

Предпосылки создания изобретения

Вирусы с отрицательной смысловой РНК относятся к семи семействам (Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Filoviridae, Bornaviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae и Arenaviridae), которые включают широко распространенные патогены человека, такие как респираторно-синцитиальный вирус, вирус гриппа, вирус кори, вирус Эбола, а также вирусы животных, наносящие значительный ущерб птицеводству и животноводству (например, вирус болезни Ньюкастла и вирус чумы рогатого скота). Первые четыре семейства характеризуются несегментированным геномом, в то время как в последние три семейства входят вирусы, геном которых состоит из шести-восьми, трех или двух отрицательных смысловых РНК соответственно. Общим свойством вирусов с отрицательной смысловой РНК является отрицательная полярность генома, т.е. вирусная РНК (вРНК) комплементарна матричной РНК (мРНК) и таким образом сама по себе неинфекционна. Для инициации вирусной транскрипции и репликации вРНК должна транскрибироваться в положительную смысловую мРНК или кРНК соответственно комплексом вирусной полимеразы и нуклеопротеина; в случае вирусов гриппа типа А комплекс вирусной полимеразы состоит из трех полимеразных белков, а именно PB2, PB1 и PA. Во время вирусной репликации кРНК служит матрицей для синтеза новых молекул вРНК. Для всех вирусов с отрицательной смысловой РНК некодирующие участки на обоих 3- и 5-концах вРНК и кРНК являются определяющими для транскрипции и репликации вирусного генома. В отличие от клеточных или вирусных мРНК-транскриптов как кРНК, так и вРНК не экпированы на 5-конце и не полиаденилированы на 3-конце.

Основные функции многих вирусных белков были установлены в биохимических экспериментах и при исследовании течения вирусной инфекции. Однако обратные генетические системы существенным образом увеличили наши знания о вирусах с отрицательной смысловой РНК, формирующей как фрагментированный, так и нефрагментированный геном, применительно к механизмам их патогенности и репликации, а также обусловили значительный прогресс в разработке живых аттенуированных вирусных вакцин. Обратные генетические системы, как этот термин используется в молекулярной вирусологии, означает формирование вирусов на основе генома, происходящего из клонированных кДНК (см., например, обзор Neumann et al., 2002).

Для инициации репликации вирусов с отрицательной смысловой РНК вРНК или кРНК должны быть экспрессированы вместе с полимеразным комплексом и нуклеопротеином. Вирус бешенства был первым вирусом с отрицательной смысловой РНК, формирующей нефрагментированный геном, который был целиком получен на основе клонированной кДНК. Schell et al. (1994) получили рекомбинантный вирус бешенства совместной трансфекцией клеток конструктом кДНК, кодирующим полноразмерную кРНК, и конструктами, экспрессирующими вирусные белки L, P и N, находящимися под контролем промотора РНК-полимеразы T7. Инфицирование клеток рекомбинантным вирусом вакцины, обеспечивающим РНК-полимеразу T7, приводило к сборке инфекционных частиц вируса бешенства. В указанной системе полимеразы T7 первичная транскрипция полноразмерной кРНК под контролем РНК-полимеразы T7 обеспечивала образование неэкпированного кРНК-транскрипта. Однако три гуанидиновых нуклеотида, которые формируют оптимальную инициаторную последовательность РНК-полимеразы T7, были прикреплены к 5-концу. С целью формирования аутентичного 3-конца кРНК-транскрипта, который необходим для продуктивного инфекционного цикла, была использована рибозимная последовательность вируса гепатита дельта (HDVRz), чтобы обеспечить точное аутокаталитическое расщепление на 3-конце кРНК-транскрипта.

Со времени первоначального сообщения Schnell et al. (1994) технологии, сходные с обратными генетическими системами, обусловили получение многочисленных вирусов с отрицательной смысловой РНК, формирующей нефрагментированный геном (Conzelmann, 1996; Conzelmann, 1998; Conzelmann et al., 1996; Magriott et al., 1999; Munoz et al., 2000; Nagai, 1999; Neumann et al., 2002; Roberts et al., 1998; Rose, 1996). Модификации исходной процедуры "спасения" включают экспрессию РНК-полимеразы T7 из стабильно трансфицированных клеточных линий (Radecke et al., 1996) или из экспрессирующих белки плазмид (Lawson et al., 1995), а также процедуры теплового шока для увеличения эффективности "спасения" (Parks et al., 1999). Основываясь на системе полимеразы T7, Bridgen и Elliott (1996) получили вирус Буньямвера (семейство Bunyaviridae) из клонированных кДНК и продемонстрировали возможность искусственного создания с помощью данной системы вирусов с отрицательной смысловой РНК, формирующей фрагментированный геном.

В 1999 г. была разработана технология плазмидных обратных генетических систем, основанная на использовании клеточной РНК-полимеразы I с целью получения вируса гриппа А с фрагментированным геномом непосредственно из клонированных кДНК (Fodor et al., 1999; Neumann и Kawaoka, 1999). РНК-полимераза I, ядерный фермент, синтезирует рибосомальную РНК, которая подобно РНК вируса гриппа не содержит кэпа на 5-конце или полиА-структуры на 3-конце. Транскрипция с помощью РНК-полимеразы I приводит к образованию конструкта, содержащего кРНК вируса гриппа, фланкированного промотором РНК-полимеразы I и последовательностями терминации, что обеспечивает синтез вРНК вируса гриппа (Fodor et al., 1999; Neumann и Kawaoka, 2001; Pekosz et al., 1999). Система является высокоэффективной, обеспечивает формирование более 10^8 инфекционных вирусных частиц в расчете на 1 мл супернатанта трансфицированных плазмидой клеток через 48 ч после трансфекции.

Необходимой остается разработка способа получения ортомиксовирусов высокого титра, таких как вирус гриппа А, исключительно при использовании кДНК.

Краткое описание изобретения

Изобретение относится к выделенной и/или очищенной молекуле нуклеиновой кислоты (полинуклеотиду), кодирующей по крайней мере один из белков вируса гриппа в высоком титре, например большем чем 10^9 /мл, например большем чем 10^{10} /мл, или участок такого белка, а также к последовательности, комплементарной указанной. В одном случае выделенная и/или очищенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует белки HA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M или NS или их участки, имеющие по существу ту же самую активность, что и соответствующие полипептиды, кодируемые SEQ ID NO: 1-8.

Используемый здесь термин "по существу та же самая активность" означает активность, которая составляет 0,1, 1, 10, 30, 50, 90%, например, до 100% или более от активности соответствующего полноразмерного полипептида или означает определяемый уровень белка, который составляет около 80, 90% или более определяемого уровня соответствующего полноразмерного полипептида. В другом варианте осуществления изобретения выделенная и/или очищенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, который, по существу, идентичен, например, по крайней мере на 80%, например на 90, 92, 95, 97 или 99% аминокислотной последовательности полипептида, кодируемого одной из SEQ ID NO: 1-8. В еще одном варианте осуществления изобретения выделенная и/или очищенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая, по существу, идентична, например, по крайней мере на 50%, например на 60, 70, 80 или 90% или более одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1-8 или комплементарна ей и, в одном случае, также кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по крайней мере на 80%, например на 90, 92, 95, 97 или 99% идентичную аминокислотной последовательности полипептида, кодируемого одной из SEQ ID NO: 1-8. В другом варианте осуществления изобретения выделенная и/или очищенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид с одной или более, например, 2, 5, 10, 15, 20 или более консервативными аминокислотными заменами, например консервативными заменами от 10 до 20% остатков по отношению к полипептиду, кодируемому одной из SEQ ID NO: 1-8.

"Консервативные аминокислотные замены" относятся к взаимозаменяемым остатками, имеющим сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, состоит из глицина, аланина, валина, лейцина и изолейцина; группа аминокислот, имеющих алифатическо-гидроксильные боковые цепи, состоит из серина и треонина; группа аминокислот, имеющих боковые цепи, содержащие амид, состоит из аспарагина и глутамина; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, состоит из фенилаланина, тирозина и триптофана; группа аминокислот, имеющих щелочные боковые цепи, состоит из лизина, аргинина и гистидина, и группа аминокислот, имеющих боковые цепи, содержащие серу, состоит из цистеина и метионина. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются следующие: валин-лейцин-изолейцин; фенилаланин-тирозин; лизин-аргинин; аланин-валин; глутаминовая кислота-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения выделенная и/или очищенная молекула нуклеиновой кислоты или комплементарная ей последовательность гибридизуется с одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1-8 или комплементарной ей последовательностью в строгих, умеренно строгих или мягких условиях. Например, могут быть использованы следующие условия гибридизации: 7% додецилсульфата натрия (SDS), 0.5 M NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмыванием 2XSSC, 0.1% SDS при 50°C (мягкие условия); 7% додецилсульфата натрия (SDS), 0.5 NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмыванием 1XSSC, 0.1% SDS при 50°C (умеренно строгие условия, которые являются более желательными); 7% додецилсульфата натрия (SDS), 0.5 NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмыванием 0.5XSSC, 0.1% SDS при 50°C (жесткие условия, которые являются наиболее желательными). Предпочтительными являются следующие условия: 7% додецилсульфата натрия (SDS), 0.5 M NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмыванием 0.1XSSC, 0.1% SDS при 50°C (более строгие условия); 7% додецилсульфата натрия (SDS), 0.5 M NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмыванием 0.1XSSC, 0.1% SDS при 65°C (очень строгие условия). В одном случае заявленная молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по крайней мере на 50%, например на 60, 70, 80 или 90% или более соответствует аминокислотной последовательности полипептида, кодируемого последовательностью нуклеотидов, идентичной одной из SEQ ID NO: 1-8, и который обладает по существу той же самой активностью, что и полноразмерный полипептид, кодируемый одной из SEQ ID NO: 1-8.

Заявленная молекула нуклеиновой кислоты может быть использована для экспрессии белков вируса гриппа, получения химерных генов, например, с другими вирусными генами, включая другие гены вируса гриппа, и/или для получения рекомбинантного вируса. Изобретение также относится к выделенным полипептидам, рекомбинантному вирусу и клеткам-хозяевам, которые контактируют с молекулами нуклеиновой кислоты или заявленным в соответствии с изобретением рекомбинантным вирусом.

Изобретение также относится по крайней мере к одному из следующих выделенных и/или очищенных векторов: вектору, содержащему промотор, функционально связанный с кДНК белка PA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектору, содержащему промотор, функционально связанный с кДНК белка PB1 вируса гриппа, соединенной с последовательностью

терминации транскрипции; вектору, содержащему промотор, функционально связанный с кДНК белка PB2 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектору, содержащему промотор, функционально связанный с кДНК белка NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектору, содержащему промотор, функционально связанный с кДНК белка NP вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектору, содержащему промотор, функционально связанный с кДНК белка NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектору, содержащему промотор, функционально связанный с кДНК белка M вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектору, содержащему промотор, функционально связанный с кДНК белка NS вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции, причем по крайней мере один вектор включает последовательности, кодирующие белки NA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M, NS или их участки, имеющие по существу ту же самую активность, что и соответствующий полипептид, кодируемый одной из SEQ ID NO: 1-8, например последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого по крайней мере на 80% идентична последовательности полипептида, кодируемого одной из SEQ ID NO: 1-8. Факультативно, два вектора могут быть использованы вместо вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка M вируса гриппа, например вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка M1 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции, и вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка M2 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции.

Изобретение также относится к выделенным и очищенным векторам или плазмидам, которые экспрессируют или кодируют белки вируса гриппа, или экспрессируют или кодируют vРНК, как нативную, так и рекомбинантную vРНК. Предпочтительно векторы содержат кДНК вируса гриппа, например, вируса гриппа А (например, любой ген вируса гриппа А, в том числе подтипов 15 NA или 9 NA), вируса гриппа В или С [см. главы 45 и 46 Fields Virology (Fields et al. (eds.), Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, PA (1996), включенные в настоящее описание в качестве ссылок], хотя в составе заявленных векторов и способов могут быть использованы гены любых организмов. Может быть использована кДНК, находящаяся как в смысловой, так и в антисмысловой ориентации по отношению к промотору. Например, вектор, заявленный в соответствии с настоящим изобретением, может кодировать белок вируса гриппа (смысловая ориентация) или vРНК (антисмысловая ориентация). Любой подходящий промотор или последовательность терминации транскрипции может использоваться для экспрессии белка или пептида, например, вирусного белка или пептида, белка или пептида невирусного патогенна или терапевтически значимого белка или пептида.

Изобретение также относится к композициям, содержащим многочисленные векторы на основе вируса гриппа, заявленные в соответствии с настоящим изобретением. В одном случае композиции включают: а) по крайней мере два вектора, выбранные из вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка PA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка PB1 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка PB2 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка NP вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка M вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции, и вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка NS вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции, причем по крайней мере один вектор содержит промотор, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, заявленной в соответствии с настоящим изобретением, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; и б) по крайней мере два вектора, выбранные из вектора, кодирующего белок PA вируса гриппа, вектора, кодирующего белок PB1 вируса гриппа, вектора, кодирующего белок PB2 вируса гриппа, и вектора, кодирующего белок NP вируса гриппа. Необязательно, векторы, указанные в б), включают один или более векторов, кодирующих белки NP, NS, M, например, M1 и M2, NA или NA. Предпочтительно векторы, кодирующие вирусные белки, также содержат последовательность терминации транскрипции.

Еще в одном случае композиции включают: а) по крайней мере два вектора, выбранные из вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка PA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка PB1 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка PB2 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции;

крипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка NP вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белков NA и NB вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка M вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка NS вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции, и вектора, содержащего промотор, функционально связанный с кДНК белка M2 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции, причем по крайней мере один вектор содержит промотор, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, заявленной в соответствии с настоящим изобретением, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; и б) по крайней мере два вектора, выбранные из вектора, кодирующего белок PA вируса гриппа, вектора, кодирующего белок PB1 вируса гриппа, вектора, кодирующего белок PB2 вируса гриппа, вектора, кодирующего белок NP вируса гриппа. Необязательно, векторы, указанные в б), включают один или более векторов, кодирующих белки NP, NS, M, NA или NA. Предпочтительно векторы, кодирующие вирусные белки, также содержат последовательность терминации транскрипции.

Композиции, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, также могут содержать представляющие интерес ген или открытую рамку считывания, например чужеродный ген, кодирующий иммуногенный пептид или белок, используемые в качестве вакцины. Соответственно, изобретение также относится к композициям, описанным выше, в которых один из векторов замещен или же композиции дополнительно содержат вектор, включающий промотор, связанный с 5-концом последовательностей вируса гриппа, необязательно содержащих 5-кодирующие вирусные последовательности или их фрагменты, связанные с представляющей интерес последовательностью нуклеиновой кислоты, например, с кДНК, соединенной с 3-концом последовательностей вируса гриппа, необязательно содержащих 3-кодирующие вирусные последовательности или их фрагменты, связанные с последовательностью терминации транскрипции. Предпочтительно представляющая интерес последовательность нуклеиновой кислоты, такая как кДНК, находится в антисмысловой ориентации. Введение такой композиции в клетку-хозяин, перmissive для репликации вируса гриппа, приводит к сборке рекомбинантного вируса, содержащего vРНК, соответствующую последовательностям вектора. Промотор в таком векторе, необходимый для образования vРНК, может быть промотором РНК-полимеразы I, промотором РНК-полимеразы II, промотором РНК-полимеразы III, промотором T7 и промотором T3, и, необязательно, вектор содержит последовательность терминации транскрипции, такую как последовательность терминации транскрипции РНК-полимеразы I, последовательность терминации транскрипции РНК-полимеразы II, последовательность терминации транскрипции РНК-полимеразы III или рибозим. В одном случае вектор, содержащий представляющую интерес последовательность нуклеиновой кислоты, содержит представляющую интерес кДНК. Такая кДНК как в составе вектора для получения vРНК, так и в составе вектора для получения белка, может кодировать иммуногенный эпитоп, такой как эпитоп, полезный для терапии рака или для использования в качестве вакцины, или пептид, а также полипептид, полезный для целей генной терапии. При получении вируса вектор или плаزمид, содержащие представляющие интерес ген или кДНК, могут быть замещены вектором или плазмидой, содержащими ген вируса гриппа, или могут быть добавлены к векторам или плазмидам, содержащим все гены вируса гриппа.

Многочисленные векторы, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, могут быть физически соединены друг с другом или же каждый вектор может присутствовать в качестве индивидуальной плазмиды или в другой форме, например в виде линейного вектора доставки нуклеиновой кислоты.

Промотор или последовательность терминации транскрипции в векторах экспрессии vРНК или белка могут быть теми же самыми или отличными от промотора и последовательности терминации транскрипции любого другого вектора. Предпочтительно, вектор или плаزمид, которые экспрессируют vРНК вируса гриппа, включают промотор, подходящий для экспрессии по крайней мере в одной подходящей клетке-хозяине, например, клетке-хозяине птиц или млекопитающих, таких, как клетка собаки, кошки, лошади, коровы, овцы или клетка приматов, в том числе человека, или, предпочтительно, в более чем одной клетке-хозяине.

В одном случае один или более векторов для получения vРНК включают промотор (без ограничений указанными) РНК-полимеразы I, например промотор РНК-полимеразы I человека; промотор РНК-полимеразы II, промотор РНК-полимеразы III, промотор T7 и промотор T3. Предпочтительные последовательности терминации транскрипции для векторов экспрессии vРНК включают (без ограничений указанными) последовательность терминации транскрипции РНК-полимеразы I, последовательность терминации транскрипции РНК-полимеразы II, последовательность терминации транскрипции РНК-полимеразы III или рибозим. В объеме настоящего изобретения рибозимы (без ограничений указанными) включают рибозимы tetrahymena, РНКазу Р, рибозимы в форме головки молотка, рибозимы в форме булавочной головки рибозимы вируса гепатита, а также синтетические рибозимы.

Еще в одном случае по крайней мере один вектор для получения vРНК включает промотор РНК-полимеразы II, соединенной с последовательностью рибозима, связанной с вирусной кодирующей последовательностью, соединенной с другой последовательностью рибозима, необязательно с последова-

тельностью терминации транскрипции РНК-полимеразы II. Кроме того, по крайней мере два и более предпочтительно, например, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 векторов для получения вРНК включают промотор РНК-полимеразы II, первую последовательность рибозима, которая связана с 5-концом последовательности, соответствующей вирусным последовательностям, в том числе вирусным кодирующим последовательностям, которые связаны с 5-концом второй последовательности рибозима, которая связана с 5-концом последовательности терминации транскрипции. Каждый промотор РНК-полимеразы II в каждом векторе для получения вРНК может быть тем же самым промотором РНК-полимеразы II или отличным от такового любого другого вектора для получения вРНК. Сходным образом, любая последовательность рибозима в каждом векторе для получения вРНК может быть той же самой последовательностью или отличной от таковой любого другого вектора для получения вРНК. Согласно одному варианту осуществления изобретения последовательности рибозимов в одном векторе не являются одинаковыми.

Изобретение также относится к способу получения вируса гриппа. Способ включает обеспечение контактирования клетки с многочисленными векторами, заявленными в соответствии с настоящим изобретением, например, одновременно или последовательно, в частности, с заявленной композицией, в количестве, эффективном для получения инфекционного вируса гриппа. Изобретение также относится к выделению вируса из клетки, которая контактировала с указанной выше композицией. Таким образом, изобретение также относится к выделенному вирусу, а также к клетке-хозяину, которая контактировала с заявленными композицией или вирусом. Кроме того, изобретение относится к способу контактирования клетки с одним или более векторами, предназначенными как для получения вРНК, так и белка, до контактирования с другими векторами, предназначенными как для получения вРНК, так и белка.

