



(51) МПК
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/09 (2019.08); *A61K 39/145* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2018138642, 01.11.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 01.11.2018

Дата регистрации:
 06.02.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.11.2018

(45) Опубликовано: 06.02.2020 Бюл. № 4

Адрес для переписки:
 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, ФГБУ
 "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава
 России, Директору А.Л. Гинцбургу

(72) Автор(ы):

**Шмаров Максим Михайлович (RU),
 Алексеева Светлана Викторовна (RU),
 Щербинин Дмитрий Николаевич (RU),
 Лысенко Андрей Александрович (RU),
 Седова Елена Сергеевна (RU),
 Артемова Элина Алексеевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**федеральное государственное бюджетное
 учреждение "Национальный
 исследовательский центр эпидемиологии и
 микробиологии имени почетного академика
 Н.Ф. Гамалеи" Министерства
 здравоохранения Российской Федерации
 (RU)**

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: WO 2010058236 A1, 27.05.2010. RU
 2507257 C1, 20.02.2014. RU 2523599 C1,
 20.07.2014. WO 2013129961 A1, 06.09.2013.

(54) Штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа Ad5-tetOFF-E3-NA125, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5 для создания противогриппозных иммуногенных препаратов, способ получения гена

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, вирусологии, медицины. Описан штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа Ad5-tetOFF-E3-NA125 для создания противогриппозных иммуногенных препаратов, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2, при этом ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Так описан способ получения гена

консенсусной последовательности гемагглютинина с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2. Кроме того, описан иммуногенный препарат, содержащий штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа по п. 1. для профилактики гриппа А, вызванного субтипами Н1, Н2 и Н5, содержащий на дозу: рекомбинантная псевдоаденовирусная частица Ad5-tetOFF-E3-NA125 - 10^7 - 10^9 акт.ед. и фармацевтически приемлемый буферный раствор - до 0,5 мл. Изобретение расширяет арсенал средств профилактики гриппа А. 3 н.п. ф-лы, 8 ил., 1 табл., 7 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 15/09 (2019.08); *A61K 39/145* (2019.08)

(21)(22) Application: **2018138642, 01.11.2018**

(24) Effective date for property rights:
01.11.2018

Registration date:
06.02.2020

Priority:

(22) Date of filing: **01.11.2018**

(45) Date of publication: **06.02.2020** Bull. № 4

Mail address:

123098, Moskva, ul. Gamalei, 18, FGBU "NITSEM
im. N.F. Gamalei" Minzdrava Rossii, Direktoru
A.L. Gintsburgu

(72) Inventor(s):

**Shmarov Maksim Mikhajlovich (RU),
Alekseeva Svetlana Viktorovna (RU),
Shcherbinin Dmitrij Nikolaevich (RU),
Lysenko Andrej Aleksandrovich (RU),
Sedova Elena Sergeevna (RU),
Artemova Elina Alekseevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj issledovatel'skij
tsentr epidemiologii i mikrobiologii imeni
pochetnogo akademika N.F. Gamalei"
Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj
Federatsii (RU)**

(54) **STRAIN OF A RECOMBINANT PSEUDO ADENOVIRAL PARTICLE BASED ON HUMAN ADENOVIRUS GENOME OF SEROTYPE 5 Ad5-tetOFF-E3-HA125 SEROTYPE, CARRYING HAEMAGGLUTININ CONSENSUS GENE OF INFLUENZA VIRUS SUBTYPES H1, H2, H5 FOR PRODUCING INFLUENZA IMMUNOGENIC PREPARATIONS, METHOD FOR PRODUCING GENE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; medicine.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology, virology, medicine. Described is a strain of a recombinant pseudo adenoviral particle based on human adenovirus genome 5 of serotype Ad5-tetOFF-E3-HA125 for producing anti-influenza immunogenic preparations, carrying a consensus gene of haemagglutinin virus of influenza A virus subtypes H1, H2, H5 enriched with B and T-cell epitopes of influenza virus with nucleotide sequence SEQ ID NO: 2, wherein the influenza A haemagglutinin consensus sequence gene codes the amino acid sequence SEQ ID NO: 1. Method for preparing a haemagglutinin consensus

sequence with the nucleotide sequence SEQ ID NO: 2. Also described is an immunogenic preparation containing a strain of a recombinant pseudo adenoviral particle based on human adenovirus genome 5 of a serotype according to claim 1. for preventing influenza A, caused by subtypes H1, H2 and H5, containing per dose: recombinant pseudo adenoviral particle Ad5-tetOFF-E3-HA125 - 10^7 - 10^9 actuation components. and a pharmaceutically acceptable buffer solution - up to 0.5 ml.

EFFECT: invention extends the range of agents for preventing influenza A.

3 cl, 8 dwg, 1 tbl, 7 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, вирусологии, медицины. Оно касается рекомбинантных векторов, которые могут быть использованы в фармацевтической промышленности для производства противогриппозных вакцин.

5 Предшествующий уровень развития

Грипп - высококонтагиозное инфекционное заболевание, широко распространенное по всему миру. Согласно ВОЗ, основным, традиционным и самым эффективным способом профилактики гриппа или его тяжелых последствий является вакцинация. В настоящее время применяют в практике живые аттенуированные, инактивированные
10 (цельновирсионные и сплит-вакцины) и субъединичные вакцины (Есмагамбетов И.Б., Алексеева С.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. Современные подходы к созданию универсальной вакцины против вируса гриппа («Инфекция и иммунитет», 2016, Т. 6, №2, С. 117-132). Большая доля вакцин предназначены для профилактики сезонного гриппа и содержат в качестве антигена три или четыре типа гемагглютинина,
15 циркулирующих на данный период вирусов гриппа.

Сложность заключается в том, что вакцинация против гриппа наиболее эффективна в случаях, когда циркулирующие вирусы в значительной мере соответствуют вирусам, содержащимся в вакцине. Однако вирус гриппа постоянно изменяется и при совместной циркуляции может происходить обмен генетическим материалом, в результате чего
20 возможно появление новых вирусов, отличающихся от всех циркулирующих вариантов и обладающих пандемическим потенциалом, против которых сезонные вакцины могут быть неэффективны.

Для таких измененных вариантов вируса гриппа разрабатывают пандемические вакцины, которые на сегодняшний день являются моновалентными, а процесс
25 производства первых серий может занимать примерно 5-6 месяцев после выявления и изоляции нового штамма [Киселев О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И. Грипп. Эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика. Москва: МИА, 2012, С. 443-466). Индуцированный ими иммунитет, является штаммоспецифическим, т.е. протективным по отношению к идентичным или близкородственным вирусам гриппа.

30 В связи с этим актуальным является получение вакцинных штаммов, способных индуцировать иммунный ответ широкого спектра против различных вирусов гриппа человека и вирусов гриппа птиц, также способных вызвать заболевания у людей.

В настоящее время наиболее перспективным является направление по разработке новых вакцин на основе консервативных антигенов вируса, которые обладали бы
35 максимальной иммуногенностью (Букринская, А.Г. Вирусология / А.Г. Букринская. - М.: Медицина, 1986. - 336 с. Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - СПб.: СпецЛит, 2002. - 591 с. Одним из подходов для решения такой задачи является поиск и характеристика консервативных антигенных детерминант в молекуле гемагглютинина (НА) вируса гриппа (Кареткина
40 Г.Н. Грипп: новое в лечении и профилактике, 2009, №1, <http://www.Ivrach.ru/2009/01/5898073/>). При этом, протективный эффект таких универсальных вакцин должен обеспечиваться индукцией комплексного иммунного ответа, базирующегося на выработке кросс-реактивных антител и Т-клеток. (Есмагамбетов И.Б., Алексеева С.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. Современные подходы к созданию универсальной вакцины против вируса гриппа, Инфекция и иммунитет, 2016, Т. 6, №2, С. 117-132).

45 В качестве примера вакцинного антигена с широким спектром противогриппозного действия можно рассмотреть следующий патент. Известны «Оптимизированные с помощью вычислительных средств антигены с широким спектром реактивности для

вирусов гриппа H5N1 и H1N1» (патент РФ 2639551). Предложен способ их получения. Указанные в патенте пептиды способны вызывать иммунный ответ с широким спектром реактивности против вируса гриппа H5N1 и H1N1. Оптимизированные полипептиды HA были разработаны путем проведения серии выравниваний последовательностей белков HA и последующего получения консенсусных последовательностей на основании строения определенных изолятов вирусов гриппа H5N1 и H1N1. Оптимизированные последовательности нуклеиновых кислот могут быть вставлены в соответствующий вектор экспрессии, такой как вектор экспрессии pTR600. Данный патент можно рассматривать в качестве прототипа.

Недостатком указанного выше прототипа является то, что указанные полипептиды не достаточно широко специфичны, т.е. защищают только от вирусов гриппа субтипов H5 и H1. Таким образом, их применение в качестве вакцинного антигена может защитить от небольшого и строго определенного количества вирусов гриппа, а, следовательно, в случае появления пандемического варианта других субтипов люди могут заболеть гриппом.

Раскрытие изобретения

Техническая задача заявляемого изобретения направлена на создание штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы для создания противогриппозных иммуногенных препаратов, способных вызвать протективный иммунитет против всех существующих и вновь появляющихся вирусов гриппа А субтипов H1, H2 и H5.

Поставленная задача решена за счет того, что получен штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа Ad5-tetOFF-E3-HA125, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2, при этом ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Способ получения гена консенсусной последовательности гемагглютинаина, осуществляемый за счет слияния консервативных участков гемагглютининов вируса гриппа А субтипов H1, H2 и H5, при этом общая длина рекомбинантного белка равна нативному гемагглютинуину вируса гриппа А - 1701 п.о., содержит Т-клеточные эпитопы и конформационный В-клеточный эпитоп в стебельной части, заключается в следующих последовательных действиях:

- из общедоступной базы генетических данных отбирают аминокислотные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа А трех субтипов H1, H2 и H5, выделенные от человека, выравнивают друг относительно друга с помощью общедоступной компьютерной программы, при этом сохраняя конформационный В-клеточный эпитоп в стебельной части, и, таким образом, получают «консенсусные» (усредненные) последовательности для каждого субтипа отдельно;

- с помощью общедоступной базы данных по распространенности аллельных частот выявляют наиболее часто встречающиеся аллели молекул HLA I-класса и HLA II-класса у жителей РФ и оставляют эпитопы с высокой афинностью, сокращая одинаковые последовательности эпитопов, которые распознаются разными аллелями;

- с помощью доступных онлайн сервисов определяют наличие эпитопов в консенсусных последовательностях H1, H2 и H5 для отобранных ранее аллелей HLA I-класса и HLA II-класса.

