



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **110024**

(13) **C2**

(51) МПК

A61K 39/145 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2012 10026	(72) Винахідник(и):	Бергман Люк (US), Боттдж Уолтер (US), Харджис Біллі (US), Лейтон Шеррілл (US)
(22) Дата подання заявки:	21.01.2011	(73) Власник(и):	ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТІЗ ОФ ДЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ АРКАНЗАС, 2404 North University Avenue Little Rock, AR 72207, United States of America (US), ДЗЕ ТЕКСАС ЕЙ ЕНД ЕМ ЮНІВЕРСІТІ СІСТЕМ, 3369 Tamu, College Station, TX 77843-3369, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.11.2015	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/297,098	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 20080305120 A1, 11.12.2008 WO 2008036675 A2, 27.03.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	21.01.2010		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.12.2012, Бюл.№ 24		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.11.2015, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/US2011/022062, 21.01.2011		

(54) ВАКЦИННИЙ ВЕКТОР І СПОСІБ ПОСИЛЕННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ

(57) Реферат:

Винахід належить до вакцинного вектора, що включає антигенний поліпептид і поліпептид НМGB1, які присутні на поверхні вакцинного вектора, а також до композиції, що включає вакцинний вектор та фармацевтично прийнятний носій для орального або інтраназального введення. Винахід також належить до способу посилення імунної відповіді, зокрема, гуморальної імунної відповіді і відповідно продукції IgA, шляхом введення суб'єкту вказаних вакцинного вектора або композиції.

UA 110024 C2

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Ця заявка на патент вимагає пріоритет попередньої заявки на патент США з № 61/297098, поданої 21 січня 2010 р., яка включена сюди за допомогою посилання в її повному об'ємі.

ВСТУП

Вакцини використовуються для виклику адаптивної імунної відповіді проти антигенів, зокрема, антигенів патогенів, пухлинних клітин або т. п., для зменшення інтенсивності або запобігання захворюванню. Синтетичні пептиди або вакцини на основі убитих або атенуйованих мікроорганізмів є часто ефективними в стимулюванні сильної імунної відповіді, яка є повністю протективною. У деяких випадках ці вакцини не є протективними або є лише частково протективними, і інші стратегії повинні застосовуватися для розробки протективних вакцин. Вакцини на основі атенуйованих мікроорганізмів також пов'язані з ризиками перенесення генів або виправлення мутацій і можуть представляти ризик для індивідумів з послабленим імунітетом. Необхідна розробка нових вакцин, які є безпечними і ефективними в стимулюванні тривалих протективних імунних відповідей.

Інфікування вірусом грипу, зокрема, вірусом пташиного грипу H5N1, являє собою зростаючу проблему в галузі охорони здоров'я і економіки. Факти явно вказують на те, що H5N1 продовжує циркулювати між чутливими птахами і свинями в областях всього світу, що розширюються. Багато вчених вважають, що у випадку залишення без заборони існуючий сьогодні вірус пташиного грипу H5N1 мутує з створенням можливості для передачі від людини до людини і викликом всесвітньої пандемії. При коефіцієнті смертності, що перевищує 50 %, така поява епідемії буде страхітливою. Незалежно від здатності вірусу до виклику захворювання у людини вірус пташиного грипу H5N1 вже загрожує великим ударом по економіці внаслідок знищення зграй домашньої птиці в уражених областях. Тому необхідна розробка вакцини для захисту людей, домашньої птиці, свиней і інших одомашнених тварин від вірусу грипу H5N1. Вакцина проти грипу, яка здатна захистити від H5N1, а також від інших вірусів грипу, таких як H1N1, буде оптимальною.

КОРОТКИЙ ВИКЛАД СУТІ ВИНАХОДУ

Тут надаються вакцинні вектори, і способи стимулювання імунної відповіді і способи зниження захворюваності, пов'язаної з інфікуванням вірусом грипу. У одному аспекті надається вакцинний вектор, що включає антигенний поліпептид і поліпептид HMGB1 або його функціональний фрагмент. Принаймні частина антигенного поліпептиду і принаймні поліпептиду HMGB1 присутні на поверхні вакцинного вектора. Вакцинний вектор може включати перший полінуклеотид, що кодує антигенний поліпептид, і другий полінуклеотид, що кодує поліпептид HMGB1. Поліпептид HMGB1 і антигенний поліпептид можуть бути пов'язані, наприклад, в гібридному білку. Як поліпептид HMGB1, так і антигенний поліпептид можуть бути вставлені в поверхневу петльову ділянку трансмембранного білка.

У іншому аспекті надається композиція, що включає вакцинний вектор і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтично прийнятний носій може бути прийнятним для орального або інтраназального застосування. Вакцинний вектор може бути не здатний до реплікації.

У ще одному аспекті надається вакцинний вектор *Bacillus* spp. Вакцинний вектор включає першу полінуклеотидну послідовність, що кодує антигенний поліпептид, що представляється на поверхні вакцинного вектора, і другу полінуклеотидну послідовність, яка кодує імуностимулюючий поліпептид, що представляється на поверхні вакцинного вектора. Антигенним поліпептидом може бути поліпептид M2e вірусу грипу, поліпептид HA вірусу грипу або поліпептид NP вірусу грипу або їх комбінація. Імуностимулюючим поліпептидом може бути поліпептид CD154 або поліпептид HMGB1 або їх комбінація. Імуностимулюючий поліпептид і антигенний поліпептид можуть бути пов'язані, наприклад, в гібридному білку, і можуть бути включені в поверхневу петльову ділянку трансмембранного білка.

Тим не менше, в іншому аспекті надаються способи посилення імунної відповіді у суб'єкта. У цьому способі тут вакцинні вектори, що надаються, або композиції вводять суб'єкту в кількості, ефективній для посилення імунної відповіді у суб'єкта проти антигенного поліпептиду. Відповідно, коли вакцинний вектор вводять орально або інтраназально.

У подальшому аспекті надаються способи посилення імунної відповіді у суб'єкта за допомогою введення вакцинного вектора *Bacillus* spp., що описується тут. Вакцинний вектор включає першу полінуклеотидну послідовність, що кодує антигенний поліпептид, що представляється на поверхні вакцинного вектора, і другу полінуклеотидну послідовність, що кодує імуностимулюючий поліпептид, що представляється на поверхні вакцинного вектора. Антигенним поліпептидом може бути поліпептид M2e вірусу грипу, поліпептид HA вірусу грипу, поліпептид NP вірусу грипу або їх комбінація. Імуностимулюючим поліпептидом може бути поліпептид CD154, поліпептид HMGB1 або їх комбінація.

Тим не менше, в подальшому аспекті надаються способи зниження пов'язаної з вірусом грипу захворюваності у суб'єкта. У цих способах введення розкритих тут вакцинних векторів або композицій знижує захворюваність, пов'язану з подальшим інфікуванням вірусом грипу.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

5 Фіг. 1 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P (зразка до позитивного контролю), отримані в ELISA для продукції специфічних для M2e антитіл курчатами після орального введення через зонд вказаної дози вакцинного вектора *Bacillus subtilis*, що експресує епітопи білків вірусу грипу А і або HMGB1, або CD154, в порівнянні з курчатами, вакцинованими сольовим розчином.

10 Фіг. 2 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P, отримані в ELISA для продукції специфічних для HALB антитіл курчатами після орального введення через зонд вказаної дози вакцинного вектора *Bacillus subtilis*, що експресує епітопи білків вірусу грипу А і або HMGB1, або CD154, в порівнянні з курчатами, вакцинованими сольовим розчином.

15 Фіг. 3 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P, отримані в ELISA для продукції специфічних для HAUА антитіл курчатами після орального введення через зонд вказаної дози вакцинного вектора *Bacillus subtilis*, що експресує епітопи білків вірусу грипу А і або HMGB1, або CD154, в порівнянні з курчатами, вакцинованими сольовим розчином.

20 Фіг. 4 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P, отримані в ELISA для продукції специфічних для M2e антитіл курчатами після орального введення через зонд вказаної дози живих або різних чином інактивованих вакцинних векторів *Bacillus subtilis*, що експресують епітопи білків вірусу грипу А і або HMGB1, або CD154, в порівнянні з курчатами, вакцинованими лише *Bacillus* вектором (BSBB).