Заявленный в соответствии с изобретением способ обеспечивает простое манипулирование вирусами гриппа, например, путем введения аттенуированных мутаций в вирусный геном. Более того, поскольку вирусы гриппа индуцируют сильный гуморальный и клеточный иммунитет, изобретение позволяет использовать указанные вирусы в качестве высокоэффективных вакцинных векторов, в особенности с точки зрения доступности природных вариантов вируса, которые могут быть использованы последовательно в целях генной терапии.

Описанные здесь способы получения вирусов, которые не требуют инфицирования хелперными вирусами, полезны в исследованиях вирусного мутагенеза, для получения вакцин (например, против СПИДа, гриппа, гепатита В, гепатита С, риновирусной инфекции, филовиральной инфекции, малярии, герпеса и ящура) и конструирования векторов для целей генной терапии (например, для терапии рака, опухолей центральной нервной системы, СПИДа, мышечной дистрофии, недостаточности аденозиндезаминазы и орнитинтранскарбамилазы). Таким образом, изобретение обеспечивает получение вирусов, которые могут использоваться в медицинской практике (например, для получения вакцин или в генной терапии).

Изобретение также относится к способу иммунизации индивидуума против патогенного организма, например бактерии, вируса или паразита, а также злокачественной опухоли. Способ включает введение индивидууму такого количества по крайней мере одного выделенного вируса, заявленного в соответствии с настоящим изобретением, необязательно в комбинации с адьювантом, которое эффективно для иммунизации индивидуума. Вирус содержит вРНК, в том числе кодирующую полипептид патогенного организма или специфичный для опухоли полипептид.

Изобретение также относится к способу усиления или увеличения экспрессии эндогенного белка в организме млекопитающих, у которых имеются указания на заболевание или само заболевание, характеризующееся пониженным количеством или утратой синтеза эндогенного белка. Способ включает введение млекопитающему такого количества выделенного вируса, заявленного в соответствии с настоящим изобретением, в таком количестве, которое эффективно для усиления или увеличения количества эндогенного белка в организме млекопитающего. Предпочтительно млекопитающим является человек.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схематическая диаграмма установленной обратной генетической системы. Согласно методу трансфекции RNP (A) очищенный NP и полимеразу собирают в комплексы RNPs при использовании *in vitro* синтезированной вРНК. Клетки трансфицируют RNPs и далее инфицируют хелперным вирусом. Согласно методу РНК-полимеразы I (B) плазмиду, содержащую промотор РНК-полимеразы I, кДНК, кодирующую вРНК, подлежащую "спасению", и терминатор РНК-полимеразы I путем трансфекции вводят в клетки. Внутриклеточная транскрипция с помощью РНК-полимеразы I приводит к синтезу синтетической вРНК, которая упаковывается в потомство вирусных частиц при инфицировании клеток хелперным вирусом. При обоих методах вирусы-трансфектанты (т.е. вирусы, содержащие РНК, происходящую из клонированной кДНК) отбирают из популяции хелперных вирусов.

Фиг. 2. Схематическая диаграмма получения конструкторов РНК-полимеразы I. КДНК, происходящую из вируса гриппа, амплифицировали методом PCR, расщепляли BsmBI и клонировали в сайты BsmBI вектора рНН21 (Е. Hoffmann, Ph. D. тезисы, Justus, Liebig-University, Giessen, Germany), который содержит промотор РНК-полимеразы I человека (P) и терминатор РНК-полимеразы I мыши (T). Тимидиновый нуклеотид "выше" терминирующей последовательности (*T) соответствует 3-концу вРНК вируса гриппа. Последовательности вируса гриппа А показаны в блоках, закрашенных черным цветом (SEQ ID NO: 29-40).

Фиг. 3. Предлагаемый обратно-генетический способ для получения сегментированных вирусов с отрицательной смысловой РНК. Плазмиды, содержащие промотор РНК-полимеразы I и кДНК для каждого из восьми сегментов вирусной РНК, а также терминатор РНК-полимеразы I вводят путем трансфекции в клетки вместе с плазмидами, экспрессирующими белок. Несмотря на то что инфекционные вирусы могут быть получены при использовании плазмид, экспрессирующих PA, PB1, PB2 и NP, экспрессия всех остальных структурных белков (показаны в овалах) увеличивает эффективность продукции вируса в зависимости от того, какой вирус получают.

Фиг. 4. Титры различных вирусов гриппа.

Детальное описание изобретения

Определения.

Используемые здесь понятия "выделенный и/или очищенный" относятся к заявленным в соответствии с изобретением полученным, выделенным и/или очищенным *in vitro* вектору, плазмиде или вирусу, которые не ассоциированы с какими-либо примесями *in vivo* или по существу свободны от каких-либо примесей *in vitro*. Выделенный препарат вируса обычно получают культивированием вируса *in vitro* и его размножением; такой препарат по существу свободен от других инфекционных агентов.

Используемый здесь термин "по существу свободный" означает, что определенный инфекционный агент находится в количествах ниже уровня детекции при использовании стандартных методов определения данного агента.

Понятие "рекомбинантный вирус" означает, что данный вирус был сконструирован *in vitro*, например, при использовании технологии рекомбинантных ДНК для введения изменений в вирусный геном.

Понятие "рекомбинантная нуклеиновая кислота" или "рекомбинантная ДНК-последовательность или фрагмент (сегмент)" относится к нуклеиновой кислоте, например, ДНК, которая происходит или выделена из источника, который может последовательно химически "изменять" указанную ДНК *in vitro* таким образом, что эта последовательность будет отличаться от природной или не будет соответствовать ни одной из известных природных последовательностей, которые локализируются или будут локализованы в нативном геноме. Примером ДНК, происходящей из такого рода источника, может быть ДНК-последовательность, представляющая собой полезный ДНК-фрагмент, который химически синтезирован в очищенной по существу форме. Примером ДНК, "выделенной" из такого рода источника, может быть полезная ДНК-последовательность, которая вырезана или удалена из указанного источника химическим путем, например, при использовании рестрикционных эндонуклеаз, таким образом, что она может быть в дальнейшем использована, скажем, амплифицирована в целях осуществления изобретения, с помощью методов генной инженерии.

Репликация вируса гриппа.

Вирус гриппа типа А имеет геном, состоящий из восьми одноцепочечных отрицательных смысловых вирусных РНК (вРНК), которые кодируют все десять вирусных белков. Жизненный цикл вируса гриппа начинается со связывания гемагглютинина (HA) с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту, находящимися на поверхности клетки-хозяина, с последующим опосредованным рецепторами эндцитозом. Низкое значение pH в эндосомах запускает конформационное изменение HA, что приводит к экспонированию N-концевых участков субъединицы HA2 (так называемого белка слияния). Белок слияния инициирует слияние вируса и эндосомной мембраны и в цитоплазму клетки высвобождаются матриксный белок (M) и комплексы RNP. Последние состоят из нуклеопротеина (NP), который образует капсид для вРНК, и комплекса вирусной полимеразы, который сформирован белками PA, PB1 и PB2. RNPs транспортируются в ядро, где происходят транскрипция и репликация вируса. Комплекс РНК-полимеразы катализирует три различные реакции: синтез мРНК с 5-кэпом и 3-полиА-структурой, синтез полноразмерной комплементарной РНК (кРНК) и синтез геномной вРНК при использовании кДНК в качестве матрицы. Вновь синтезированные вРНК, NP и белки полимеразы затем собираются в RNPs, экспортируются из ядра и транспортируются к плазматической мембране, где происходит выпоноковывание вирусных частиц потомства. Белок нейраминидаза (NA) играет определяющую роль на поздней стадии инфекционного процесса, удаляя сиаловую кислоту из сиалилиполисахаридов, что приводит к высвобождению заново собранных вирионов через клеточную мембрану и предотвращает самоагрегацию вирусных частиц. Несмотря на то что сборка вируса включает взаимодействия типа "белок-белок" и "белок-вРНК", природа таких взаимодействий остается в значительной степени неизвестной.

Хотя вирусы гриппа типов В и С структурно и функционально схожи с вирусом гриппа типа А, между ними имеются определенные различия. Например, вирус гриппа типа В не имеет белка M2, обладающего активностью ионных каналов. Вирус гриппа типа С также не имеет белка M2, обладающего активностью ионных каналов. Однако белок SM1, скорее всего, имеет такую активность. Активность белка ионных каналов может быть определена методами, хорошо известными из уровня техники, например, описанными Holsinger et al. (1994) или в заявке WO 01/79273.

Клеточные линии и вирусы гриппа, которые могут быть использованы в соответствии с заявленным изобретением.

В соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы любые клетки, эффективно поддерживающие репликацию вирусов гриппа, в том числе мутантные клетки, которые экспрессируют

пониженные уровни одной или более сиаловых кислот, которые являются рецепторами вируса гриппа. Полученные таким образом вирусы могут быть реассортантными вирусами.

Предпочтительно клетки являются клетками, которые сертифицированы ВОЗ или проходят сертификацию и формируют перевиваемые клеточные линии. Требования к таким линиям при прохождении сертификации включают их характеристику посредством указания, по крайней мере, на родословную, ростовые свойства, иммунологический маркер, туморогенность, условия хранения, а также подразумевают тестирование на животных, куриных эмбрионах и клеточных культурах. Такая характеристика делается для того, чтобы подтвердить, что линии свободны от определяемых побочных агентов. В некоторых странах могут требоваться кариологические исследования. Кроме того, туморогенность предпочтительно тестируется в клетках, которые находятся на том же уровне пассирования, что и клетки, используемые для получения вакцин. Вирус предпочтительно очищают способом, который продемонстрировал постоянные результаты, до того, как он будет инактивирован или аттенуирован для получения вакцины (см., например, ВОЗ, 1982).

Также предпочтительно полностью охарактеризовать клеточные линии, подлежащие использованию, с точки зрения чистоты получаемого конечного продукта. Данные, которые могут быть использованы для характеристики клеток, используемых в соответствии с настоящим изобретением, включают (а) информацию об их источнике, происхождении и числе пассажей; (б) информацию об их ростовых свойствах и морфологических признаках; (в) результаты тестирования на наличие аденовирусных агентов; (г) описание отличительных свойств, например, биохимических, иммунологических, цитогенетических, которые позволяют четко идентифицировать клетки среди других клеточных линий, и (д) результаты тестирования туморогенности. Предпочтительно число пассажей и время удвоения популяции клеточной линии, используемой в качестве хозяина, должно быть как можно более низким.

Также предпочтительно, чтобы вирус, продуцируемый в клетках, был очень хорошо очищен до того, как он будет использован в целях приготовления вакцины или генной терапии. В целом, способы очистки должны приводить к эффективному удалению клеточной ДНК, других клеточных компонентов и аденовирусных агентов из препарата вируса. Способы эффективного расщепления или денатурации ДНК также могут быть использованы. См., например, Mizrahi, 1990.

Вакцины.

Заявленные в соответствии с настоящим изобретением вакцины могут содержать иммуногенные белки, в том числе гликопротеины любого патогенного организма, например, иммуногенный белок одной или более бактерий, вирусов, дрожжей или грибов. Таким образом, в одном случае заявленные вирусы гриппа могут быть вакцинными векторами вирусов гриппа или других вирусов, включая (без ограничений указанными) лентивирусы, такие как СПИД; вирусы гепатита В и С; вирусы герпеса, такие как CMV и HSV и вирус ящура.

Полную вирусную вакцину концентрируют путем ультрафильтрации и затем очищают зональным центрифугированием или хроматографией. Вакцину инактивируют до очистки или после очистки с помощью, например, формалина или бета-пропиолактона.

Субъединичные вакцины содержат очищенные гликопротеины. Такие вакцины могут быть получены, например, при использовании вирусных суспензий, фрагментированных обработкой детергентом, очищенных поверхностных антигенов или ультрацентрифугированием. Субъединичные вакцины могут содержать главный НА белок, а также НА. Используемый детергент может быть катионным детергентом, например дексадецил триметил бромидом аммония (Bachmeyer, 1975), анионным детергентом, таким как дезоксихолат аммония (Laver & Webster, 1976); или неионным детергентом, таким как имеющий коммерческое название TRITON X100. Гемагглютинин также может быть выделен после обработки вирионов протеазой, такой как бромелин, и далее очищен любым способом, например, описанным Grand и Skehel (1972).

Расщепленные вакцины содержат вирионы, которые были подвергнуты обработке агентами, которые растворяют липиды. Такие вакцины могут быть получены, например, при использовании водной суспензии очищенного вируса, полученного, как описано выше, инактивированного или нет, обработанной при перемешивании растворителями липидов, такими как этиловый эфир или хлороформ, ассоциированными с детергентами. Растворение липидов вирусной оболочки приводит к фрагментации вирусных частиц. Замещенная водная фаза содержит расщепленную вакцину, включающую фрагментированные вирусные частицы с удаленными природными липидными оболочками гемагглютинина и нейраминидазы, а также удаленными коровыми структурами и продуктами их деградации. Полученные в результате указанных процедур инфекционные частицы инактивируют, если это не было сделано ранее.

Инактивированные вакцины.

Заявленные инактивированные вакцины вируса гриппа получают инактивированием реплицирующегося вируса, который является объектом настоящего изобретения, при использовании известных способов, таких как (без ограничений указанными) обработка формалином или бета-пропиолактоном. Инактивированные вакцины, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением, могут включать вакцины, содержащие целые вирусы (WV), или вакцины, содержащие субвирионы (SV) (расщепленные вакцины). WV вакцины содержат интактный, инактивированный вирус, в то время как SV вакци-

ны содержат очищенный вирус, разрушенный обработкой детергентами, которые растворяют содержащую липиды вирусную оболочку, и далее подвергнутый химической инактивации.

Кроме того, вакцины, которые могут быть использованы, включают такие вакцины, которые содержат выделенные поверхностные белки HA и NA. В целом, ответы на SV вакцины и вакцины, содержащие поверхностные антигены (т.е. на HA или NA), являются схожими. Экспериментальным образом инактивированная WV вакцина, содержащая антиген NA, иммунологически родственной таковому эпидемическому вирусу, и неродственной HA, по-видимому, менее эффективна (Ogra et al., 1977). Инактивированные вакцины, содержащие оба релевантных поверхностных антигена, предпочтительны.

Живые аттенуированные вирусные вакцины

Живые аттенуированные вакцины вируса гриппа также могут быть использованы для предупреждения или лечения инфекции, вызываемой указанным вирусом, в соответствии с известными подходами. Аттенуация предпочтительно обеспечивается при использовании одностадийной процедуры, подразумевающей перенос аттенуированных генов из аттенуированного донорного вируса в реплицируемый вирусный изолят или реассортантный вирус с помощью известных методов (см., например, Murphy, 1993). Поскольку устойчивость к вирусу гриппа типа А опосредуется развитием иммунного ответа на гликопротеины HA и NA, гены, кодирующие указанные поверхностные антигены, должны быть получены из реассортантных вирусов или клинических изолятов, обладающих высокой скоростью роста. Аттенуированные гены получают из аттенуированных родительских вирусов. Согласно данному подходу, гены, которые обеспечивают аттенуацию, предпочтительно, не кодируют гликопротеины HA и NA. С другой стороны, эти гены не могут быть перенесены в реассортанты, экспонирующие поверхностные антигены клинических вирусных изолятов.

Многие донорные вирусы были протестированы на их способность служить аттенуированными вирусами гриппа. В качестве примера, не ограничивающего соответствующий подход, для получения аттенуированной вирусной вакцины может быть использован адаптированный к холоду донорный вирус A/AnnArbor(AA)/6/60(H2N2) (см., например, Edwards, 1994; Murphy, 1993). Кроме того, живые аттенуированные реассортантные вирусные вакцины могут быть получены путем комбинирования адаптированного к холоду донорного вируса с вирулентным реплицируемым вирусом, заявленным в соответствии с настоящим изобретением. Реассортантное потомство затем отбирают при 25°C (рестриктивная температура для репликации вирулентного вируса) в присутствии антисыворотки к H2N2, которая ингибирует репликацию вируса, экспрессирующего поверхностные антигены аттенуированного адаптированного к холоду донорного вируса A/AA//6/60(H2N2).

Значительные серии реассортантов H1N1 и H3N2 были протестированы на людях и удовлетворяли следующим свойствам: (а) инфекционности; (б) были аттенуированы по отношению к серонегативным детям и иммунологически примированным людям; (в) иммуногенности и (г) генетической стабильности. Иммуногенность адаптированных к холоду реассортантов коррелировала с уровнем их репликации. Таким образом, приобретение шести трансферабельных генов адаптированного к холоду вируса новыми вирусами дикого типа воспроизводимым образом аттенуировало эти вирусы и позволило использовать их в вакцинах, предназначенных как для взрослых, так и для детей.

Другие аттенуирующие мутации могут быть введены в гены вируса гриппа с помощью сайт-направленного мутагенеза для "спасения" инфекционных вирусов, имеющих эти мутантные гены. Аттенуирующие мутации могут быть введены в некодирующие участки генома, а также и в кодирующие участки. Такие мутации также могут быть введены в гены, отличные от тех, что кодируют HA или NA, например в ген PB2 полимеразы (Subbarao et al., 1993). Таким образом, могут быть получены новые донорные вирусы, содержащие аттенуированные мутации, введенные сайт-направленным мутагенезом, которые могут быть использованы для редукции живых аттенуированных реассортантов H1N1 и H3N2, являющихся кандидатными вакцинными вирусами, с помощью метода, аналогичного описанному выше для адаптированного к холоду донорного вируса A/AA//6/60. Сходным образом, другие известные и подходящие аттенуированные донорные штаммы могут быть реассортированы с заявленным в соответствии с настоящим изобретением вирусом гриппа с целью получения аттенуированных вакцин, пригодных для вакцинации млекопитающих (Enami et al., 1990; Muster et al., 1991; Subbarao et al., 1993).

Предпочтительно, чтобы такие аттенуированные вирусы сохраняли гены, полученные от вирусов, кодирующих антигенные детерминанты, практически сходные с таковыми первоначальных клинических изолятов. Это обусловлено тем, что аттенуированная вакцина предназначена для генерации по существу той же самой антигенности, которой обладает первоначальный клинический изолят вируса, и в то же время она должна утратить инфекционность до такой степени, чтобы минимальным образом индуцировать серьезные условия для развития заболевания в организме иммунизируемого млекопитающего.

Соответственно, вирус должен быть аттенуирован или инактивирован, введен в состав вакцины и применен согласно известным методам, чтобы вакцина индуцировала иммунный ответ в организме животного, например млекопитающего. Из уровня техники хорошо известны способы определения того, обладает ли аттенуированная или инактивированная вакцина той же антигенностью, что и клинический изолят или обладающий высокой ростовой активностью происходящий из него штамм. Указанные известные способы включают использование антисыворотки или антител к выделенным вирусам, экспрес-

сирующим антигенные детерминанты донорного вируса; химическую селекцию (например, с помощью амантадина или римантидина); выявление активности или ингибирование активности НА или NA и скрининг ДНК (например, гибридизация с пробой или PCR) для подтверждения того, что донорные гены, кодирующие антигенные детерминанты (например, гены НА и NA), не обнаруживаются в аттенуированных вирусах. См., например, Robertson et al., 1988; Kilbourne, 1969; Aymard-Henry et al., 1985; Robertson et al., 1992).

Фармацевтические композиции.

Заявленные в соответствии с настоящим изобретением фармацевтические композиции, подходящие для инокуляции или парентерального или перорального введения, содержат аттенуированные или инактивированные вирусы гриппа и необязательно стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Композиции также могут содержать дополнительные агенты или наполнители, известные из уровня техники. См., например, Berkow et al., 1987; Avery's Drug Treatment, 1987; Osol, 1980; Katzung, 1992. Заявленные композиции, в основном, находятся в форме индивидуальных доз (единичных доз).