- накладывают последовательности выявленных эпитопов аллелей HLA I-класса и HLA II-класса на каждую из трех консенсусных последовательностей вируса гриппа

субтипов H1, H2 и H5 и определяют наличие соответствующих эпитопов и отмечают их местоположение;

- с помощью общедоступной базы данных иммунологических эпитопов из отобранных ранее Т-клеточных эпитопов HLA отбираются все известные эпитопы с экспериментально подтвержденной активностью и также на каждую из трех консенсусных последовательностей вируса гриппа субтипов H1, H2 и H5 и определяют наличие соответствующих эпитопов и отмечают их местоположение.

- три консенсусные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа А трех субтипов H1, H2 и H5 выравнивают относительно друг друга;

- собирают консенсусную последовательность гемагглютининов вируса гриппа А путем слияния того участка гена, на котором отмечено наибольшее количество Т-клеточных эпитопов, выбранного каждый раз из одной из трех консенсусных последовательностей гемагглютининов вирусов гриппа А субтипов H1, H2 и H5, и последовательно включаемого в собираемую консервативную последовательность;

- лученную консервативную аминокислотную последовательность гемагглютининов вируса гриппа А, содержащую участки гемагглютининов вирусов гриппа субтипов H1, H2 и H5 и максимально насыщенную консервативными В- и Т-клеточными эпитопами, переводят в соответствующую ей нуклеотидную последовательность, в которой оптимизируют кодоны общеизвестным способом для более эффективной экспрессии в клетках человека.

Иммуногенный препарат, содержащий штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа по п. 1. для профилактики гриппа А, вызванного субтипами H1, H2 и H5 содержи на дозу:

- рекомбинантная псевдоаденовирусная частица Ad5-tetOFF-E3-NA125 - 10^7 - 10^9 акт.ед.;

- фармацевтически приемлемый буферный раствор-до 0,5 мл.

Описание фигур

На фигуре 1

представлено схематическое изображение фрагмента гена консенсусной последовательности гемагглютининов вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа.

Использованы следующие обозначения:



- выбранный фрагмент гемагглютининов вируса гриппа субтипа H1;



- выбранный фрагмент гемагглютининов вируса гриппа субтипа H2;



- выбранный фрагмент гемагглютининов вируса гриппа субтипа H5.

На фигуре 2

представлена электрофореграмма ПЦР-анализа.

Результаты ПЦР подтверждают подлинность созданной по изобретению рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы, так как показывает наличие аденовирусного вектора, отсутствие реплицирующихся частиц аденовируса (по отсутствию E1 области генома), наличие целевого трансгена.

Обозначения:

М - маркер молекулярного веса Thermo Scientific Gene Ruler 1 kb DNA Ladder;

Треки 1, 2, 3 - на трансген (NA 125), где:

1 - Контроль отрицательный;

2 - Контроль положительный (плазмида);

3 - гексон (440 п.о.)

Треки 4, 5, 6 - на аденовирусный геном (наличие гексона),

где:

4 - Контроль отрицательный;

5 - Контроль положительный (плазмида);

5 6 - HA 125 (504 п.о.).

Треки 7, 8, 9 - реплицирующиеся аденовирусные частицы (по наличию области E1 генома аденовируса должны отсутствовать), где:

7 - Контроль отрицательный;

8 - Контроль положительный (Ad5-wt);

10 9 - E1 (размер фрагмента 1000 п.о.).

Таким образом, результаты проведенного анализа подтверждают создание рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущих ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5, обогащенной В- и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа, так как на представленном форезе присутствует целевая полоса на гексон аденовируса в опыте и положительном контроле, равная 440 п.о., полоса на HA125 в опыте и положительном контроле, равная 504 п.о., а также отсутствует область E1 генома аденовируса, что говорит о создании рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы по изобретению.

20 На фигуре 3.

представлены результаты иммуноблоттинга при определении экспрессии целевых белков рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц в дыхательных путях мыши через 72 часа после однократного интраназального введения в дозе $4,0 \times 10^7$ акт. ед.

Обозначения:

25 1 - экстракт лизированной ткани носовой перегородки интактной мыши;

2 - экстракт лизированной ткани носовой перегородки мыши, получавшей препарат;

3 - экстракт лизированной ткани носовой перегородки мыши, получавшей Ad5-null;

4 - экстракт лизированной ткани легких интактной мыши;

5 - экстракт лизированной ткани легких мыши, получавшей препарат;

30 6 - экстракт лизированной ткани легких мыши, получавшей Ad5-null;

7 - маркер молекулярного веса, кДА. На фигуре 4

представлена схема изучения специфического Т-клеточного ответа у мышей, иммунизированных Ad5-tetOFF-HA125, к целевому антигену, представленному в комплексе с молекулами МНС I и МНС II.

35 Из костного мозга аллогенных интактных мышей, с помощью культивирования *in vitro* в присутствии GM-CSF, получают дендритные клетки. Дендритные клетки, трансдуцированные Ad5-tetOFF-HA125, превращаются в антиген-презентирующие клетки, экспрессирующие эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС I. Дендритные клетки, активированные LPS и нагруженные смесью пептидов целевого антигена, превращаются в антиген-презентирующие клетки, экспрессирующие эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС II.

45 Из селезенки иммунизированных и контрольных мышей методом клеточной сортировки на проточном цитофлуориметре-сортировщике получают высокоочищенные (чистота 95-97%) популяции CD4 и CD8 Т-клеток. При сокультивировании CD8 Т-клеток с дендритными клетками, экспрессирующими эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС I, и CD4 Т-клеток с дендритными клетками, экспрессирующими эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС II, Т-клетки начинают секретировать IFN- γ . Детекция секреции IFN- γ от единичных клеток производится с

помощью набора ELISPOT.

На фигуре 5

показаны результаты определения методом ELISPOT количества CD8+IFN- γ секретирующих клеток, специфичных к эпитопам целевого антигена в комплексе с молекулами MHC I, в селезенке мышей, иммунизированных Ad5-tetOFF-NA125.

Ось абсцисс - экспериментальные группы, ось ординат - число IFN- γ секретирующих клеток в пересчете на 1 млн CD8+ Т-клеток.

А - фоновый уровень секреции IFN- γ при сокультивировании сортированных CD8+ Т-клеток и аллогенных дендритных клеток. В - стимуляция выработки IFN- γ сортированными CD8 Т-клетками при трансдукции дендритных клеток Ad5-tetOFF-NA125 (за вычетом фоновых значений).

В лунки 96-луночного планшета для ELISPOT помещали по 50 тыс BM DC или 50 тыс BM DC, трансдуцированных 100 БОЕ Ad5-tetOFF- NA125 на клетку, и по 50 тыс сортированных CD8 Т-клеток от индивидуальных мышей тестируемых групп. Планшет инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 20 часов и обрабатывали в соответствии с протоколом фирмы производителя. Данные приведены для индивидуальных мышей. Достоверность отличий между группами в тесте one-way ANOVA/Bonferroni обозначена *** p<.001.

На фигуре 6

показаны результаты определения методом ELISPOT количества CD4+IFN- γ секретирующих клеток Т-клеток, специфичных к эпитопам целевого антигена в комплексе с молекулами MHC II, в селезенке мышей, иммунизированных Ad5-tetOFF-NA125.

Ось абсцисс - экспериментальные группы, ось ординат - число IFN- γ секретирующих клеток в пересчете на 1 млн CD4+ Т-клеток. А - фоновый уровень секреции IFN- γ при сокультивировании сортированных CD4 Т-клеток и аллогенных дендритных клеток, активированных LPS. В - стимуляция выработки IFN- γ сортированными CD4+ Т-клетками при добавлении к активированным дендритным клеткам смеси пептидов из целевого антигена (за вычетом фоновых значений).

В лунки 96-луночного планшета для ELISPOT помещали по 50 тыс BM DC, активированных LPS 100 нг/мл, и по 100 тыс сортированных CD4+ Т-клеток от индивидуальных мышей тестируемых групп. В ряд лунок добавляли смесь пептидов целевого антигена. Планшет инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 20 часов и обрабатывали в соответствии с протоколом фирмы производителя. Данные приведены для индивидуальных мышей. Достоверность отличий между группами в тесте one-way ANOVA/Bonferroni обозначена * p<0.05.

На фигуре 7 изображены:

А - результаты белкового электрофореза;

Б - результат вестерн-блотта.



Обозначения: 1 - отрицательный контроль (клетки трансдуцированные рекомбинантным вирусом гриппа без экспрессионной кассеты), 2 - белок NA125 от клеток трансдуцированных рекомбинантным аденовирусом Ad-NA125 в денатурирующем буфере, 3 - белок NA125 от клеток трансдуцированных рекомбинантным аденовирусом Ad-NA125 в не денатурирующем буфере, М - маркер молекулярного веса Amersham (кат. № RPN756E), 4 - белок NA от штамма A/California/04/2009 H1N1 в денатурирующем буфере, 5 - белок NA от штамма A/California/04/2009 H1N1 в не денатурирующем буфере, 6 - белок NA от штамма A/Japan/305/1957 H2N2 в денатурирующем буфере, 7 - белок NA от штамма A/Japan/305/1957 H2N2 в не



денатурирующем буфере, 8 - белок HA от штамма A/Egypt/N05056/2009 H5N1 в денатурирующем буфере, 9 - белок HA от штамма A/Egypt/N05056/2009 H5N1 в не денатурирующем буфере.



В треке №3 видна полоса в районе 130-250 кДа (расчетная масса белка 190 кДа), она соответствует полосам из положительных контролей - треки 5, 7 и 9. В треках 2, 4, 6 и 8 нет полосы, так как эпитоп к антителу CR9114 является конформационным и в денатурирующих условиях четвертичная конформация разрушается. Разрушение конформации белка видно по результатам белкового электрофореза - масса мономера в среднем составляет 63,4 кДа (треки 4, 6 и 8).



На фигуре 8



представлены результаты оценки иммуногенных свойств иммуногенного препарата, содержащего штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа:



А - кривые выживаемости мышей, иммунизированных Ad5-HA125, после заражения 15ЛД₅₀ вируса гриппа А /California/20/09H1N1, (1  - мыши, иммунизированные Ad5-HA125, 2  - контрольные мыши, получавшие буфер для хранения аденовирусных препаратов);

Б - кривые изменения веса мышей, иммунизированных Ad5-HA125, после заражения 15ЛД₅₀ вируса гриппа А /California/20/09 H1N1 (1  - мыши, иммунизированные Ad5-HA125, 2  - контрольные мыши, получавшие буфер для хранения аденовирусных препаратов);

В - кривые выживаемости мышей, иммунизированных Ad5-HA125, после заражения 15ЛД₅₀ вируса гриппа А/BlackDuck/NewJersey/1580/78(H2N3), (1  - мыши, иммунизированные Ad5-HA125, 2  - контрольные мыши, получавшие буфер для хранения аденовирусных препаратов);

Г. - кривые изменения веса мышей после заражения мышей вирусом гриппа А/BlackDuck/NewJersey/1580/78(H2N3) (1  - мыши, иммунизированные Ad5-HA125, 2  - контрольные мыши, получавшие фармацевтически приемлемый буфер;

Д - кривые выживаемости мышей после заражения вирусом гриппа А/Duck(Mallard)/Pensylvania/10218/84 H5N2 (1  - мыши, иммунизированные Ad5-HA125, 2  - контрольные мыши, получавшие фармацевтически приемлемый буфер;

Е - кривые изменения веса мышей после заражения мышей вирусом гриппа А/Duck (Mallard)/Pensylvania/10218/84 H5N2 (1  - мыши, иммунизированные Ad5-HA125, 2  - контрольные мыши, получавшие фармацевтически приемлемый буфер.

