антигена или антигенов, входящих в состав представляющей интерес композиции или вакцины. Предпочтительно у хозяина, у которого возникает терапевтический или защитный
 45 иммунный ответ, такой как устойчивость к новой инфекции, должно происходить снижение развития и/или серьезности клинических симптомов заболевания. Указанную защиту можно продемонстрировать либо по снижению или отсутствию симптомов, характерных для зараженного хозяина, более быстрому восстановлению и/или по пониженному вирусному титру у зараженного хозяина.

Таким образом, настоящее изобретение относится также к способу получения и/или выделения рекомбинантного белка Н5, предпочтительно в указанных выше количества, заключающемся в том, что I) осуществляют заражение определенного

количества чувствительных клеток (см. выше) в культуре рекомбинантным вирусным вектором при указанном выше значении MOI, II) экспрессируют белок Н5 с помощью рекомбинантного вирусного вектора и III) затем выделяют белок Н5 из полученных клеток через 5-8 дней после заражения и/или когда жизнеспособность клеток снизится до менее 10%, и IV) инактивируют рекомбинантный вирусный вектор.

Предпочтительно указанную инактивацию осуществляют непосредственно до или непосредственно после стадии фильтрации, при этом предпочтительно инактивацию осуществляют после стадии фильтрации. Для целей настоящего изобретения можно использовать любой общепринятый метод инактивации. Так, инактивацию можно осуществлять путем химической и/или физической обработки. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения определяют объем собранной жидкости и температуру доводят примерно до 32-42°C, более предпочтительно примерно до 34-40°C и наиболее предпочтительно примерно 35-39°C. Предпочтительные методы инактивации включают добавление циклизованного бинарного этиленимина (BEI), предпочтительно в концентрации от примерно 1 до примерно 20 мМ, предпочтительно от примерно 2 до примерно 10 мМ, еще более предпочтительно от примерно 2 до примерно 8 мМ, еще более предпочтительно от примерно 3 до примерно 7 мМ, наиболее предпочтительно примерно 5 мМ. Например, инактивация включает добавления раствора гидробромида 2-бромэтиленамина, предпочтительно примерно 0,4 М, который был циклизован до 0,4 М бинарного этиленимина (BEI) в 0,3 н. NaOH, к жидкостям до получения конечной концентрации примерно 5 мМ BEI. Предпочтительно затем жидкости перемешивают в течение 72-96 ч и инаktivированные собранные жидкости можно хранить в замороженном состоянии при температуре -40°C или ниже или примерно 1-7°C. После завершения инактивации добавляют раствор тиосульфата натрия, предпочтительно 1,0 М, для нейтрализации каких-либо остаточных количеств BEI. Предпочтительно тиосульфат натрия добавляют в количестве, эквивалентном относительно количества BEI, добавленного ранее для инактивации. Например, если BEI добавляют до конечной концентрации 5 мМ, то добавляют 1,0 М тиосульфат натрия до достижения конечной минимальной концентрации 5 мМ для нейтрализации каких-либо остаточных количеств BEI.

Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является способ получения рекомбинантного белка Н5, предпочтительно в указанных выше количествах, заключающийся в том, что I) осуществляют заражение определенного количества чувствительных клеток (см. выше) в культуре рекомбинантным вирусным вектором при указанном выше значении MOI, II) экспрессируют белок Н5 с помощью рекомбинантного вирусного вектора и III) затем выделяют белок Н5 из полученных клеток через 5-8 дней после заражения и/или когда жизнеспособность клеток снизится до менее 10%, и IV) инактивируют рекомбинантный вирусный вектор. Предпочтительно рекомбинантный вирусный вектор представляет собой бакуловирус, содержащий кодирующие последовательности ДНК Н5, и клетки представляют собой SF+-клетки. Предпочтительные стадии инактивации описаны выше. Предпочтительно инактивацию осуществляют примерно при 35-39°C и в присутствии 2-8 мМ BEI, еще более предпочтительно в присутствии примерно 5 мМ BEI.

Таким образом, согласно еще одному объекту настоящего изобретения описанный выше способ включает также стадию нейтрализации после стадии IV. На стадии V) добавляют в эквивалентном количестве агент, который нейтрализует инактивирующий агент в растворе. Предпочтительно, если инактивирующий агент

представляет собой ВЕІ, то предпочтительно добавляют тиосульфат натрия до достижения эквивалентного количества. Таким образом, Согласно еще одному объекту изобретения стадия V) заключается в том, что добавляют раствор тиосульфата натрия до конечной концентрации от примерно 1 до примерно 20 мМ, предпочтительно от примерно 2 до примерно 10 мМ, еще более предпочтительно от примерно 2 до примерно 8 мМ, еще более предпочтительно от примерно 3 до примерно 7 мМ, наиболее предпочтительно примерно 5 мМ, когда инактивирующий агент представляет собой ВЕІ.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения и прежде всего в вариантах, которые позволяют применять рекомбинантный белок Н5 в иммуногенной композиции, такой как вакцина, каждую партию собранного белка Н5 следует тестировать в отношении инактивации путем пересева в зависимые от прикрепления чувствительные к бакуловирусам клетки насекомых, такие как Sf9-клетки. В предпочтительном варианте этой оценки 150 см³ монослоя соответствующей клеточной культуры инокулируют 1,0 мл инаktivированных содержащих Н5 жидкостей и выдерживают при 25-29°C в течение 14 дней по меньшей мере с двумя пересевами. В конце периода поддержания клеточные монослои оценивают в отношении цитопатогенного действия (ЦПД), типичного для содержащего Н5 бакуловируса. Предпочтительно применяют также положительные вирусные контроли. Такие контроли могут представлять собой только одну культуру Sf9-клеток, инокулированных неактивированным содержащим Н5 референс-бакуловирусом, и одну колбу с оставшимися неинокулированными Sf9-клетками. После инкубации и пересева отсутствие зараженных вирусом клеток в обработанных ВЕІ содержащих вирусы жидкостях должно удовлетворять требованиям теста на инактивацию. В отношении контрольных клеток, инокулированных референс-вирусом, должно проявляться ЦПД, характерное для содержащего Н5 бакуловируса, а в неинокулированной колбе не должны присутствовать признаки связанного с Н5 бакуловируса ЦПД. В другом варианте в конце стадии поддержания можно собирать образцы супернатанта и инокулировать Sf9-клетки на 96-луночном планшете, загруженном Sf9-клетками, и затем поддерживать при 25-29°C в течение 5-6 дней. Затем планшет фиксируют и окрашивают антителом к Н5, конъюгированным с ФИТЦ, или любым меченым антителом к специфическим для бакуловируса белкам (т.е. gp64). Отсутствие ЦПД, экспрессии Н5 или экспрессии специфических белков бакуловируса (т.е. gp64) в обработанных ВЕІ содержащих вирусы жидкостях удовлетворяют требованиям теста на инактивацию. В контрольных клетках, инокулированных референс-вирусом, должны проявляться ЦПД и активность, выявляемая методом непрямой иммунофлуоресценции (IFA-активность), а в неинокулированной колбе не должны присутствовать признаки связанного с Н5 бакуловируса ЦПД и должна отсутствовать IFA-активность.