Соответствующие вакцины, в целом, содержат от около 0.1 до около 200 мкг, предпочтительно от 10 до 15 мкг гемагглютинина каждого из штаммов, входящих в состав композиции. Вакцина, которая представляет собой основную составляющую заявленной в соответствии с изобретением вакцинной композиции, может содержать вирусы типов А, В или С или их комбинацию, например, по крайней мере из двух или трех типов, по крайней мере из двух различных субтипов, по крайней мере из двух одинаковых типов, по крайней мере из двух одинаковых субтипов или из различных изолятов или реассортантов. Вирус гриппа человека типа А включает субтипы H1N1, H2N2 и H3N3.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и/или эмульсии, которые могут содержать дополнительные агенты или наполнители, известные из уровня техники. Примерами неводных растворов могут служить пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, например, оливковое и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Носители или окклюзивные повязки могут использоваться для увеличения проницаемости кожи и усиления адсорбции антигена. Жидкие дозированные формы для перорального применения могут включать раствор липосом, содержащий жидкую дозированную форму. Подходящие формы для суспендирования липосом включают эмульсии, суспензии, растворы, сиропы и эликсиры, содержащие инертные добавки, широко используемые в практике, например очищенную воду. Помимо инертных добавок такие композиции могут также включать адъюванты, увлажняющие агенты, эмульгаторы и суспендирующие агенты, а также подсластители, добавки, улучшающие вкус и запах и маскирующие вкус и запах. См., например, Berkow et al., 1992; Avery s, 1987; Osol, 1980 и Katzung, 1992.

Для введения заявленной композиции индивидууму она может быть составлена таким образом, что содержит соли, буферы, адъюванты или другие вещества, которые желательны использовать для повышения ее эффективности. В случае вакцин могут быть использованы адъюванты, вещества, которые усиливают специфический иммунный ответ. Обычно адъювант и композицию смешивают до презентации иммунной системе, но иногда вводят отдельно, но в один и тот же участок тела иммунизируемого млекопитающего. Примеры соединений, подходящих для использования в вакцинах, описаны Osol (1980).

Гетерогенность вакцин может быть обеспечена смешиванием по крайней мере двух штаммов реплицированных вирусов гриппа, например 2-50 штаммов. Штаммы вируса гриппа А или В, имеющие более новую антигенную композицию, предпочтительны. В соответствии с настоящим изобретением вакцины могут содержать штамм вируса гриппа, имеющий определенные антигенные вариации, полученные с помощью известных методов.

Заявленные в соответствии с настоящим изобретением фармацевтические композиции могут содержать или дополнительно включать по крайней мере одно химиотерапевтическое соединение, например, необходимое для генной терапии, иммуносупрессор, противовоспалительный агент или усилитель иммунитета. В случае вакцин химиотерапевтическое соединение включает (без ограничений указанными) гамма-глобулин, амантадин, гуанидин, гидроксibenзимидазол, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, фактор некроза опухолей альфа, тиосемикарбазоны, метисазоны, рифампин, рибавирин, аналог пиримидина, аналог пурина, фоскарнет, фосфоноуксусную кислоту, ацикловир, дидезоксинуклеозиды, ингибитор протеазы или ганцикловир. См., например, Katzung (1992) и ссылки, приведенные в этой работе на с. 798-800 и 680-681 соответственно.

Композиции также могут содержать различные, но небольшие количества формальдегида, свободного от эндотоксина, и консервантов, которые безопасны и не обладают нежелательными побочными эффектами при введении в организм при иммунизации млекопитающего соответствующей композицией.

Фармацевтические цели.

Введение композиции (или антисыворотки) может быть как профилактическим, так и терапевтическим. При профилактическом использовании заявленные композиции, которые в данном случае представляют собой вакцины, вводят в организм до того, как будут обнаружены какие-либо симптомы инфекции. Профилактическое введение композиции служит для предотвращения или ослабления возможной последующей инфекции. Сказанное справедливо и в том случае, когда заявленные в соответствии с изобретением композиции используются для целей генной терапии. Такое использование также предот-

вращает или ослабляет один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием.

При терапевтическом использовании аттенуированные или инактивированные вирусные вакцины вводят в организм при обнаружении какие-либо симптомов инфекции. Терапевтическое введение композиции служит для ослабления имеющейся инфекции.

См., например, Berkow et al., 1992; Avery, 1987 и Katzung, 1992. Сказанное справедливо и в том случае, когда заявленные в соответствии с изобретением композиции используются для целей генной терапии. Такое использование также ослабляет один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием, или течение заболевания.

Таким образом, заявленные в соответствии с изобретением аттенуированные или инактивированные вакцинные композиции могут применяться как до возникновения инфекции (для предотвращения или ослабления возможной инфекции), так и после ее обнаружения. Сходным образом, когда заявленные в соответствии с изобретением композиции используются для целей генной терапии, они вводятся в организм до того, как обнаруживаются какие-либо симптомы заболевания или нарушения, а также после этого.

Композиция считается "фармацевтически приемлемой", если ее введение не вызывает у реципиента никаких побочных реакций. Агент вводится в "терапевтически эффективном количестве", если это количество достаточно с физиологической точки зрения. Заявленная композиция считается "физиологически достаточной", если ее введение приводит к определяемому изменению физиологического состояния реципиента, например, усиливает по крайней мере один первичный или вторичный гуморальный или клеточный иммунный ответ по крайней мере на один штамм инфекционного вируса гриппа.

"Защита" не является абсолютной, т.е. инфекция вируса гриппа не может быть полностью предотвращена или устранена, даже если выявляется статистически значимое улучшение по сравнению с контрольной популяцией или выборкой пациентов. Защита может заключаться в смягчении тяжести заболевания или снижении скорости проявления симптомов инфицирования вирусом гриппа.

Фармацевтическое введение.

Заявленные в соответствии с изобретением композиции могут обеспечивать устойчивость к одному или более патогенам, например одному или более штаммам вируса гриппа как за счет пассивной, так и за счет активной иммунизации. При активной иммунизации инактивированные или аттенуированные живые вакцинные композиции вводят профилактически в организм хозяина (например, млекопитающего), и иммунная система хозяина отвечает на это введение защитой организма от соответствующей инфекции и/или заболевания. При пассивной иммунизации реципиенту, имеющему инфекцию вируса гриппа, вызванную по крайней мере одним штаммом, или находящемуся в группе риска, вводится готовая антисыворотка. Заявленные композиции при использовании в процедурах целей генной терапии могут вводиться как с терапевтическими целями, так и с профилактическими целями, что обеспечивается экспрессией нужного генного продукта при активной иммунизации.

В одном случае вакцина может использоваться применительно к особи женского пола млекопитающего (как во время беременности или родов, так и после них) в такие временные сроки и в таком количестве, чтобы обеспечить генерацию иммунного ответа, способного защитить как мать, так плод или новорожденного (путем пассивного проникновения антител через плаценту или их передачи с материнским молоком).

Настоящее изобретение также относится к способам предотвращения или аттенуирования нарушения или заболевания, например инфекции по крайней мере одного штамма патогенного организма. Как понимается в настоящем описании, вакцина предотвращает или ослабляет заболевание, если ее введение приводит к полному или частичному ослаблению (т.е. супрессии) симптомов или течения заболевания или же к развитию полного или частичного иммунитета к данному заболеванию. Как здесь понимается, композиция, используемая в целях генной терапии, предотвращает или ослабляет заболевание, если ее введение приводит к полному или частичному ослаблению (т.е. супрессии) симптомов или течения заболевания или же к развитию полного или частичного иммунитета к данному заболеванию.

Инактивированный или аттенуированный вирус гриппа или полученная на его основе композиция, может быть введена любым способом, обеспечивающим достижение заданных целей, если она приготовлена в виде фармацевтической композиции, как описано ранее.

Например, введение такой композиции может осуществляться различным парентеральным путем, таким как подкожный, внутривенный, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, интраназальный, пероральный или чрескожный. Парентеральное введение может быть осуществлено в виде болюсной инъекции или путем последовательной перфузии. Предпочтительным способом введения заявленной фармацевтической композиции является внутримышечный или подкожный способ. См., например, Berkow et al., 1992; Avery, 1987 и Katzung, 1992.

Обычная схема предотвращения, супрессии или лечения инфекции, связанной с вирусом гриппа, включает однократное введение эффективного количества вакцинной композиции, как описано выше, или повторяющиеся введения бустерных доз в течение периода времени, составляющего от одной недели до 24 месяцев, а также любые другие режимы.

В соответствии с заявленным изобретением "эффективное количество" композиции представляет

собой такое количество, которое достаточно для достижения желательного биологического эффекта. Следует понимать, что эффективная доза зависит от возраста пациента, пола, состояния здоровья, веса, терапии сопутствующего заболевания (если таковая имеет место быть), схемы лечения и природы того эффекта, который необходимо обеспечить. Количественные значения эффективных доз приведены ниже и не предназначены для ограничения объема изобретения; они отражают предпочтительные для использования дозы. Однако наиболее предпочтительные дозы должны подбираться индивидуально, как это всегда и происходит, специалистом в данной области знаний. См., например, Berkow et al., 1992; Avery's, 1987 и Katzung, 1992.

Доза аттенуированной вирусной вакцины для млекопитающих (например, человека) или птиц (имеется в виду взрослый организм) может составлять около 10^3 - 10^7 бляшкообразующих единиц (PFU) на 1 кг веса или же может быть выражена в любых других единицах. Доза инактивированной вакцины может составлять около 0.1-200, например 50 мкг гемагглютининового белка. Однако доза должна быть безопасной и эффективной, что определяется соответствующими методами при использовании существующих вакцин в качестве стандарта.

Доза иммунореактивного НА в каждой дозе реплицированной вирусной вакцины может быть стандартизована для того, чтобы содержать подходящее количество, например, 1-50 мкг НА или же такое количество НА, которое рекомендовано Службой общественного здравоохранения США, а именно 15 мкг НА в расчете на компонент вакцины для детей старше трех лет и 7,5 мкг НА в расчете на компонент вакцины для детей менее трех лет. Количество НА также может быть стандартизовано, однако указанный гликопротеин может оказаться лабильным в процессе очистки и хранения (Kendal et al., 1980). Каждая 0.5-1 мл доза вакцины предпочтительно содержит примерно 1-50 млн вирусных частиц, более предпочтительно 10 млн вирусных частиц. Изобретение иллюстрируется приведенными ниже примерами.

Пример 1.

Материалы и методы.

Клетки и вирусы. Клетки 293 почки эмбриона человека и клетки почки собаки Madin-Darby (MDCK) поддерживают в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и в модифицированной среде Игла (MEM), содержащей 5% сыворотки новорожденного теленка, соответственно. Клетки культивируют при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Вирусы гриппа A/WSN/33(H1N1) и A/PR/8/34(H1N1) размножают в 10-дневных куриных эмбрионах.

Конструирование плазмид. Для получения конструкторов РНК-полимеразы I клонированную кДНК, полученную из вирусной РНК A/WSN/33 и A/PR/8/34 встраивают между промоторной и терминирующей последовательностями РНК-полимеразы I. Коротко говоря, клонированную кДНК амплифицируют с помощью PCR при использовании праймеров, содержащих сайты BsmBI, расщепляют BsmBI и клонируют в сайтах BsmBI вектора рНН21, который содержит промотор РНК-полимеразы I человека и терминатор РНК-полимеразы I мыши, разделенные сайтами BsmBI (фиг. 2). Гены PB2, PB1, PA, NA, NP, NA, M и NS штамма A/WSN/33 амплифицируют с помощью PCR-реакции при использовании следующих плазмид: рSCWPB2, рGW-PB1 и рSCWPA (все плазмиды получают от д-ра Debi Nayak из Калифорнийского университета, Лос-Анжелес), рWH17, рWNP152, рT3WNA15 (Castracci et al., 1992), рGT3WM и рWNS1, соответственно. Ген PB1 вируса A/PR/8/34 амплифицируют при использовании рсДНК774 (Perez et al., 1998) в качестве матрицы. На фиг. 6 приведены последовательности праймеров. Для подтверждения того, что гены свободны от нежелательных мутаций, полученные с помощью PCR фрагменты секвенируют на автоматическом секвенаторе (Applied Biosystem Inc., CA, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. КДНК, кодирующую гены NA, NP, NA и M1 штамма A/WSN/33 клонируют, как описано в литературе (Huddleston et al., 1982) и субклонируют в эукариотическом векторе экспрессии рCAGGS/MCS (под контролем промотора бета-актина цыпленка) (Niwa et al., 1991) с получением рEWSN-NA, рCAGGS-WSN-NP0-14, рCAGGS-WNA15 и рCAGGS-WSN-M1-2/1, соответственно.

Гены M2 и NS2 из штамма A/WSN/33 амплифицируют с помощью PCR и клонируют в векторе рCAGGS/MCS с получением рEP24с и рCA-NS2. На конечном этапе используют рсДНК774(PB1), рсДНК762(PB2) и рсДНК787(PA) для экспрессии белков PB2, PB1 и PA под контролем промотора цитомегаловируса (Perez et al., 1998).

Получение инфекционных частиц вируса гриппа. Клетки 293 (1×10^6) трансфицируют максимально 17 плазмидами в различных количествах при использовании транс IT LT-1 (Panvera, Madison, Wisconsin) согласно рекомендациям производителя. Коротко говоря, ДНК и реагент для трансфекции смешивают (2 мкл транс IT LT-1 на 1 мкг ДНК), инкубируют при комнатной температуре в течение 45 мин и добавляют к клеткам. Через шесть часов смесь ДНК и агента для трансфекции заменяют на среду Opti-MEM (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland), содержащую 0.3% бычьего сывороточного альбумина и 0.01% эмбриональной телячьей сыворотки. В различное время после трансфекции вирусы собирают и титруют на клетках MDCK. Поскольку для осуществления указанной процедуры не требуются хелперные вирусы, полученные вирусы-трансфектанты анализируют без очистки методом бляшек.

Определение процентного содержания трансфицированных плазмидами клеток, продуцирующих вирусы. Через 24 ч после трансфекции клетки 293 диспергируют с помощью 0.02% EDTA до отдельных клеток. Затем клеточную суспензию разводят в 10 раз и переносят на слившийся монослой клеток MDCK

в 24-луночные планшеты. Далее вирусы определяют в исследовании гемагглютинации.

Иммунологическое окрашивание. Через 9 ч после инфицирования вирусом гриппа клетки дважды отмывают фосфатно-буферным раствором (PBS) и фиксируют параформальдегидом (в PBS) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем клетки обрабатывают 0.1%-ным Тритоном X-100 и исследуют, как описано Neumann et al. (1997).

Результаты.

Получение инфекционных вирусов при экспрессии плазмидами вирусных РНК-фрагментов, трех субъединиц полимеразы и белка NP. Несмотря на то что трансфекция клеток смесью RNPs, экстрагированных из очищенных вирионов, приводит к формированию инфекционных частиц вируса гриппа, описанная стратегия недостаточно эффективна, когда используются восемь различных RNPs, полученных *in vitro*. Для получения инфекционных вирусов гриппа полностью на основе кДНК восемь вирусных RNPs генерируют *in vitro*. Таким образом получают плазмиды, содержащие кДНК для полноразмерных вирусных РНК штамма A/WSN/33, фланкированную промотором РНК-полимеразы I человека и терминатором РНК-полимеразы I мыши. В принципе, трансфекция указанными 8 плазмидами эукариотических клеток должна приводить к синтезу всех восьми vРНК вируса гриппа. Белки PB2, PB1, PA и NP, полученные совместной трансфекцией плазмид, экспрессирующих белок, затем должны собираться вместе с vРНК в функционально активные vRNPs, которые затем должны реплицироваться и транскрибироваться, формируя инфекционные частицы вируса гриппа (фиг. 3). Клетки 293 в количестве 1×10^6 трансфицируют плазмидами, экспрессирующими белок (1 мкг рсДНК762(PB2), 1 мкг рсДНК774(PB1), 0.1 мкг рсДНК787(PA) и 1 мкг рCAGGS-WSN-NPO/14) и 1 мкг каждой из следующих плазмид для РНК-полимеразы I (рPo1I-WSN-PB2, рPo1I-WSN-PB1, рPo1I-WSN-PA, рPo1I-WSN-NA, рPo1I-WSN-NP, рPo1I-WSN-NS). Решение использовать пониженное количество рсДНК787(PA) основано на предварительных наблюдениях (Mena et al., 1996) и данных по оптимальным условиям получения вирусоподобных частиц (VLPs) (данные не приведены). Через 24 ч после трансфекции клеток 293×10^3 PFU вируса на 1 мл было обнаружено в супернатанте (эксперимент 1, табл. 1). Это подтверждает, в первую очередь, что методы обратной генетики способны обеспечить получение вируса гриппа типа А полностью из плазмид.

Таблица 1

Набор плазмид, используемых для получения вируса гриппа из клонированной кДНК*

I	Эксперимент							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Плазмиды для РНК полимеразы I:**								
PB1	+	+	-	-	-	-	-	-
PR8-PB1	-	-	+	+	+	+	+	+
PB2	+	+	+	+	+	+	+	+
PA	+	+	+	+	+	+	+	+
NA	+	+	+	+	+	+	+	+
NP	+	+	+	+	+	+	+	+
NA	+	+	+	+	+	+	+	+
M	+	+	+	+	+	+	+	+
NS	+	+	+	+	+	+	+	+
Плазмиды для экспрессии белка:								
PB1	+	+	+	+	+		+	+
PB2	+	+	+	+	+	+	-	+
PA	+	+	+	+	+	+	-	+
NP	+	+	+	+	+	+	+	-
NA	-	+	-	+	+	+	+	+
NA	-	+	-	+	+	+	+	+
M1	-	+	-	+	+	+	+	+
M2	-	+	-	+	+	+	+	+
NS2	-	+	-	+	+	+	+	+
Титр вируса (PFU/мл)	7×10^3	7×10^3	1×10^3	3×10^4	0	0	0	0

* Клетки 293 трансфицировали указанными плазмидами. Через 24 ч (эксперименты 1 и 2) и 48 ч (эксперименты 3-8) определяли титры вируса в супернатантах на клетках MDCK.

** Если не указано иное, плазмиды конструировали на основе кДНК, соответствующей РНК штамма A/WSN/33.

Эффективность образования вируса гриппа при совместной экспрессии всех вирусных структурных белков.

Несмотря на то что экспрессии вирусных NP и белков полимеразы достаточно для определяемого плазмидой продуцирования вирусов гриппа, возможно улучшение эффективности данного процесса. В предварительных исследованиях было показано, что экспрессия всех структурных белков вируса гриппа (PB2, PB1, PA, NA, NP, NA, M1, M2 и NS) приводит к образованию VLPs, содержащих искусственную vРНК, кодирующую маркерный ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (Mena et al., 1996). Таким образом, доступность целой кДНК, кодирующей структурные белки, вместо той, которая требуется для репликации и транскрипции vРНК, может повысить эффективность продуцирования вирусов. С этой целью клетки 293 трансфицировали оптимальными количествами плазмид экспрессии вирусного белка (оценка с помощью образования VLP; неопубликованные данные): 1 мкг рсДНК762(PB2) и рсДНК774(PB1); 0.1 мкг рсДНК787(PA); 1 мкг рEWSN-NA, рCAGGS-WSN-NPO/14 и рCAGGS-WNA15; 2 мкг рCAGGS-WSN-M1-2/1; 0.3 мкг рCA-NSA и 0.03 мкг рEP24с (для M2) вместе с 1 мкг каждой плазмиды для РНК-полимеразы I (эксперимент 2, табл. 2). Вторую партию клеток трансфицировали тем же самым набором плазмид для РНК-полимеразы I, за исключением гена PB1, для которого рPo11-PR/8/34-PB1 была замещена для попытки получить реассортантный вирус, вместе с плазмидами, экспрессирующими PA, PB1, PB2 и NP (эксперимент 3, табл. 1) или плазмидами, экспрессирующими все структурные белки (эксперимент 4, табл. 1). Выход вируса WSN не был существенно другим через 24 ч (эксперименты 1 и 2, табл. 1) и 36 ч (данные не приведены) после трансфекции. Однако более чем 10-кратное увеличение выхода вируса при использовании PR/8/34-PB1 было обнаружено, когда все структурные белки вируса гриппа были экспрессированы (эксперименты 3 и 4, табл. 1). Негативные контроли, в которых не было одной из плазмид экспрессии белков PA, PB1, PB2 или NP, не продуцировали вирус (эксперименты 5-8, табл. 1). Таким образом, в зависимости от продуцируемого вируса, экспрессия всех структурных белков вируса гриппа типа А повышало эффективность метода обратной генетики.