Реализация изобретения

Использование вирусных векторов является перспективным направлением при разработке вакцин. Наиболее хорошо изученными являются векторы на основе рекомбинантных аденовирусов. По данным базы данных Gene Therapy Clinical Trials World (provided by the Journal of Gene Medicine) <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php> в 20% протоколов клинических испытаний в качестве вектора использовали аденовирусы.

В качестве рекомбинантного вектора по изобретению использовали аденовирусный вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа - рекомбинантные псевдоаденовирусные частицы. Рекомбинантные аденовирусы обладают рядом преимуществ, благодаря которым они используются в качестве векторов,

экспрессирующих целевые антигены, в частности белки вируса гриппа для получения кандидатных гриппозных вакцин. Геном большинства аденовирусов хорошо охарактеризован и прост для манипуляций, ДНК аденовируса остается в экстрахромосомной форме. Векторы способны трансдуцировать, как делящиеся, так и постмитотические клетки. Рекомбинантные аденовирусы могут быть получены в количестве более 10^{10} вирусных (физических) частиц/мл, что позволяет легко масштабировать технологический процесс их получения, также они не способны к размножению, кроме как в особых условиях, возможных только в специальных линиях клеток *in vitro*; обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого гена в клетке-мишени. При иммунизации они обеспечивают индукцию как клеточного, так и гуморального иммунного ответа против вируса гриппа и выводятся из организма в течение 4-5 недель. Еще одним преимуществом является то, что процесс получения нового рекомбинантного аденовируса занимает несколько недель, что может позволить быстро реагировать на меняющуюся эпидемиологическую обстановку в максимально сжатые сроки, чего нельзя сделать при получении классических вакцинных штаммов.

В качестве трансгена в рекомбинантные псевдоаденовирусные частицы встраивали ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, предварительно обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа. Обогащение В и Т-клеточными эпитопами гена консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5 позволило индуцировать иммунитет широкого спектра действия ко всем вирусам гриппа внутри каждого из субтипов Н1, Н2, Н5, а также вновь появляющимся в будущем новым вирусам гриппа указанных субтипов.

Для решения поставленной технической задачи были проведены следующие работы:

1. Получен ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа.

2. Сконструирован штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущий в своем геноме экспрессионную кассету гена консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа.

3. Получен иммуногенный препарат, содержащий штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа.

4. Определено наличие экспрессии целевого белка методом иммуноблоттинга.

5. Оценен гуморальный ответ на введение иммуногенного препарата, содержащего штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа, методом ИФА.

6. Оценена индукция Т- и В- клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных иммуногенным препаратом, содержащим штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц по изобретению.

7. Оценены протективные свойства иммуногенного препарата, содержащего рекомбинантные псевдоаденовирусные частицы по изобретению.

Пример 1.

Получение гена консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа

В данном примере рассмотрен ход работ по получению аминокислотной и нуклеотидной последовательностей транскрипта (гена консенсусной последовательности гемагглютиниона вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса) гриппа который в следующем примере будет встроен в рекомбинантную псевдоаденовирусную частицу.

Получение консенсусной последовательности гена гемагглютиниона происходит путем слияния консервативных участков гемагглютининов вируса гриппа А субтипов Н1, Н2 и Н5, при этом общая длина рекомбинантного белка равна нативному гемагглютинуину вируса гриппа А (1701 п.о.), содержит Т-клеточные эпитопы и конформационный В-клеточный эпитоп в стебельной части.

Процесс получения заключается в следующих последовательных действиях:

1) Из общедоступной базы генетических данных Influenza virus Resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=database>) отбирали аминокислотные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа А трех субтипов Н1, Н2 и Н5, выделенные от человека, выравнивали друг относительно друга с помощью общедоступной компьютерной программы, при этом сохраняя известный конформационный В-клеточный эпитоп в стебельной части, и, таким образом, получили «консенсусные» (усредненные) последовательности для каждого субтипа отдельно;

Всего количество включенных последовательностей составляло:

Н1: 5991 белковых сиквенсов;
Н5: 218 белковых сиквенсов;
Н2: 80 белковых сиквенсов.

2) С помощью общедоступной базы данных по распространенности аллельных частот - The Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefrequency.net/>), выявляли наиболее часто встречающиеся аллели молекул HLA I-класса и HLA II-класса у жителей РФ и оставляли эпитопы с высокой афинностью, сокращая одинаковые последовательности эпитопов, которые распознаются разными аллелями;

Согласно этой базе данных у жителей России наиболее часто встречаются следующие серотипы молекул HLA:

HLA I-класса: A*02, A*24, C*03, C*04, C*07;
HLA II-класса: DQA1*01, DQB1*06; DRB1*01, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*11, DRB1*15.

3) Далее с помощью доступных онлайн сервисов определяли наличие эпитопов в консенсусных последовательностях Н1, Н2 и Н5 для отобранных ранее аллелей HLA I-класса (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCcons/>) и HLA II-класса (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>). Таким образом было определено наличие следующих эпитопов:

HLA I-класса:

HLA-A0201, HLA-A0202, HLA-A0203, HLA-A0205, HLA-A0206, HLA-A0207, HLA-A0211, HLA-A0212, HLA-A0216, HLA-A0217, HLA-A0219, HLA-A0250, HLA-A2402, HLA-A2403, HLA-C0303, HLA-C0401, HLA-C0701, HLA-C0702

HLA II-класса:

HLA-DQA10101-DQB10501, HLA-DQA10102-DQB10602, HLA-DRB10101, HLA-DRB10401, HLA-DRB10404, HLA-DRB10405, HLA-DRB10701, HLA-DRB11101, HLA-DRB11501.

4) В общеизвестной компьютерной программе (например, Geneious) накладывали последовательности выявленных эпитопов аллелей HLA I-класса и HLA II-класса, на каждую из трех консенсусных последовательностей вируса гриппа субтипов Н1, Н2 и Н5, определяли наличие соответствующих эпитопов и отмечали их местоположение;

Для выполнения данной работы создавали базу данных эпитопов от трех сиквенсов,

принадлежащие одному HLA-классу, переносили на одну страницу Xlsx-файла и сохраняли только эпитопы с высокой аффинностью. Повторяющиеся значения удаляли, и конечные данные переносили в общеизвестную компьютерную программу (например, Geneious) (т.е. удаляли одинаковые сиквенсы эпитопов к одному и тому же аллелю, например RMNYYWTLV HLA-A0202 и RMNYYWTLV HLA-A0202). В компьютерной программе сохраняли только уникальные последовательности: то есть сокращали одинаковые последовательности эпитопов, которые распознаются разными аллелями (например, последовательность RMNYYWTLV распознают такие аллели как HLA-A0201, HLA-A0202, HLA-A0203, HLA-A0206, HLA-A0207, HLA-A0211, HLA-A0212, HLA-A0216, HLA-A0250, HLA-C0401). Таким образом, были получены две базы данных эпитопов: к HLA I-классу и HLA II-классу.

5) С помощью общедоступной базы данных иммунологических эпитопов из отобранных ранее Т-клеточных эпитопов HLA отбираются все известные эпитопы с экспериментально подтвержденной активностью и также на каждую из трех консенсусных последовательностей вируса гриппа субтипов H1, H2 и H5 и определяют наличие соответствующих эпитопов и отмечают их местоположение;

В процессе отбирались все известные Т-клеточные эпитопы, дающие положительный результат (связывания Т-клетками HLA-тетрамеров, продукция различных воспалительных цитокинов и т.д.) в исследованиях.

6) Три консенсусные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа А трех субтипов H1, H2 и H5 выравнивали относительно друг друга;

7) Собирали консенсусную последовательность гемагглютинина вируса гриппа А путем слияния того участка гена, на котором отмечено наибольшее количество Т-клеточных эпитопов, выбранного каждый раз из одной из трех консенсусных последовательностей гемагглютининов вирусов гриппа А субтипов H1, H2 и H5, и последовательно включали в собираемую консервативную последовательность;

Были использованы следующие обозначения, например HLA-DRB10101 (3): HLA-DRB10101 - это название эпитопа; (3) - количество аллелей, которое распознает данный эпитоп.

В качестве примера представлен процесс получения фрагмента консенсусной последовательности из:

1) H1 консенсуса, определены следующие:

а) HLA I-класса: HLA-A0211 (3), HLA-C0303 (2), HLA-C0401, HLA-A0206 (4);

б) HLA II-класса: HLA-DRB10101 (3), HLA-DRB10701, HLA-DRB10401 (4), HLA-DRB-10101 (3), HLA-DRB10701, HLA-DRB10101, HLA-DRB10701, HLA-DRB10701;

2) H2 консенсуса определены следующие:

а) HLA I-класса: HLA-C0303, HLA-A0201 (11);

б) HLA II-класса: HLA-DRB10101 (3), HLA-DRB10101 (2), HLA-DRB10101, HLA-DRB10701;

3) H5 консенсуса определены следующие:

а) HLA I-класса: HLA-A0211 (5), HLA-A0201 (10), HLA-A0201 (5);

б) HLA II-класса: HLA-DRB10101 (2), HLA-DRB10701, HLA-DRB10404(2), HLA-DRB10101, HLA-DRB10701.

Таким образом, при сравнительном анализе трех ранее составленных консенсусных последовательностей генов гемагглютинина субтипов в состав первого фрагмента консенсусной последовательности был включен участок H1 консенсуса:

а) HLA I-класса: HLA-A0211 (3), HLA-C0303 (2), HLA-C0401, HLA-A0206 (4);

б) HLA II-класса: HLA-DRB10101 (3), HLA-DRB10701, HLA-DRB10401 (4), HLA-DRB-

10101 (3), HLA-DRB10701, HLA-DRB10101, HLA-DRB10701, HLA-DRB10701.

По такому же принципу был составлен второй участок оптимизированной последовательности:

1) из H1 консенсуса определены следующие:

а) HLA I-класса: HLA-C0401; HLA-A0250;

б) HLA II-класса: HLA-DRB10101, HLA-DRB10101 (2), HLA-DRB10101, HLA-DRB10401 (2);

2) из H2 консенсуса определены следующие:

а) HLA I-класса: HLA-C0401, HLA-C0701; HLA-C0701 (2);

б) HLA II-класса: HLA-DRB10701, HLA-DRB10101, HLA-DRB10101 (2), HLA-DRB10101;

3) из H5 консенсуса определены следующие:

а) HLA I-класса: HLA-C0401, HLA-A0207 (2), HLA-A0250, HLA-A0211 (2), HLA-A0205 (6), HLA-C0702, HLA-A0206 (2).