Таким образом, еще одним объектом изобретения является тест на инактивацию, предназначенный для определения эффективности инактивации рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего белок, включающий следующие стадии, на которых: I) приводят в контакт по меньшей мере часть культуральной жидкости, содержащей рекомбинантный вирусный вектор, с инактивирующим агентом, предпочтительно описанным выше, II) добавляют нейтрализующий агент для нейтрализации инактивирующего агента, предпочтительно описанный выше, и III) определяют остаточную инфективность с помощью описанных выше анализов.

После инактивации относительное количество рекомбинантного белка Н5 в образце можно определять различными путями. Предпочтительными методами количественной оценки являются ДСН-ПААГ-денситометрия, ELISA и опыты с использованием вакцинации животных, которые основаны на корреляции известных количеств вакцины и клиническими последствиями (серология и т.д.). Когда для количественной оценки применяют ДСН-ПААГ, то образец продукта, содержащий неизвестное количество рекомбинантного белка Н5, разгоняют в геле вместе с образцами, которые содержат различные известные количества рекомбинантного белка Н5. Затем можно получать стандартную кривую на основе данных для образцов с известным содержанием белка и количество рекомбинантного Н5 в образцах с неизвестным содержанием можно определять путем сравнения со стандартной кривой. Поскольку ELISA, как правило, признаны в качестве индустриального стандарта для количественной оценки антигенов, то этот анализ является предпочтительным для количественной оценки.

Вакцины, содержащие белки Н5 или кодирующие их молекулы нуклеиновых кислот или векторы

Еще одним объектом настоящего изобретения являются вакцины или фармацевтические композиции в целом, которые содержат:

I. один или несколько белков Н5, предлагаемых в настоящем изобретении;

II. одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, предлагаемых в настоящем изобретении, которые кодируют любой из белков Н5; и/или

III. Один или несколько векторов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые включают любую из молекул нуклеиновых кислот и кодируют любой из указанных белков Н5, предлагаемых в настоящем изобретении; и

IV. фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

Понятие «фармацевтическая композиция», «фармацевтическая композиция/вакцина» в контексте настоящего описания включают, но не ограничиваясь только ими, вакцины, предназначенные для снижения или предупреждения инфекции, или для включения в композицию, предлагаемую в изобретении, предназначенную для лечения и снижения инфекции.

Получение вакцин, предпочтительно кДНК-вакцин, на основе нуклеиновых кислот, кодирующих гемагглютинин гриппа, описано, например, у Deck и др., Vaccine 15(1), 1997, сс.71-78; Ulmer и др., Science, 259, 1993, сс.1745-1749; Ulmer и др., Vaccine, 12(16), 1994, сс.1541-1544. Любой из описанных методов можно применять для получения вакцин, предпочтительно кДНК-вакцин, на основе нуклеиновых кислот, кодирующих белок Н5 гриппа.

Кроме того, вакцину, которая содержит предлагаемый в изобретении белок Н5 или его фрагмент, можно получать с использованием традиционных подходов, например методами рекомбинантной экспрессии или методами биохимической очистки и разделения. Методы рекомбинантной экспрессии, включая методы экспрессии в клетках насекомых, хорошо известны в данной области и описаны, например, у Sambrook и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; DNA Cloning: A Practical Approach, т.т. I и II под ред. D. N. Glover, 1985; Oligonucleotide Synthesis под ред. M. J. Gait, 1984; Nucleic Acid Hybridization, под ред. B. D. Hames и S. J. Higgins, 1985; Transcription And Translation, под ред. B. D. Hames и S. J. Higgins, 1984; Animal Cell Culture, под ред. R. I. Freshney, 1986; Immobilized Cells And Enzymes, изд-во IRL Press, 1986; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984; Current Protocols in Molecular Biology, под ред.

F. M. Ausubel и др., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 1994. Кроме того, примерами хорошо изученных рекомбинантных экспрессионных систем являются бактериальные системы экспрессии, такие как *E. coli* или *B. subtilis*, экспрессионные системы на основе дрожжей, таких как *S. cerevisiae* или *S. pombe*, или экспрессионные системы на основе
 5 клеток млекопитающих, например системы экспрессии на основе клеток ВНК, CHO и/или NSO. Такие системы хорошо известны в данной области, и, как правило, их можно покупать через фирму Clontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, USA. Другие стратегии экспрессии описаны, например, у Luschow
 10 и др., Vaccine №19, 2001, сс.4249-425 или у Veit и др., PNAS, т.103, 2006, сс.8197-8202. Кроме того, хорошо известны системы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, и они описаны, например, в US 5436146 или WO 2002/03872, в том числе в дополнительных приведенных в указанных документах ссылках. Кроме того, системы экспрессии на основе вируса коровьей оспы (оспа,
 15 болезнь с высыпаниями на коже), например, описанные в US 6265183, в том числе в дополнительных приведенных в нем ссылках, также являются хорошо известными и их можно применять для получения рекомбинантного(ых) антигена(ов), антигенной(ых) композиции(ий) согласно изобретению. Другие пригодные
 20 экспрессионные системы созданы на основе рекомбинантных вирусов Попова, таких как ОВ-40, вирус птичьего гриппа, вирус псевдобешенства и ретровирусы.

Приемлемые фармацевтические композиции/вакцины, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать также предлагаемый в настоящем изобретении
 25 инактивированный вирус, который содержит белок Н5, непатогенную версию живого вируса, содержащего белок Н5, препарат и/или фрагмент вируса, где препарат и/или фрагмент содержат белок Н5, предлагаемый в настоящем изобретении.

Специалистам в данной области известны другие компоненты, которые могут входить в состав композиций/вакцин в сочетании с антигеном (см., например,
 30 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., изд-во Mack Publ., Easton, 1990). Эксперту известны инъеклируемые физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к применению раствора широко известны водные изотонические растворы, например физиологический раствор или соответствующие
 35 растворы белков плазмы. Фармацевтическая композиция/вакцина могут представлять собой лиофилизаты или сухие препараты, которые можно восстанавливать известным инъеклируемым раствором непосредственно перед применением в стерильных условиях, например, представлять собой состоящий из компонентов набор.

Кроме того, фармацевтические композиции/вакцины, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать также один или несколько приемлемых для применения
 40 в ветеринарии носителей. В контексте настоящего описания понятие «приемлемый для применения в ветеринарии носитель» включает, но не ограничиваясь только ими, любые и все растворители, дисперсионные среды, материалы для нанесения покрытия, адъюванты, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и
 45 противогрибковые агенты, агенты для придания изотоничности, замедляющие адсорбцию агенты и т.п.

Разбавители могут представлять собой воду, физиологический раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Агенты для придания изотоничности могут представлять
 50 собой среди прочего хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы представляют собой среди прочего альбумин и соли щелочных металлов и этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Понятие «консервант» в контексте настоящего описания относится к обладающему

противомикробной активностью действующему веществу, такому, например, как гентамицин, мертиолат и т.п. В частности, добавление консерванта наиболее предпочтительно при приготовлении композиции в виде нескольких доз. Указанные обладающие противомикробной активностью действующие вещества добавляют в 5 концентрациях, эффективных для предупреждения любого микробного загрязнения представляющей интерес композиции или для ингибирования роста микроорганизмов в представляющей интерес композиции.