Далее определяли кинетику продукции вируса после трансфекции клеток при использовании набора плазмид, содержащих ген A/PR/8/34-PB1, применяемых для получения вируса. В двух из трех экспериментах вирус впервые определялся через 24 ч после трансфекции. Титр, измеренный в данный момент времени, составил более 103 PFU/мл и затем он увеличился до более 106 PFU/мл через 48 ч после трансфекции (табл. 2). Для установления процента трансфицированных плазмидой клеток, продуцирующих вирусы, клетки 293Т обрабатывали EDTA (0.02%) через 24 ч после трансфекции для их диспергирования и проводили исследования методом лимитирующих разведений. В этом эксперименте на указанный момент времени не было обнаружено вирусов в культуральном супернатанте. Полученные результаты свидетельствуют, что одна из 103.3 клеток продуцирует инфекционные вирусные частицы.

Таблица 2

Кинетика продукции вируса после трансфекции плазмидами клеток 293Т*

Часы после трансфекции плазмидой	Титры вируса в культуральном супернатанте (PFU/мл)		
	Эксперимент		
	1	2	2
6	0	ND	ND
12	0	ND	0
18	0	ND	0
24	0	2×10^3	6×10^3
30	ND	5×10^4	9×10^4
36	6×10^2	$> 1 \times 10^5$	7×10^5
42	ND	$> 1 \times 10^6$	5×10^6
48	8×10^4	$> 1 \times 10^6$	1×10^7

*Клетки 293Т были трансфицированы 8 плазмидами для РНК-полимеразы I, кодирующими вирусные гены из штамма A/WSN/33, за исключением гена PB1, происходящего из A/PR/8/34, и 9 плазмидами, экспрессирующими белки, как раскрыто в описании. В различные временные точки вирус титровали в клетках MDCK (ND - данные отсутствуют).

Выделение вируса гриппа, содержащего эпитоп FLAG в составе белка NA.

Для подтверждения того факта, что новая система обратной генетики обеспечивает встраивание мутаций в геном вируса гриппа типа А, был получен вирус, содержащий эпитоп FLAG в составе белка NA (Castrucci et al., 1992). Клетки 293Т трансфицировали плазмидой для РНК-полимеразы I (рPo11-WSN-NA/FL79), содержащей кДНК, кодирующую как белок NA, так и эпитоп FLAG, находящийся в основании "головки" белка, а также плазмидами для РНК-полимеразы I и плазмидами, экспрессирующими белок. Для подтверждения того факта, что выделенный вирус (PR8-WSN-FL79) действительно экспрессирует белок NA-FLAG, проводили иммунологическое окрашивание клеток, инфицированных PR8-WSN-FL79

или A/WSN/33 дикого типа.

Моноклональное антитело к эпитопу FLAG выявляло клетки, инфицированные PR8-WSN-FL79, но не инфицированные вирусом дикого типа. Получение вируса PR8-WSN-FL79 было в такой же степени эффективным, что и получение вируса дикого типа, не являющегося в данном случае мишенью (сведения не приведены). Указанные результаты свидетельствуют, что новая система обратной генетики обеспечивает получение введённых мутаций в геном вируса гриппа типа А.

Получение инфекционного вируса гриппа, содержащего мутации в гене PA.

Для получения вирусов, содержащих мутации в гене PA, были введены две молчащие мутации, создающие новые сайты распознавания рестрикционными эндонуклеазами (Bsp120I в положении 846 и PvuII в положении 1284 мРНК). Ранее было невозможно модифицировать указанный ген методом обратной генетики, поскольку не было действенной системы отбора. Были получены вирусы-трансфектанты PA-T846C и PA-A1284. Эти вирусы были клонированы двумя последовательными лимитирующими разведениями. Для подтверждения того факта, что полученные вирусы действительно являются трансфектантами с мутациями в гене PA, методом обратной PCR-транскрипции была получена кДНК гена PA. Вирусы PA-T846C и PA-A1284 содержали ожидаемые мутации в гене PA, что было показано наличием в их геноме новых введённых сайтов рестрикции. Осуществление PCR тех же самых вирусных образцов с теми же самыми праймерами, но без стадии обратной транскрипции, не приводило к получению каких-либо продуктов (данные не приведены), свидетельствуя о том, что кДНК PA действительно происходит из вРНК, а не из плазмиды, используемой для получения вирусов. Эти результаты показывают, каким образом вирусы с мутантными генами могут быть получены и выделены без использования хелперных вирусов.

Обсуждение результатов.

Описанная здесь система обратной генетики, таким образом, обеспечивает эффективное получение вирусов гриппа типа А полностью из клонированной кДНК. Bridgen и Elliot (1996) также использовали метод обратной генетики для получения вируса Буньявьера (семейство Bunyaviridae), но он содержал только три фрагмента отрицательной смысловой РНК и эффективность его продукции была ниже, а именно 10^2 PFU/ 10^7 клеток. Несмотря на то что выход вируса варьировал от эксперимента к эксперименту, постоянно определялось более 10^3 PFU/106 клеток вирусов гриппа, содержащих восемь фрагментов генома. Существуют различные объяснения высокой эффективности описанной здесь системы обратной генетики. Вместо получения RNPs *in vitro* (Luytjes et al., 1989), RNPs были получены *in vivo* посредством внутриклеточного синтеза вРНК при использовании РНК-полимеразы I и посредством направляемого плазмидой экспрессии белков вирусной полимеразы и NP. Также использование клеток 293Т, которые легко трансфицируются плазмидами (Goto et al., 1997), позволило убедиться в том, что для продукции вируса необходима большая популяция клеток, получающих все плазмиды. Кроме того, большое количество транскриптов, продуцируемых РНК-полимеразой I, которая является одним из наиболее обильно экспрессируемых белков в растущих клетках, также способствовало превышающему все ожидания повышению эффективности используемой системы. Все это привело, в свою очередь, к избытию транскриптов вРНК и синтезу адекватного количества вирусного белка, необходимого для инкапсулирования вРНК, формированию RNPs в ядре и экспорту указанных комплексов к клеточной мембране, где новые вирусы собирались и высвобождались из клеток.

Ранее созданные системы обратной генетики (Enami et al., 1990; Neumann et al., 1994; Luytjes et al., 1989; Pleschka et al., 1996) требуют инфицирования хелперным вирусом и, соответственно, таких способов селекции, которые позволяют выделить небольшое число трансфектантов из огромного количества хелперных вирусов. Такие стратегии использовались для получения вирусов гриппа, содержащих один из следующих происходящих из кДНК генов: PB2 (Subbarao et al., 1993), HA (Enami et al., 1991; Horimoto et al., 1994), NP (Li et al., 1995), NA (Enami et al., 1990), M (Castracci et al., 1995; Yasuda et al., 1994) и NS (Enami et al., 1991). Большинство способов селекции, за исключением тех, которые применимы к генам HA и NA, основаны на температуре роста, природе хозяина, чувствительности к лекарственным препаратам и, таким образом, лимитируют использование системы обратной генетики для функционального анализа генных продуктов. Даже в случае генов HA и NA, для которых созданы системы селекции, основанные на антителах, трудно выделить вирус с явными ростовыми дефектами. В противоположность этому, описанная здесь система обратной генетики не требует хелперного вируса и позволяет получать вирусы-трансфектанты с мутациями в любом фрагменте гена или с тяжелыми дефектами роста. Владение технологией введения любой нужной мутации в геном вируса гриппа типа А позволяет исследователям осуществлять многочисленные долговременные исследования, такие, как установление природы регуляторных последовательностей в нетранслируемых участках вирусного генома, структурно-функциональных взаимодействий между вирусными белками и взаимозависимости между молекулярной основой рестрикции по организму-хозяину и патогенностью вируса.

Несмотря на доступность инактивированных вакцин вируса гриппа, их эффективность является субоптимальной, что частично обусловлено их ограниченной способностью вызывать локальный IgA и цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ. Текущие клинические испытания живых вакцин вируса гриппа на основе адаптированных к холоду штаммов позволяют предположить, что такие вакцины опти-

мальным образом аттенуированы и не вызывают симптомов гриппа, но в достаточной степени индуцируют протективный иммунитет (см. обзор в Keitel & Piedra, 1998). Однако предварительные результаты свидетельствуют, что указанные живые вакцины вируса гриппа не значительно более эффективны, чем наилучшие инактивированные вакцины генам (см. обзор в Keitel & Piedra, 1998), и оставляют пространство для дальнейшего улучшения. Одна из возможностей заключается в модификации вакцины на основе адаптированных к холоду штаммов при использовании описанной выше системы обратной генетики. Альтернативно, можно начать с применения системы обратной генетики для получения эффективного штамма вируса гриппа типа А со множественными аттенуированными мутациями в генах, кодирующих внутренние белки. Наиболее значимое применение описанной здесь системы обратной генетики может привести к быстрой продукции аттенуированных живых вирусных вакцин при ожидаемых пандемиях, обусловленных новыми HA- и NA-субтипами вируса гриппа.

Новая система обратной генетики будет способствовать применению вирусов гриппа в качестве вакцинных векторов. Вирусы могут быть сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать чужеродные белки или иммуногенные эпитопы помимо белков вируса гриппа. Возможно, например, получение вирусов с чужеродными белками, которые кодируются девятым сегментом vRNA (Enami et al., 1991), и применение их в качестве вакцин. Вирусы гриппа не только вызывают сильный клеточно-опосредованный и гуморальный иммунитет, но и "поставляют" широкий спектр поверхностных вирионных белков HA и NA (например, 15 HA и 9 NA субтипов и их эпидемических вариантов), обеспечивая возможность повторной иммунизации той же самой популяции индивидуумов.

VLPs вирусов гриппа, содержащие искусственную vRNA, кодирующую маркерный ген, были получены экспрессией вирусных структурных белков и vRNA с помощью полимеразной системы "вирус осповакцины-T7" (Mena et al., 1996). Используя систему обратной генетики, в настоящее время можно получить VLPs, содержащие vRNA, кодирующую белки, необходимые для транскрипции и репликации vRNA (т.е. PA, PB1, PB2 и NP), а также vRNA, кодирующую представляющие интерес белки. Такие VLPs могут быть полезными векторами доставки генов. Важно, что отсутствие в них генов, кодирующих вирусные структурные белки, позволяет утверждать, что инфекционные вирусы не будут образовываться после осуществления VLP-генной терапии. Поскольку геном вируса гриппа не интегрируется в хромосому хозяина, VLP-система подходит для генной терапии в случаях, требующих только кратковременной трансдукции клеток (например, для лечения рака). В противоположность аденовирусным векторам (Kovesdi et al., 1997) VLPs вируса гриппа могут содержать варианты как HA, так и NA, что обеспечивает возможность повторного лечения популяции индивидуумов.

Семейство Orthomyxoviridae включает вирусы гриппа типов А, В и С, а также недавно классифицируемые в составе этого семейства тогтовирuсы. Стратегия получения инфекционных вирусов гриппа типа А полностью из клонированной кДНК, описанная здесь, может быть применена к любым ортомиксовирусам и, возможно, к другим вирусам с отрицательной смысловой РНК (например, Bunyaviridae, Arenaviridae). Возможность манипулирования вирусным геномом без технических ограничений имеет большое значение для изучения жизненного цикла вирусов и его регуляции, функционирования вирусных белков и молекулярных механизмов вирусного патогенеза.

Пример 2.

Для применения системы обратной генетики по отношению к вирусу гриппа A/Puerto Rico/8/34 vRNA экстрагировали из аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, зараженных A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), вариантом Madison с более высокой скоростью роста (PR8HG), при использовании набора РНКазы Qiagen в соответствии с рекомендациями производителя. КДНК синтезировали с помощью РТазы MMLV (Promega) и праймера Uni12. Затем кДНК амплифицировали в течение ночи с помощью PCR-реакции при использовании следующих реагентов.

Наборы праймеров

PB1: Ва PB1-1 и PB1-1735R (прямой фрагмент) и PB1-903 и Ва-PB1-2341R
(наращивающий фрагмент)

Ва PB1-1: CACACACGGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGCA (SEQ ID NO:9)

173PB1-1735R: GGGTTTGTATTTGTGTGTCACC (SEQ ID NO:10)

233PB1-903: CCAGGACACTGAAATTTCTTTCAC (SEQ ID NO:11)

Ba-PB1-2341R: CACACAGGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGCATTT (SEQ ID NO:12)

PB2: Ba PB2-1 и B2 1260R (прямой фрагмент) и WSN PB2 seq-2 и Ba-PB2-2341R (наращивающий фрагмент)

Ba PB2-1: CACACAGGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGCT (SEQ ID NO:13)

B2 1260R: CACACACGTCTCCATCATAACAATCCTCTTG (SEQ ID NO:14)

WSN PB2 seq-2: CTCCTCTGATGGTGGCATAAC (SEQ ID NO:15)

Ba-PB2-2341R: CACACAGGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT (SEQ ID NO:16)

PA: Bm-PA-1: CACACACGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGTAC (SEQ ID NO:17)

Bm-PA-2233R: CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTA CTT (SEQ ID NO:18)

HA: Bm-HA-1: CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGG (SEQ ID NO:19)

Bm-NS-890R: CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTGT TTT (SEQ ID NO:20)

NP: Bm-NP-1: CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGTA (SEQ ID NO:21)

Bm-NP-1565R: CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTAT TTTT (SEQ ID NO:22)

NA: Bm-NA-1: CACACAGGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGAGT (SEQ ID NO:23)

Ba-NA-1413R: CACACAGGTCTGGTATTAGTAGAAACAAGGAG TTTT (SEQ ID NO:24)

M: Bm-M-1: CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGTAG (SEQ ID NO:25)

Bm-M-1027R: CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTAG TTTT (SEQ ID NO:26)

NS: Bm-NS-1: CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGTG (SEQ ID NO:27)

Bm-NS-890R: CACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTGT TTT (SEQ ID NO:28)

ДНК-полимераза: нативная ДНК-полимераза pfu (Stratagene).
PCR-продукты разделяют гель-электрофорезом и экстрагируют из агарозного геля с помощью на-

бора фирмы Qiagen. Экстрагированные гены лигируют в слепой вектор pT7Blue (Novagen) при использовании набора для лигирования фирмы Takara ver. II. Через 5 ч лигированные гены переносят путем трансформации в клетки бактерий JM109 (гены PB2, M и NS) или DH5 альфа (гены PA, PB1 и NP). Шесть колоний для каждого гена культивируют в среде TB в течение 8 ч. Плазмиды экстрагируют из бактериальных культур и секвенируют по четыре колонии на ген.

Гены PA, NP, M и NS вырезают из вектора pT7Blue с помощью фермента BsmBI (New England Biolabs). Ген PB1 вырезают с помощью Bsa I (New England Biolabs). Вырезанные гены лигируют в течение ночи в вектор pPolIR, содержащий промотор РНК-полимеразы I человека и терминатор РНК-полимеразы I мыши, расщепленный с помощью BsmBI. Передний фрагмент гена PB2 из вектора pT7Blue вырезают с помощью Bsr GI (New England Biolabs) и Bam HI (Roche), а задний фрагмент - с помощью Bsr GI (New England Biolabs) и Spe I (Roche). Вырезанные фрагменты смешивают и расщепляют Bsa I. Через 6 ч расщепленные гены очищают при использовании набора для PCR-очистки фирмы Qiagen и лигируют в течение ночи между сайтами BsmBI вектора pPolIR.

Лигированные гены PB1-, PA-, NP-, M- и NS-pPolIR используют для трансформации клеток JM109 (гены M и NS) или DH5 альфа (гены PA, PB1 и NP) в течение ночи. Колонии трансформированных бактерий культивируют в среде LB в течение ночи. Лигированные гены PB2-pPolIR используют для трансформации клеток JM109 в течение ночи.

Плазмиды экстрагируют из бактериальных культур и правильность вставки генов подтверждают расщеплением ферментами. Колонии бактерий, трансформированные PB2-pPolIR, культивируют в LB в течение 8 ч. Затем плазмиды экстрагируют и правильность вставки генов подтверждают расщеплением ферментами. Все pPolIR-конструкты секвенируют для того, чтобы убедиться в том, что они не содержат нежелательных мутаций.

pPolIR-конструкты для PR8HG переносят путем трансфекции в эмбриональные клетки почки человека 293Т с помощью pPolIR-конструктов A/WSN/33(WSN)-HA и NA, A/HongKong/483/97(HK)-HAavir и NA или A/Kawasaki/01(Kawasaki)-HA и NA и четырех конструктов, экспрессирующих белки, для белков полимеразы и NP A/WSN/33. Супернатанты из трансфицированных клеток 293Т последовательно разводят (до 10^{-7}) и инфицируют ими аллантоисную полость 9-дневных куриных эмбрионов. Аллантоисную жидкость инфицированных эмбрионов затем собирают и титруют вирус в исследовании HA (табл. 3).

Таблица 3

Вирус, содержащий гены PR8 вместе со следующими генами HA и NA	Титр HA (HAU/мл) вируса в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, инокулированных супернатантами клеток 293Т, разведенными в следующих значениях:							
	без разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
WSN-HA NA	< 1	< 1	200	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
HK-HAavir NA	100	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Kawasaki-HA NA	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Позитивные по HA образцы (вирус с WSN-HA NA при разведении 10^{-2} и вирус с HK-HAavir NA при отсутствии разведения) разводят последовательно от 10^{-2} до 10^{-8} и 100 мкл каждого разведения инфицируют куриные эмбрионы. Аллантоисную жидкость инфицированных куриных эмбрионов собирают и титруют вирус в исследовании HA (табл. 4). 50%-ная доза инфицированных эмбрионов (EID₅₀) для A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), полученная из плазмиды, составляет $10^{10.33}$ /мл, а титр вируса равен 1:3200.

Получают рекомбинантный вирус, содержащий гены HA и NA A/HongKong/213/2003 (H5N1) и остальные гены вируса гриппа типа A из штамма PR8HG. Для данного вируса EID₅₀ составляет $10^{10.67}$ /мл, а титр вируса равен 1:1600.