25 Фіг. 5 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P, отримані в ELISA для продукції специфічних для HALB антитіл курчатами після орального введення через зонд вказаної дози живих або різних чином інактивованих вакцинних векторів *Bacillus subtilis*, що експресують епітопи білків вірусу грипу А і або HMGB1, або CD154, в порівнянні з курчатами, вакцинованими лише *Bacillus* вектором (BSBB).

30 Фіг. 6 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P, отримані в ELISA для продукції специфічних для HAUА антитіл курчатами після орального введення через зонд вказаної дози живих або різних чином інактивованих вакцинних векторів *Bacillus subtilis*, що експресують епітопи білків вірусу грипу А і або HMGB1, або CD154, в порівнянні з курчатами, вакцинованими лише *Bacillus* вектором (BSBB).

35 Фіг. 7 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P, отримані в ELISA для продукції специфічних для M2e антитіл класу IgG курчатами після орального введення через зонд або 10^6 живих, або різних вказаних доз інактивованих формаліном вакцинних векторів *Bacillus subtilis*, що експресують епітопи білків вірусу грипу А і HMGB1, в порівнянні з курчатами, вакцинованими лише *Bacillus* вектором (BSBB).

40 Фіг. 8 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P, отримані в ELISA для продукції специфічних для M2e антитіл класу IgA курчатами, вакцинованими, або орально, або підшкірно, 10^6 живих, інактивованих формаліном або інактивованих формаліном і ліофілізованих вакцинних векторів *Bacillus subtilis*, що експресують епітопи білків вірусу грипу А і HMGB1, в порівнянні з курчатами, вакцинованими лише *Bacillus* вектором (BSBB).

45 Фіг. 9 являє собою діаграму, на якій представлені відношення S/P, отримані в ELISA для продукції специфічних для M2e антитіл класу IgA курчатами, вакцинованими, або орально, або підшкірно, 10^6 живих, інактивованих формаліном або інактивованих формаліном і ліофілізованих вакцинних векторів *Bacillus subtilis*, що експресують епітопи білків вірусу грипу А і HMGB1, в порівнянні з курчатами, вакцинованими лише *Bacillus* вектором (BSBB).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ДАНОГО ВИНАХОДУ

50 Технології рекомбінантних ДНК забезпечують можливість для відносно легкої маніпуляції багатьма бактеріальними і вірусними видами. Деякі бактерії і віруси або є за своєю природою малопатогенними або непатогенними, але залишаються здатними до виклику сильної імунної відповіді, або їх можна піддати відбору на таку властивість або створити такими. Ці бактерії і віруси породжують привабливі вакцинні вектори для виклику імунної відповіді проти гетерологічних або чужорідних антигенів. Бактеріальні або вірусні вакцинні вектори можуть імітувати природну інфекцію і викликати сильний і імунітет, що тривало зберігається. Часто виробництво і введення вакцинних векторів є відносно недорогими. Крім того, такі вектори можуть часто містити більше ніж один антиген і можуть забезпечити захист від множини інфекційних агентів.

60 Вакцинні вектори у вигляді живих бактерій або вірусів можуть, проте, представляти ризик для індивідумів з послабленим імунітетом, і в їх випадку потрібний додатковий регулятивний

розгляд. Тому бажаним є застосування векторів, які є убитими або інактивованими або кваліфікуються як організми, які звичайно вважаються безпечними (GRAS), Управлінням по контролю за продуктами і ліками (FDA). Проблемою є виклик сильної імунної відповіді, використовуючи такі вектори. Як продемонстровано в прикладах, за допомогою розміщення поліпептидів HMGB1 (амфотеринів, білків B1 з групи білків з високою рухливістю) на поверхні вакцинного вектора автори даного винаходу можуть викликати сильну імунну відповідь проти антигенних поліпептидів, використовуючи вектор *Bacillus* spp. Насправді, в прикладах демонструється, що цей вектор можна піддати інактивації, так що він не може реплікуватися, використовуючи множину способів, і, проте, може викликати сильну імунну відповідь після введення.

Тут надаються вакцинні вектори, що включають антигенний поліпептид і поліпептид HMGB1 або його функціональний фрагмент. Принаймні частина антигенного поліпептиду і принаймні частина поліпептиду HMGB1 або його функціонального фрагмента присутні на поверхні вакцинного вектора. Вакцинний вектор може включати перший поліпептид, що кодує антигенний поліпептид, і другий поліпептид, що кодує поліпептид HMGB1. Поліпептид HMGB1 і антигенний поліпептид можуть бути пов'язані, наприклад, в гібридному білку, або можуть експресуватися окремо. Як поліпептид HMGB1, так і антигенний поліпептид можуть бути включені в поверхневу петльову ділянку трансмембранного білка.

Вакцинні вектори можуть бути бактеріальними, вірусними векторами або векторами на основі ліпосом. Потенційні вакцинні вектори включають, але без обмеження, *Bacillus* (*Bacillus subtilis*), *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, аденовірус, поксвірус, вірус гепатиту, альфавірус і аденоасоційований вірус. Відповідно, коли вакцинним вектором є GRAS організм. Вакцинний вектор може бути інактивованим або убитим, так що він не здатний до реплікації. Способи інактивації або убивання бактеріальних або вірусних вакцинних векторів відомі кваліфікованим в даній галузі техніки фахівцям і включають, але без обмеження, такі способи, як ті, які приведені в прикладах, тобто інактивацію формаліном, основану на антибіотиках інактивацію, термічну обробку і обробку етанолом.

Антигенним поліпептидом є поліпептид, який може специфічно розпізнати адаптивну імунну систему. Антигенний поліпептид включає будь-який поліпептид, який є імуногенним. Антигенні поліпептиди включають, але без обмеження, антигенні, які стосуються патогенів, стосуються алергенів, стосуються пухлин або пов'язані із захворюванням. Патогени включають вірусні, паразитичні, грибові і бактеріальні патогени, а також білки-патогени, такі як пріони. Антигенними поліпептидами можуть бути повнорозмірні білки або їх частини. Добре відомо, що розпізнавання імунною системою багатьох білків засноване на відносно невеликому числі амінокислот, що часто називається епітопом. Епітопи можуть являти собою лише 8-10 амінокислот. Таким чином, тут антигенні поліпептиди, що описуються можуть являти собою повнорозмірні білки, епітопи довжиною 8 амінокислот або будь-яка ділянка між цими межами. Насправді, антигенні поліпептиди можуть включати більше ніж один епітоп одиночного патогена або білка.

У вакцинний вектор можуть бути включена множина піків одного і того ж епітопа або множини епітопів різних білків. Передбачається, що декілька епітопів або антигенів, пов'язані з одним і тим же патогеном або захворюванням або різними патогенами або захворюваннями, можуть вводитися разом в одному вакцинному векторі для виклику посиленої імунної відповіді проти множини антигенів. Рекombінантні вакцинні вектори можуть кодувати антигенні множини патогенних мікроорганізмів, вірусів або пухлинноспецифічних антигенів. Введення вакцинних векторів, здатні експресувати множину антигенів, сприяє виклику імунітету до двох або більше захворювань в один і той же час.

Антигенним поліпептидом може бути поліпептид вірусу грипу, відповідно, коли ним є поліпептид вірусу грипу штаму H5N1 або поліпептид, що асоціюється з множиною штамів вірусу грипу, такий як поліпептид білка M2 вірусу грипу. Ектодомен білка M2 вірусу грипу А, відомий як M2e, випинається з поверхні вірусу. M2e-частина білка M2 містить приблизно 24 амінокислоти. Поліпептид M2e трохи варіюють від одного ізоляту до іншого ізоляту вірусу грипу. Насправді, лише декілька мутацій, що зустрічаються в природі, в M2e було виявлено в ізолятах від інфікованих людей з моменту епідемії грипу в 1918. Крім того, віруси грипу, виділений з організмів-носіїв, що є птахами і свинями, мають різні, однак консервативні, послідовності M2e. Для перегляду послідовностей поліпептидів M2e, виділених з організмів-носіїв, що є людьми, птахами і свинями, дивіться Liu et al., *Microbes and Infection* 7: 171-177 (2005) і Reid et al., *J. Virol.* 76: 10717-10723 (2002), кожний з яких включений сюди за допомогою посилання в його повному об'ємі. Дивіться також SEQ ID NO: 1-4.