Понятие «адъюванты» в контексте настоящего описания может относиться к 10 гидроксиду алюминия и фосфату алюминия, сапонидам, таким, например, как, Quil A, OS-21 (фирма Cambridge Biotech Inc., Кэмбридж, шт.Массачусетс), GPI-0100 (фирма Galenica Pharmaceuticals, Inc., Бирмингем, шт.Алабама), эмульсия вода-в-масле, эмульсия масло-в-воде, эмульсия вода-в-масле-в-воде.

Основой эмульсии может являться, в частности, легкое жидкое парафиновое масло 15 (соответствующее Европейской фармакопеи); изопреноидное масло, такое как сквалан или сквален; масло, образовавшееся в результате олигомеризации алкенов, прежде всего изобутена или децена; эфиры кислот или спиртов, содержащие линейную алкильную группу, более конкретно растительные масла, этилолеат, 20 ди(каприлат/капрат) пропиленгликоля, три(каприлат/капрат) глицерина или диолеат пропиленгликоля; эфиры разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности эфиры изостеариновой кислоты. Масла применяют в сочетании с эмульгаторами для получения эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионогенные поверхностно-активные вещества, прежде всего сложные эфиры 25 сорбитана, маннида (например, безводный маннитолеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности продукты 30 типа Pluronic, прежде всего L121 (см. Hunter и др., The Theory and Practical Application of Adjuvants, под ред. Stewart-Tull D. E. S., изд-во JohnWiley and Sons, NY. cc.51-94, 1995 и Todd и др., Vaccine 15, 1997, cc.564-570). Примерами приемлемых эмульсий типа масло-в-воде являются адъюванты на основе эмульсигена (Emulsigen), такие как EMULSIGEN®, EMULSIGEN-D®, EMULSIGEN-P®, EMULSIGEN-75® (фирма MVP 35 Laboratories, Inc., Омаха, шт.Небраска). При создании изобретения неожиданно было установлено, что можно повышать эффективность фармацевтических композиций/вакцин, которые содержат белок H5, предпочтительно рекомбинантный белок H5, предлагаемый в изобретении, с помощью эмульсий типа масло-в-воде, 40 предпочтительно с помощью адъювантов на основе эмульсигена, более предпочтительно с помощью EMULSIGEN® и EMULSIGEN-P®.

Кроме того, можно применять SPT-эмульсию, описанную на с.147 в: «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach», под ред. M. Powell и M. Newman, изд-во Plenum Press, 1995, и эмульсию MF59, описанную на с.183 в этой же публикации.

Другим примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров 45 акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного. Предпочтительными адъювантами являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, прежде всего, сшитые с простыми 50 полиалкениловыми эфирами сахаров или многоатомными спиртами. Эти соединения известны под названием карбомеры (Phameuropa, т.8, №.2 июня 1996 г.). Специалистам в данной области в качестве ссылки можно предложить US 2909462, в котором описаны указанные акриловые полимеры, сшитые с полигидроксильным

соединением, которое имеет по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, при этом атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных групп замещены ненасыщенными алифатическими радикалами, которые имеют по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными являются
 5 радикалы, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например винильные, аллильные и другие ненасыщенные группы ряда этилена. Ненасыщенные радикалы могут сами содержать другие заместители, такие как метил. Наиболее предпочтительными являются продукты, поступающие в продажу под названием
 10 карбопол (Carbopol) (фирма BF Goodrich, шт.Огайо). Их сшивают с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди прежде всего следует упомянуть Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным для применения является Carbopol 971P. Из сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного следует упомянуть сополимеры ЕМА (фирма Monsanto), представляющие собой сополимеры
 15 малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к получению кислого раствора, который следует нейтрализовать, предпочтительно до физиологического значения рН, для получения раствора адьюванта, в который можно включать иммуногенную, иммунологическую композицию или вакцину.

Также приемлемыми адьювантами среди прочего являются, но не ограничиваясь только ими, система RIBI-адьювантов (фирма Ribi Inc.), блок-сополимеры (фирма CytRx, Анланта, шт.Джорджия), SAF-M (фирма Chiron, Emeryville, шт.Калифорния), монофосфорил-липид А, адьювант на основе липидаавридин-амин, термолабильный энтеротоксин E. coli (рекомбинантный или нет), токсин холеры или
 25 мурамил-дипептид.

Предпочтительно адьювант добавляют в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу. Еще более предпочтительно адьювант добавляют в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу. Еще более
 30 предпочтительно адьювант добавляют в количестве от примерно 500 мкг до примерно 5 мг на дозу. Еще более предпочтительно адьювант добавляют в количестве от примерно 750 мкг до примерно 2,5 мг на дозу. Наиболее предпочтительно адьювант добавляют в количестве примерно 1 мг на дозу.

Фармацевтические композиции/вакцины могут содержать также один или
 35 несколько других иммуномодулирующих агентов, таких, например, как интерлейкины, интерфероны или другие цитокины. Фармацевтические композиции/вакцины могут содержать также гентамицин и мертиолат. Хотя специалист в данной области легко может определить количества и концентрации
 40 адьювантов и добавок, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, в настоящем изобретении предложены композиции, содержащие от примерно 50 до примерно 2000 мкг адьюванта и предпочтительно примерно 250 мкг/мл дозы композиции вакцины. Другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения являются композиции вакцин, содержащие от
 45 примерно 1 до примерно 60 мкг/мл антибиотиков и более предпочтительно менее примерно 30 мкг/мл антибиотиков.

Таким образом, следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является фармацевтическая композиция/вакцина, которая содержит:

50 I в терапевтически эффективном количестве любой из белков Н5 вируса гриппа, предлагаемых в настоящем изобретении, где белок Н5 имеет аминокислоту 223N и модификацию 328K+, при этом нумерация аминокислотных положений белка Н5 соответствует нумерации аминокислотных положений, приведенной в качестве

примера в SEQ ID NO:1, и где модификация 328K+ означает, что в аминокислотное положение 328 белка H5 встроены второй лизин (K+); и

II фармацевтически приемлемые адъюванты, описанные выше.

Предпочтительно адъювант выбирают из группы, включающей:

а) EMULSIGEN®, эмульсия масло-в-воде (o/w);

б) EMULSIGEN-D®, эмульсия масло-в-воде (o/w) с бромидом диметилдиоктадециламмония (DDA);

в) Polygen, сополимер;

г) EMULSIGEN-P®, эмульсия масло-в-воде (o/w) с входящим в ее состав иммуностимулятором;

д) Carbigen, представляющий собой сетчатый полимер;

е) EMULSIGEN-75®, двойной адъювант, представляющий собой эмульсию масло-в-воде (o/w) с сетчатым полимером;

ж) ISA 70, представляющий собой эмульсию вода-в-масле (w/o).