Таблица 4

Вирус, содержащий гены PR8 вместе со следующими генами HA и NA	Титр HA (HAU/мл) вируса в каждом разведении						
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
WSN-HA NA	160	40	40	320	40	640	< 1
HK-HAavir NA	400	800	400	400	400	800	< 1

Последовательности генов PR8:

PA

AGCGAAAGCA GGTACTGATC CAAAATGGAA GATTTTGTGC
 GACAATGCTT
 CAATCCGATG ATTGTGCGAGC TTGCGGAAAA AACAAATGAAA
 GAGTATGGGG
 AGGACCTGAA AATCGAAACA AACAAATTG CAGCAATATG
 CACTCACTTG
 GAAGTATGCT TCATGTATTC AGATTTTCAC TTCATCAATG
 AGCAAGGCGA
 GTCAATAATC GTAGAACTTG GTGATCCAAA TGCACITTTG
 AAGCACAGAT
 TTGAAATAAT CGAGGGAAGA GATCGCACAA TGGCCTGGAC
 AGTAGTAAAC
 AGTATTTGCA ACACTACAGG GGCTGAGAAA CCAAAGTTTC
 TACCAGATT
 GTATGATTAC AAGGAGAATA GATTCATCGA AATTGGAGTA
 ACAAGGAGAG
 AAGTTCACAT ATACTATCTG GAAAAGGCCA ATAAAATTA
 ATCTGAGAAA
 ACACACATCC ACATTTTCTC GTTCACTGGG GAAGAAATGG
 CCACAAAGGC
 AGACTACACT CTCGATGAAG AAAGCAGGGC TAGGATCAAA
 ACCAGACTAT
 TCACCATAAG ACAAGAAATG GCCAGCAGAG GCCTCTGGGA
 TTCCTTTCGT

CAGTCCGAGA GAGGAGAAGA GACAATTGAA GAAAGGTTTG
 AAATCACAGG
 AACAAATGCGC AAGCTTGCCG ACCAAAGTCT CCCGCCGAAC
 TTCTCCAGCC
 TTGAAAATTT TAGAGCCTAT GTGGATGGAT TCGAACCGAA
 CGGCTACATT
 GAGGGCAAGC TGTCTCAAAT GTCCAAAGAA GTAAATGCTA
 GAATTGAACC
 TTTTTGAAA ACAACACCAC GACCACTTAG ACTTCCGAAT
 GGGCCTCCCT
 GTTCTCAGCG GTCCAAATTC CTGCTGATGG ATGCCTTAAA
 ATTAAGCATT
 GAGGACCCAA GTCATGAAGG AGAGGGAATA CCGCTATATG
 ATGCAATCAA
 ATGCATGAGA ACATTCTTTG GATGGAAGGA ACCCAATGTT
 GTTAAACCAC
 ACGAAAAGGG AATAAATCCA AATTATCTTC TGTCATGGAA
 GCAAGTACTG
 GCAGAACTGC AGGACATTGA GAATGAGGAG AAAATTCCAA
 AGACTAAAAA
 TATGAAGAAA ACAAGTCAGC TAAAGTGGGC ACTTGGTGAG
 AACATGGCAC
 CAGAAAAGGT AGACTTTGAC GACTGTAAAG ATGTAGGTGA
 TTTGAAGCAA
 TATGATAGTG ATGAACCAGA ATTGAGGTCG CTTGCAAGTT
 GGATTCAGAA
 TGAGTTAAC AAGGCATGCG AACTGACAGA TTCAAGCTGG
 ATAGAGCTCG
 ATGAGATTGG AGAAGATGTG GCTCCAATTG AACACATTGC
 AAGCATGAGA
 AGGAATTATT TCACATCAGA GGTGTCTCAC TGCAGAGCCA
 CAGAATACAT
 AATGAAGGGA GTGTACATCA ATACTGCCTT GCTTAATGCA
 TCTGTGCAG
 CAATGGATGA TTTCCAATTA ATTCCAATGA TAAGCAAGTG
 TAGAACTAAG
 GAGGGAAGGC GAAAGACCAA CTTGTATGGT TTCATCATAA
 AAGGAAAGATC
 CCACTTAAGG AATGACACCG ACGTGGTAAA CTTTGTGAGC
 ATGGAGTTTT
 CTCTCACTGA CCCAAGACTT GAACCACATA AATGGGAGAA
 GTACTGTGTT
 CTTGAGATAG GAGATATGCT TATAAGAAAGT GCCATAGGCC
 AGGTTTCAAG
 GCCCATGTTC TTGTATGTGA GAACAAATGG AACCTCAAAA
 ATTAAAATGA
 AATGGGGAAT GGAGATGAGG CGTTGCCTCC TCCAGTCACT
 TCAACAAATT
 GAGAGTATGA TTGAAGCTGA GTCCTCTGTC AAAGAGAAAAG
 ACATGACCAA

AGAGTTCTTT GAGAACAAAT CAGAAACATG GCCCATTGGA
 GAGTCCCCCA
 AAGGAGTGGA GGAAAGTTCC ATTGGGAAGG TCTGCAGGAC
 TTTATTAGCA
 AAGTCGGTAT TCAACAGCTT GTATGCATCT CCACAACAG
 AAGGATTTTC
 AGCTGAATCA AGAAAACAGC TTCTTATCGT TCAGGCTCTT
 AGGGACAACC
 TGGAACCTGG GACCTTTGAT CTGGGGGGC TATATGAAGC
 AATTGAGGAG
 TGCCTGATTA ATGATCCCTG GGTTTTGCTT AATGCTTCTT
 GGTCAACTC
 CTTCTTACA CATGCATTGA GTTAGTTGTG GCAGTGCTAC
 TATTTGCTAT
 CCATACTGTC CAAAAAAGTA CCTGTGTTTCT ACT
 (SEQ ID NO:1)

PB1

AGCGAAAGCA GGCAAACCAT TTGAATGGAT GTCAATCCGA
 CCTTACTTTT CTAAAAAGTG CCAGCACAAA ATGCTATAAG
 CACAACCTTC
 CCTTATACTG GAGACCCTCC TTACAGCCAT GGGACAGGAA
 CAGGATACAC
 CATGGATACT GTCAACAGGA CACATCAGTA CTCAGAAAAG
 GGAAGATGGA
 CAACAAACAC CGAAACTGGÀ GCACCGCAAC TCAACCCGAT
 TGATGGGCCA
 CTGCCAGAAG ACAATGAACC AAGTGGTTAT GCCCAAACAG
 ATTGTGTATT
 GGAGGCGATG GCTTTCCTTG AGGAATCCCA TCCTGGTATT
 TTTGAAAAC
 CGTGTATTGA AACGATGGAG GTTGTTCAGC AAACACGAGT
 AGACAAGCTG
 ACACAAGGCC GACAGACCTA TGAAGGACT CTAAATAGAA
 ACCAACCTGC
 TGCAACAGCA TTGGCCAACA CAATAGAAGT GTTCAGATCA
 AATGGCCTCA
 CGGCCAATGA GTCTGGAAGG CTCATAGACT TCCTTAAGGA
 TGTAATGGAG
 TCAATGAACA AAGAAGAAAT GGGGATCACA ACTCATTTC
 AGAGAAAGAG
 ACGGGTGAGA GACAATATGA CTAAGAAAAT GATAACACAG
 AGAACAATGG
 GTAAAAAGAA GCAGAGATTG AACAAAAGGA GTTATCTAAT
 TAGAGCATTG
 ACCCTGAACA CAATGACCAA AGATGCTGAG AGAGGGAAGC
 TAAAACGGAG
 AGCAATTGCA ACCCCAGGGA TGCAAATAAG GGGGTTTGTA
 TACTTTGTTG

AGACACTGGC AAGGAGTATA TGTGAGAAAC TTGAACAATC
AGGGTTGCCA
GTTGGAGGCA ATGAGAAGAA AGCAAAGTTG GCAAATGTTG
TAAGGAAGAT
GATGACCAAT TCTCAGGACA CCGAACTTTC TTTCACCATC
ACTGGAGATA
ACACCAAATG GAACGAAAAT CAGAATCCTC GGATGTTTTT
GGCCATGATC
ACATATATGA CCAGAAATCA GCCCGAATGG TTCAGAAATG
TTCTAAGTAT
TGCTCCAATA ATGTTCTCAA ACAAATGGC GAGACTGGGA
AAAGGGTATA
TGTTTGAGAG CAAGAGTATG AACTTAGAA CTCAAATACC
TGCAGAAATG
CTAGCAAGCA TCGATTTGAA ATATTTCAAT GATTCAACAA
GAAAGAAGAT
TGAAAAATC CGACCGCTCT TAATAGAGGG GACTGCATCA
TTGAGCCCTG
GAATGATGAT GGGCATGTC AATATGTAA GCACTGTATT
AGGCGTCTCC
ATCCTGAATC TTGGACAAAA GAGATACACC AAGACTACTT
ACTGGTGGGA
TGGTCTTCAA TCCTCTGACG ATTTTGCTCT GATTGTGAAT
GCACCCAATC
ATGAAGGGAT TCAAGCCGGA GTCGACAGGT TTTATCGAAC
CTGTAAGCTA
CTTGGAATCA ATATGAGCAA GAAAAAGTCT TACATAAACA
GAACAGGTAC
ATTTGAATTC ACAAGTTTTT TCTATCGTTA TGGGTTTGT
GCCAATTTCA
GCATGGAGCT TCCCAGTTTT GGGGTGTCTG GGATCAACGA
GTCAGCGGAC
ATGAGTATTG GAGTTACTGT CATCAAAAAC AATATGATAA
ACAATGATCT
TGGTCCAGCA ACAGCTCAA TGGCCCTTCA GTTGTTCATC
AAAGATTACA
GGTACACGTA CCGATGCCAT ATAGGTGACA CACAAATACA
AACCCGAAGA
TCATTTGAAA TAAAGAACT GTGGGAGCAA ACCCGTTCCA
AAGCTGGACT
GCTGGTCTCC GACGGAGGCC CAAATTTATA CAACATTAGA
AATCTCCACA
TTCTGAAGT CTGCCTAAAA TGGGAATTGA TGGATGAGGA
TTACCAGGGG
CGTTTATGCA ACCCACTGAA CCCATTTGTC AGCCATAAAG
AAATTGAATC
AATGAACAAT GCAGTGATGA TGCCAGCACA TGGTCCAGCC
AAAAACATGG
AGTATGATGC TGTTGCAACA ACACACTCCT GGATCCCCAA
AAGAAATCGA

TCCATCTTGA ATACAAGTCA AAGAGGAGTA CTTGAGGATG
 AACAAATGTA
 CCAAAGGTGC TGCAATTTAT TTGAAAAATT CTTCCCCAGC
 AGTTCATACA
 GAAGACCAGT CGGGATATCC AGTATGGTGG AGGCTATGGT
 TTCCAGAGCC
 CGAATTGATG CACGGATTGA TTTCGAATCT GGAAGGATAA
 AGAAAGAAGA
 GTTCACTGAG ATCATGAAGA TCTGTTCCAC CATTGAAGAG
 CTCAGACGGC
 AAAAAATAGTG AATTTAGCTT GTCCTTCATG AAAAAATGCC
 TTGTTTCTAC
 T
 (SEQ ID NO:2)

PB2

AGCGAAAGCA GGTCAATTAT ATTCAATATG GAAAGAATAA
 AAGAACTACG
 AAATCTAATG TCGCAGTCTC GCACCCGCGA GATACTCACA
 AAAACCACCG
 TGGACCATAT GGCCATAATC AAGAAGTACA CATCAGGAAG
 ACAGGAGAAG
 AATCCAGCAC TTAGGATGAA ATGGATGATG GCAATGAAAT
 ATCCAATTAC
 AGCAGACAAG AGGATAACGG AAATGATTCC TGAGAGAAAT
 GAGCAAGGAC
 AAACCTTATG GAGTAAAATG AATGATGCCG GATCAGACCG
 AGTGATGGTA
 TCACCTCTGG CTGTGACATG GTGGAATAGG AATGGACCAA
 TAACAAATAC
 AGTTCATTAT CCAAAAAATCT ACAAACCTTA TTTTGAAAGA
 GTCGAAAGGC
 TAAAGCATGG AACCTTTGGC CCTGTCCATT TTAGAAACCA
 AGTCAAAAATA
 CGTCGGAGAG TTGACATAAA TCCTGGTCAT GCAGATCTCA
 GTGCCAAGGA
 GGCACAGGAT GTAATCATGG AAGTTGTTTT CCCTAACGAA
 GTGGGAGCCA
 GGATACTAAC ATCGGAATCG CAACTAACGA TAACCAAAGA
 GAAGAAAGAA
 GAACTCCAGG ATTGCAAAAT TTCTCCTTG ATGGTTGCAT
 ACATGTTGGA
 GAGAGAACTG GTCCGCAAAA CGAGATTCCT CCCAGTGGCT
 GGTGGAACAA
 GCAGTGIGTA CATTGAAGTG TTGCATTGA CTCAAGGAAC
 ATGCTGGGAA
 CAGATGTATA CTCCAGGAGG GGAAGTGAGG AATGATGATG
 TTGATCAAAG

CTTGATTATT GCTGCTAGGA ACATAGTGAG AAGAGCTGCA
GTATCAGCAG
ATCCACTAGC ATCTTTATTG GAGATGTGCC ACAGCACACA
GATTGGTGGA
ATTAGGATGG TAGACATCCT TAGGCAGAAC CCAACAGAAG
AGCAAGCCGT
GGATATATGC AAGGCTGCAA TGGGACTGAG AATTAGCTCA
TCCTTCAGTT
TTGGTGGATT CACATTTAAG AGAACAAGCG GATCATCAGT
CAAGAGAGAG
GAAGAGGTGC TTACGGGCAA TCTTCAAACA TTGAAGATAA
GAGTGCATGA
GGGATATGAA GAGTTCACAA TGGTTGGGAG AAGAGCAACA
GCCATACTCA
GAAAAGCAAC CAGGAGATTG ATTCAGCTGA TAGTGAGTGG
GAGAGACGAA
CAGTCGATTG CCGAAGCAAT AATTGTGGCC ATGGTATTTT
CACAAGAGGA
TTGTATGATA AAAGCAGTCA GAGGTGATCT GAATTTTCGTC
AATAGGGCGA
ATCAACGATT GAATCCTATG CATCAACTTT TAAGACATTT
TCAGAAGGAT
GCGAAAGTGC TTTTCAAAA TTGGGGAGTT GAACCTATCG
ACAATGTGAT
GGGAATGATT GGGATATTGC CCGACATGAC TCCAAGCATC
GAGATGTCAA
TGAGAGGAGT GAGAATCAGC AAAATGGGTG TAGATGAGTA
CTCCAGCACG
GAGAGGGTAG TGGTGAGCAT TGACCGTTTT TTGAGAATCC
GGGACCAACG
AGGAAATGTA CTA CTACTGTCTC CCGAGGAGGT CAGTGAAACA
CAGGGAACAG
AGAAACTGAC AATAACTTAC TCATCGTCAA TGATGTGGGA
GATTAATGGT
CCTGAATCAG TGTGGTCAA TACCTATCAA TGGATCATCA
GAAACTGGGA
AACTGTTAAA ATTCAGTGGT CCCAGAACCC TACAATGCTA
TACAATAAAA
TGGAATTTGA ACCATTTTCAAG TCTTTAGTAC CTAAGGCCAT
TAGAGGCCAA
TACAGTGGGT TTGTAAGAAC TCTGTTCCAA CAAATGAGGG
ATGTGCTTGG
GACATTTGAT ACCGCACAGA TAATAAAACT TCTTCCCTTC
GCAGCCGCTC
CACCAAAGCA AAGTAGAATG CAGTTCTCCT CATTTACTGT
GAATGTGAGG
GGATCAGGAA TGAGAATACT TGTAAGGGGC AATTCTCCTG
TATTCAACTA
TAACAAGGCC ACGAAGAGAC TCACAGTTCT CGGAAAGGAT
GCTGGCACTT

TAACTGAAGA CCCAGATGAA GGCACAGCTG GAGTGGAGTC
 CGCTGTICTG
 AGGGGATTCC TCATTCTGGG CAAAGAAGAC AAGAGATATG
 GGCCAGCACT
 AAGCATCAAT GAACTGAGCA ACCTTGCGAA AGGAGAGAAG
 GCTAATGTGC
 TAATTGGGCA AGGAGACGTG GTGTTGGTAA TGAAACGGAA
 ACGGGACTCT
 AGCATACTTA CTGACAGCCA GACAGCGACC AAAAGAATTC
 GGATGGCCAT
 CAATTAGTGT CGAATAGTTT AAAAACGACC TTGTTTCTAC T
 (SEQ ID NO:3)

NP

AGCAAAAGCA GGGTAGATAA TCACTCACTG AGTGACATCA
 AAATCATGGC GTCTCAAGGC ACCAAACGAT CTTACGAACA
 GATGGAGACT
 GATGGAGAAC GCCAGAATGC CACTGAAATC AGAGCATCCG
 TCGGAAAAAT
 GATTGGTGA ATTGGACGAT TCTACATCCA AATGTGCACC
 GAACTCAAAC
 TCAGTGATTA TGAGGGACGG TTGATCCAAA ACAGCTTAAC
 AATAGAGAGA
 ATGGTGCTCT CTGCTTTTGA CGAAAGGAGA AATAAATACC
 TTGAAGAACA
 TCCCAGTGCG GGGAAAGATC CTAAGAAAAC TGGAGGACCT
 ATATACAGGA
 GAGTAAACGG AAAGTGGATG AGAGAACTCA TCCTTTATGA
 CAAAGAAGAA
 ATAAGGCGAA TCTGGCGCCA AGCTAATAAT GGTGACGATG
 CAACGGCTGG
 TCTGACTCAC ATGATGATCT GGCATTCCAA TTTGAATGAT
 GCAACTTATC
 AGAGGACAAG AGCTCTTGT CGCACCGGAA TGGATCCCAG
 GATGTGCTCT
 CTGATGCAAG GTTCAACTCT CCCTAGGAGG TCTGGAGCCG
 CAGGTGCTGC
 AGTCAAAGGA GTTGAACAA TGGTGATGGA ATTGGTCAGA
 ATGATCAAAC
 GTGGGATCAA TGATCGGAAC TTCTGGAGGG GTGAGAATGG
 ACGAAAAACA
 AGAATTGCTT ATGAAAGAAT GTGCAACATT CTCAAAGGGA
 AATTTCAAAC
 TGCTGCACAA AAAGCAATGA TGGATCAAGT GAGAGAGAGC
 CGGAACCCAG
 GGAATGCTGA GTTCGAAGAT CTCACCTTTC TAGCACGGTC
 TGCACTCATA
 TTGAGAGGGT CGGTTGCTCA CAAGTCCTGC CTGCCTGCCT
 GTGTGTATGG

ACCTGCCGTA GCCAGTGGGT ACGACTTTGA AAGGGAGGGA
 TACTCTCTAG
 TCGGAATAGA CCTTTCAGA CTGCTTCAAA ACAGCCAAGT
 GTACAGCCTA
 ATCAGACCAA ATGAGAATCC AGCACACAAG AGTCAACTGG
 TGTGGATGGC
 ATGCCATTCT GCCGCATTG AAGATCTAAG AGTATTAAGC
 TTCATCAAAG
 GGACGAAGGT GCTCCCAAGA GGGAAGCTTT CCACTAGAGG
 AGTTCAAATT
 GCTTCCAATG AAAATATGGA GACTATGGAA TCAAGTACAC
 TTGAACTGAG
 AAGCAGGTAC TGGGCCATAA GGACCAGAAG TGGAGGAAAC
 ACCAATCAAC
 AGAGGGCATC TGCGGGCCAA ATCAGCATAA AACCTACGTT
 CTCAGTACAG
 AGAAATCTCC CTTTTGACAG AACAACCATT ATGGCAGCAT
 TCAATGGGAA
 TACAGAGGGG AGAACATCTG ACATGAGGAC CGAAATCATA
 AGGATGATGG
 AAAGTGCAAG ACCAGAAGAT GTGTCTTTCC AGGGGCGGGG
 AGTCTTCGAG
 CTCTCGGACG AAAAGGCAGC GAGCCCGATC GTGCCTTCTT
 TTGACATGAG
 TAATGAAGGA TCTTATTCT TCGGAGACAA TGCAGAGGAG
 TACGACAATT
 AAAGAAAAAT ACCCTTGTTT CTACT
 (SEQ ID NO:4)