б) HLA II-класса: HLA-DRB10701, HLA-DRB10701, HLA-DRB10101 (2), HLA-DRB10101.

На данном этапе после сравнения трех консенсусных последовательностей был выбран участок H5 консенсуса для включения в оптимизированную последовательность:

а) HLA I-класса: HLA-C0401, HLA-A0207 (2), HLA-A0250, HLA-A0211 (2), HLA-A0205 (6), HLA-C0702, HLA-A0206 (2);

б) HLA II-класса: HLA-DRB10701, HLA-DRB10701, HLA-DRB10101 (2), HLA-DRB10101.

По такому же принципу были определены остальные участки оптимизированной последовательности.

8) Полученную консервативную аминокислотную последовательность гемагглютинаина вируса гриппа А, содержащую участки гемагглютининов вирусов гриппа субтипов H1, H2 и H5 и максимально насыщенную консервативными (В- и Т-клеточными) эпитопами, переводят в соответствующую ей нуклеотидную последовательность, в которой оптимизируют кодоны общеизвестным способом для более эффективной экспрессии в клетках человека.

Таким образом, в результате работ была получена сначала аминокислотная (SEQ ID NO: 1), а затем и нуклеотидная (SEQ ID NO: 2) последовательности гемагглютинаина вируса гриппа, содержащего части гемагглютининов вирусов гриппа субтипов H1, H2 и H5 и максимально насыщенного консервативными (В- и Т-клеточными) эпитопами вируса гриппа.

Для теоретической оценки наличия иммуногенных свойств у полученного гена далее была проведена оценка встречаемости среди населения РФ Т-клеточных эпитопов, входящих в сконструированную консервативную последовательность гемагглютинаина HA125 с помощью онлайн ресурса располагающегося в базе данных иммунологических эпитопов (http://tools.iedb.org/tools/population/iedb_input). Установлено, что доля жителей России, распознающих хотя бы один эпитоп, составляет - 94,69%, среднее число распознаваемых человеком эпитопов - 15,70%, а также минимальное число эпитопов, распознаваемых 90% людей - 2,94%. Полученные результаты говорят о высоких иммуногенных свойствах разработанного гена консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5, обогащенной В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа.

На фиг. 1

представлено схематическое изображение фрагмента полученной консенсусной последовательности гена гемагглютинаина вируса гриппа, состоящего из различных участков гемагглютининов субтипов H1, H2 и H5 (HA 125).

Пример 2.

Конструирование штамма рекомбинантной

псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей в своем геноме экспрессионную кассету гена консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными

5 эпитопами вируса гриппа.

В данном примере рассмотрен процесс встраивания полученного гена консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа в рекомбинантную псевдоаденовирусную частицу на основе генома аденовируса человека 5 серотипа.

10 Способом получения штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа была гомологичная рекомбинация между плазмидой, несущей кассету с системой Tet-off, позволяющей

15 блокировать экспрессию подконтрольных генов путем добавления доксицилина и ген НА125 ДНК аденовируса 5 серотипа с делецией E1 области в клетках E.coli штамма BJ5183, сборка рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц в клетках линии НЕК293 (Human embryonic kidney 293) после трансфекции рекомбинантной ДНК Ad5-tetOFF-E3-NA125.

20 Процесс получения штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа состоял из нескольких основных этапов, суть которых известна специалисту данной области, основывался на

25 общеизвестных методиках (например, Sambrook J. et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed., Russell, 2001, том 1, 2, 3 - Молекулярное клонирование - лабораторное руководство) и поэтому в данном примере подробно не рассматривается, указывая лишь на самые основные этапы:

1) Постановка трансфекции пермиссивной культуры эукариотических клеток плазмидой, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами;

2) Получение рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа с кассетой гена-регулятора ТТА промотора ТЕТOFF в E3 области аденовирусного генома;

35 3) Получение штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа с кассетой целевого гена в E1 области аденовирусного генома;

В результате проведенных генно-инженерных манипуляций были получены клоны плазмиды pAdTetNA125_E3tTA, содержащей ген гемагглютинаина по изобретению, под контролем TetOff промотора и ген-регулятор tTA промотора TetOff в делетированной E3 области аденовирусного генома.

40 Далее эти плазмиды использовались для трансфекции пермиссивной клеточной культуры клеток НЕК293 с последующим получением определенного титра штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы, который применялся для дальнейшего

45 наращивания.

4) Наращивание для депонирования полученного штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А

субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа.

Штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц наращивали в перmissive культуре клеток почки человека НЕК293 в присутствии доксициклина после трансдукции клеток линии НЕК293. Для роста клеток линии НЕК293 в адгезионной культуре
5 использовали среду DMEM (Invitrogen, №52100-047, США), содержащую 25 мМ глюкозы, 4 мМ L-глутамин и 10% эмбриональной бычьей сыворотки, специальный инкубатор с поддержанием температуры +37°C и 5% CO₂.

Полученный штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц может храниться при температуре не выше -70°C в среде для культивирования DMEM (Invitrogen,
10 кат.№52100-047, США) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Hy Clone, кат. №SV30160.03, Великобритания), собранной вместе с клетками НЕК293 через 40-46 часов после трансдукции клеток линии НЕК293.

Клеточную линию 293-НЕК (клетки почки эмбриона человека, human embryo kidney) использовали для определения титра рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц
15 методом бляшкообразования.

По окончании наращивания активность (продуктивность) полученного штамма рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущих ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса
20 гриппа, составляла от 5×10^7 - до 10^8 акт. ед./мл (бляшкообразующих единиц на 1 мл культуры).

Получение штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными
25 эпитопами вируса гриппа, было подтверждено результатами ПЦР со специфическими праймерами (представлен на фигуре 2).

Штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами
30 вируса гриппа (Ad5-tetOFF-E3-NA125) зарегистрирован в Государственной коллекции микроорганизмов при ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» (Музей генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов) под номером 21. Продукт, синтезируемый штаммом - консенсусный гемагглютинин вируса гриппа А, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами (NA125).
35

Пример 3.

Получение иммуногенного препарата, содержащего штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа.
40

Получение иммуногенного препарата, содержащего штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущих ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа
45 необходимо для изучения его иммуногенных и протективных свойств, в качестве обоснования возможности применения в противогриппозных вакцинах.

Для получения иммуногенного препарата, содержащего штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц использовали культуру клеток почки эмбриона человека НЕК 293, адаптированную для роста в суспензии. Клеточную суспензию, полученную

в примере 2, содержащую штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц Ad5-tetOFF-E3-NA125 с титром 5×10^7 - 10^8 акт. ед./мл, использовали для наращивания с целью приготовления иммуногенного препарата с эффективным количеством рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц.

5 Для наработки необходимых титров рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц волновой биореактор с 4500,0 мл суспензии перmissive клеточной культуры 293NEК засеивали клеточной суспензией объемом 500,0 мл, содержащей рекомбинантные псевдоаденовирусные частицы с титром 5×10^7 - 10^8 акт. ед./мл. Для наращивания
10 рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц Ad5-tetOFF-E3-NA125 и достижения титра 2×10^8 акт. ед./мл, их культивировали в течение 48 часов в присутствии доксицилина в концентрации 5,0 мкг/мл. Затем клеточную массу очищали с помощью общеизвестных методов ультрафильтрации и высокоэффективной жидкостной хроматографии в несколько этапов:

- 15 1) Осаждение клеточной массы центрифугированием;
- 2) Перемораживание осадка;
- 3) Обработка бензоной;
- 4) Центрифугирование для удаления клеточного дебриса;
- 5) Ультрафильтрация супернатанта;
- 20 6) Анионообменная хроматография;
- 7) Эксклюзионная хроматография;
- 8) Нормальная фильтрация.

Для стерилизации полученный препарат фильтровали через систему фильтров с размером пор 0,22 мкм и разбавляли стерильным фармацевтически приемлемым
25 буферным раствором, например: 10 mM TrisHCl, 75 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5% сахара, 0,05% полисорбат 80, 0,5% этанол, 100 мкм ЭДТА, pH 8.0, с получением препарата с заданной активностью 10^7 - 10^9 акт. ед. рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц Ad5-tetOFF-E3-NA125 на дозу 0,5 мл.

30 Таким образом, представленная технология позволяет выпускать иммуногенный препарат, содержащий на дозу 0,5 мл:

- рекомбинантные псевдоаденовирусные частицы Ad5-tetOFF-E3-NA125 - 10^7 - 10^9 акт. ед.;
- фармацевтически приемлемый буферный раствор - до 0,5 мл.

35 В конкретном примере произведенный иммуногенный препарат содержал $4,0 \times 10^8$ акт. ед./дозу 0,5 мл рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущих ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа. Данный иммуногенный препарат был использован для
40 дальнейших исследований экспрессии целевого гена, иммуногенности и протективных свойств.

Пример 4.

Определение наличия экспрессии целевого белка методом иммуноблоттинга

В примере показано определение экспрессии целевого белка в месте введения
45 иммуногенного препарата, содержащего штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа методом иммуноблоттинга.

Для выявления и идентификации в тканях экспрессии целевого антигена вируса гриппа - консенсусного гемагглютинина опытным мышам однократно интраназально вводили иммуногенный препарат, содержащий штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц в дозе $4,0 \times 10^7$ акт. ед. в объеме 50 мкл на животное. Для контроля использовали мышей, иммунизированных вирусным вектором, не несущим трансгена Ad5-null и интактные мыши.

Проводили анализ методом электрофореза с последующим иммуноблоттингом. Для этого через 72 часа после интраназальной иммунизации мыши были бескровно умерщвлены и из них были извлечены ткани носовой перегородки и легких.

Ткани помещали в лизирующий буфер CCLR (E1531 Promega Cell Culture Lysis 5X Reagent), содержащий ингибиторы протеиназ (S8820 SIGMA SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets) и гомогенизировали с бусами (19-644 Omni International Garnet Bead Material 0.7mm) двукратно (4 м/с, по 20 секунд). После гомогенизации пробирки инкубировали 10 минут на льду, дебрис осаждали центрифугированием (12000g, 1 мин) и надосадочную жидкость отбирали для дальнейшего анализа. Определение содержания общего белка в образцах проводили по стандартному методу Брэдфорд, на спектрофотометре BioMate 3S (ThermoScientific). Фракционирование белков проводили методом электрофореза в градиентном 10-20% ПААГ-ДСН, в буферной системе Лэммли, с использованием вертикального прибора для минигелей Mini-Protean 3 Cello (BIO-RAD) и готовых пластин геля Mimi-Protein TGX Stain-free Precast Gel S (BIO-RAD). Для анализа экспрессии рекомбинантного белка HA125, несущего антигенные детерминанты конформационного типа, в пробы добавили равный объем 2-кратного диссоциирующего буфера без меркаптоэтанола.