Наиболее предпочтительно адъюванты представляют собой эмульсию масло-в-воде, как в случае адъювантов, основой которых является эмульсиген, которые выбирают из группы, включающей EMULSIGEN®, EMULSIGEN-D®, EMULSIGEN-P®, EMULSIGEN-75®, EMULSIGEN® и EMULSIGEN-P®. Наиболее предпочтительно в

препаративных формах, предлагаемых в настоящем изобретении, применяют EMULSIGEN® и d EMULSIGEN-P®.

Таким образом, следующим объектом изобретения является фармацевтические композиции/вакцины, содержащие один или несколько антигенов. Предпочтительно дополнительный антиген представляет собой птичий патоген или патоген млекопитающих. Согласно дополнительным вариантам осуществления изобретения дополнительный антиген представляет собой другой антиген вируса гриппа, такой как гемагглютинин H3, H7, H9 или любой другой гемагглютинин вируса гриппа.

Дополнительный(ые) антиген(ы) можно вводить в очищенной форме, в качестве части антигенного препарата, в форме убитого микроорганизма или в форме модифицированного живого микроорганизма.

Понятие «антиген» в контексте настоящего описания включает, но не ограничиваясь только ими, пептиды, полипептиды, гликопептиды или полисахариды, которые обладают способностью специфически взаимодействовать с антигенраспознающей молекулой иммунной системы, такой как иммуноглобулин (антитело) или Т-клеточный рецептор антигена, вызывая, активируя или стимулируя иммунный ответ против указанного антигена в хозяине, в который вводят антиген.

Понятие «антиген» относится также к молекулам нуклеиновых кислот, предпочтительно молекулам ДНК или РНК, каждая из которых кодирует и экспрессирует пептид, полипептид или гликопептид, обладающие способностью специфически взаимодействовать с антигенраспознающей молекулой иммунной системы, такой как иммуноглобулин (антитело) или Т-клеточный рецептор антигена, вызывая, активируя или стимулируя иммунный ответ против антигена, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты. Антиген, используемый для приготовления фармацевтической композиции, который применяют согласно изобретению, представляет собой микроорганизм или антигенный фрагмент и/или препарат, включающий указанный микроорганизм. В этой связи понятие «иммунизация» в контексте настоящего описания включает, но не ограничиваясь только ими, любое вызывание или усиление иммунного ответа. Понятие «иммунный ответ» уже объяснено выше.

Стратегии применения противогриппозных вакцин хорошо известны в данной области. К ним относятся стратегии мукозальной вакцинации при применении противовирусных вакцин, содержащих инактивированные или ослабленные вирусы. Когда слизистая оболочка является мишенью для местного введения вакцин, можно

применять различные стратегии для введения иммуногенных белков в слизистую оболочку. Согласно конкретному варианту осуществления изобретения вакцину можно вводить в смеси или в виде конъюгата или в виде химерного слитого белка с токсином холеры, таким как холерный токсин В или химера А/В холерного токсина (Hajishengallis, J Immunol., 154, 1995, сс.4322-4332; Jobling и Holmes, Infect Immun., 60, 1992, сс.4915-4924). Описаны мукозальные вакцины, основой которых являются субъединицы холерного токсина В (Lebens и Holmgren, Dev Biol Stand 82, 1994, сс.215-227). В другом варианте осуществления изобретения для мукозальной вакцинации можно применять смесь с термолабильным энтеротоксином (LT).

Другие стратегии мукозальной иммунизации предусматривают капсулирование вируса в микрокапсулы (US 5075109, US 5820883 и US 5853763) и с помощью усиливающего иммунизацию мембранного носителя (WO 98/0558). Иммуногенность вводимых орально иммуногенов можно усиливать с помощью эритроцитов (rbc) или гемолизированных эритроцитов (US 5643577) или с помощью антигена вируса «синего языка» (US 5690938).

Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является способ получения фармацевтической композиции/вакцины, описанной выше, предпочтительно способ получения вакцины, которая содержит рекомбинантный экспрессируемый бакуловирусом белок H5, описанный выше. В целом, способ заключается в том, переносят конструкцию в вирус, где конструкция содержит I) рекомбинантную кДНК H5, предлагаемую в настоящем описании, II) заражают питательные среды трансфектированным вирусом, III) обеспечивают экспрессию рекомбинантного белка H5, предлагаемого в изобретении, IV) выделяют экспрессированный белок H5 из культуры и V) приготавливают композицию путем смешения экспрессированного белка H5 с приемлемым адъювантом и/или другим фармацевтически приемлемым носителем.

Предпочтительные адъюванты описаны выше. Таким образом, следующим объектом изобретения является способ получения антигенной композиции, такой, например, как вакцина, предназначенной для вызывания иммунного ответа на гриппозную инфекцию, заключающийся в том, что I) получают и выделяют белок H5 и II) смешивают его с приемлемыми адъювантами.

Кроме того, в состав композиции вакцины, предлагаемой в настоящем изобретении, могут входить также разбавители, агенты для придания изотоничности, стабилизаторы и/или консерванты. Разбавители могут представлять собой воду, физиологический раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Агенты для придания изотоничности могут представлять собой среди прочего соли неорганических или органических кислот, например хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит, и лактозу, сахараиды, трегалозу, маннит, сахарозу. Стабилизаторы представляют собой среди прочего альбумин и соли щелочных металлов и этилендиаминтетрауксусной кислоты. Приемлемые адъюванты описаны выше.

Медицинское применение любых указанных белков H5, молекул нуклеиновых кислот, векторов и вакцин

Описанные выше белки H5, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые

указанные белки H5, векторы, содержащие любые молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любые белки H5, предлагаемые в изобретении, и любую фармацевтическую композицию/вакцину, содержащую любой указанный белок H5, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, можно применять в медицине, предпочтительно для лечения и профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа, наиболее предпочтительно вирусом гриппа А. Описанные выше белки H5, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые указанные белки H5, векторы, содержащие любые молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любые белки H5, предлагаемые в изобретении, и любую фармацевтическую композицию/вакцину, содержащую любой указанный белок H5, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, можно применять для лечения или профилактики человека, а также в ветеринарии. При применении в ветеринарии предпочтительным применением является лечение домашней птицы, предпочтительно птиц, кур, уток, индеек и т.п., а также млекопитающих, предпочтительно свиней, коров, лошадей, тюленей, верблюдов, собак, кошек, хомяков, мышей и т.п.

Таким образом, следующим вариантом настоящего изобретения является применение описанных выше белков H5, молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любые указанные белки H5, векторов, содержащих любые молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любые белки H5, предлагаемые в изобретении, и любых фармацевтических композиций/вакцин в медицине, предпочтительно для лечения человека и/или в ветеринарии.

Кроме того, описанные выше белки H5, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые указанные белки H5, векторы, содержащие любые молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любые белки H5, предлагаемые в изобретении, можно применять для приготовления фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, предназначенной для профилактики или лечения инфекций, вызываемых вирусом гриппа. Как отмечалось выше, указанные фармацевтические композиции/композиции вакцин можно применять для лечения и/или профилактики человека, а также для лечения и/или профилактики животных, таких как домашняя птица, предпочтительно птиц, кур, уток, индеек и т.п., а также млекопитающих, предпочтительно свиней, коров, лошадей, тюленей, верблюдов, собак, кошек, хомяков, мышей и т.п.