Відповідно, коли весь поліпептид M2e включають у вакцинний вектор, або може використовувати лише частину. У прикладах поліпептид з восьми амінокислот (LM2, що має амінокислотну послідовність EVETPIRN, SEQ ID NO: 5, або його варіант M2eA, що має амінокислотну послідовність EVETPTRN, SEQ ID NO: 6) був включений у вакцинний вектор і, як

5 показано, викликав гуморальну імунну відповідь після введення курчатам. Відповідно, коли частина поліпептиду M2e, включена у вакцинний вектор, є імуногенною. Імуногенним фрагментом є пептид або поліпептид, здатний до виклику клітинних або гуморальних імунних відповідей. Відповідно імуногенним фрагментом M2e може бути повнорозмірний поліпептид M2e, або відповідно він може являти собою 20 або більше амінокислот, 15 або більше

10 амінокислот, 10 або більше амінокислот або 8 або більше амінокислот повної послідовності.

Інші епітопи, прийнятні для включення у вакцинний вектор проти вірусу грипу А, включають, але без обмеження, поліпептиди гемаглютиніну (HA) або ядерного білка (NP) вірусу грипу А. Наприклад, пептиди SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 або SEQ ID NO: 10 можуть бути включені у вакцинний вектор. У прикладах SEQ ID NO: 7 (HAUA) і SEQ ID NO: 8 (HALB) були

15 включені у вакцинний вектор і, як показано, викликали гуморальний імунну відповідь після введення курчатам. Дивіться Фіг. 2-3 і 5-6. Крім того, епітопи NP-SEQ ID NO: 9 (NP54) і SEQ ID NO: 10 (NP147) були включені у вакцинний вектор в прикладах. Кваліфікованому в даній галузі техніки фахівцеві буде зрозуміло, що будь-яка з цих послідовностей може використовуватися в комбінації з будь-яким іншим епітопом, в тому числі з епітопами, що походять з інших патогенів

20 або антигенів.

Білок HMGB1 (амфотерин, білок B1 з групи білків з високою рухливістю) був спочатку ідентифікований як ДНК-зв'язувальний білок, важливий для структури і стабільності ДНК. Він є повсюдно експресованим ядерним білком, який зв'язується з ДНК без специфічності відносно її послідовності. Цей білок є висококонсервативним і виявляється в рослинах аж до ссавців.

25 Амінокислотні послідовності HMGB1 данію, курчати і людини представлені в SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 18 і SEQ ID NO: 29, відповідно. Послідовність для всіх ссавців є висококонсервативною, при цьому ідентичність послідовностей становить 98 %, і амінокислотні заміни є консервативними. Тому білок HMGB1 одного вигляду може, ймовірно, функціонально замінити білок іншого виду. Повнорозмірний білок HMGB1 або його частина можуть

30 використовуватися як поліпептид HMGB1 в тут вакцинних векторах, що описуються. HMGB1 має дві ДНК-зв'язувальні області, що називаються блоком А, представленим в SEQ ID NO: 23 і 24, і блоком В, представленим в SEQ ID NO: 25 і 26. Дивіться Andersson and Tracey, Annu. Rev. Immunol. 2011, 29: 139-162, який включений сюди за допомогою посилання в його повному об'ємі.

35 HMGB1 є медіатором запалення і виконує функцію сигналу ядерного пошкодження, наприклад, від некротичних клітин. HMGB1 може також секретуватися клітинами моноцитарної/макрофагальної лінії диференціювання в ході процесу, для якого необхідні ацетилювання білка, пересування через ядро і секреція. Екстраклітинний HMGB1 функціонує як сильний медіатор запалення за допомогою передачі сигналів через рецептор для кінцевих

40 продуктів посиленого глікозилювання (RAGE) і через члени сімейства Toll-подібних рецепторів (TLR), зокрема, TLR4. Активність зв'язування з RAGE була ідентифікована, і для неї потрібно поліпептид SEQ ID NO: 27. Для зв'язування з TLR4 потрібно цистеїн в положенні 106 SEQ ID NO: 18, який виявляється в області блока В HMGB1.

Для запальної активності HMGB1 не потрібно повнорозмірний білок, і були ідентифіковані функціональні фрагменти. Встановлено, що блок В достатній, щоб опосередкувати прозапальні ефекти HMGB1, і тому SEQ ID NO: 25 і 26 є поліпептидами HMGB1 або його функціональними

45 фрагментами в контексті даного винаходу. Крім того, сайт зв'язування з RAGE і прозапальна цитокінова активність були картовані в SEQ ID NO: 27 і SEQ ID NO: 28, відповідно. Таким чином, ці поліпептиди є функціональними фрагментами поліпептидів HMGB1 в контексті даного

50 винаходу.

Кваліфікована в даній галузі техніки фахівці можуть ідентифікувати поліпептиди HMGB1 і їх фрагменти, здатна до стимулювання прозапальної цитокінової активності, використовуючи такі способи, як ті, які описані в публікації міжнародної заявки з № WO02/092004, яка включена сюди за допомогою посилання в її повному об'ємі. Відповідно, коли поліпептид HMGB1 включає

55 RAGE-зв'язувальний домен в положеннях 150-183 амінокислот SEQ ID NO: 18 (SEQ ID NO: 27 або його гомолог) і домен прозапальної цитокінової активності між амінокислотами 89-109 SEQ ID NO: 18 (SEQ ID NO: 28 або його гомолог). Зокрема, поліпептиди HMGB1 і їх функціональні фрагменти або гомологи включають поліпептиди, ідентичні або ідентичні на принаймні 99 %, принаймні 98 %, принаймні 95 %, принаймні 90 %, принаймні 85 % або принаймні 80 %

60 поліпептидам HMGB1 з SEQ ID NO: 18 або 23-30.

Принаймні частина антигенного поліпептиду і принаймні частина поліпептиду HMGB1 присутні на поверхні вакцинного вектора. Присутні на поверхні вакцинного вектора поліпептиди включають поліпептиди, які включені в трансмембранний білок, взаємодіють з, ковалентно або хімічно зшиті з трансмембранним білком, мембранним ліпідом або прикріпленим до мембрани вуглеводом. Поліпептид можна включити в трансмембранний білок, зв'язавши амінокислоти, що включають поліпептид, через пептидний зв'язок з N-кінцем, C-кінцем трансмембранного білка або де-небудь в ньому (тобто включивши між двома амінокислотами трансмембранного білка або замість однієї або більше амінокислот трансмембранного білка (тобто за допомогою делеції-вставки). Відповідно поліпептиди можна включити в поверхневу петльову ділянку трансмембранного білка. Відповідними трансмембранними білками є *cotB* і *lamB*, але кваліфікованим в даній галузі техніки фахівцям буде зрозуміло, що в наявності є множина відповідних трансмембранних білків.

Альтернативно, поліпептиди можна ковалентно або хімічно зв'язати з білками, ліпідами або вуглеводами в мембрані, або капсидом у випадку використання вірусного вектора, за допомогою способів, що є в розпорядженні кваліфікованих в даній галузі техніки фахівців. Наприклад, дисульфідні зв'язки або перехресне зшиття біотину з авідином можна було б використовувати для уявлення антигенного поліпептиду і поліпептиду HMGB1 на поверхні вакцинного вектора. Відповідно, коли антигенний поліпептид і поліпептид HMGB1 є частиною гібридного білка. Два поліпептиди можна безпосередньо з'єднати через пептидний зв'язок, або вони можуть бути розділені лінкером або областю третього білка, в який їх включають.