По данным иммуноблоттинга (Фигура 3) в реакции с рекомбинантными антителами в образцах экстрактов тканей дыхательных путей (носовая перегородка и легкие) иммунизированных мышей идентифицирован рекомбинантный белок HA125 (темная полоса на треках 2 и 5, молекулярная масса более 140 кДа, что соответствует гемагглютинину вируса гриппа А). В дыхательных путях контрольных животных экспрессия целевых антигенов отсутствует.

Как видно из представленных результатов, через 72 часа после введения иммуногенного препарата, содержащего штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц по изобретению в месте введения (назальная перегородка) и легких иммунизированных мышей наблюдается экспрессия целевых антигенов - гена консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа, что соответствует поставленной цели изобретения.

Пример 5.

Оценка гуморального ответа на введение иммуногенного препарата, содержащего штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенного В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа, методом ИФА

Иммуногенные свойства созданного штамма Ad5-tetOFF-E3-HA125 изучались методом ИФА.

Для изучения иммуногенности мышам линии BALB/c (самки весом 18-20 грамм) однократно интраназально вводили препарат Ad5-tetOFF-E3-HA125 в дозе 2×10^8 акт. ед./мышь. В каждой группе было 6 животных. В качестве контрольной группы использовали мышей, получавших интраназально буферный раствор для хранения

аденовирусных препаратов. Через 3 недели после иммунизации у мышей отбирали кровь, получали сыворотки.

Определение титра IgG в сыворотках крови мышей проводили методом непрямого ИФА, широко известного специалисту. В качестве антигенов использовали
5 рекомбинантные гемагглютинины вирусов гриппа А H1N1, H5N2 и H2N2 (A/Egypt/
N05056/2009 H5N1 (Sino biological Inc., Китай, кат №1702-V08H), A/California/04/2009
H1N1 (Sino biological Inc., Китай, кат №11055-V08H2), A/Japan/305/1957 H2N2 (Sino
biological Inc., Китай, кат №11088-V08H), A/New Caledonia/20/1999 H1N1 (Sino biological
Inc., Китай, кат №11683-V08H)).

10

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 1. Результаты ИФА при оценке иммуногенности препаратов, содержащих штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц Ad5-tetOFF-E3-NA125

№ группы, наименование вещества	Доза препарата и способ введения	В качестве антигена использовали гемагглютинин вируса гриппа	Средний геометрический титр
№1, Ad5-tetOFF-E3-NA125	2x10 ⁸ акт.ед./мышь, интраназально	A/Egypt/N05056/2009 H5N1	1/1795
№2, Ad5-tetOFF-E3-NA125	2x10 ⁸ акт.ед./мышь, интраназально	A/California/04/2009 H1N1	1/3591
№3, Ad5-tetOFF-E3-NA125	2x10 ⁸ акт.ед./мышь, интраназально	A/Japan/305/1957 H2N2	1/1425
№4, Ad5-tetOFF-E3-NA125	2x10 ⁸ акт.ед./мышь, интраназально	A/New Caledonia/20/1999 H1N1	1/800
№ 5, контроль, буферный раствор	50 мкл	A/Egypt/N05056/2009 H5N1	менее 1/200
№ 6, контроль, буферный раствор	50 мкл	A/California/04/2009 H1N1	менее 1/200
№ 7, контроль, буферный раствор	50 мкл	A/Japan/305/1957 H2N2	менее 1/200
№ 8, контроль, буферный раствор	50 мкл	A/New Caledonia/20/1999 H1N1	менее 1/200

Таким образом, из представленных в таблице результатов следует, что иммуногенный препарат, содержащий штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущих ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа вызывает в организме иммунизированных животных индукцию высоких титров специфических антител против различных вирусов гриппа А субтипов Н1, Н5 и Н2.

Пример 6.

Оценка Т- и В- клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных иммуногенным препаратом, содержащим штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц по изобретению

Известно, что наличие специфического клеточного иммунного ответа в отношении различных субтипов вируса гриппа позволяет говорить об индукции иммунитета, позволяющего защищать от множества штаммов вируса гриппа А, в нашем случае ко всем вирусам гриппа А субтипов Н1, Н2 и Н5, что является современным требованием к противогриппозным вакцинам широкого спектра действия.

Для изучения Т- клеточного иммунного ответа у мышей был использован полученный в примере 5 иммуногенный препарат, содержащий Ad5-tetOFF-E3-NA125. Для этой цели применяли метод ELISPOT, позволяющий выявлять Т-лимфоциты, специфичные к белку NA125, по их способности секретировать IFN- γ в ответ на реактивацию дендритными клетками, презентующими белок NA125. Дендритные клетки получали из костного мозга интактных мышей и культивировали в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора.

Для проведения опыта мышей (Balb/c, самки) иммунизировали однократно интраназально препаратом, содержащим штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц, экспрессирующих ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа в дозах $4,0 \times 10^6$ акт. ед. и $4,0 \times 10^7$ акт. ед. в объеме 50 мкл. В качестве контрольной группы использованы животные, получившие рекомбинантный аденовирусный вектор, не несущий целевого трансгена и фосфатный буфер. Количество мышей в опытных и контрольной группе составляло по 4 особи, срок после иммунизации составлял 30 дней, после чего мышей эвтаназируют бескровным методом и в асептических условиях извлекали селезенку.

Затем спленоциты реактивировали *in vitro* дендритными клетками, презентующими эпитопы антигена NA125 и определяли количество спленоцитов, отвечающих секретацией IFN- γ в ответ на реактивацию. Для реактивации спленоцитов *in vitro* использовали 2 варианта дендритных клеток. В первом варианте, дендритные клетки предварительно активировали LPS для индукции экспрессии молекул МНС класса II и ко-стимулирующих молекул CD80/CD86. Затем предварительно активированные дендритные клетки инкубировали в присутствии антигенных пептидов:

Пептиды производства фирмы ООО "Алма-Бион"

№ код	последовательность	Серия
1 YN-15	VKSNRLVLATGLRN	567765
2 NL-15	NTKCQTPIGAINSTL	567775
3 GS-15	GVYQILAIYATVAGS	567773
4 QN-15	QNPTTYISVGTSTLN	567774
5 HT-15	HFERFEIFPKTSRWT	567772
6 MT-15	MEFEWTILKPNDAIT	567771.

Пептидные антигены разводили в дистиллированной воде в концентрации 0,3 мг/мл и фильтровали через 0,2 мкм. Аликвоты хранили замороженными при -80°C .

В качестве контроля реактивации использовали дендритные клетки, активированные

LPS, без нагрузки антигеном. При втором варианте постановки эксперимента дендритные клетки трансдуцировали рекомбинантным вирусным вектором, экспрессирующим ген HA125 в количестве 100 акт. ед./клетку и по истечению двух суток после трансдукции, использовали их для реактивации спленоцитов (схема постановки эксперимента представлена на фигуре 4). Методом ELISPOT, проводимым в соответствии с представленной на фигуре последовательностью определяли количество CD4 и CD8 Т-клеток, секретирующих IFN- γ .

В результате проведенных исследований установлено, что однократная интраназальная иммунизация препаратом, содержащим штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц Ad5-tetOFF-HA125 в дозах $4,0 \times 10^6$ и $4,0 \times 10^7$ акт. ед на мышшь вызывает через 30 суток массовое появление в селезенке CD8+ Т-клеток, которые специфически вырабатывают IFN- γ в ответ на презентацию эпитопов целевого антигена в комплексе с молекулами МНС I. Число IFN- γ секретирующих клеток составляет - около 1500 на 1 млн спленоцитов (0.15% IFN- γ от всех спленоцитов) при иммунизации Ad5-tetOFF-HA125 в дозе $2,5 \times 10^9$ частиц и около 2800 на 1 млн спленоцитов (0.28% IFN- γ от всех спленоцитов) при дозе иммунизации $4,0 \times 10^7$ акт. ед. на мышшь. Количество CD4+IFN- γ секретирующих клеток, специфичных к эпитопам целевого антигена в комплексе с молекулами МНС II, было незначительным (Фигуры 5 и 6).

Таким образом, было заключено, что развитие иммунного ответа на антиген HA125, экспрессируемый рекомбинантными псевдоаденовирусными частицами по изобретению, происходит преимущественно в направлении цитотоксических Т-клеток (CD8+), и протективность, соответственно, обеспечивается преимущественно цитотоксическим действием, что свидетельствует о возникновении иммунитета широкого спектра действия к вирусам гриппа А субтипов H1, H2, H5.

Наличие В-клеточных эпитопов было доказано экспериментальным взаимодействием антигена HA125 с универсальными антителами к стеблевой части гемагглютинаина - CR9114 по экспрессии рекомбинантного белка HA125 методом вестерн-блотта.

Для получения этого антитела, был получен рекомбинантный аденовирус, несущий ген антитела CR9114. Клетки A549 были трансдуцированы этим рекомбинантным аденовирусом и через 12 часов среду DMEM меняли на новую с 2% содержание сыворотки. Через 5 дней среда была собрана и использована в качестве первичных антител в вестерн-блотте.

В качестве положительного контроля были использованы следующие белки производства Альмабион:

Influenza A H1N1 (A/California/04/2009) Hemagglutinin Protein, SB кат. №11055-M08P2 100 мкг.

Influenza A H2N2 (A/Japan/305/1957) Hemagglutinin Protein, SB кат. №11088-V08H 100 мкг.

Influenza A H5N1 (A/Egypt/N05056/2009) Hemagglutinin Protein, SB кат. №11702-V08H 100 мкг.

В качестве вторичных антител были использованы anti-Human антитела компании Sigma-Aldrich (кат.№11886-2ML).

Рекомбинантным аденовирусом Ad-HA125 трансдуцировали клетки линии A549, через двое суток клетки собирали, лизировали и ставили вестерн-блотт. Результаты показаны на фигуре 7.

Таким образом, по результатам эксперимента было показано, что, во-первых, универсальное антитело CR9114 распознает эпитоп только в нативной конформации,

во-вторых, нативная конформация по крайней мере стебельной части сохраняется в рекомбинантном белке HA125 и, в-третьих, CR9114 способен распознавать конформационный эпитоп в гемагглютинине HA125. Было заключено, что Ad5-tetOFF-E3-HA125 содержит в составе гена гемагглютинина В-клеточный эпитоп.

5 Пример 7.

Оценка протективных свойств иммуногенной композиции, содержащей штамм рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц по изобретению.