Описанные выше белки H5, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые указанные белки H5, векторы, содержащие любые молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любые белки H5, предлагаемые в изобретении, можно применять для приготовления фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, предназначенной для лечения и профилактики инфекции, вызываемой вирусом гриппа, предпочтительно вызываемой вирусом птичьего, свиного или человеческого гриппа или любой их комбинацией или гибридом.

Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является способ лечения или профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа, заключающийся в том, что вводят в терапевтически эффективном количестве белок H5, предлагаемый в изобретении, индивидууму, который нуждается в таком лечении. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа, заключающемуся в том, что вводят в терапевтически эффективном количестве любую молекулу нуклеиновой кислоты H5 или вектор, предлагаемые в изобретении, которые кодируют любой белок H5, предлагаемый в изобретении, индивидууму, который нуждается в таком лечении. Кроме того,

настоящее изобретение относится также к способу лечения или профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа, заключающемуся в том, что вводят в терапевтически эффективном количестве вакцину, содержащую любые предлагаемые в изобретении белок H5, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, индивидууму, который нуждается в таком лечении. Индивидуум, который нуждается в таком лечении, может представлять собой человека, а также животного, предпочтительно домашнюю птицу, предпочтительно птиц, кур, уток, индеек и т.п., а также млекопитающих, предпочтительно свиней, коров, лошадей, тюленей, верблюдов, собак, кошек, хомяков, мышей и т.п.

Предпочтительно, когда осуществляют вакцинацию кур, то белок H5, предлагаемый в изобретении, можно применять для вакцинации кур возрастом 1 день или более старшего возраста, например, в день 10 или в дни 1-10 или в день 10, или позднее.

Предпочтительно грипп, который можно лечить путем введения любого белка H5, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующий любой указанный белок H5, или любых фармацевтических композиций/вакцин, предлагаемых в изобретении, вызывается вирусом птичьего, свиного или человеческого гриппа или любой их комбинацией или гибридом.

Таким образом, следующим объектом настоящего изобретения является состоящий из компонентов набор, который содержит I) любой указанный белок H5, предлагаемый в изобретении, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, которые кодируют любой указанный белок H5, или любую фармацевтическую композицию/вакцину, содержащую предлагаемые в изобретении любой указанный белок H5, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, и II) листовку-вкладыш в упаковку, в которой содержится инструкция по применению указанного белка H5, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или вакцины для лечения или профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа. Когда осуществляют вакцинацию кур, то белок H5, предлагаемый в изобретении, применяют для вакцинации кур возрастом 1 день или более старшего возраста.

Таким образом, еще одним вариантом осуществления является состоящий из компонентов набор, который содержит по меньшей мере один дополнительный антиген, представляющий собой патоген домашней птицы или млекопитающих, и информацию о медицинских показаниях, медицинскому или ветеринарному применению указанного дополнительного антигена.

Примеры

В приведенных ниже примерах представлены предпочтительные материалы и процедуры, предлагаемые в настоящем изобретении. Следует понимать, что эти примеры даны только с целью иллюстрации и не направлены на ограничение общего объема изобретения.

Пример 1

Конструирование рекомбинантных бакуловирусов, кодирующих и экспрессирующих антигены HA H5

Рекомбинантный бакуловир, содержащий антиген H5 HA, создавали следующим образом: кодирующие последовательности H5 HA (SEQ ID NO:2) получали химическим синтезом и субклонировали в векторе для переноса pVL1392 (фирма BD Biosciences Pharmingen, Сан-Диего, шт. Калифорния). H5 HA MutK+ (SEQ ID NO:4) создавали, используя олигонуклеотидные праймеры и набор для сайтнаправленного мутагенеза QuikChange® (фирма Stratagene, Ла-Джолла, шт. Калифорния), и

субклонировали в векторе для переноса pVL1392 (фирма BD Biosciences Pharmingen, Сан-Диего, шт.Калифорния). Плазмидами pVL1392, содержащими гены, которые кодируют антиген H5 HA (SEQ ID NO:2) и H5 HA MutK+ (SEQ ID NO:4), совместно трансфектировали бакуловирусную ДНК DiamondBac® (фирма Sigma) в клетках насекомых линии Sf9 (фирма BD Biosciences Pharmingen) с получением рекомбинантного бакуловируса, содержащего гены H5 HA, кодирующие SEQ ID NO:2, и H5 HA mutK+, кодирующие SEQ ID NO:4. Рекомбинантные бакуловирусы, содержащие гены, которые кодируют H5 HA (SEQ ID NO:2) и H5 HA MutK+ (SEQ ID NO:4), очищали методом вирусных бляшек и мастер-посевы вирусов (MSV) размножали в клетках линии SF9, разделяли на аликвоты и хранили при -70°C. Клетки насекомых, зараженные содержащими H5 HA бакуловирусами, которые, как описано выше, применяли для создания MSV или рабочих посевов вирусов, экспрессировали антиген H5 HA (SEQ ID NO:2) и антиген H5 HA MutK+ (SEQ ID NO:4), что установлено с использованием поликлональной сыворотки или моноклональных антител с помощью непрямого анализа флуоресценция антител или методом Вестерн-блоттинга.

После засева соответствующими количествами рекомбинантных бакуловирусов (H5 HA и H5 HA MutK+ соответственно) вращающиеся колбы, содержащие SF+-клетки (фирма Protein Sciences, Inc., Meriden, шт.Коннектикут), инкубировали при 27±2°C в течение 7 дней со скоростью вращения в течение этого периода 100 об/мин. Колбы были снабжены вентиляционными крышками для обеспечения прохождения потока воздуха. Собирали культуру неочищенных цельных клеток, содержащую зараженные бакуловирусом SF+-клетки, и супернатанты каждой клеточной культуры.

Пример 2

Получение фармацевтических композиций (вакцин), содержащих антигены HA H5. Собирали белок H5 HA и белок H5 HA Mutk+ неочищенных цельных клеток, которые экспрессировались в клетках насекомых, трансфектированных экспрессионной системой на основе бакуловируса. Бакуловирусы инактивировали обработкой 5 мМ циклизированным бинарным этиленимином (BEI) (конечная концентрация) при температуре примерно от 32 до 39°C в течение 72-96 ч. После завершения инактивации добавляли 0,3 М тиосульфат натрия до конечной концентрации 5 мМ для нейтрализации любых остаточных количеств BEI. После нейтрализации добавляли различные адъюванты и в результате получали следующие вакцины/фармацевтические композиции.

Вакцины	
Незапатентованное название продукта	501
Антиген	Присутствующий в неочищенных цельных клетках белок H5 HA, экспрессируемый в клетках насекомых, трансфектированных экспрессионной системой на основе бакуловируса
Препаративная форма	Экспериментальная вакцина, состоящая из культур клеток насекомых и супернатантов, экспрессирующих рекомбинантный H5 HA. В вакцину в качестве адъюванта добавляли Emulsigen (эмульсиген).