Полінуклеотиди, що кодують антигенний поліпептид або поліпептид HMGB1, можна ввести у вакцинний вектор і експресувати зі створенням антигенного поліпептиду і поліпептиду HMGB1. Полінуклеотиди можна вбудовувати в хромосому вакцинного вектора, або вони можуть кодуватися на плазмідах або іншій екстрахромосомній ДНК. Відповідно полінуклеотиди, що кодують антигенний поліпептид і/або поліпептид HMGB1, можуть експресуватися незалежно, або вони вбудовані в полінуклеотид вакцинного вектора, який експресується. Відповідно, коли полінуклеотид вакцинного вектора кодує поліпептид, що представляється на поверхні вакцинного вектора, такий як трансмембранний білок. Полінуклеотид, що кодує антигенний поліпептид і/або поліпептид HMGB1, можна вбудувати в полінуклеотидну послідовність вакцинного вектора, щоб зробити можливим уявлення антигенного поліпептиду і/або поліпептиду HMGB1 на поверхні вектора. Наприклад, полінуклеотид, що кодує антигенний поліпептид і поліпептид HMGB1, можна вбудовувати в рамці зчитування в бактеріальний полінуклеотид в області, яка кодує поверхневу петльову ділянку трансмембранного білка, за умови, щоб бактеріальна полінуклеотидна послідовність залишалася в рамці зчитування. Дивіться приклад 1.

Альтернативно, полінуклеотид, що кодує антигенний поліпептид і/або поліпептид HMGB1, можна вбудовувати в полінуклеотид секретованого поліпептиду, який представляється на поверхні вакцинного вектора завдяки зв'язку з білком, ліпідом або вуглеводом на поверхні вакцинного вектора. Кваліфікованим в даній галузі техніки фахівцям буде зрозуміло, що полінуклеотид, який кодує антигенний поліпептид і/або поліпептид HMGB1, можна було б вбудовувати в широкий ряд полінуклеотидів вакцинного вектора для забезпечення експресії і уявлення антигенного поліпептиду і/або поліпептиду HMGB1 на імуніцитах суб'єкта, що піддається вакцинотерапії. У прикладах декілька епітопів білків вірусу грипу, включаючи епітоп M2e, епітоп HA і епітоп NP, були експресовані з плазмід для експресії у вегетативних клітинах *Bacillus subtilis*. Результуючі рекомбінантні бактерії експресують включені епітопи, що показано за допомогою імунної відповіді, представленої на Фіг. 1-6.

У прикладах вакцинні вектори містять антигенні поліпептиди (поліпептиди M2e, HA і NP) і імуностимулюючий поліпептид (або CD154, або HMGB1), що кодуються одним і тим полінуклеотидом і в рамці зчитування один з одним. У альтернативних варіантах здійснення імуностимулюючий поліпептид і антигенному поліпептид можуть кодуватися окремими полінуклеотидами. Кваліфікованим в даній галузі техніки фахівцям буде зрозуміло, що множина способів може використовуватися для досягнення представленості антигенного поліпептиду і поліпептиду HMGB1 на поверхні вакцинного вектора. Такі способи відомі кваліфікованим в даній галузі техніки фахівцям.

Також надаються композиції, що включають вакцинний вектор і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтично прийнятним носієм є будь-ким носій, прийнятний для *in vivo* введення. Відповідно, коли фармацевтично прийнятний носій є прийнятним для оральної, інтраназальної доставки або доставки через слизову оболонку. Фармацевтично прийнятний носій може включати воду, забуферені розчини, розчини глюкози або рідкі середовища для культивування бактерій. Додаткові компоненти композицій можуть відповідно включати наповнювачі, таку як

стабілізатори, консерванти, розріджувачі, емульгатори і змазки. Приклади фармацевтично прийнятних носіїв або розріджувачів включають стабілізатори, такі як вуглеводи (наприклад, сорбіт, маніт, крохмаль, сахароза, глюкоза, декстран), білки, такі як альбумін або казеїн, білковмісні агенти, такі як бичача сироватка або зняте молоко, і буфери (наприклад, фосфатний

буфер). Особливо у випадку додавання таких стабілізаторів до композицій композиція підходить для сушіння сублімацією або сушіння розпиленням. Вакцинний вектор в композиціях може бути нездатний до реплікації, відповідно, коли вакцинний вектор інактивують або вбивають до додавання в композицію.

Композиції, що описуються тут, можуть використовуватися для посилення імунної відповіді, такої як продукція антитіл проти антигенного поліпептиду. Композиції, що містять поліпептиди вірусу грипу, можуть також використовуватися для зниження захворюваності, пов'язаної з подальшим інфікуванням вірусом грипу. Композиції можуть запобігати виклику вірусом грипу захворювання або будь-якої пов'язаної захворюваності у суб'єкта, якому введені композиції або вакцинні вектори, що описуються тут. Композиції і вакцинні вектори, що описуються тут, можуть зменшувати тяжкість подальшого захворювання в результаті зменшення тривалості захворювання, зниження коефіцієнта захворюваності або смертності, пов'язаної із захворюванням, або зменшення імовірності зараження. Захворюваність і смертність, пов'язана із захворюванням, після введення тут вакцинних векторів, що описуються, можуть знизитися на 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або навіть 100 % в порівнянні з подібними суб'єктами, яким не наданий вакцинний вектор.

Також надаються способи посилення імунних відповідей у суб'єкта за допомогою введення вакцинного вектора. Вакцинний вектор може містити поліпептид HMGB1, здатний до стимулювання імунної відповіді проти вакцинного вектора і пов'язаного з ним антигенного поліпептиду. Вакцинний вектор, що включає поліпептид HMGB1, вводять суб'єкту в кількості, ефективній для посилення імунної відповіді у суб'єкта проти вакцини і, зокрема, антигенного поліпептиду. Відповідно, коли вакцинний вектор містить полінуклеотид, що кодує поліпептид, який включає амінокислоти 150-183 і 89-109 поліпептиду HMGB1 (SEQ ID NO: 18), або його гомолог. У прикладах використовується поліпептид з 190 амінокислот HMGB1. Відповідно, коли полінуклеотид кодує поліпептид HMGB1 виду, однакового з видом суб'єкта. Гетерологічні комбінації поліпептидів HMGB1 і суб'єктів (тобто поліпептид HMGB1 людини для застосування у вакцині для курчат) можуть застосовуватися в способах даного винаходу, оскільки HMGB1 є висококонсервативним для широко ряду видів. Поліпептид HMGB1 може використовуватися для посилення імунної відповіді у суб'єкта, спрямованого на будь-якого чужорідний антиген або антигенний поліпептид, присутній у вакцинному векторі або на ньому. Кваліфікованому в даній галузі техніки фахівцеві буде зрозуміло, що поліпептид HMGB1 міг би використовуватися для посилення імунної відповіді проти більше ніж одного антигенного поліпептиду, присутнього у вакцинному векторі. Поліпептид з HMGB1 стимулює імунну відповідь принаймні частково в результаті активації дендритних клітин і макрофагів і, отже, стимулювання продукції цитокінів, таких як IL-1, IL-6, IFN- γ і TNF- α . У прикладах поліпептид HMGB1 представлений на поверхні вакцинного вектора.

Крім того, розкриваються способи посилення імунної відповіді проти вірусу грипу А і способи зниження захворюваності, пов'язаної з подальшим інфікуванням вірусом грипу А. Коротко, способи включають введення суб'єкту вакцинного вектора, що включає епітоп білка вірусу грипу А (антигенний поліпептид вірусу грипу), здатний до виклику імунної відповіді, в кількості, ефективній для виклику імунної відповіді. Епітопом білка вірусу грипу А може бути поліпептид M2e, поліпептид HA або поліпептид NP, або інший поліпептид вірусу грипу, що обговорювався вище. Включення антигенних поліпептидів у вакцинний вектор можна виконати множиною способів, відомих кваліфікованим в даній галузі техніки фахівцям, що включають, але без обмеження, систему сайт-спрямованого мутагенезу, що не залишає глибоких слідів, описаного в публікації міжнародної заявки на патент з № WO 2008/036675. Можна також створити бактерію, яка експресує поліпептиди вірусу грипу, в поєднанні з полінуклеотидами, здатними до посилення імунної відповіді, що обговорювалися вище. Зокрема, поліпептид CD154 або HMGB1 може експресуватися вакцинним вектором для посилення імунної відповіді у суб'єкта проти поліпептидів вірусу грипу. У прикладах демонструється виклик рясної продукції IgA і IgG на вакцинацію у курчат. Автори даного винаходу передбачають, що така сильна відповідь буде оберігати від захворюваності, пов'язаної з подальшим інфікуванням або зараженням джерелом антигенного поліпептиду (вірусом грипу в прикладах), або принаймні знижувати її.