M

AGCAAAAGCA GGTAGATATT GAAAGATGAG TCTTCTAACC
 GAGGTCGAAA
 CGTACGTACT CTCTATCATC CCGTCAGGCC CCTCAAAGC
 CGAGATCGCA
 CAGAGACTTG AAGATGTCTT TGCAGGGAAG AACACCGATC
 TTGAGGTTCT
 CATGGAATGG CTAAGACAA GACCAATCCT GTCACCTCTG
 ACTAAGGGGA
 TTTTAGGATT TGTGTTACAG CTCACCGTGC CCAAGTGAGCG
 AGGACTGCAG
 CGTAGACGCT TTGTCCAAA TGCCCTTAAT GGGAACGGGG
 ATCCAAATAA
 CATGGACAAA GCAGTTAAAC TGTATAGGAA GCTCAAGAGG
 GAGATAACAT
 TCCATGGGGC CAAAGAAATC TCACTCAGTT ATTCTGCTGG
 TGCACTTGCC
 AGTTGTATGG GCCTCATATA CAACAGGATG GGGGCTGTGA
 CCACTGAAGT
 GGCATTGGC CTGGTATGTG CAACCTGTGA ACAGATTGCT
 GACTCCAGC

ATCGGTCTCA TAGGCAAATG GTGACAACAA CCAATCCACT
 AATCAGACAT
 GAGAACAGAA TGGTTTTAGC CAGCACTACA GCTAAGGCTA
 TGGAGCAAAT
 GGCTGGATCG AGTGAGCAAG CAGCAGAGGC CATGGAGGTT
 GCTAGTCAGG
 CTAGACAAAT GGTGCAAGCG ATGAGAACCA TTGGGACTCA
 TCCTAGCTCC
 AGTGCTGGTC TGAAAAATGA TCTTCTTGAA AATTGTCAGG
 CCTATCAGAA
 ACGAATGGGG GTGCAGATGC AACGGTTCAA GTGATCCTCT
 CACTATTGCC
 GCAAATATCA TTGGGATCTT GCACTTGACA TTGTGGATT
 TTGATCGTCT
 TTTTTTCAA TGCATTIACC GTCGCTTTAA ATACGGACTG
 AAAGGAGGGC
 CTTCTACGGA AGGAGTGCCA AAGTCTATGA GGGAAAGAATA
 TCGAAAGGAA
 CAGCAGAGTG CTGTGGATGC TGACGATGGT CATTITGTCA
 GCATAGAGCT
 GGAGTAAAAA ACTACCTTGT TTCTACT
 (SEQ ID NO:5)

NS

AGCAAAAGCA GGGTGACAAA AACATAATGG ATCCAAACAC
 TGTGTCAAGC
 TTTCAGGTAG ATTGCITTCT TTGGCATGTC CGCAAACGAG
 TTGCAGACCA
 AGAACTAGGC GATGCCCCAT TCCTTGATCG GCTTCGCCGA
 GATCAGAAAT
 CCCTAAGAGG AAGGGCAGT ACTCTCGGTC TGGACATCAA
 GACAGCCACA
 CGTGCTGGAA AGCAGATAGT GGAGCGGATT CTGAAAGAAG
 AATCCGATGA
 GGCCTTAAA ATGACCATGG CCTCTGTACC TGCGTCGCGT
 TACCTAACTG
 ACATGACTCT TGAGGAAATG TCAAGGGACT GGTCCATGCT
 CATACCCAAG
 CAGAAAGTGG CAGGCCCTCT TTGTATCAGA ATGGACCAGG
 CGATCATGGA
 TAAGAACATC ATACTGAAAG CGAACTTCAG TGTGATTTTT
 GACCGGCTGG
 AGACTCTAAT ATTGCTAAGG GCTTTCACCG AAGAGGGAGC
 AATTGTTGGC
 GAAATTTCAC CATTGCCTTC TCITCCAGGA CATACTGCTG
 AGGATGTCAA
 AAATGCAGTT GGAGTCCTCA TCGGAGGACT TGAATGGAAT
 GATAACACAG
 TTCGAGTCTC TGAAACTCTA CAGAGATTTCG CTTGGAGAAG
 CAGTAATGAG

AATGGGAGAC CTCCACTCAC TCCAAAACAG AAACGAGAAA
 TGGCGGGAAC
 AATTAGGTCA GAAGTTTGAA GAAATAAGAT GGTGATTGA
 AGAAGTGAGA
 CACAACTGA AGATAACAGA GAATAGTTTT GAGCAAATAA
 CATTATGCA
 AGCCTTACAT CTATTGCTTG AAGTGGAGCA AGAGATAAGA
 ACTTTCCTCGT
 TTCAGCTTAT TTAGTACTAA AAAACACCCT TGTTTCTACT
 (SEQ ID NO:6)

HA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACCAAAATGAAGGCAAAACCT
 ACTGGTCCTGTTATGTGCACTTGCAGCTGCAGAT
 GCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAAATTCAACCGACAC
 TGTTGACACAGTACTCGAGAAGAATGTGACAGT
 GACACACTCTGTTAACCTGCTCGAAGACAGCCACAACCGAAAACTAT
 GTAGATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGG
 GGAAATGTAACATCGCCGGATGGCTCTTGGGAAAACCCAGAATGCGAC
 CCACTGCTTCCAGTGAGATCATGGTCTACATT
 GTAGAAAACCAAACTCTGAGAATGGAATATGTTATCCAGGAGATTT
 CATCGACTATGAGGAGCTGAGGGAGCAATTGAG
 CTCAGTGTATCATTCGAAAAGATTCGAAAATATTTCCCAAAGAAAGCT
 CATGGCCCAACCACAACACAACCGGAGTAACGG
 CAGCATGCTCCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTA
 TGGCTGACGGAGAAGGAGGGCTCATACCCAAAG
 CTGAAAAATTTCTTATGTGAACAAAAAAGGAAAAGAGTCCCTTGTACT
 GTGGGGTATTCATACCCGCTAACAGTAAGGA
 ACAACAGAAATCTCTATCAGAATGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGA
 CTTCAAAATATAACAGGAGATTTACCCCGGAAA
 TAGCAGAAAAGACCCAAAAGTAAGAGATCAAGCTGGGAGGATGAACTA
 TTAAGGACCTTGCTAAAACCCGGAGACACAATA
 ATATTTGAGGCAAATGGAATCTAATAGCACCAATGTATGCTTTCCG
 ACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCGGCATCATCAC
 CTCAAAACGCATCAATGCATGAGTGTAACACGAAAGTGCAAAACACCCC
 TGGGAGCTATAAACAGCAGTCTCCCTTACCAGA
 ATATACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCAAAATACGTCAGGAGT
 GCCAAATGAGGATGGTTACAGGACTAAGGAAC
 ATTCCGTCCATCAATCCAGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCCGGTTTT
 ATTGAAGGGGGATGGACTGGAATGATAGATGG
 ATGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAACAGGGATCAGGCTATGCAG
 CGGATCAAAAAAGCACAAAAATGCCATTAACG
 GGATTACAAAACAAGGTGAACACTGTTATCGAGAAAATGAACATTCAA
 TTCACAGCTGTGGGTAAGAATTCAACAAATTA
 GAAAAAAGGATGGAAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTCT
 GGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTAGT
 TCTACTGGAAAATGAAAGGACTCTGGATTTCCATGACTCAAATGTGA
 AGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTA
 AGAATAATGCCAAAGAAATCGGAAATGGATGTTTTGAGTTCTACCAC
 AAGTGTGACAATGAATGCATGGAAAGTGTAAAGA

AATGGGACTTATGATTATCCCAAATATTCAGAAGAGTCAAAGTTGAA
 CAGGGAAAAGGTAGATGGAGTGAAATTGGAATC
 AATGGGGATCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCCGAGTTC
 ACTGGTGCCTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCA
 GTTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCT
 GAGATTAGAATTCAGAGATATGAGGAAAAAC
 ACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:7)

NA

AGCAAAAGCAGGGGTTTAAAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAAC
 CATTGGATCAATCTGTCTGGTAGTCGGACTAATT
 AGCCTAATATTGCAAATAGGGAATATAATCTCAATATGGATTAGCCA
 TTCAATTCAAACTGGAAGTCAAAACCATACTGG
 AATATGCAACCAAAACATCATTACCTATAAAAAATAGCACCTGGGTAA
 AGGACACAACCTCAGTGATATTAACCGCAATT
 CATCTCTTTGTCCCATCCGTGGGTGGGCTATATACAGCAAAGACAAT
 AGCATAAGAATTGGTTCCAAAGGAGACGTTTTT
 GTCATAAGAGAGCCCTTATTTCATGTTCTCACTTGAATGCAGGACC
 TTTTTCTGACCCAAGGTGCCTTACTGAATGA
 CAAGCATTCAAGTGGGACTGTTAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCCT
 TAATGAGCTGCCCTGTCCGTGAAGCTCCGTCCC
 CGTACAATTCAAGATTTGAATCGGTTGCTTGGTCAGCAAAGTGCATGTC
 ATGATGGCATGGGCTGGCTAACCAATCGGAATT
 TCAGGTCCAGATAATGGAGCAGTGGCTGTATTAATAACAACGGCAT
 AATAACTGAAACCATAAAAAAGTTGGAGGAAGAA
 AATATTGAGGACACAAGAGTCTGAATGTGCCTGTGTAATGGTTCAT
 GTTTTACTATAATGACTGATGGCCCGAGTGATG
 GGCTGGCCTCGTACAAAATTTCAAGATCGAAAAGGGGAAGGTTACT
 AAATCAATAGAGTTGAATGCACCTAATICTCAC
 TATGAGGAATGTTCTGTACCCTGATACCGGCAAAGTGATGTGTGT
 GTGCAGAGACAATTGGCATGGTTCGAACCGGCC
 ATGGGTGCTTTTCGATCAAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCT
 GCAGTGGGGTTTTTCGGTGACAACCCGCGTCCC
 AAGATGGAACAGGCAGCTGTGGTCCAGTGATGTTGATGGAGCAAAC
 GGAGTAAAGGGATTTTCATATAGGTATGGTAAT
 GGTGTTGGATAGGAAGGACCAAAAGTACAGTCCAGACATGGGTT
 TGAGATGATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGA
 GACTGATAGTAAGTTCCTGTGAGGCAAGATGTTGTGGCAATGACTG
 ATTTGGTCAGGGTATAGCGGAAGTTTCGTTCAAC
 ATCCTGAGCTGACAGGGCTAGACTGTATGAGGCCGTGCTTCTGGGTT
 GAATTAATCAGGGGACGACCTAAAGAAAAACA
 ATCTGACTAGTGCAGCAGCATTTCTTTTGTGGCGTGAATAGTGAT
 ACTGTAGATTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGA
 GTTGCCATTCAGCATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAAACTCCTGTGTT
 CTAAT (SEQ ID NO:8)

Пример 3.

Вирус гриппа A/HongKong/213/2003(H5N1, HK213) систематически реплицируется в организме цыплят, вызывая летальную инфекцию. Более того, этот вирус вызывает гибель и куриных эмбрионов. Таким образом, хотя поверхностные белки указанного вируса близкородственны циркулирующим в настоящее время патогенным штаммам вируса гриппа птиц, HK213 не может быть использован в качестве вакцинного штамма, поскольку попытки его выращивания в куриных эмбрионах заканчиваются получением аллантоисной жидкости, практически не содержащей вирус. Также использование высоковирулентного вируса с целью получения вакцины небезопасно для персонала. Для тестирования возможности использования A/PR/8/34 в качестве эффективного вакцинного вирусного штамма сайт расщепления гена NA НК 213 (содержащий многочисленные основные аминокислоты) подвергали мутированию от вирулентного до авирулентного фенотипа [от RERRRKR (SEQ ID NO: 9) к TETR]. Вирус, содержащий мутированный ген NA, не вызывал летальной, локализованной инфекции в организме цыплят. Кроме того, мутированный вирус не вызывал гибель куриных эмбрионов. Таким образом, выращивание мутированного вируса в куриных эмбрионах приводит к получению аллантоисной жидкости, содержащей большое количество вируса, и в такой аттенуированной форме он безопасен для применения в вакцинах.

В куриных эмбрионах получали рекомбинантный вирус, содержащий ген NA и мутированный ген NA из штамма HK213 и остальные гены из штамма высокого титра A/PR/8/34 (H1N1, HG-PR8) (пример 2), который растет в куриных эмбрионах в 10 раз с большей скоростью, чем другие штаммы A/PR/8/34 PR8 (10^{10} EID₅₀/мл; титр NA равен 1:8 000). Этот рекомбинантный вирус, экспрессирующий поверхностные белки, которые близкородственны циркулирующим в настоящее время патогенным штаммам вируса гриппа птиц, в куриных эмбрионах размножается в высоких титрах (фиг. 4). Таким образом, замена генов NA и NA HG-PR8 на гены циркулирующих в настоящее время патогенных штаммов вируса гриппа приводит к получению вакцинного штамма, который безопасен и позволяет использовать HG-PR8 в ка-

честве эффективного вакцинного штамма.

Источники информации.

Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1987).

Aymard-Henry et al., *Virology: A Practical Approach*, Oxford IRL Press, Oxford, 119-150(1985).

Bachmeyer, *Intervirology*, 5:260 (1975).

Berkow et al., eds. *The Merck Manual*. 16th edition, Merck & Co., Rahway, NJ (1992).

Bridgen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:15400 (1996).

Castrucci et al., *J. Virol.*, 66:4647 (1992).

Castrucci et al., *J. Virol.*, 69:2725 (1995).

Conzelmann et al., *J. Gen. Virol.*, 77:381 (1996).

Conzelmann et al., *Trends Microbiol.*, 4:386 (1996).

Conzelmann, *Annu. Rev. Genet.*, 32:123 (1998).

Cozelmann et al., *J. Virol.*, 68:713 (1994).

Edwards, *J. Infect. Dis.*, 169: 68 (1994).

Enami et al., *J. Virol.*, 65:2711 (1991).

Enami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:3802 (1990).

Enami et al., *Virology*, 185:291 (1991).

Fodor et al., *J. Virol.*, 73:9679 (1999).

Goto et al., *Virology*. 238:265 (1997).

Grand and Skehel, *Nature. New Biology*. 238:145 (1972).

Hatta et al., *Science*. 293:1840 (2001).

Horimoto et al., *J. Virol.*, 68:3120 (1994).

Huddleston et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:1029 (1982).

Keitel et al., in *Textbook of Influenza*, eds. Nickolson, K.G., Webster, R.G., and Hay, A. (Blackwell, Oxford), pp. 373-390 (1998).

Kendal et al., *Infect. Immunity*, 29:966 (1980).

Kilbourne, *Bull. M2 World Health Org.*, 41: 653 (1969).

Kovesdi et al., *J. Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:583 (1997).

Laver & Webster, *Virology*, 69:511 (1976).

Lawson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:4477 (1995).

Li et al., *Virus Res.*, 37:153 (1995).

Luytjes et al., *Cell*, 59:1107 (1989).

Marriott et al., *Adv. Virus Res.*, 53:321 (1999).

Mena et al., *J. Virol.*, 70:5016 (1996).

Mizrahi, (ed.), *Viral Vaccines*. Wiley-Liss, New York, 39-67 (1990).

Murphy, *Infect. Dis. Clin. Pract.*, 2: 174 (1993).

Muster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 5177 (1991).

Munoz et al., *Antiviral Res.*, 46:91 (2000).

Nagai et al., *Microbiol. Immunol.* 43:613 (1999).

Nagai, *Rev. Med. Virol.*, 9:83 (1999).

Neumann et al., *Adv. Virus Res.*, 53:265 (1999).

Neumann et al., *J. Gen. Virol.*, 83:2635 (2002).

Neumann et al., *J. Virol.*, 71:9690 (1997).

Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:9345 (1999).

Neumann et al., *Virology*, 202:477 (1994).

Neumann et al., *Virology*, 287:243 (2001).

Niwa et al., *Gene*. 108:193 (1991).

Ogra et al., *J. Infect. Dis.*, 134: 499 (1977).

Osol (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980).

Parks et al., *J. Virol.*, 73:3560 (1999).

Pekosz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:8804 (1999).

Perez et al., *Virology*, 249:52 (1998).

Pleschka et al., *J. Virol.*, 70:4188 (1996).

Radecke et al., *EMBO J.*, 14:5773 (1995).

Roberts et al., *Virology*, 247:1 (1998).

Robertson et al., *Biologicals*, 20:213 (1992).

Robertson et al., *Giornale di Igiene e Medicina Preventiva*, 29:4 (1988).

Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:14998 (1996).

Schnell et al., *EMBO J.*, 13:4195 (1994).

Subbarao et al., *J. Virol.* 67:7223 (1993).

World Health Organization TSR No. 673 (1982).

Все публикации, патенты и заявки на патенты включены в настоящее описание исключительно в качестве ссылок. В то время как в настоящем описании раскрыты наиболее предпочтительные варианты осуществления заявленного изобретения и многие детали приведены в целях иллюстрации изобретения, специалисту в данной области очевидно, что возможны дополнительные варианты осуществления изобретения, а многие приведенные здесь детали могут существенно варьировать, не выходя за рамки основных принципов изобретения.