Незапатентованное название продукта	502
Антиген	Присутствующий в неочищенных цельных клетках белок H5 HA, экспрессируемый в клетках насекомых, трнсфектированных экспрессионной системой на основе бакуловируса.
Препаративная форма	Экспериментальная вакцина, состоящая из культур клеток насекомых и супернатантов, экспрессирующих рекомбинантный H5 HA. В вакцину в качестве адъюванта добавляли Emulsigen-D.
Незапатентованное название продукта	503

5	Незапатентованное название продукта	512
	Антиген	Присутствующий в неочищенных цельных клетках белок H5 NA mutK+, экспрессируемый в клетках насекомых, трансфектированных экспрессионной системой на основе бакуловируса
	Препаративная форма	Экспериментальная вакцина, состоящая из культур клеток насекомых и супернатантов, экспрессирующих рекомбинантный H5 NA. В вакцину в качестве адьюванта добавляли Carbigen.
10	Незапатентованное название продукта	513
	Антиген	Присутствующий в неочищенных цельных клетках белок H5 NA mutK+, экспрессируемый в клетках насекомых, трансфектированных экспрессионной системой на основе бакуловируса
	Препаративная форма	Экспериментальная вакцина, состоящая из культур клеток насекомых и супернатантов, экспрессирующих рекомбинантный H5 NA. В вакцину в качестве адьюванта добавляли Emulsigen-75.
15	Незапатентованное название продукта	514
	Антиген	Присутствующий в неочищенных цельных клетках белок H5 NA mutK+, экспрессируемый в клетках насекомых, трансфектированных экспрессионной системой на основе бакуловируса
	Препаративная форма	Экспериментальная вакцина, состоящая из культур клеток насекомых и супернатантов, экспрессирующих рекомбинантный H5 NA. В вакцину в качестве адьюванта добавляли ISA 70.

Пример 3

Вакцинация свиней (поросят) против птичьего гриппа

1. Введение

Целью настоящего исследования было определение способности экспериментальных вакцин, содержащих в качестве антигена неочищенный экстракт рекомбинантного гемагглютинина H5 (HA), для индукции реакции торможения гемагглютинации (HI) у свиней. В сочетании с антигенами H5 NA изучали различные адьюванты.

Изученные при создании изобретения прототипные вирусные вакцины HA H5 содержали антиген либо из стандартного H5 NA, либо H5 NA MutK+. Стандартный H5 NA получали из штамма А/утиный/Китай/Е319-2/03, а H5 NA MutK+ состоял из стандартного H5 NA, который создавали таким образом, чтобы он содержал три специфические аминокислотные замены S120N, D150N, S223N и 328mutK+. Он содержал также аминокислоту 94N. Указанные аминокислотные замены в H5 NA MutK+ приводили к получению H5 NA, в большей степени напоминающего HA штамма А/НК/213/03. В настоящее время считается, что аминокислотный состав H5 NA штамма А/НК/213/03 способствует распознаванию антителом H5 NA.

2. План эксперимента:

Схема опыта

Группа	Количество поросят	Прототипная вирусная вакцина	День 0	День 21	День 35
1	5	501	Взятие крови и внутримышечная вакцинация (в плечеголовную)	Взятие крови и внутримышечная вакцинация (в плечеголовную)	
2	5	502			
3	5	503			
4	5	504			
5	5	505			
6	5	506	группу) путем введения 1 мл в левую сторону шеи)	группу) путем введения 1 мл в правую сторону шеи)	Взятие крови и окончание опыта
7	5	507			
8	5	508			
9	5	509			
10	5	510			
11	5	511			
12	5	512			
13	5	513			
14	5	514			
15	5	нет	Взятие крови	Взятие крови	

В начале опыта поросята имели возраст 3 недели ± 5 дней. В начале опыта поросята были клинически здоровы. Образцы крови брали в дни 0, 21 и 35 опыта.

Всех подопытных животных обследовали ежедневно в дни 1-35 опыта в отношении общего состояния здоровья. В течение 7 дней после каждой вакцинации место инъекции обследовали ежедневно и фиксировали видимые реакции. После завершения проведенной на животных фазы опыта в день 35 всех животных гуманно умерщвляли.

3. Вакцины

Вакцины 501-514, описанные в примере 2, применяли в опытах по вакцинации поросят.

4. Тест торможения гемагглютинации

Свиней вакцинировали содержащими H5 HA прототипными вирусными вакцинами в дни 0 и 21. Собирали сыворотку свиней для оценки реакции торможения гемагглютинации (HI) в дни 0, 21, 35. HI-тест осуществляли для выявления присутствия специфических в отношении HA антител. Гетерологичный вирус типа H5N1, т.е. A/chicken/Mexico/232/94, применяли в концентрации, соответствующей четырем гемагглютинирующим единицам [4 HA-единицы] в HI-тесте. В титрационных микропланшетах с U-образным дном последовательно смешивали серийные двукратные разведения в ЗФР с равными объемами (25 мкл) содержащего 4 HA-единицы вируса и инкубировали при комнатной температуре (примерно 25°C) в течение 30 мин. Куриные эритроциты в концентрации 0,5% в ЗФР добавляли в содержащие сыворотку-вирус лунки. Определяли HI-титры как обратные величины наибольших разведений сыворотки, при которых обнаружено торможение гемагглютинации.

5. Результаты

Для HI-теста применяли официальный утвержденный Мексиканским правительством антиген H5N1 (A/ chicken/Mexico/232/94) [4 HA-единицы] и режим вакцинации 1x1 мл в дни 0 и 21.

		HI-титр		
		День 0	День 21	День 35
501	H5 - Emulsigen	0	0	4
502	H5 - Emulsigen-D	0	0	4
503	H5 - Polygon	0	0	0
504	H5 - Emulsigen-P	0	0	2
505	H5 - Carbigen	0	0	4
506	H5 - Emulsigen-75	0	0	16
507	H5 ISA 70	0	0	16
508	H5 K+ - Emulsigen	0	0	128
509	H5 K+ - Emulsigen-D	0	0	64
510	H5 K+ - Polygon	0	0	16
511	H5 K+ - Emulsigen-P	0	0	0
512	H5 K+ - Carbigen	0	0	0
513	H5 K+ - Emulsigen-75	0	0	16
514	H5 K+ - ISA 70	0	4	32
Контроль	Нет	0	0	0

BIV H5 (получен из вируса гриппа A (A/duck/China/E319-2/03(H5N1)) BIV H5 K+ (мутантный BIV H5, включающий S120N, D155N, S223N, и с модификацией 328K+)

Результаты продемонстрировали, что большая часть композиций вакцин вызывали иммунный ответ у вакцинированных поросят. В частности, большинство композиций

вакцин вызывало сероконверсию, это означает, что у большинства вакцинированных поросят возникали специфические антитела к вирусу птичьего гриппа, который применяли для HI-теста. Кроме того, результаты ясно свидетельствуют и убедительно доказывают, что предложенная в изобретении идея реализуется очень хорошо. Риск пандемии поросят (животных второго вида), связанной с вирусом птичьего гриппа (патоген первого вида), можно резко снижать путем вакцинации поросят соответствующим антигеном вируса птичьего гриппа. Это четко продемонстрировано. Кроме того, согласно предложенной концепции вакцинации, передачу и адаптацию вируса птичьего гриппа млекопитающим, включая человека, можно резко снижать. Свиньи являются одним из наиболее важных резервуаров птичьих патогенов, включая вирус птичьего гриппа. Если репликацию вируса в свиньях и, как следствие, риск адаптации вируса птичьего гриппа к организму свиней резко снижать и контролировать, то риск какой-либо адаптации вируса птичьего гриппа к организму человека также должен резко снижаться. В случае когда введение антигена приводило к получению более низких HI-титров, т.е. титрам ниже 30, то могут потребоваться дополнительные реиммунизации антигеном для дальнейшего повышения HI-титра и для усиления иммунной защиты у вакцинированных поросят. Таким образом, низкий титр не означает, что нельзя достичь никакой защиты, а только свидетельствуют о том, что могут потребоваться дополнительные реиммунизации для повышения иммунного ответа. Тот факт, что иммунный ответ можно оценивать в вакцинированных поросят, демонстрирует, что идея, лежащая в основе настоящего изобретения, реализуется очень хорошо. Другими словами, приведенные в настоящем описании эксперименты ясно и убедительно демонстрируют, что идея, лежащая в основе настоящего изобретения, реализуется очень хорошо.