Композиції можна вводити множиною способів, в тому числі, але без обмеження, орально, інтраназально або через слизову оболонку. Наприклад, доставку композицій або вакцинних векторів можна здійснити з використанням аерозолі, за допомогою розпилення, за допомогою

додавання в харчові продукти або воду, за допомогою орального введення через зонд або через очні краплі. У деяких варіантах здійснення композиції вводять за допомогою ін'єкції, наприклад, внутрішньошкірно, парентерально, підшкірно, внутрьоочеревинно, внутрішньовенно, інтракраніально або внутрішньом'язово. У випадку курчат або іншої домашньої птиці композиції можна вводити в яйце.

Суб'єкти включають, але без обмеження, хребетних, відповідно ссавців, відповідно людини, корів, кішок, собак, свиней, або птахів, відповідно домашньої птиці, такої як курчата. Можуть також використовуватися інші моделі інфекційного захворювання на тваринах. Посилення імунної відповіді включає, але без обмеження, виклик терапевтичного або профілактичного ефекту, що опосередковується імунною системою суб'єкта. Зокрема, посилення імунної відповіді може включати збільшену продукцію антитіл, наприклад, продемонстровану на Фіг. 1-3, збільшене перемикавання класу - перемикавання синтезу важких ланцюгів антитіл, наприклад, продукцію IgA, продемонстровану на Фіг. 8, дозрівання антигенпрезентуючих клітин, стимуляцію Т-клітин-хелперів, стимуляцію цитолітичних Т-клітин або індукцію Т- і В-клітинної імунологічної пам'яті.

Дози, застосовні для ведення, будуть варіювати залежно від віку, ваги і виду суб'єкта, способу і шляху введення і типу патогена або захворювання, проти якого потрібна імунна відповідь. Композицію можна вводити в будь-якій дозі вакцинного вектора, достатній для виклику імунної відповіді. Передбачається, що прийнятними є дози в діапазоні від 10^3 до 10^{10} піків вектора (тобто бляшкоутворювальних або колонієутворювальних одиниць), від 10^4 до 10^9 піків вектора або від 10^5 до 10^7 піків вектора.

Композицію можна вводити тільки один раз, або її можна вводити два або більше разів для збільшення імунної відповіді. Наприклад, композицію можна вводити два або більше разів з інтервалами, що складають один тиждень, два тижні або три тижні, один місяць, два місяці, три місяці, шість місяців або більше. Бактерії можуть бути життєздатними перед введенням, але в деяких варіантах здійснення бактерії можуть бути убитими або інактивованими перед введенням. У деяких варіантах здійснення бактерії можуть бути здатними до реплікації в організмі суб'єкта, в той час як в інших варіантах здійснення бактерії можуть бути нездатними до реплікації в організмі суб'єкта. Як продемонстровано в прикладах, бактеріальні вакцинні вектори можна інактивувати до введення, використовуючи формалін, етанол, нагрівання або антибіотики. Кваліфікованому в даній галузі техніки фахівцеві буде зрозуміло, що інші способи інактивації вакцинних векторів могли б також використовуватися.

Тут також надається вакцинний вектор *Bacillus* spp. *Bacillus* вакцинний вектор включає першу полінуклеотидну послідовність, що кодує антигенний поліпептид, і другу полінуклеотидну послідовність, що кодує імуностимулюючий поліпептид. Антигенний поліпептид і імуностимулюючий поліпептид присутні на поверхні *Bacillus* вакцинного вектора, описаного вище. Антигенним поліпептидом є поліпептид вірусу грипу, описаний вище, а імуностимулюючим поліпептидом є поліпептид HMGB1, описаний вище, або поліпептид CD154.

Полінуклеотиди, що кодують імуностимулюючі поліпептиди, які гомологічні білкам суб'єкта і здатні до стимулювання відповіді імунної системи на антигенний поліпептид, можуть бути також введені у вакцинний вектор. Як описано детальніше в прикладах, вакцинний вектор може включати поліпептид CD154, який здатний до зв'язування CD40 у суб'єкта і стимулювання відповіді суб'єкта на вакцинний вектор і пов'язаний з ним антигенний поліпептид, подібно HMGB1, описаному вище. *Bacillus* вакцинний вектор може включати поліпептид HMGB1, поліпептид CD154 або їх комбінацію. Як описано вище, полінуклеотиди, що кодують ці поліпептиди, можуть бути вбудовані в хромосому вакцинного вектора або зберігатися поза хромосомою. Кваліфікованому в даній галузі техніки фахівцеві буде зрозуміло, що ці поліпептиди можуть бути включені в ряд поліпептидів вакцинного вектора і представлені в різних частинах вакцинного вектора або можуть секретуватися.

Полінуклеотид, що кодує імуностимулюючий поліпептид, здатний до посилення імунної відповіді проти антигенного поліпептиду, може також кодувати антигенний поліпептид. Полінуклеотид, що кодує імуностимулюючий поліпептид, може бути пов'язаний з полінуклеотидом, що кодує антигенний поліпептид, наприклад, у вакцинному векторі імуностимулюючий поліпептид і антигенний поліпептид кодуються одним і тим же полінуклеотидом. У прикладах полінуклеотид, що кодує поліпептид CD154, який здатний до зв'язування CD40, або HMGB1, також кодує епітоп M2e, епітоп HA і епітоп NP вірусу грипу А. Дивіться SEQ ID NO: 19-22. В прикладах як полінуклеотид, що кодує епітопи білків вірусу грипу, так і полінуклеотид, що кодує імуностимулюючий поліпептид, експресуються з плазмід для експресії у вегетативних клітинах. У деяких варіантах здійснення полінуклеотиди вбудовані в ген *cotB* або інший ген, що кодує білок, який представляється на поверхні спор. Кваліфікованим

в даній галузі техніки фахівцям буде зрозуміло, що бактеріальні полінуклеотиди, які кодують інші трансмембранні білки, можуть також використовуватися.

Як обговорювалося вище, полінуклеотид, що кодує імуностимулюючий поліпептид, гомологічний білку у суб'єкта, який здатний до посилення імунної відповіді проти епітопа, може бути включений у вакцинний вектор. У прикладах *Bacillus* вакцинний вектор, що включає полінуклеотид, який кодує або поліпептид CD154, здатний до зв'язування з CD40, або поліпептид HMGB1, як показано, посилював імунну відповідь проти епітопа M2e і два відмінні епітопа HA, що визначено по збільшенню продукції антитіл у відповідь на вакцинацію.

Відповідно, коли довжина поліпептиду CD154 складає менше ніж 50 амінокислот, ще більш відповідно менше ніж 40, менше ніж 30 або менше ніж 20 амінокислот. Довжина поліпептиду може складати від 10 до 15 амінокислот, від 10 до 20 амінокислот або від 10 до 25 амінокислот. Серед різних видів послідовність CD154 і CD40-зв'язувальна область не є у високій мірі консервативними. Послідовності CD154 курки і людини представлені в SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 12, відповідно.

CD40-зв'язувальні області CD154 були визначені для ряду видів, в тому числі людини, курки, качки, миші і великої рогатої худоби, і представлені в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, відповідно. Хоча існують варіабельність послідовностей в CD40-зв'язувальній області між видами, в представлених нижче прикладах показано, що поліпептид CD154 людини здатний до посилення імунної відповіді у курчат. Отже, даний винахід можна здійснити на практиці, використовуючи видоспецифічні поліпептиди CD154 або гетерологічний поліпептид CD154. Зокрема, поліпептиди CD154 і їх функціональні фрагменти або гомологи включають поліпептиди, ідентичні або ідентичні на принаймні 99 %, принаймні 98 %, принаймні 95 %, принаймні 90 %, принаймні 85 % або принаймні 80 % поліпептидам CD154 з SEQ ID NO: 11-17.