Список последовательностей

<110> Каваока, Йошихиро

<120> Вирусы гриппа высокого титра для приготовления вакцин и генной терапии

<130> 800.038W01

<150> US 60/473,798

<151> 2003-05-28

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2233

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 1

```

agcgaagca ggtactgac caaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caatccgatg      60
attgtcagagc ttgcggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa aatcgaaaaa      120
aacaatttg cagcaaatatg cactcacttg gaagtatgct tcatgtattc agattttcac      180
ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgatccaaa tgcacttttg      240
aagcacagat ttgaaataat cgagggaaga gatcgcaaa tggcctggac agtagtaaac      300
agtatttgca aactacacag ggctgagaaa ccaaagtttc taccagattt gtatgattac      360
aaggagaata gattcatcga aattggagta acaaggagag aagttcacat atactatctg      420
gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaaa acacacatcc acattttctc gttcactggg      480
gaagaaatgg ccacaaaggc agactacact ctctgatgaag aaagcagggc taggatcaaa      540
accagactat tcaccataag acaagaaatg gccagcagag gcctctggga ttctcttctg      600
cagtccgaga gaggagaaga gacaattgaa gaaaggtttg aatcacagc aacaatgccc      660
aagccttccg accaaaagtct cccgccgaac ttctccagcc ttgaaaattt tagagcctat      720
gtggatggat tcgaaccgaa cggctacatt gagggcaagc tgtctcaaat gtccaaagaa      780
gtaaatgcta gaattgaacc ttttttgaaa acaacaaccac gaccacttag acttccgaat      840
gggcctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgatgg atgccttaaa attaagcatt      900
gaggacccaa gtcatgaagg agagggaata ccgctatatt atgcaatcaa atgcatgaga      960
acattctttg gatggaagga acccaatggt gttaaaccac acgaaaaggg aataaatcca      1020
aattatcttc tgtcatggaa gcaagtactg gcagaactgc aggacattga gaatgaggag      1080
aaaattccaa agactaaaaa tatgaagaaa acaagttagc taaagtgggc acttggtgag      1140
aacatggcac cagaaaagggt agactttgac gactgtaaag atgtagggtg tttgaagcaa      1200
tatgatagtg atgaaccaga attgaggtcg cttgcaagtt ggattcagaa tgagtttaac      1260
aaggcatgcg aactgacaga ttcaagctgg atagagctcg atgagattgg agaagatgtg      1320
gtcccaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcacatcaga ggtgtctcac      1380
tgcagagcca cagaatacat aatgaaggga gtgtacatca atactgcctt gcttaatgca      1440
tcttgtgcag caatggatga tttccaatta attccaatga taagcaagtg tagaactaag      1500
gagggaaggc gaaagaccaa cttgtatggt ttcatcataa aagggaagatc ccacttaagg      1560
aatgacaccg acgtggtaaa ctttgtgagc atggagtttt ctctcactga cccaagactt      1620
gaaccacata aatgggagaa gtaactgtgt cttgagatag gagatattgct tataagaagt      1680
gccataggcc aggtttcaag gcccatgttc ttgtatgtga gaacaaatgg aacctcaaaa      1740
attaaaatga aatggggaat ggagatgagg cgttgcctcc tccagtcact tcaacaaatt      1800
gagagtatga ttgaagctga gtctctgtc aaagagaaaag acatgaccaa agagttcttt      1860
gagaacaaat cagaaacatg gccattgga gagtccccca aaggagtgga ggaaagtccc      1920
attgggaagg tctgcaggac tttattagca aagtcggtat tcaacagctt gtatgcatct      1980
ccacaactag aaggattttc agctgaatca agaaaactgc ttcttatcgt tcaggctctt      2040
agggacaacc tggaacctgg gacctttgat cttggggggc tatatgaagc aattgaggag      2100

```

```

tgectgatta atgatccctg ggttttgett aatgcttctt ggttcaactc cttccttaca 2160
catgcattga gttagttgtg gcagtgctac tatttgctat ccatactgto caaaaaagta 2220
ccttgtttct act 2233

```

```

<210> 2
<211> 2341
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

```

```

<400> 2
agcgaaagca ggcaaacat ttgaatggat gtcaatccga ccttactttt cttaaaagtg 60
ccagcaca aa atgctataag cacactttc ccttatactg gagaccctcc ttacagccat 120
gggacaggaa caggatacac catggatact gtcaacagga cacatcagta ctcagaaaaag 180
ggaagatgga caacaacac cgaactgga gcaccgcaac tcaaccogat tgatgggcca 240
ctgccagaag acaatgaacc aagtggttat gcccaaacag attgtgtatt ggagcggatg 300
gctttccttg aggaatccca tcctggattt ttgaaaact cgtgtattga aacgatggag 360
gttgttcagc aaacacaggt agacaagctg acacaaggcc gacagacctc tgactggact 420
ctaaatagaa accaacctgc tgcaacagca ttggccaaca caatagaagt gttcagatca 480
aatggcctca cggccaatga gtctggaagg ctcatagact tccttaagga tgtaatggag 540
tcaatgaaca aagaagaaat ggggatcaca actcattttc agagaaagag acgggtgaga 600
gacaatatga ctaagaaat gataacacag agaacaatgg gtaaaaagaa gcagagattg 660
aacaagaaga gttatcta atagacattg accctgaaca caatgacca agatgctgag 720
agagggagc taaaacggag agcaattgca accccaggga tgcaataag ggggtttgta 780
tactttgttg agacactggc aaggagtata tgtgagaaac ttgaacaatc agggttgcca 840
gttgaggcca atgagaagaa agcaaagttg gcaaatgttg taaggaagat gatgaccaat 900
tctcaggaca cogaacttcc ttcaaccatc actggagata acaaccaatg gaaccgaaat 960
cagaatcctc ggatgttttt ggccatgac acatataatga ccagaaatca gcccgaaatg 1020
ttcagaaatg ttctaagtat tgctccaata atgttctcaa acaaaatggc gagactggga 1080
aaagggata tgtttgagag caagagtatg aaacttagaa ctcaaatacc tgcagaaatg 1140
ctagcaagca tcgatttgaa atatttcaat gattcaaca gaaagaagat tgaaaaaatc 1200
cgacogctct taatagagg gactgcatac ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc 1260
aatatgttaa gcactgtatt aggcgtctcc atcctgaatc ttggacaaaa gagatacacc 1320
aagactactt actggtgga tggctctcaa tcctctgacg attttgctct gattgtgaat 1380
gcacccaatc atgaaggat tcaagccgga gtgcacaggt tttatcgaac ctgtaagcta 1440
cttggaaatc atatgagcaa gaaaaagtct tacataaaca gaacaggta atttgaatc 1500
acaagttttt tctatcgta tgggtttgtt gccaatcca gcatggagct tcccagtttt 1560
gggtgtctg ggatcaacga gtcagcggac atgagtattg gaggttactgt catcaaaaac 1620
aatatgataa acaatgatct tgggtccagca acagctcaaa tggccttca gttgttcac 1680
aaagattaca ggtacacgta cogatgccat atagggtgaca cacaaataca aaccogaaga 1740
tcatttgaaa taagaaact gtgggagcaa acccgttcca aagctggact gctggctcc 1800
gacggaggcc caaatttata caacattaga aatctccaca ttctgaaat ctgctaaaaa 1860
tgggaattga tggatgagga ttaccagggg cgtttatgca acccactgaa cccattgtc 1920
agccataaag aaattgaaat aatgaacaat gcagtatga tgccagcaca tgggtccagcc 1980
aaaaacatgg agtatgatgc tgttgcaaca acacactcct ggatcccaa aagaaatcga 2040
tccatcttga atacaagtca aagaggagta cttgaggatg aacaaatgta ccaaagggtc 2100
tgcaatttat ttgaaaaatt cttcccagc agttcataca gaagaccagt cgggatatcc 2160
agtatgggtg aggctatggg ttccagagcc cgaattgatg cacggattga tttcgaatct 2220
ggaaggataa aaaaaaga gttcactgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagag 2280
ctcagacggc aaaaatagtg aatttagctt gtcttcatg aaaaaatgcc ttgtttctac 2340
t 2341

```

```

<210> 3
<211> 2341
<212> ДНК
<213> Вирус гриппа

```

```

<400> 3
agcgaaagca ggtcaattat attcaatag gaaagaataa aagaactacg aaatctaagt 60
tcgcagtctc gccccgca gatactaca aaaaccaccg tggaccatat ggcataatc 120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aaccagcac ttaggatgaa atggatgatg 180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggataacg aaatgattcc tgagagaaat 240

```

gagcaaggac	aaactttatg	gagtaaaatg	aatgatgccg	gatcagaccg	agtgatggta	300
tcacctctgg	ctgtgacatg	gtggaatag	aatggacca	taacaaatc	agttcattat	360
ccaaaaatct	acaaaactta	ttttgaaaga	gtcgaaggc	taaagcatgg	aacctttggc	420
cctgtccatt	ttagaacca	agtcaaaata	cgtcggagag	ttgacataaa	tctgtgcat	480
gcagatctca	gtgccaagga	ggcacaggat	gtaatcatgg	aagttgtttt	ccctaacgaa	540
gtgggagcca	ggatactaac	atcggaatcg	caactaacga	taaccaaaga	gaagaaagaa	600
gaactccagg	attgcaaaat	ttctcctttg	atggttgcat	acatgttggg	gagagaactg	660
gtccgcaaaa	cgagattcct	cccagtggtc	ggtggaacaa	gcagtgtgta	cattgaagtg	720
ttgcatttga	ctcaaggaac	atgctgggaa	cagatgtata	ctccaggagg	ggaagtgagg	780
aatgatgatg	ttgatcaaa	cttgattatt	gctgctagga	acatagttag	aagagctgca	840
gtatcagcag	atccactagc	atctttattg	gagatgtgcc	acagcacaca	gatttgtgga	900
attaggatgg	tagacatcct	taggcagaac	ccaacagaag	agcaagccgt	ggatatatgc	960
aaggctgcaa	tggactgag	aattagctca	tccttcagtt	ttggtggatt	cacatttaag	1020
agaacaagcg	gatcatcagt	caagagagag	gaagaggtgc	ttacgggcaa	tcttcaaa	1080
ttgaagataa	gagtgcatga	gggatatgaa	gagttcacia	tggttgggag	aagagcaaca	1140
gccatactca	gaaaagcaac	caggagattg	attcagctga	tagtgagtgg	gagagacgaa	1200
cagtcgattg	ccgaagcaat	aattgtggcc	atggtathtt	cacaagagga	ttgtatgata	1260
aaagcagtca	gaggtgatct	gaatttcgtc	aatagggcga	atcaacgatt	gaatcctatg	1320
catcaacttt	taagacattt	tcagaaggat	gcgaaagtgc	tttttcaaaa	ttggggagtt	1380
gaacctatcg	acaatgtgat	gggaatgatt	gggatattgc	ccgacatgac	tccaagcatc	1440
gagatgtcaa	tgagaggagt	gagaatcagc	aaaatgggtg	tagatgagta	ctccagcacg	1500
gagagggtga	tgggtgacat	tgaccgtttt	ttgagaatcc	gggaccaacg	aggaaatgta	1560
ctactgtctc	ccgaggaggt	cagtgaaaca	cagggaacag	agaaactgac	aataacttac	1620
tcactgtcaa	tgatgtggga	gattaatggt	cctgaatcag	tggtgtgcaa	tacctatcaa	1680
tggatcatca	gaaactggga	aactgttaaa	attcagtggt	cccagaacct	tacaatgcta	1740
tacaataaaa	tggaaattga	accatttcag	tctttagtac	ctaaggccat	tagaggccaa	1800
tacagtgggt	ttgtaagaac	tctgttccaa	caaatgaggg	atgtgcttgg	gacatttgat	1860
accgcacaga	taataaaaact	tcttcccttc	gcagccgctc	caccaaagca	aagtagaatg	1920
cagttctcct	catttactgt	gaatgtgagg	ggatcaggaa	tgagaatact	tgtaaggggc	1980
aattctcctg	tattcaacta	taacaaggcc	acgaagagac	tcacagttct	cggaaaggat	2040
gctggcaact	ttaactgaaga	cccagatgaa	ggcacagctg	gagtgagctc	cgctgtctctg	2100
aggggattcc	tcattctggg	caaagaagac	aagagatatg	ggccagcact	aagcatctag	2160
gaactgagca	accttgcgaa	aggagagaag	gctaattgtc	taatgggca	aggagacgtg	2220
gtgttggtaa	tgaaacggaa	acgggactct	agcatactta	ctgacagcca	gacagcgacc	2280
aaaagaattc	ggatggccat	caattagtgt	cgaatagttt	aaaaacgacc	ttgtttctac	2340
t						2341

<210> 4

<211> 1565

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 4

agcaaaaagca	gggtagataa	tcactcactg	agtgacatca	aaatcatggc	gtctcaagggc	60
accaaaacgat	cttacgaaca	gatggagact	gatggagaac	gccagaatgc	cactgaaatc	120
agagcatccg	tcggaaaaat	gatttgggtg	attggacgat	tctacatcca	aatgtgcacc	180
gaactcaaac	tcagtgatta	tgagggacgg	ttgatccaaa	acagcttaac	aatagagaga	240
atggtgctct	ctgcttttga	cgaaaggaga	aataaatacc	ttgaagaaca	tcccagtgcg	300
gggaaagatc	ctaagaaaac	tggaggacct	atatacagga	gagtaaacgg	aaagtggatg	360
agagaactca	tcctttatga	caaagaagaa	ataaggcgaa	tctggcgcca	agctaataat	420
ggtgacgatg	caacggctgg	tctgactcac	atgatgatct	ggcattccaa	tttgaatgat	480
gcaactttatc	agaggacaag	agctcttggt	cgcaccggaa	tggatcccag	gatgtgctct	540
ctgatgcaag	gttcaactct	ccctaggagg	tctggagccg	caggtgctgc	agtcaaagga	600
gttggaacaa	tgggtgatgga	atttggtcaga	atgatcaaac	gtgggatcaa	tgatoggaac	660
ttctggaggg	gtgagaatgg	acgaaaaaca	agaattgctt	atgaaagaat	gtgcaacatt	720
ctcaaaggga	aatttcaaac	tgctgcacaa	aaagcaatga	tggatcaagt	gagagagagc	780
cggaaaccag	ggaatgctga	gttcgaagat	ctcacttttc	tagcacggtc	tgcaactcata	840
ttgagagggt	cggttgetca	caagtccctgc	ctgcctgcct	gtgtgtatgg	acctgcccga	900
gccagtggtg	acgactttga	aagggaggga	tactctctag	tcggaataga	ccctttcaga	960
ctgcttcaaaa	acagccaagt	gtacagccta	atcagaccaa	atgagaatcc	agcacacaag	1020
agtcaactgg	tgtggatggc	atgccattct	gccgcatttg	aagatctaag	agtattaagc	1080
ttcatcaaa	ggaagaggt	gctcccaaga	gggaagcttt	coactagagg	agttcaaatt	1140
gcttccaatg	aaaatatgga	gactatggaa	tcaagtacac	ttgaactgag	aagcaggtac	1200

tggggcataa	ggaccagaag	tggaggaaac	accaatcaac	agagggcacc	tgggggcaaa	1260
atcagcatic	aacctacggt	ctcagtacag	agaaatctcc	cttttgacag	aacaaccatt	1320
atggcagcat	tcaatgggaa	tacagagggg	agaacatctg	acatgaggac	cgaaatcata	1380
aggatgatgg	aaagtgcaag	accagaagat	gtgtctttcc	aggggcgggg	agtcttcogag	1440
ctctcggacg	aaaaggcagc	gagcccgatc	gtgccttccct	ttgacatgag	taatgaagga	1500
tcttatttct	toggagacaa	tgcagaggag	tacgacaatt	aaagaaaaat	acccttgttt	1560
ctact						1565

<210> 5

<211> 1027

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 5

agcaaaagca	ggtagatatt	gaaagatgag	tcttctaacc	gaggtcgaaa	cgtagctact	60
ctctatcatic	cogtcaggcc	cctcacaagc	cgagatcgca	cagagacttg	aagatgtctt	120
tgcagggaag	aacaccgac	ttgaggttct	catggaatgg	ctaaagacaa	gaccaatcct	180
gtcacctctg	actaagggga	ttttaggatt	tgtgttcaag	ctcacccgtgc	ccagtgagcg	240
aggacttgcg	cgtagacgct	ttgtccaaaa	tgccttaaat	gggaacgggg	atccaaataa	300
catggacaaa	gcagttaaac	tgtataggaa	gctcaagagg	gagataacat	tccatggggc	360
caaaagaaatc	tcaactcagtt	attctgtctgg	tgcacttgcc	agttgtatgg	gcctcatata	420
caacaggatg	ggggctgtga	ccactgaagt	ggcatttggc	ctggtatgtg	caacctgtga	480
acagattgct	gactccagc	atcggctca	taggcaaatg	gtgacaacaa	ccaatccact	540
aatcagacat	gagaacagaa	tggttttagc	cagcactaca	gctaaggcta	tggagcaaat	600
ggctggatcg	agtgagcaag	cagcagagcc	catggagggt	gctagtcagg	ctagacaaat	660
ggtgcaagcg	atgagaacca	ttgggactca	tcttagctcc	agtgtctggtc	tgaaaaatga	720
tcttcttgaa	aatttgcagg	cctatcagaa	agcaatgggg	gtgcagatgc	aacggttcaa	780
gtgatcctct	cactattgcc	gcaaatatca	ttgggatctt	gcacttgaca	ttgtggattc	840
ttgatcgtct	ttttttcaaa	tgcatttacc	gtcgttttaa	atacggactg	aaaggagggc	900
cttctacgga	aggagtgcc	aagtctatga	gggaagaata	tcgaaaggaa	cagcagagtg	960
<u>ctgtggatgc</u>	<u>tgaogatggt</u>	<u>cattttgtca</u>	<u>gcatagaact</u>	<u>ggagtaaaaa</u>	<u>actaccttgt</u>	1020
ttctact						1027

<210> 6

<211> 890

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 6

agcaaaagca	gggtgacaaa	aacataatgg	atccaaacac	tgtgtcaagc	tttcaggtag	60
attgctttct	ttggcatgtc	cgcaaacgag	ttgcagacca	agaactaggc	gatgccccat	120
tctttgatcg	gcttcgcccga	gatcagaaat	ccctaagagg	aaggggcagt	actctcggtc	180
tggacatcaa	gacagccaca	cgtgctggaa	agcagatagt	ggagcggatt	ctgaaagaag	240
aatccgatga	ggcacttaaa	atgaccatgg	cctctgtacc	tgcgtcgcgt	tacctaactg	300
acatgactct	tgaggaaatg	tcaagggact	ggtccatgct	catacccaag	cagaaagtgg	360
caggccctct	ttgtatcaga	atggaccagg	cgatcatgga	taagaacatc	atactgaaag	420
cgaaactcag	tgtgattttt	gaccggctgg	agactctaat	attgctaagg	gctttcaccg	480
aaagaggagc	aattgttgcc	gaaatttcac	cattgccttc	tcttccagga	catactgctg	540
aggatgtcaa	aaatgcagtt	ggagtccctca	tccgaggact	tgaatggaat	gataacacag	600
ttcgagctct	tgaaaactcta	cagagattcg	cttgagaag	cagtaatgag	aatgggagac	660
ctccactcac	tccaaaacag	aaacagaaaa	tggcgggaac	aattagggtca	gaagtttgaa	720
gaaataagat	ggttgattga	agaagtgaga	cacaaactga	agataacaga	gaatagtttt	780
gagcaataaa	catttatgca	agccttacat	ctattgcttg	aagtggagca	agagataaga	840
actttctcgt	tcaagcttat	ttagtactaa	aaaacaccct	tgtttctact		890

<210> 7

<211> 1775

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 7

agcaaaagca	ggggaaaata	aaaacaacca	aatgaaggc	aaacctactg	gtcctgttat	60
gtgcacttgc	agctgcagat	gcagacacaa	tatgtatagg	ctaccatgog	aacaattcaa	120
ccgacactgt	tgacacagta	ctcgagaaga	atgtgacagt	gacacactct	gttaacctgc	180
tcgaaagcag	ccacaacgga	aaactatgta	gattaaaagg	aatagoccca	ctacaattgg	240
ggaaatgtaa	catcgccgga	tggctcttgg	gaaacccaga	atgogaccca	ctgcttccag	300
tgagatcatg	gtcctacatt	gtagaaacac	caaactctga	gaatggaata	tgttatccag	360
gagatttcat	cgactatgag	gagctgaggg	agcaattgag	ctcagtgtca	tcattcgaaa	420
gattcgaat	atttcccaaa	gaaagctcat	ggoccaaaca	caacacaaac	ggagtaacgg	480
cagcatgctc	ccatgagggg	aaaagcagtt	ttacagaaa	tttgctatgg	ctgacggaga	540
aggagggctc	atacccaaag	ctgaaaaaatt	cttatgtgaa	caaaaaaggg	aaagaagtcc	600
ttgtactgtg	gggtattcat	cacccgccta	acagtaagga	acaacagaat	ctctatcaga	660
atgaaaatgc	ttatgtctct	gtagtgcatt	caattataa	caggagattt	accccgaaa	720
tagcagaaa	acccaaagta	agagatcaag	ctgggaggat	gaactattac	tggaccttgc	780
taaaaccocg	agacacaata	atatttgagg	caaatggaaa	tctaatagca	ccaatgtatg	840
ctttcgcact	gagtagaggg	tttgggtccg	gcatcatcac	ctcaaacgca	tcaatgcatg	900
agtgtaacac	gaagtgtcaa	acacccctgg	gagctataaa	cagcagtctc	ccttaccaga	960
atatacacc	agtcacaata	ggagagtgc	caaaatacgt	caggagtgc	aaattgagga	1020
tggttacagg	actaaggaac	attccgtcca	ttcaatccag	aggtctatct	ggagccattg	1080
ccggttttat	tgaaggggga	tggactggaa	tgatagatgg	atggtatggt	tatcatcatc	1140
agaatgaaca	gggatcaggg	tatgcagcgg	atcaaaaaag	cacacaaaat	gccattaacg	1200
ggattacaaa	caaggtgaac	actgttatcg	agaaaatgaa	catccaattc	acagctgtgg	1260
gtaaagaatt	caacaatta	gaaaaaagga	tggaaaattt	aaataaaaaa	gttgatgatg	1320
gatttctgga	cttttgaca	tataatgcag	aattggttagt	tctactggaa	aatgaaagga	1380
ctctggattt	ccatgactca	aatgtgaaga	atctgtatga	gaaagtaaaa	agccaattaa	1440
agaataatgc	caaagaaatc	ggaaatggat	gttttgagtt	ctaccacaag	tgtgacaatg	1500
aatgcatgga	aagtgtgaag	aatgggactt	atgattatcc	caaatattca	gaagagtcaa	1560
agttgaacag	ggaaaaggta	gatggagtga	aattggaatc	aatggggatc	tatcagattc	1620
tggcgatcta	ctcaactgtc	gccagttcac	tgggtctttt	ggtctcctcg	ggggcaatca	1680
gtttctggat	gtgttcta	ggatctttgc	agtgcagaat	atgcatctga	gattagaatt	1740
tcagagatat	gaggaaaaac	accctgtttt	ctact			1775