Пример 4

Вакцинация птиц против птичьего гриппа

1. Введение

Целью настоящего исследования было определение способности экспериментальных вакцин, содержащих в качестве антигена гемагглютинин неочищенного экстракта рекомбинантного H5mutk+ (H5 HA mutk+), для индукции реакции торможения гемагглютинации (HI) у кур. Кроме того, в качестве контроля применяли антиген, представляющий собой стандартный рекомбинантный H5 (H5 HA), а также инаktivированную вакцину Volvac® AI (фирма Boehringer Ingelheim Vetmedica, Мехико). Кроме того, в сочетании с антигенами H5 HA изучали различные адъюванты.

2. План эксперимента:

SPF-кур (15-25) вакцинировали независимо различными экспериментальными вакцинами в возрасте 1 или 10 дней подкожно в заднюю область шеи, используя по 0,5 мл препарата; всех птиц в процессе эксперимента содержали в изоляторах. Птицы имели свободный доступ к корму и воде. Контрольное заражение осуществляли в день 31 или 32 после вакцинации высокопатогенным штаммом птичьего гриппа H5N2.

Образцы сыворотки получали путем взятия у птиц крови через яремную вену через 15, 30 дней после вакцинации. Полученные образцы сыворотки хранили при 4°C до оценки реакции торможения гемагглютинации (HI-тест) согласно методу, описанному в примере 3, получая данные о титрах антител.

3. Вакцины и вирус, применяемый для контрольного заражения:

Независимо оценивали четыре различные препаративные формы:

1. Стандартная масляная эмульсия H5NA Mut k+: Антиген H5 NA mutk+ включали в состав масляной эмульсии (неполный адъювант Фрейнда) согласно процедуре фирмы Boehringer Ingelheim Vetmedica.

2. H5NA Mut k+ фирмы Seppic: Антиген H5 NA mutk+ приготавливали с использованием нетрадиционного адъюванта (ISA 206, W/O/W, фирмы Seppic) согласно рекомендациям поставщика.

3. Стандартная масляная эмульсия H5NA: Антиген H5 NA включали в состав масляной эмульсии (неполный адъювант Фрейнда) согласно процедуре фирмы Boehringer Ingelheim Vetmedica.

4. H5NA фирмы Seppic: Антиген H5 NA приготавливали с использованием нетрадиционного адъюванта (ISA 206, W/O/W, фирмы Seppic) согласно рекомендациям поставщика.

В качестве контроля применяли вакцину против птичьего гриппа в виде масляной эмульсии фирмы Boehringer Ingelheim Vetmedica Volvac® AI (фирма Boehringer Ingelheim Vetmedica, Мехико).

Контрольное заражение вакцинированных и невакцинированных цыплят проводили путем интраназальной инокуляции, используя по 0,2 мл препарата, содержащего $10^{6,7}$ CEID вируса для контрольного заражения штамма H5N2 на птицу. После контрольного заражения оценивали симптомы и смертность. Через 10 дней после инокуляции всех выживших цыплят умерщвляли в соответствии с процедурами лабораторного содержания животных.

4. Результаты:

Результаты представлены ниже в таблицах:

Препаративная форма	Вакцинация птиц возрастом 1 день		Вакцинация птиц возрастом 10 дней	
	Контрольное заражение в день 31 после вакцинации		Контрольное заражение в день 32 после вакцинации	
	Количество погибших	Смертность, %	Количество погибших	Смертность, %
H5NA Mut k+ фирмы Seppic	8/25	32%	0/20	0%
Стандартная масляная эмульсия H5NA Mut k+	0/24	0%	0/20	0%
H5NA фирмы Seppic	17/25	68%	7/19	36,8%
Стандартная масляная эмульсия H5NA	4/25	16%	2/20	10%
Volvac AI KV			0/14	0%
Отрицательный контроль	10/10	100%	14/14	100%

	Вакцинация птиц возрастом 1 день (0,5 мл)		Вакцинация птиц возрастом 10 дней (0,5 мл)		
	Препаративная форма вакцины	HI-титры через 30 дней после вакцинации (MG Log2)	Защита после контрольного заражения (%)	HI-титры через 30 дней после вакцинации (MG Log2)	Защита после контрольного заражения (%)
5	H5NA Mut k+ фирмы Seppic	0,56	68	2,5	100
	Стандартная масляная эмульсия H5NA Mut k+	2,59	100	4,3	100
10	H5NA фирмы Seppic	0,18	32	1,3	63,2
	Стандартная масляная эмульсия H5NA	0,7	84	1,6	100
15	Volvac AI KV	-	-	8,8	100
	Отрицательный контроль	-	-	0	0

Положительный сывороточный титр соответствовал logs 4 согласно стандарту Всемирной организации по защите здоровья животных (OIE). Согласно этому критерию серологические результаты были отрицательными, хотя обнаружено небольшое количество положительных значений при сравнении с основным уровнем. Самые высокие серологические титры обнаружены при использовании препаративной формы вакцины на основе масляного адьюванта с антигеном H5NA Mut k+ у птиц, вакцинированных в возрасте 1 день или 10 дней. Наименьшие серологические титры обнаружены при использовании препаративной формы прототипной вирусной вакцины фирмы Seppic, содержащей антиген H5NA. В опыте с использованием контрольного заражения обнаружено, что прототипные вирусные вакцины обеспечивают защитное действие прежде всего при применении стандартной препаративной формы вакцины в виде масляной эмульсии, содержащей антиген H5NA Mut k+. Наименьший уровень защиты в опыте с использованием контрольного заражения обнаружен для содержащей H5NA вакцины фирмы Seppic, при применении которой гибель достигала 68%. В противоположность этому, наиболее высокой серологический титр обнаружен у птиц, вакцинированных в день 10, по сравнению с птицами, которых вакцинировали в первый день жизни.