Bacillus вакцинний вектор, що описується тут, може використовуватися в способах посилення імунної відповіді і способах зниження захворюваності грипом у суб'єкта, описаних вище. *Bacillus* вакцинний вектор може використовуватися для виготовлення композицій для введення суб'єктам, таким як ті, які також описані вище.

Гетерологічні полінуклеотиди, що кодують антигенні поліпептиди, можуть бути вбудовані в бактеріальний геном в будь-якому неістотному місці, або альтернативно їх можна перемістити на плазмиду, використовуючи добре відомі в даній галузі техніки способи. Одне місце, прийнятне для вбудовування полінуклеотидів, знаходиться всередині поверхневих частин трансмембранних білків або пов'язані з послідовностями, які орієнтують гетерологічний полінуклеотид на шляху секреції. Прикладами гена трансмембранного білка, прийнятного для вставки полінуклеотидів, є ген *cotB* *Bacillus* і ген *lamb* *Salmonella*.

Гетерологічні полінуклеотиди включають, але без обмеження, полінуклеотиди, що кодують антигени, які відбираються з патогенних мікроорганізмів або вірусів, відмінних від вакцинного вектора. Такі полінуклеотиди можуть походити від патогенних вірусів, таких як вірус грипу (наприклад, M2e, гемаглютинін або нейрамінідаза), віруси герпесу (наприклад, гени, копіруючі структурні білки вірусів герпесу), ретровіруси (наприклад, оболонковий білок *gpl60*), аденовіруси, параміксовіруси, коронавіруси і т. п. Можна також отримати гетерологічні полінуклеотиди з патогенних бактерій, наприклад, гени, що кодують бактеріальні білки, такі як токсини або білки зовнішньої мембрани. Крім того, гетерологічні полінуклеотиди з паразитів, таких як *Eimeria*, є привабливими кандидатами на застосування у векторній вакцині.

Додаткові імуностимулюючі поліпептиди, залучені до приведення в дію імунної системи, можуть бути також включені у вакцинні вектори, що описуються тут. Полінуклеотиди можуть кодувати молекули імунної системи, відомі відносно їх стимулюючих ефектів, такі як інтерлейкін, фактор некрозу пухлин або інтерферон, або інший поліпептид, залучених до імунорегуляції.

Наступні приклади, як мається на увазі, є виключно ілюстративними і не мають на увазі як обмеження об'єму даного винаходу або прикладеної формули винаходу.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Конструювання HA/NP/M2e/cCD154 і HA/NP/M2e/HMGB1 *Bacillus* векторів.

Штами і умови культивування

Всі плазмиди спочатку зберігали в клітинах *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, США), крім особливо обумовлених випадків. *Bacillus* spp. використовували для введення мутацій (штам *Bacillus subtilis*, Poultry Health Laboratory, названий NP122). Бактерії, що містять плазмиду pDGIEF і pHT10, вирощували при 37 °C.

Середу Лурія-Бертані (LB) використовували для звичайного вирощування клітин, а середовище SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) використовували для фенотипічного вираження після електропорації. По мірі доцільності в середовище додавали наступне:

ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид (IPTG) в концентрації 1 мМ, ампіцилін (Amp) в концентрації 100 мкг/мл, спектиноміцин (SP) в концентрації 100 мкг/мл і хлорамфенікол (Cm) в концентрації 5 мкг/мл.

Плазмід

- 5 Плазмід рDGIEF (Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, OH) і рHT10, використані в даному дослідженні, були описані раніше (Zhang et al., Nuc. Acids Research 2006, 34 (9): 1-8 і Nguyen et al., Curr. Micro. 2007, 55: 89-93). Плазмід рDGIEF виконувала функцію матриці для ампліфікації гена *mazF*, який використовувався як проміжний селектований маркер під час маніпулювання хромосомою *Bacillus*. Плазмід рHT10 використовували для кодування і
- 10 продукування гетерологічних послідовностей епітопів білків вірусу птишиного грипу в *Bacillus* spp. Ця плазмід містить ген стійкості до CM, її індукцію здійснюють, додаючи 1 мМ IPTG, і її зберігають в *Bacillus* при 37 °C.

Продукція гетерологічних білків для експресії у вегетативних клітинах:

- 15 Плазмід рHT10, куплену у MoBioTec/Boca Scientific, Boca Raton, FL (Nguyen et al., 2007), перетворювали в сайт множинного клонування при додаванні вставкової послідовності з оптимізацією частоти використання кодонів для *Bacillus subtilis*. Проводили секвенування ДНК для підтвердження правильної вставки послідовності. По-новому модифіковану плазмід потім трансформували в *Bacillus*. Коротко, культури *Bacillus* нарощували протягом ночі при 37 °C в середовищі HS (середовищі Спіцайзена, доповненої 0,5 % глюкози, 50 мкг/мл DL-триптофану,
- 20 50 мкг/мл урацилу, 0,02 % гідролізату казеїну, 0,1 % дріжджового екстракту, 8 мкг/мл аргініну, 0,1 мкг/мл гістидину, 1 мМ MgSO₄). Нічну культуру (1 мл) використовували для засівання в 20 мл середовища (середовища Спіцайзена, доповненого 0,5 % глюкози, 5 мкг/мл DL-триптофану, 5 мкг/мл урацилу, 0,01 % гідролізату казеїну, 0,1 % дріжджового екстракту, 1 мМ MgSO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ CaCl₂), і інкубацію проводили при струшуванні протягом 3-4 годин при 30 °C. До 1
- 25 мл результуючої культури LS додавали 10 мкл 0,1 М EGTA, і інкубацію проводили при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Потім додавали 1-2 мкг плазмідної ДНК, здійснювали струшування протягом 2 годин при 37 °C, і здійснювали засівання на чашки з LB з селективними антибіотиками. Ці трансформовані *Bacillus* spp. Тепер продукують гетерологічні послідовності епітопів з AI після індукції 1 мМ IPTG.)

ПЛР

- 30 Всі праймери, використані для ПЛР, перераховані в таблиці 1. Типові умови для ПЛР склалися з приблизно 0,1 мкг очищеної геномної, плазмідної або утвореної в ході ПЛР ДНК (Qiagen, Valencia, CA, США), 1x буфера для полімерази Pfu, 5 Е полімерази Pfu (Stratagene La Jolla, CA, США), 1 мМ dNTP (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), 1,2 мМ кожного праймера в загальному об'ємі, що дорівнює 50 мкл. Термоциклер - прилад для ампліфікації ДНК
- 35 (Bio-Rad, Hercules, CA, США) застосовували з наступними умовами ампліфікації: 94 °C протягом 2 хвилин; 30 циклів, кожен з яких складався з 94 °C протягом 30 сек, 58 °C протягом 60 сек, 72 °C протягом 90 сек для кожної 1 т. о.; і 72 °C протягом 10 хвилин для кінцевого подовження. Кожний продукт ПЛР піддавали очищенню з гелю (Qiagen, Valencia, CA, США) і елюванню або
- 40 в 25 мкл буфера EB для приготування матриць, що використовуються в ПЛР з використанням перекриття і подовження, або в 50 мкл буфера EB, осаджували етанолом і суспендували в 5 мкл ddH₂O для електропорації в *Bacillus* spp.