<210> 8

<211> 1413

<212> ДНК

<213> Вирус гриппа

<400> 8

agcaaaagca	ggggtttaaa	atgaatccaa	atcagaaaat	aataaccatt	ggatcaatct	60
gtctggtagt	cggactaatt	agcctaatat	tgcaaatagg	gaatataatc	tcaatatgga	120
ttagccattc	aattcaaaact	ggaagtcaaaa	accatactgg	aatatgcaac	caaaacatca	180
ttacctataa	aaatagcacc	tgggtaaagg	acacaacttc	agtgatatta	accggcaatt	240
catctctttg	tcccatccgt	gggtgggcta	tatacagcaa	agacaatagc	ataagaattg	300
gttccaaagg	agacgttttt	gtcataagag	agccctttat	ttcatgttct	cacttggaat	360
gcaggacott	ttttctgacc	caaggtgcct	tactgaatga	caagcattca	agtgggactg	420
ttaaggacag	aagcccttat	agggccttaa	tgagctgccc	tgtcggtgaa	gctccgtccc	480
cgtacaattc	aagatttgaa	tcggttgctt	ggtcagcaag	tgcatgtcat	gatggcatgg	540
gctggctaac	aatcgggaatt	tcaggtccag	ataatggagc	agtggctgta	ttaaaaatac	600
aoggcataat	aactgaaacc	ataaaaagtt	ggaggaaaga	aatattgagg	acacaagagt	660
ctgaatgtgc	ctgtgtaaat	ggttcatggt	ttactataat	gactgatggc	ccgagtgatg	720
ggctggcctc	gtacaaaatt	ttcaagatcg	aaaaggggaa	ggttactaaa	tcaatagagt	780
tgaatgcacc	taattctcac	tatgaggaat	gttctctgta	ccttgatacc	ggcaaatgga	840
tgtgtgtgtg	cagagacaat	tggcatgggt	cgaaccggcc	atgggtgtct	ttcgatcaaa	900
acctggatta	tcaaatagga	tacatctgca	gtggggtttt	cggtgacaac	cccggtcccg	960
aagatggaac	aggcagctgt	gggtccagtt	atggtgatgg	agcaaacgga	gtaaagggat	1020
tttcatatag	gtatggtaat	gggttttggg	taggaaggac	caaaagtcac	agttccagac	1080
atgggttga	gatgatttgg	gatcctaattg	gatggacaga	gactgatagt	aagttctctg	1140
tgaggcaaga	tgttgtggca	atgactgatt	ggtcagggta	tagcgggaagt	ttcgttcaac	1200
atcctgagct	gacagggcta	gactgtatga	ggcctgctt	ctgggtttaa	ttaatcaggg	1260
gacgacctaa	agaaaaaaca	atctggacta	gtgcgagcag	catttctttt	tgtggcgtga	1320
atagtatac	tgtagattgg	tcttggccag	acgggtctga	gttgccattc	agcattgaca	1380
agtagtctgt	tcaaaaaact	ccttgtttct	act			1413

<210> 9
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 9
 cacacacggg ctccgggagc gaaagcaggc a 31
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 10
 gggtttgtat ttgtgtgtca cc 22

 <210> 11
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 11
 ccaggacact gaaatttctt tcac 24

 <210> 12
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 12
 cacacaggtc tcctattagt agaaacaagg cattt 35

 <210> 13
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 13
 cacacaggtc tccgggagcg aaagcaggtc 30

<210> 14
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 14
 cacacacgtc tccatcatac aatcctcttg 30

<210> 15
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 15
 ctctctgat ggtgacatac 20

<210> 16
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 16
 cacacaggtc tcctattagt agaacaagg tcgttt 36

<210> 17
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 17
 cacacacgtc tccgggagcg aaagcaggta c 31

<210> 18
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 18
 cacacacgtc tcctattagt agaacaagg tactt 35

<210> 19
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 19
 cacacacgtc tccgggagca aaagcagggg 30

<210> 20
 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 20
 cacacacgtc tcctattagt agaacaagg gtgtttt 37

<210> 21
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 21
 cacacacgtc tccgggagca aaagcaggggt a 31

<210> 22
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический праймер

<400> 22
 cacacacgtc tcctattagt agaacaagg gtattttt 38

<210> 23

<211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 23
 сасасaggtc тссgggagса аагсaggag t 31

 <210> 24
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 24
 сасасaggtc тggтattagt агааасаagg агттттт 38

 <210> 25
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 25
 сасасасgtc тссgggagса аагсaggta g 31

 <210> 26
 <211> 38
 <212> ДНК

 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 26
 сасасасgtc тсctattagt агааасаagg tagттттт 38

 <210> 27
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический праймер

 <400> 27

casacacgtc tccgggagca aaagcagggt g	31
<210> 28	
<211> 37	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Синтетический праймер	
<400> 28	
casacacgtc tcctattagt agaacaagg gtgtttt	37
<210> 29	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Синтетический вектор	
<400> 29	
gggttattgg agacggtagc gtctcctccc ccc	33
<210> 30	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Синтетический вектор	
<400> 30	
ggggggagga gacggtagcg tctccaataa ccc	33
<210> 31	
<211> 18	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа	
<220>	
<221> необяз_характеристика	
<222> (1)...(18)	
<223> n = A,T,C or G	
<400> 31	
cgtctcntat tagtagaa	18

<210> 32
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <220>
 <221> необяз_характеристика
 <222> (1)...(17)
 <223> n = A,T,C or G

 <400> 32
 ttttgctccc ngagacg 17

 <210> 33
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <220>
 <221> необяз_характеристика
 <222> (1)...(17)
 <223> n = A,T,C or G

 <400> 33
 cgtctenggg agcaaaa 17

 <210> 34
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <220>
 <221> необяз_характеристика
 <222> (1)...(18)
 <223> n = A,T,C or G

 <400> 34
 ttctactaat angagacg 18

 <210> 35
 <211> 11
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <400> 35
 tattagtaga a 11

 <210> 36
 <211> 10
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <400> 36
 gggagсаааа 10

 <210> 37
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <400> 37
 gggttattag tagaa 15

 <210> 38
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <400> 38
 ttttgctccc ccc 13

 <210> 39
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <400> 39
 ggggggagca aaa 13

 <210> 40
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический вектор/кДНК вирусного гриппа

 <400> 40
 ttctactaat ааccc 15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для получения "6+2" реассортантного рекомбинантного вируса гриппа с высоким титром, содержащая множество векторов вирусов гриппа, включающая в себя:

а) векторы для продуцирования вРНК, включающие вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка PA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка PB1 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка PB2 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка NP вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка M вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции, и вектор, содержащий промотор, функционально связанный с кДНК белка NS вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции, причем кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS содержат последовательности, которые соответствуют последовательностям, кодирующим полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по крайней мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности полипептида, кодируемого одной из SEQ ID NO: 1-6, а кДНК для NA и NA не содержат последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 7 или 8, и векторы по подпункту а) содержат промотор РНК-полимеразы I и последовательность терминации РНК-полимеразы I; и

б) векторы для продуцирования мРНК, включающие вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок PA вируса гриппа; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок PB1 вируса гриппа; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок PB2 вируса гриппа, или вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок NP вируса гриппа.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что векторы по подпункту б) дополнительно включают вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок NA вируса гриппа; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок NA вируса гриппа; вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок M1 вируса гриппа, вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок M2 вируса гриппа, или вектор, содержащий промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим белок NS2 вируса гриппа.

3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что NA представляет собой NA типа А.

4. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что NA представляет собой NA типа В.

5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что промотор РНК-полимеразы I представляет собой человеческий промотор РНК-полимеразы I.

6. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что все векторы по подпункту б) содержат промотор РНК-полимеразы II.

7. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что каждый вектор по подпункту а) является отдельной плазмидой.

8. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что каждый вектор по подпункту б) является отдельной плазмидой.

9. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что каждый из векторов, приведенных в подпункте б), дополнительно содержит последовательность терминации РНК-транскрипции.

10. Композиция по п.1, дополнительно содержащая вектор, включающий промотор, связанный с 5'-концом последовательностей вируса гриппа, содержащих 5'-некодирующие последовательности вируса гриппа, связанные с представляющей интерес последовательностью кДНК, соединенной с 3'-концом последовательностей вируса гриппа, содержащих 3'-некодирующие последовательности вируса гриппа, связанные с последовательностью терминации транскрипции.

11. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что представляющая интерес кДНК находится в смысловой ориентации.

12. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что представляющая интерес кДНК находится в анти-смысловой ориентации.

13. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что представляющая интерес кДНК включает открытую рамку считывания иммуногенного полипептида, или пептида патогенного организма, или терапевтически активного полипептида, или пептида.

14. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что NA представляет собой подтип H5.

15. Композиция по п.14, отличающаяся тем, что H5 NA представляет собой мутантный H5 с авиру-

лентным сайтом расщепления.

16. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS имеют нуклеотидные последовательности, по меньшей мере на 90% идентичные последовательностям SEQ ID NO: 1-6 или комплементарным им последовательностям.

17. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS кодируют полипептид с одной или более консервативных замен по сравнению с соответствующим полипептидом, кодируемым одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-6.

18. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS содержат область, кодирующую полипептид, кодируемый одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-6.

19. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 1-6.

20. Способ получения инфекционного вируса гриппа, включающий обеспечение контактирования клетки с композицией по п.1 в количестве, эффективном для получения инфекционного вируса гриппа.

21. Способ по п.20, дополнительно включающий выделение вируса.

22. Способ получения переносчика (носителя) для доставки генов, включающий обеспечение контактирования клеток с композицией по п.10 в количестве, эффективном для получения вируса гриппа, который является указанным переносчиком, и выделение вируса.

23. Способ получения "6+2" реассортантного рекомбинантного вируса гриппа, включающий обеспечение контактирования клетки с вектором для продуцирования вРНК, содержащим промотор, функционально связанный с кДНК PA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектором для продуцирования вРНК, содержащим промотор, функционально связанный с кДНК PB1 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектором для продуцирования вРНК, содержащим промотор, функционально связанный с кДНК PB2 вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектором для продуцирования вРНК, содержащим промотор, функционально связанный с кДНК NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектором для продуцирования вРНК, содержащим промотор, функционально связанный с кДНК NP вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектором для продуцирования вРНК, содержащим промотор, функционально связанный с кДНК NA вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектором для продуцирования вРНК, содержащим промотор, функционально связанный с кДНК M вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектором для продуцирования вРНК, содержащим промотор, функционально связанный с кДНК NS вируса гриппа, соединенной с последовательностью терминации транскрипции; вектором для продуцирования мРНК, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим PA вируса гриппа; вектором для продуцирования мРНК, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим PB1 вируса гриппа; вектором для продуцирования мРНК, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим PB2 вируса гриппа, и вектором для продуцирования мРНК, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим NP вируса гриппа, так чтобы получить инфекционный вирус, причем кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS содержат последовательности, кодирующие полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по крайней мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности полипептида, кодируемого одной из SEQ ID NO: 1-6, а кДНК для NA и NA не содержат последовательностей, соответствующих SEQ ID NO: 7 или 8, и векторы для продуцирования вРНК содержат промотор РНК-полимеразы I и последовательность терминации РНК-полимеразы I.

24. Способ по п.23, дополнительно включающий обеспечение контактирования клеток с вектором, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим NA вируса гриппа, вектором, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим NA вируса гриппа, вектором, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим M1 вируса гриппа, вектором, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим M2 вируса гриппа, и вектором, содержащим промотор, функционально связанный с сегментом ДНК, кодирующим NS2 вируса гриппа.

25. Способ по п.23 или 24, дополнительно включающий обеспечение контактирования клеток с вектором, содержащим промотор, функционально связанный с 5'-концом последовательностей вируса гриппа, содержащих 5'-некодирующие последовательности вируса гриппа, связанные с представляющей интерес последовательностью кДНК или ее фрагментом, соединенной (или соединенным) с 3'-концом последовательностей вируса гриппа, содержащих 3'-некодирующие последовательности вируса гриппа, связанные с последовательностью терминации транскрипции.

26. Способ по п.25, отличающийся тем, что представляющая интерес кДНК включает открытую рамку считывания иммуногенного полипептида, или пептида патогенного организма, или терапевтически активного полипептида, или пептида.

27. Способ по п.25, отличающийся тем, что представляющая интерес кДНК находится в смысловой ориентации.

28. Способ по п.25, отличающийся тем, что представляющая интерес кДНК находится в антисмысловой ориентации.

29. Способ по п.23, дополнительно включающий выделение вируса.

30. Способ по п.23, отличающийся тем, что НА представляет собой подтип H5.

31. Способ по п.23, отличающийся тем, что кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS имеют нуклеотидные последовательности, по меньшей мере на 90% идентичные последовательностям SEQ ID NO: 1-6 или комплементарным им последовательностям.

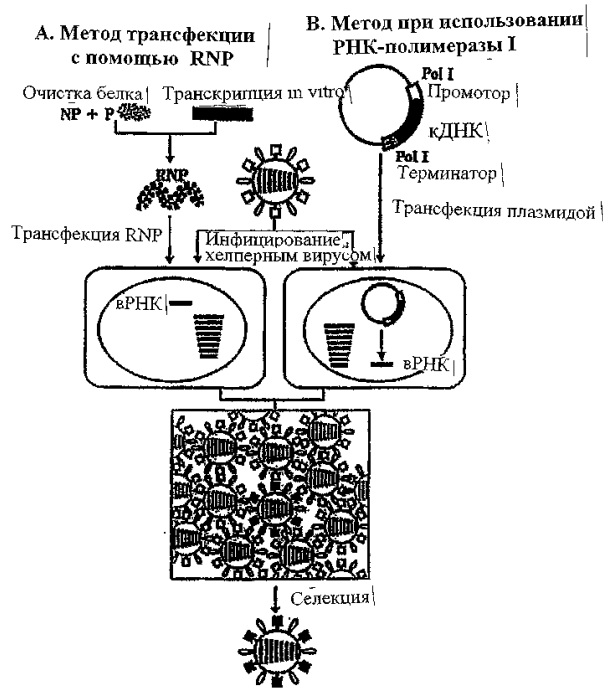
32. Способ по п.23, отличающийся тем, что кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS кодируют полипептид с одной или более консервативных замен по сравнению с соответствующим полипептидом, кодируемым одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-6.

33. Способ по п.23, отличающийся тем, что кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS имеют кодирующую область для полипептида, кодируемого одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-6.

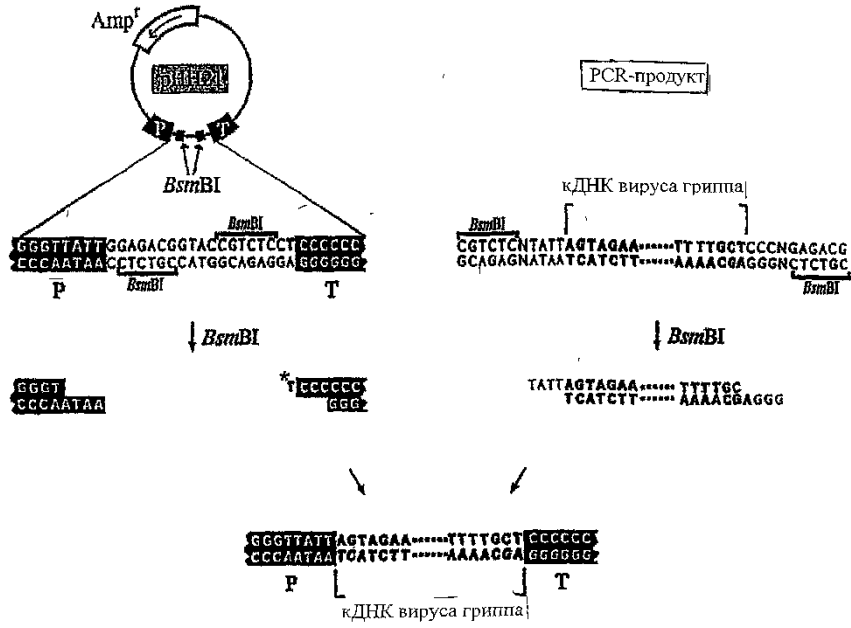
34. Способ по п.23, отличающийся тем, что кДНК для PB1, PB2, PA, NP, M и NS комплементарны последовательностям SEQ ID NO: 1-6.

35. Выделенный "6+2" реассортантный рекомбинантный вирус гриппа, полученный способом по п.31, содержащий вирусную геномную РНК для H5 НА, который выращивают в куриных эмбрионах до титра по меньшей мере 10^{10} ED₅₀/мл.

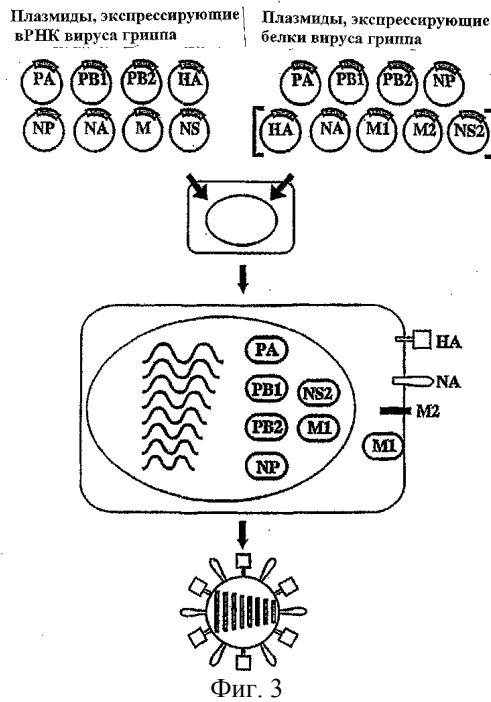
36. Реассортантный вирус гриппа по п.35, отличающийся тем, что H5 НА представляет собой мутантный H5.



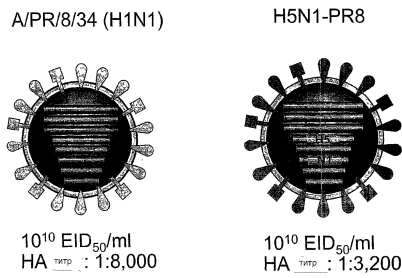
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4