Оценку протективных свойств препарата на основе штамма Ad5-HA125 проводили на мышах линии BALB/c (самках весом 18-20 грамм). Мыши были иммунизированы
10 однократно интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 2×10^8 акт. ед./мышь. В каждой группе было 10 животных. В качестве контрольной группы использовали мышей, получавших интраназально буферный раствор препарата. Через 28 дней после иммунизации мышей интраназально под легким эфирным наркозом заражали вирусами гриппа А в дозе 15ЛД_{50} на животное. Для приготовления нужных разведений вирусов
15 гриппа использовали среду Хенкса с гидролизатом лактальбумина и антибиотиком гентомицином (ПанЭко, Россия). Оценку выживаемости и изменения веса животных проводили в течение 14 дней после заражения. Все работы выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Для пробы мышей были использованы следующие штаммы вирусов гриппа:

20 A/California/20/09 H1N1

A/BlackDuck/NewJersey/1580/78(H2N3)

A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84 H5N2

В ходе опыта иммуногенный препарат, содержащий штамм рекомбинантных
25 псевдоаденовирусных частиц на основе генома аденовируса человека 5 серотипа, несущих ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа, продемонстрировал 100% протекцию иммунизированных мышей от заражения вирусом гриппа А субтипа H5, 100% протекцию при заражении вирусом гриппа А субтипа H2
30 и 70% протекцию при заражении вирусом гриппа А субтипа H1 (Фигура 9).

Полученные данные свидетельствуют об индукции защитного иммунитета в отношении вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5.

Иммуногенный препарат на основе штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа Ad5-tetOFF-E3-HA125,
35 несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов H1, H2, H5 может применяться, как самостоятельно в качестве противогриппозной вакцины, так и в качестве одного из действующих веществ многокомпонентной по составу противогриппозной вакцины.

Заявленный штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы по изобретению
40 по сравнению с прототипом имеет ряд существенных преимуществ:

- наличие Т-клеточных эпитопов в составе гемагглютинина вируса гриппа позволяет выработать долговременную иммунологическую память на патоген, что позволит для поддержания иммунитета проводить ревакцинации 1 раз в несколько лет, а не 1 раз в год, как предлагается для существующих вакцин;

- присутствуют конформационные В-клеточные эпитопы на консервативные области гемагглютинина, а именно на его стебельную часть. Известно, что гуморальный иммунитет играет основную роль в защите против вируса гриппа и именно на выработку антител к стебельной части HA направленно большинство исследований вирусологов.

- позволяет de-novo активировать наивные Т-хелперы, что, при естественном

заражении, во-первых, вызывает появление антител к экзотическому гемагглютиниону, а, во-вторых, более быстрое (в 2-3 дня) появление специфических антител, так как известно, что для индукции гуморального иммунного ответа В-лимфоцитам, необходима помощь в активации со стороны хелперных Т-лимфоцитов. При этом более ранние встречи с другим штаммом вируса гриппа, мешают de-novo активации наивных В-лимфоцитов и, следовательно, сероконверсии после иммунизации. Этот феномен известен в литературе как изначальный «антигенный грех» (антигенный импринтинг или иммунологическое старшинство) и его объяснение лежит в нескольких иммунологических механизмах (маскирование эпитопов, конкуренция за антиген и т.д.). Для того чтобы его преодолеть, в целевой антиген рекомбинантной частицы включены эпитопы гемагглютининов Н1, Н2 и Н5 именно для Т-хелперных лимфоцитов.

Таким образом, поставленная задача, а именно, создание штамма рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы, способной вызвать протективный иммунитет против всех существующих и вновь появляющихся вирусов гриппа А субтипов Н1, Н2 и Н5, - выполнена.

Промышленная применимость

Все приведенные примеры также подтверждают промышленную применимость заявленного изобретения.

Перечень сокращений

293-НЕК - клетки линии эмбриональной почки человека

Ad5 - аденовирус человека 5 серотипа

CD4+- Т-лимфоциты субпопуляции CD4+

CD8+- Т-лимфоциты субпопуляции CD8+

CMV - цитомегаловирус человека

DMEM - Dulbecco modified Eagle's medium; минимальная среда Игла, модифицированная Дельбекко

HA - гемагглютинин

HLA - человеческий лейкоцитарный антиген

M - маркер молекулярного веса

M2 - белок ионного канала

mCMV - минимальный промотор цитомегаловируса человека

MHC - главный комплекс гистосовместимости NP - нуклеопротеин

NS - неструктурный белок вируса гриппа

RCA - репликативно-компетентный аденовирус

TMB - тетраметилбензидин индикаторная смесь

TRE - тетрациклин-зависимый элемент

tTA - тетрациклин контролируемый трансактиватор

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА - иммуноферментный анализ

ЛД50 - 50% летальная доза

п.о. - пар оснований

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

ЦПД - цитопатическое действие.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

<120> Штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса

<160> 2

<170> BISSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 4275

<212> DNA

5 <213> Influenza virus

<400> 1

	cgtgaggctc	cggtgcccgt	cagtgggcag	agcgcacatc	gccacagtc	cccgagaagt	60
	tggggggagg	ggtcggcaat	tgaaccgggtg	cctagagaaa	gtggcgcggg	gtaaactggg	120
	aaagtgatgt	cgtgtactgg	ctccgccttt	ttcccagagg	tgggggagaa	ccgtatataa	180
10	gtgcagtagt	cgccgtgaac	gttctttttc	gcaacggggt	tgccgccaga	acacaggtaa	240
	gtgccgtgtg	tggttccccg	gggcctggcc	tctttacggg	ttatggccct	tgctgcctt	300
	gaattacttc	cacgcccctg	gctgcagtac	gtgattcttg	atcccagact	tcgggttggg	360
	agtgggtggg	agagtctcag	gccttgccgt	taaggagccc	cttcgcctcg	tgcttgagtt	420
	gaggcctggc	ttgggcgctg	gggccgccgc	gtgcgaatct	ggtggcacct	tcgcgcctgt	480
15	ctcgcctgctt	tcgataagtc	tctagccatt	taaaattttt	gatgacctgc	tgcgacgctt	540
	tttttctggc	aagatagtct	tgtaaatgcg	ggccaagatc	tgcacactgg	tatttcggtt	600
	tttggggccg	cgggcggcga	cggggcccgt	gcgtcccagc	gcacatgttc	ggcgaggcgg	660
	ggcctgcgag	cgcgccacc	gagaatcgga	cggggtagt	ctcaagctgg	ccggcctgct	720
	ctgggtgcctg	gcctcgcgcc	gccgtgtatc	gccccgccct	ggcgggcaag	gctggcccgg	780
20	tcggcaccag	ttgcgtgagc	ggaaagatgg	ccgcttcccg	gccctgctgc	agggagctca	840
	aaatggagga	cgcggcgctc	gggagagcgg	gcgggtgagt	caccacaca	aaggaaaagg	900
	gcctttccgt	cctcagccgt	cgcttcatgt	gactccacgg	agtaccgggc	gccgtccagg	960
	cacctcgatt	agttctcgag	cttttgaggt	acgtcgtctt	taggttgggg	ggaggggttt	1020
	tatgcgatgg	agtttcccca	cactgagtg	gtggagactg	aagttaggcc	agcttggcac	1080
25	ttgatgtaat	tctccttggg	atgtgccctt	tttgagtttg	gatcttgggt	cattctcaag	1140
	cctcagacag	tggttcaaag	tttttttctt	ccatttcagg	tgctgtgaaa	actacccta	1200
	aaagccagga	tccaccatgc	agtggacctc	cctcctgctg	ctggcagggc	tcttctcct	1260
	ctcccaggcc	cagtatgaag	atgaccctca	ttggtgggtc	cactacctcc	gcagccagca	1320
	gtccacctac	tacgatccct	atgaccctta	cccgatgag	acctacgagc	cttacccta	1380
30	tggggtggat	gaagggccag	cctacaccta	cggctctcca	tcccctccag	atccccgcga	1440
	ctgccccag	gagtgcgact	gcccaccaa	cttccccacg	gcatgtact	gtgacaatcg	1500
	caacctcaag	tacctgccct	tcgttccctc	ccgcatgaag	tatgtgtact	tccagaacaa	1560
	ccagatcacc	tccatccagg	aaggcgtctt	tgacaatgcc	acagggctgc	tctggattgc	1620
	tctccacggc	aaccagatca	ccagtgataa	ggtgggcagg	aaggtcttct	ccaagctgag	1680
35	gcacctggag	aggctgtacc	tggaccacaa	caacctgacc	cggatgcccg	gtcccctgcc	1740
	tcgatccctg	agagagctcc	atctcgacca	caaccagatc	tcacgggtcc	ccaacaatgc	1800
	tctggagggg	ctggagaacc	tcacggcctt	gtacctcaa	cacaatgaga	tccaggaagt	1860
	gggcagttcc	atgaggggcc	tccggtcact	gatcttgctg	gacctgagtt	ataaccacct	1920
	tcggaagggtg	cctgatgggc	tgccctcagc	tcttgagcag	ctgtacatgg	agcacaacaa	1980
40	tgtctacacc	gtccccgata	gctacttccg	gggggcgccc	aagctgctgt	atgtgcggct	2040
	gtcccacaac	agtctaacca	acaatggcct	ggcctccaac	accttcaatt	ccagcagcct	2100
	ccttgagcta	gacctctcct	acaaccagct	gcagaagatc	ccccagtc	acaccaacct	2160
	ggagaacctc	tacctccaag	gcaataggat	caatgagttc	tccatcagca	gcttctgcac	2220
	cgtggtggac	gtcgtgaact	tctccaagct	gcaggtgctg	cgctggacg	ggaacgagat	2280
45	caagcgcagc	gccatgcctg	ccgacgcgcc	cctctgcctg	cgcttgcca	gcctcatcga	2340
	gatctaagaa	ttccctgtga	cccctcccca	gtgcctctcc	tggccctgga	agttgccact	2400
	ccagtgccca	ccagccttgt	cctaataaaa	ttaagttgca	tcattttgtc	tgactaggtg	2460
	tccttctata	atattatggg	gtggaggggg	gtggtatgga	gcaaggggca	agttggaag	2520

RU 2 713 722 C1

acaacctgta gggcctgCGG ggtctattgg gaaccaagct ggagtgcagt ggcacaatct 2580
 tggctcactg caatctccgc ctctgggtt caagcgattc tcctgcctca gcctcccag 2640
 ttgttgggat tccaggcatg catgaccagg ctCagctaatt ttttgTTTTT ttggtagaga 2700
 cggggTTTTca ccatattggc caggctggtc tccaactcct aatctcaggT gatctacca 2760
 5 ccttggcctc ccaaattgct gggattacag gCGTgaacca ctgctccctt ccctgtcctt 2820
 acgcgtagaa ttggtaaaga gagtcgtgta aaatatcgag ttcgcacatc ttgttgtctg 2880
 attattgatt tttggcgaaa ccatttgatc atatgacaag atgtgtatct accttaactt 2940
 aatgattttg ataaaaatca ttaactagtc catggctgcc tcgcgcgTtt cggTgatgac 3000
 ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccG gagacggTca cagcttgtct gtaagcggat 3060
 10 gccgggagca gacaagcccG tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggcgca 3120
 gccatgacc agtcacgtag cgatagcggA gtgtatactg gcttaactat gcggcatcag 3180
 agcagattgt actgagagtg caccatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga 3240
 gaaaataccg catcaggcgc tcttccgctt cctcgcTcac tgactcgcTg cgctcggTcg 3300
 ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggT aatacggTta tccacagaat 3360
 15 caggggataa cgcaggaaaG aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 3420
 aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaAAA 3480
 atcgcgcTc aagtcagagg tggcgaAAcc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 3540
 ccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 3600
 ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctCacgctgt aggtatctca 3660
 20 gttcggTgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccG 3720
 accgctgCgc cttatccggT aactatcgtc ttgagtcaa cccggtaaga cagcacttat 3780
 cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 3840
 cagagttctt gaagtggTgg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggTatct 3900
 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagTtg tagctcttga tccggcaaac 3960
 25 aaaccaccgc tggtagcggT ggtTTTTttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 4020
 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggTc tgacgctcag tggAACgaaa 4080
 actcacgtta agggattttg gTcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 4140
 taaattaaAA atgaagTttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggTctgaca 4200
 gttaccaatg cttaatcagT gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgTtcatcca 4260
 30 tagttgcctg actcc 4275
 <210> 2
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Influenza virus
 35 <400> 2
 Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 40 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Lys Asn
 35 40 45
 Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val
 50 55 60
 Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly
 45 65 70 75 80
 Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Tyr Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe

RU 2 713 722 C1

			100					105				110				
	Asn	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Lys	His	Phe
			115					120					125			
	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys	Thr	Ser	Arg	Trp	Thr	Gln	His	Thr
5			130					135					140			
	Thr	Thr	Gly	Gly	Ser	Arg	Ala	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Asn	Pro	Ser	Phe
	145						150				155					160
	Phe	Arg	Asn	Met	Val	Trp	Leu	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Ser	Tyr	Pro	Lys
					165					170						175
10	Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Ile	Asn	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Leu
					180					185						190
	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ile	Asp	Glu	Thr	Glu	Gln	Arg	Thr	Leu	Tyr
			195					200					205			
	Gln	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln
15			210					215					220			
	Arg	Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Pro	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Gly
	225						230				235					240
	Gly	Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile
					245					250						255
20	Thr	Phe	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Val	Val	Pro	Arg	Tyr	Ala	Phe	Ala
					260					265						270
	Met	Glu	Arg	Asn	Ala	Gly	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Ser	Asp	Thr	Glu	Tyr
					275					280			285			
	Gly	Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Ile	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser
25			290					295					300			
	Thr	Leu	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro
	305						310					315				320
	Lys	Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn
					325						330					335
30	Val	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe
					340						345					350
	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His
					355						360					365
	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr
35			370					375					380			
	Gln	Lys	Ala	Phe	Asp	Gly	Ile	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Ile	Glu
	385					390					395					400
	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Phe	Ser	Asn	Leu
					405						410					415
40	Glu	Arg	Arg	Leu	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp	Gly	Phe	Leu
					420						425					430
	Asp	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Glu	Asn	Glu
					435						440					445
	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	Asp	Lys
45			450					455					460			
	Val	Arg	Met	Gln	Leu	Arg	Asp	Asn	Val	Lys	Glu	Leu	Gly	Asn	Gly	Cys
	465						470					475				480
	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Thr	Cys	Met	Asn	Ser	Val	Lys

		485		490		495											
	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Lys	Tyr	Glu	Glu	Glu	Ser	Lys	Leu	Asn	
				500					505				510				
	Arg	Asn	Glu	Ile	Lys	Gly	Val	Lys	Leu	Ser	Ser	Met	Gly	Val	Tyr	Gln	
5			515					520					525				
	Ile	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ala	Thr	Val	Ala	Gly	Ser	Leu	Ser	Leu	Ala	Ile	
			530					535					540				
	Met	Met	Ala	Gly	Ile	Ser	Phe	Trp	Met	Cys	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Gln	
			545			550					555					560	
10	Cys	Arg	Ile	Cys	Ile												
					565												

(57) Формула изобретения

1. Штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа Ad5-tetOFF-E3-NA125 для создания противогриппозных иммуногенных препаратов, несущей ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А субтипов Н1, Н2, Н5, обогащенный В и Т-клеточными эпитопами вируса гриппа с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2, при этом ген консенсусной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

2. Способ получения гена консенсусной последовательности гемагглютинина с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2, осуществляемый за счет слияния консервативных участков гемагглютининов вируса гриппа А субтипов Н1, Н2 и Н5, при этом общая длина рекомбинантного белка равна нативному гемагглютинуину вируса гриппа А - 1701 п. о., содержит Т-клеточные эпитопы и конформационный В-клеточный эпитоп в стебельной части, заключающийся в следующих последовательных действиях:

- из общедоступной базы генетических данных отбирают аминокислотные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа А трех субтипов Н1, Н2 и Н5, выделенные от человека, выравнивают друг относительно друга с помощью общедоступной компьютерной программы, при этом сохраняя конформационный В-клеточный эпитоп в стебельной части, и, таким образом, получают «консенсусные» (усредненные) последовательности для каждого субтипа отдельно;

- с помощью общедоступной базы данных по распространенности аллельных частот выявляют наиболее часто встречающиеся аллели молекул HLA I-класса и HLA II-класса у жителей РФ и оставляют эпитопы с высокой афинностью, сокращая одинаковые последовательности эпитопов, которые распознаются разными аллелями;

- с помощью доступных онлайн сервисов определяют наличие эпитопов в консенсусных последовательностях Н1, Н2 и Н5 для отобранных ранее аллелей HLA I-класса и HLA II-класса.

- накладывают последовательности выявленных эпитопов аллелей HLA I-класса и HLA II-класса на каждую из трех консенсусных последовательностей вируса гриппа субтипов Н1, Н2 и Н5 и определяют наличие соответствующих эпитопов и отмечают их местоположение;

- с помощью общедоступной базы данных иммунологических эпитопов из отобранных ранее Т-клеточных эпитопов HLA отбираются все известные эпитопы с экспериментально подтвержденной активностью и также на каждую из трех консенсусных последовательностей вируса гриппа субтипов Н1, Н2 и Н5 и определяют

наличие соответствующих эпитопов и отмечают их местоположение;

- три консенсусные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа А трех субтипов Н1, Н2 и Н5 выравнивают относительно друг друга;

5 - собирают консенсусную последовательность гемагглютинина вируса гриппа А путем слияния того участка гена, на котором отмечено наибольшее количество Т-клеточных эпитопов, выбранного каждый раз из одной из трех консенсусных последовательностей гемагглютининов вирусов гриппа А субтипов Н1, Н2 и Н5, и последовательно включаемого в собираемую консервативную последовательность;

10 - полученную консервативную аминокислотную последовательность гемагглютинина вируса гриппа А, содержащую участки гемагглютининов вирусов гриппа субтипов Н1, Н2 и Н5 и максимально насыщенную консервативными В- и Т-клеточными эпитопами, переводят в соответствующую ей нуклеотидную последовательность, в которой оптимизируют кодоны общеизвестным способом для более эффективной экспрессии в клетках человека.

15 3. Иммуногенный препарат, содержащий штамм рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе генома аденовируса человека 5 серотипа по п. 1. для профилактики гриппа А, вызванного субтипами Н1, Н2 и Н5, содержащий на дозу:

20 - рекомбинантная псевдоаденовирусная частица Ad5-tetOFF-E3-NA125- 10^7 - 10^9 акт.ед.;
- фармацевтически приемлемый буферный раствор - до 0,5 мл.