Таблиця 1

Послідовності праймерів, використовувані для створення вакцинного вектора

Праймер	Ампліфікована область	Послідовність праймера (SEQ ID NO:)
mazF прямий	<i>MazF</i> ген	5' <i>ctaaaatcttcagatgatcaatcatcctcactgcccgcgtttccagtcgggaaa</i> 3' (SEQ ID NO: 31)
mazF зворотний	<i>MazF</i> ген	5' <i>tgaacgtgacgaacgaccagattccccctatgaagggtttat</i> 3' (SEQ ID NO: 32)
5' CotB прямий	5' <i>Cot B</i>	5' <i>gaaatgctcgtatgctgatga</i> 3' (SEQ ID NO: 33)
5' CotB	5' <i>Cot B</i>	5' <i>ggatgattgatcatctgaagattttag</i> 3' (SEQ ID NO: 34)
3' CotB прямий	3' <i>Cot B</i>	5' <i>aaatctggctgctgcacgttca</i> 3' (SEQ ID NO: 35)
3' CotB зворотний	3' <i>Cot B</i>	5' <i>ttacgtttccagtgatagctctatcg</i> 3' (SEQ ID NO: 36)
BS/AI/HMGB1 прямий	BS/AI/HMGB1 5' CotB	5' <i>aaccattcttcaattgtaattgaattgaatcagctgcctgatgatgacagttctcataatcattaaaatc gcccgatagcacagatcattgcccgttgcgtgatgatgaatccatgcctgttctaaccagtgctctgttc ttgatagt ggatgattgatcatctgaagattttag</i> 3' (SEQ ID NO: 37)
BS/AI/HMGB1 зворотний	BS/AI/HMGB1 3' CotB	5' <i>ttacaattgaagaatgggtctgtcatcatcactgctgtaagaattaatcatttgaaaaaattcaatcat catcagaagtgaacaccgattgaaatcatcatcatgagacacatcatatgcaccgacatcatcatca tcagaagttgaacaccgattgaaataaatctggctgctgcacgttca</i> 3' (SEQ ID NO: 38)
BS/AI/CD154 прямий	BS/AI/CD154 5' CotB	5' <i>tcaaaatgattaattcttgacagcagtgatgatgatgacagaaccattcttcaattgtaatttgaat cagctgcctgatgatgacagttctcataatcattaaaatcggcgatagcacagatcattgcccgttgc cggatgattgatcatctgaagattttag</i> 3' (SEQ ID NO: 39)
BS/AI/CD154 зворотний	BS/AI/CD154 3' CotB	5' <i>caagaattaatcatttgaaaaaattcaatcatcatcagaagtgaaacaccgattgaaatcatcactgaaa gaaaaatagaaaaagatattgcagcatatagacaaaaggcaaaagttgatgcaggcaaaaaagttgtgcaaa agcagaaaaatcaaaaaaaatctggctgctgcacgttca</i> 3' (SEQ ID NO: 40)

У таблиці 1 виділені курсивом нуклеотиди є нуклеотидами, які комплементарні тій або іншій стороні сайта вставки в ген *CotB* *Bacillus subtilis*.

Електропорація

Коротко, клітини засівали в 10 мл середовища LB і нарощували при 37 °C протягом ночі. Потім 100 мкл нічної культури знову засівали в 10 мл нового середовища LB з інкубацією при 37 °C протягом 3-4 годин. Клітини промивали п'ять разів водою ddH₂O і ресуспендували в 60 мкл 10 % гліцерину. Потім на клітини посиляли імпульси при 2,4-2,45 кВ протягом 1-6 мсек, їх інкубували в 0,5 мл SOC протягом 2-3 годин при 37 °C і засівали на середовище LB з відповідними антибіотиками.

Інтеграція в хромосому гетерологічної ДНК для представлення в оболонці спори:

Рекомбінантні штами *Bacillus*, що містять стійко інтегровані копії відібраних епітопів M2e, HA і NP, конструювали, використовуючи недавно опубліковані способи з модифікацією. Коротко, штами *Bacillus* трансформували касетою *MazF* (Zhang et al., 2006), яка породжувала штам, який був чутливим до IPTG і стійким до спектоміцину. Касету *MazF*, фланковану гомологічною ДНК розміром приблизно 300 п. о. з кожної сторони, вводили в ген *CotB* (Isticato et al., 2001) *Bacillus* вектора з допомогою електропорації з подальшим вирощуванням в середовищі, що містить спектоміцин, для відбору позитивних клонів, які тепер містять касету *MazF*, яка є стійкою до спектоміцину.

Після підтвердження мутації *MazF* в *CotB*, цю область заміняли оптимізованою відносно частоти використання кодонів послідовністю ДНК, що кодує антигенні детермінанти AI, знову фланкованою гомологічною ДНК розміром приблизно 300 п. о. Це виконували за допомогою створення продукту ПЛР, використовуючи ПЛР з використанням перекриття і подовження, щоб створити антигенні послідовності, фланковані послідовностями розміром приблизно 300 п. о. з кожної сторони, гомологічними хромосомі *Bacillus* (Cox et al., 2007). Продукт ПЛР вводили в *Bacillus* знову за допомогою електропорації і заміщення касети *MazF*. Відбирання трансформантів здійснювали на чашках, що містять IPTG, позитивні клони повинні тепер бути нереагуючими на IPTG і чутливими до спектоміцину. Правильну вставку послідовності в хромосому підтверджували за допомогою секвенування ДНК.

Приклад 2. Дослідження 1 і 2 вакцинації.

Курчат в день вилуплення (день 0) отримували з місцевої комерційної інкубаторної станції і випадковим чином розділяли на групи терапії (n=15/група терапії в експерименті 1 і n=20/групи терапії в експерименті 2). Всіх курчат в кожній групі терапії забезпечували ярличками і

занумеровували. Курчат орально інфікували за допомогою введення через зонд 0,25 мл сольового розчину або 10^6 - 10^8 КУО/мл різних *Bacillus* терапій, вказаних в таблиці 2 для дослідження 1 і в таблиці 3 для дослідження 2.

Таблиця 2

Заражувальна доза для кожної групи терапії в дослідженні 1 вакцинації

Група терапії	Заражувальна доза
Тільки сольовий розчин	
BS/AI/HMGB1	10^6 КУО/мл
BS/AI/HMGB1	10^8 КУО/мл
BS/AI/CD154	10^6 КУО/мл
BS/AI/CD154	10^8 КУО/мл

5

Таблиця 3

Заражувальна доза для кожної групи терапії в дослідженні 2 вакцинації

Група терапії	Заражувальна доза
BSBB (<i>Bacillus</i>)	10^6 КУО/мл
BS/AI/HMGB1	10^6 КУО/мл
BS/AI/CD154	10^6 КУО/мл
BS/AI/HMGB1 інактивовані нагріванням	10^6 КУО/мл
BS/AI/HMGB1 інактивовані формаліном	10^6 КУО/мл
BS/AI/HMGB1 піддані основаній на антибіотиках інактивації	10^6 КУО/мл
BS/AI/HMGB1 інактивовані етанолом	10^6 КУО/мл

У дослідженні 2 бактерії інактивували декількома різними способами для оцінки, чи необхідна реплікація для виклику продукції антитіл, спрямованих проти антигенних пептидів вірусу грипу. Використовували декілька способів інактивації, оскільки способи інактивації могли привести до руйнування епітопа і привести до невірної інтерпретації даних і підтвердження необхідності реплікації або життєздатності *Bacillus* вектора. Бактерії інактивували за допомогою інкубації протягом 10 хвилин в 0,022 % формаліні (інактивовані формаліном); інкубації протягом 10 хвилин при 70 °C (інактивовані нагріванням); інкубації в 5 мкг/мл гентаміцину (піддані основаній на антибіотиках інактивації) або інкубації протягом 10 хвилин в 70 % етанолі (інактивовані етанолом).

Кожну групу терапії розміщували в окремому підлоговому загоні на свіжій сосновій підстилці і необмежено надавали воду і їжу. У дні 11 і 21 після вилуплення птахи отримували бустер-вакцину тієї ж терапії, яку вони отримували в день 0. Також в дні 21 і 31/32 від кожного забезпеченого ярличком птаха отримували кров, і знімали сироватку.

Сироватку, отриману від забезпечених ярличками птахів в кожній групі терапії, потім використовували в ELISA із захопленням антитіл для визначення продукції антитіл, специфічних для M2e, HAUA і HALB. Коротко, індивідуальна ямка 96-ямкового планшета покривала 10 мкг/мл епітопа M2e, епітопа HAUA або епітопа HALB, кон'югованого з BSA. Допускали проходження адгезії антигенів протягом ночі при 4 °C. Планшети промивали PBS+0,05 % Tween 20, блокували PBS Superblock (Pierce Chemical Co.) протягом як мінімум 2 годин і інкубували протягом 2 годин з сироваткою, попередньо отриманою від птахів в кожній з груп терапій, описаних вище. Планшети промивали PBS+0,05 % Tween 20 з подальшою інкубацією з кон'югованим з пероксидазою козячим другим антитілом проти IgY курей (в розведенні 1:7500), отриманим з Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), протягом ще години. Після подальшого промивання планшети виявляли, використовуючи набір з субстратом для пероксидази, отриманий від Fisher Scientific, і оптичні густини зчитувала на спектрофотометрі при 450 нм і 405 нм.