Формула изобретения

1. Белок гемагглютинаина H5 вируса гриппа для лечения или предупреждения инфекций, которые опосредуются вирусом гриппа, где такой H5 белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где серин в положении 223 SEQ ID NO:1 замещен аспарагином и в аминокислотное положение 328 встроены второй лизин.
2. Белок гемагглютинаина H5 по п.1 для лечения или предупреждения инфекций, которые опосредуются вирусом гриппа, где белок гемагглютинаина H5 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.
3. Белок гемагглютинаина H5 по п.1 или 2 в качестве лекарственного средства.
4. Белок гемагглютинаина H5 по п.1 или 2 для применения для профилактики или лечения инфекций, вызываемых вирусом гриппа.
5. Молекула нуклеиновой кислоты для лечения или предупреждений инфекций, которые опосредуются вирусом гриппа, где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок гемагглютинаина H5 по п.1 или 2.
6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.5 в качестве лекарственного средства.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п.5 для применения для профилактики или лечения инфекций, вызываемых вирусом гриппа.

8. Вакцина для лечения или предупреждений инфекций, которые опосредуются вирусом гриппа, содержащая

- а) белок гемагглютинаина по п.1 или 2, молекулу нуклеиновой кислоты по п.5, и
- б) фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

9. Вакцина по п.8 для лечения или предупреждения инфекции, которые опосредуются вирусом гриппа, где вакцина в качестве дополнительного антигена включает белок гемагглютинаина H3, H7 или H9 вируса гриппа.

10. Способ получения белка гемагглютинаина H5 по п.1 или 2, который включает следующие этапы:

а) выделяют или амплифицируют нуклеиновую кислоту, которая кодирует указанный гемагглютинаина белок H5, по п.5;

б) клонируют нуклеиновую кислоту, которая кодирует гемагглютинин H5, в экспрессионном векторе;

в) экспрессируют белок гемагглютинаина H5.

11. Способ по п.10, в котором экспрессионный вектор представляет собой рекомбинантный бакуловирус.

12. Способ получения вакцины, содержащей белок гемагглютинаина H5 по п.1 или 2, который включает следующие этапы:

а) получают белок гемагглютинаина H5 по п.1 или 2;

б) смешивают полученный на стадии а) белок гемагглютинаина с фармацевтически приемлемым носителем и/или эксципиентом.

13. Способ получения вакцины, содержащей кодирующую белок гемагглютинаина H5 нуклеиновую кислоту по п.5, который включает следующие этапы:

а) получают кодирующую белок гемагглютинаина H5 молекулу нуклеиновой кислоты по п.5;

б) смешивают кодирующую белок гемагглютинаина H5 молекулу нуклеиновой кислоты, полученную на стадии а), с фармацевтически приемлемым носителем и/или эксципиентом.

14. Набор для лечения или предупреждения инфекций, которые опосредуются вирусом гриппа, включающий

а) белок гемагглютинаина H5 по п.1 или 2, молекулу нуклеиновой кислоты по п.5 или вакцину по п.8 или 9; и

б) листовку-вкладыш в упаковку с указанием по применению указанного белка гемагглютинаина H5, молекулы нуклеиновой кислоты или вакцины, которые указаны в подпункте а), для лечения или профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Бёрингер Ингельхайм Ветмедика, Инк.

<120> Применение вакцин для лечения/предупреждения трансмиссий патогенов

<130> Case 1-1959

<150> 60/730998

<151> 2005-10-28

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 551

<212> PRT

<213> Вирус птичьего гриппа

<400> 1

Asp	Gln	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Glu	Gln	Val
1				5					10					15	

Asp	Thr	Ile	Met	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ala	Gln	Asp	Ile
			20					25					30		

Leu	Glu	Lys	Thr	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Asp	Leu	Asp	Gly	Val	Lys
		35					40					45			

Pro	Leu	Ile	Leu	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn
	50					55					60				

Pro	Met	Cys	Asp	Glu	Phe	Ile	Asn	Val	Pro	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val
65					70					75				80	

Glu	Lys	Ala	Asn	Pro	Ala	Asn	Asp	Leu	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asn	Phe	Asn
			85						90					95	

Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Arg	Ile	Asn	His	Phe	Glu
			100					105					110		

Lys	Ile	Gln	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ser	Trp	Ser	Asp	His	Glu	Ala	Ser
		115					120						125		

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser Ser Ser Phe Phe															
130						135					140				
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Ile						150				155					160
Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp					165				170						175
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln				180				185						190	
Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg				195			200						205		
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly				210			215				220				
Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn				225		230				235					240
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile					245				250						255
Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly				260				265						270	
Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser				275			280						285		
Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys				290			295				300				
Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser				305			310			315					320
Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala					325				330						335
Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly				340				345					350		
Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu				355				360					365		
Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile				370			375					380			

RU 2 479 589 C2

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
385 390 395 400

Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly
405 410 415

Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu
420 425 430

Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
435 440 445

Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
450 455 460

Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser
465 470 475 480

Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg
485 490 495

Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
500 505 510

Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu
515 520 525

Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
530 535 540

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
545 550

<210> 2

<211> 567

<212> PRT

<213> Вирус птичьего гриппа

<400> 2

Met Glu Lys Thr 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 Ser Ser Ser Phe Phe			
145	150	155	160
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asp 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 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	Met	Lys	Ser	Glu	Val	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	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser	325	330	335	
Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	340	345	350	
Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	355	360	365	
Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	370	375	380	
Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Ile	385	390	395	400
Ile	Asp	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe	Asn	405	410	415	
Asn	Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp	Gly	420	425	430	
Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Glu	435	440	445	
Asn	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	450	455	460	
Asp	Lys	Val	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	Asn	465	470	475	480
Gly	Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys	Met	Glu	Ser	485	490	495	
Val	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala	Arg	500	505	510	
Leu	Lys	Arg	Glu	Glu	Ile	Ser	Gly	Val	Lys	Leu	Glu	Ser	Ile	Gly	Thr	515	520	525	

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

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

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 3
<211> 568
<212> PRT
<213> Вирус птичьего гриппа

<400> 3

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	Arg	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 Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp 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 Val 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> 4
<211> 568
<212> PRT
<213> Вирус птичьего гриппа

<400> 4

Met Glu Lys Thr 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 Asn Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser	130	135	140
Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser 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 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 Met Lys Ser Glu Val 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
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser	325	330	335
Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	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
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
Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys	Met	Glu	485	490	495
Ser	Val	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	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 Val 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> 5
<211> 263
<212> PRT
<213> Вирус птичьего гриппа

<400> 5

His Ala Asn Asn Trp Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn
1 5 10 15

Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly
20 25 30

Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys
35 40 45

Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile
50 55 60

Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn
65 70 75 80

Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His
85 90 95

Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys
100 105 110

Asn Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys
115 120 125

Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile
130 135 140

Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr
145 150 155 160

Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Leu	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	Asp			
				165					170					175				
Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	Arg	Leu	Tyr	Gln	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser			
				180				185					190					
Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg	Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr			
				195			200					205						
Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Asn	Gly	Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr			
				210		215					220							
Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn	Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe			
225					230					235					240			
Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile	Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Ala			
				245				250						255				
Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu												
				260														

<210> 6

<211> 290

<212> PRT

<213> Вирус птичьего гриппа

<400> 6

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

RU 2 479 589 C2

Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro		
100	105	110
Gly Asn 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 Gln Gly Ser		
145	150	155 160
Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asp 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 Ser Gly Arg Met Asp 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
Val Glu		
290		