25

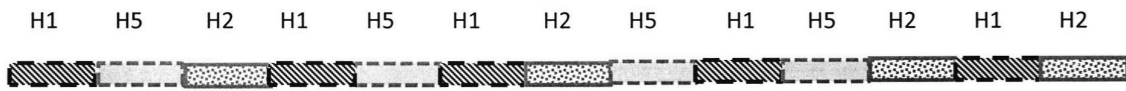
30

35

40

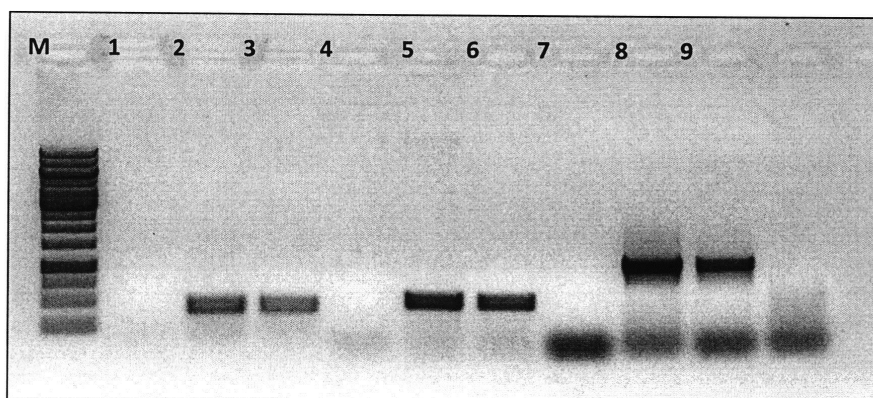
45

1

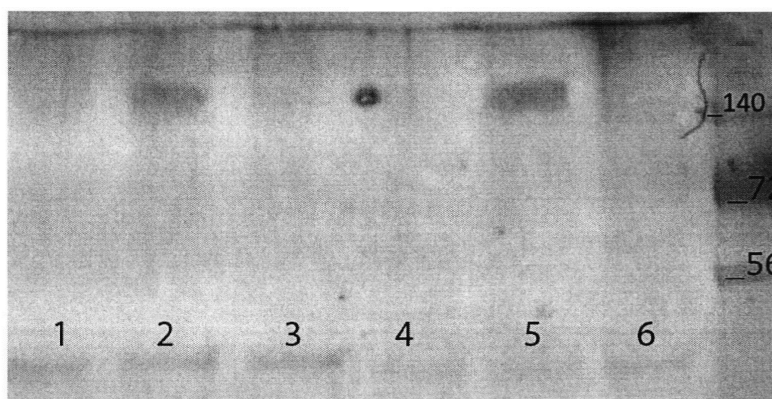


Фиг. 1

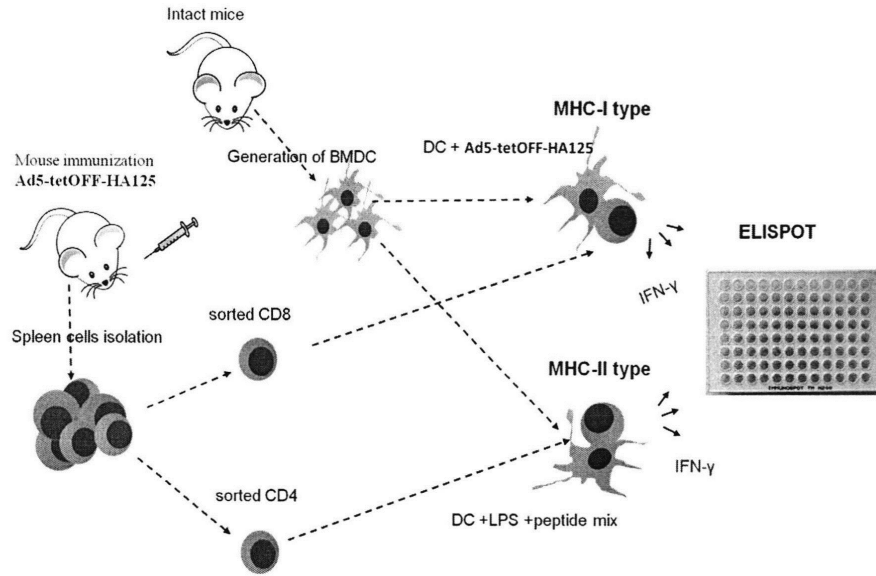
2



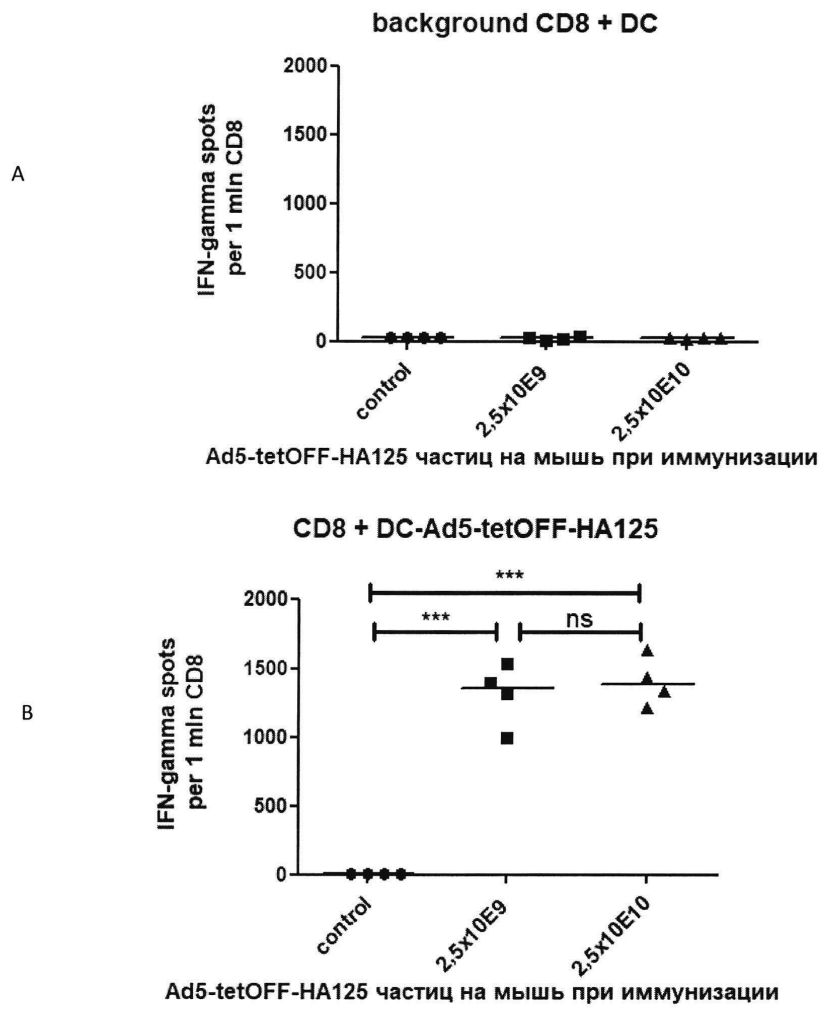
Фиг. 2



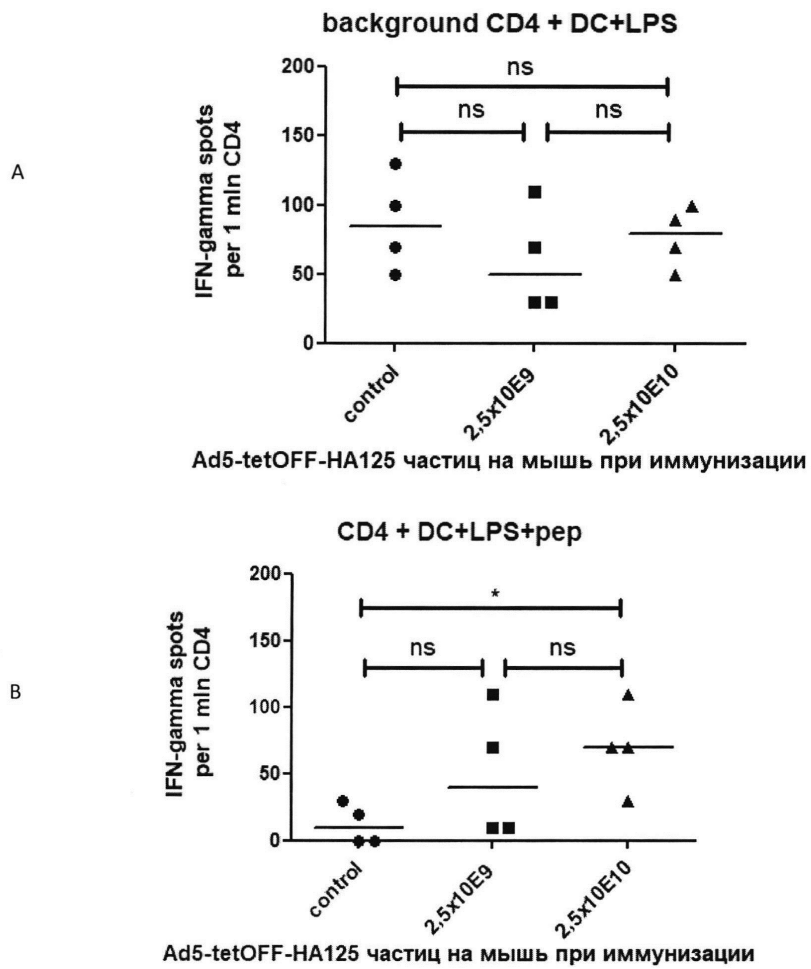
Фиг. 3



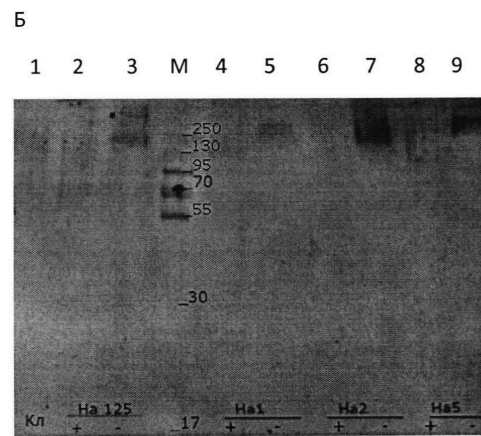
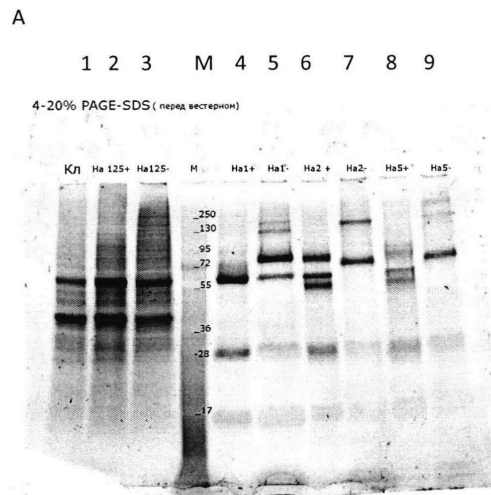
Фиг. 4



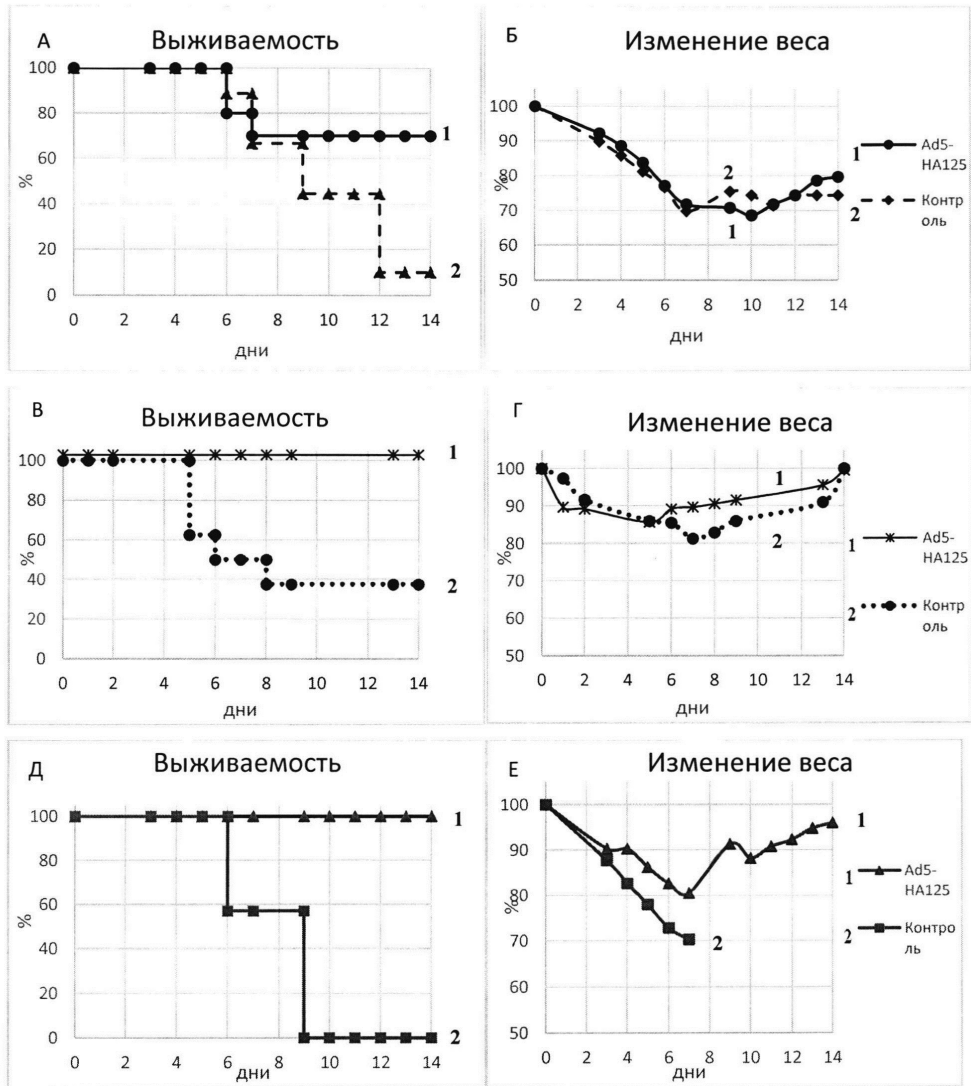
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8