Зразки об'єднаних сироваток від груп, одержуючих векторні вакцини, використовували як позитивні контролю, а зразки об'єднаних сироваток від невакцинованих груп використовували як негативні контролю в кожному планшеті для заміни сироватки від груп терапій. Оптична густина, отримана для позитивного контролю, негативного контролю і експериментальних зразків, використала для розрахунку відношень зразка до позитивного контролю (відношень S/P), використовуючи наступний розрахунок:

Розрахунок відношення S/P:

середнє значення для зразка – середнє значення для
негативного контролюсереднє значення для позитивного контролю – середнє
значення для негативного контролю

Розраховані відношення S/P для кожного дослідження представлені на Фіг. 1-6. На Фіг. 1-3 представлені сумарні титри антитіл проти M2e, HALB і HAUА для дослідження 1, відповідно, в дні 21 і 31 після вилуплення. Результати доводять, що сильні імунні відповіді проти кожного з цих антигенів були викликані після орального введення Bacillus, що експресує кожний з цих епітопів разом або з CD154, або HMGB1 як імуностимулюючого пептиду. На Фіг. 4-6 представлені сумарні титри антитіл проти M2e, HALB і HAUА для дослідження 2, відповідно, в дні 21 і 32 після вилуплення. Результати доводять, що сильні імунні відповіді проти кожного з цих епітопів були викликані після орального введення живий Bacillus, що експресує епітоп і імуностимулюючий пептид. На Фіг. 4-6 також показано, що схожі рівні специфічних антитіл були також породжені, коли вектор (Bacillus) був інактивованій до введення.

Приклад 3. Дослідження 3 вакцинації

Курчат в день вилуплення (день 0) отримували з місцевої комерційної інкубаторної станції і випадковим чином розділяли на групи терапії (n=20/група терапії). Всіх курчат в кожній групі терапії забезпечували ярличками і занумеровували. Курчат оральний інфікували за допомогою введення через зонд 0,25 мл сольового розчину або 10^5 - 10^8 КУО/мл Bacillus вектора (BSBB), Bacillus вектора, що експресує епітопи білків пташиного грипу і HMGB1 (BS/Al/HMGB1), або різних кількостей BS/Al/HMGB1 вектора після інактивації формаліном (як описано вище). У день 10 після вилуплення птахи отримували бустер-вакцину тієї ж терапії, яку вони отримували в день 0. Також в дні 21 і 32 від кожного забезпеченого ярличком птаха отримували кров, і знімали сироватку. Рівні специфічних для M2e антитіл класу IgG в сироватці визначали, використовуючи описаний вище спосіб з використанням міченого пероксидазою другого антитіла, специфічного для IgG курей (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Представлені на Фіг. 7 результати доводять, що так само як живі бактерії інактивовані формаліном бактерії були здатні до стимулювання продукції специфічних для M2e антитіл класу IgG. Цей результат був несподіваним, оскільки звичайно вважають, що тільки живі бактерії можуть стимулювати сильну імунну відповідь після орального введення.

Приклад 4. Дослідження 4 вакцинації

Курчат в день вилуплення (день 0) отримували з місцевої комерційної інкубаторної станції і випадковим чином розділяли на групи терапії (n=20-35/група терапії). Всіх курчат в кожній групі терапії забезпечували ярличками і занумеровували. Курчат інфікували за допомогою орального введення через зонд або підшкірної ін'єкції 0,25 мл сольового розчину або 10^6 КУО/мл Bacillus вектори (BSBB), Bacillus вектора, що експресує епітопи білків пташиного грипу і HMGB1 (BSAl), або BSAl вектора після інактивації формаліном (як описано вище) або після інактивації формаліном з подальшої ліофілізацією (сольового розчину, що відтворюється з використанням безпосередньо перед введенням). У день 10 після вилуплення деякі птахи отримували бустер-вакцину тієї ж терапії, яку вони отримували в день 0. В дні 11, 14 і 21 від кожного забезпеченого ярличком птаха отримували кров, і знімали сироватку. Рівні специфічних для M2e антитіл класів IgA і IgG в сироватці визначали, використовуючи описаний вище спосіб з використанням міченого пероксидазою антитіла проти IgA курей (GenTex) або міченого пероксидазою другого антитіла проти IgG курей (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Представлені на Фіг. 8 результати доводять, що приблизно так само як живі бактерії інактивовані формаліном бактерії були здатні до стимулювання продукції специфічних для M2e антитіл класу IgA після орального введення. Навпаки, у випадку підшкірного введення інактивованій BSAl вектор не був настільки ж ефективний в стимулюванні продукції антитіл класу IgA, і ліофілізовані бактерії не стимулювали продукцію IgA. Представлені на Фіг. 9 результати доводять, що кожний з протоколів введення BSAl підтримував рясне утворення IgG.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> UNIVERSITY OF ARKANSAS
THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM

<120> ВАКЦИННІ ВЕКТОРИ І СПОСОБИ ПОСИЛЕННЯ ІМУННИХ ВІДПОВІДЕЙ

<130> 5658-00099

<150> US 61/297,098

<151> 2010-01-21

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> БІЛОК

<213> Вірус пташиного грипу

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 1

Met	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Thr	Arg	Asn	Gly	Trp	Glu
1				5					10					15	

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 2

<211> 24

<212> БІЛОК

<213> Вірус пташиного грипу

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 2

Met	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Thr	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly
1				5					10					15	

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 3

<211> 24

<212> БІЛОК

<213> Вірус пташиного грипу

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 3

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 4

<211> 24

<212> БІЛОК

<213> Вірус пташиного грипу

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 4

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 5

<211> 8

<212> БІЛОК

<213> Вірус пташиного грипу

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 5

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1 5

<210> 6

<211> 8

<212> БІЛОК

<213> Вірус пташиного грипу

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 6

Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn
1 5

<210> 7
 <211> 12
 <212> БІЛОК
 <213> Вірус пташиного грипу

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HA5 UA

<400> 7

Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln
 1 5 10

<210> 8
 <211> 19
 <212> БІЛОК
 <213> Вірус пташиного грипу

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HA5 LB

<400> 8

Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr
 1 5 10 15

Glu Glu Leu

<210> 9
 <211> 16
 <212> БІЛОК
 <213> Вірус пташиного грипу

<220>
 <221> misc_feature
 <223> NP 54-69

<400> 9

Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 14
 <212> БІЛОК
 <213> Вірус пташиного грипу

<220>
 <221> misc_feature
 <223> NP 147-160

<400> 10

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
1 5 10

<210> 11
<211> 272
<212> БИЛОК
<213> Gallus gallus

<220>
<221> misc_feature
<223> CD154 купки

<400> 11

Met Asn Glu Ala Tyr Ser Pro Ala Ala Pro Arg Pro Met Gly Ser Thr
1 5 10 15

Ser Pro Ser Thr Met Lys Met Phe Met Cys Phe Leu Ser Val Phe Met
20 25 30

Val Val Gln Thr Ile Gly Thr Val Leu Phe Cys Leu Tyr Leu His Met
35 40 45

Lys Met Asp Lys Met Glu Glu Val Leu Ser Leu Asn Glu Asp Tyr Ile
50 55 60

Phe Leu Arg Lys Val Gln Lys Cys Gln Thr Gly Glu Asp Gln Lys Ser
65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Cys Glu Lys Val Leu Lys Gly Phe Gln Asp Leu Gln
85 90 95

Cys Lys Asp Arg Thr Ala Ser Glu Glu Leu Pro Lys Phe Glu Met His
100 105 110

Arg Gly His Glu His Pro His Leu Lys Ser Arg Asn Glu Thr Ser Val
115 120 125

Ala Glu Glu Lys Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys
130 135 140

Ser Asn Thr Thr Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala
145 150 155 160

Pro Thr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr His Glu Gly Lys Leu Lys Val Glu
165 170 175

Lys Ala Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Val Ser Phe Cys Thr Lys
180 185 190

Ala Ala Ala Ser Ala Pro Phe Thr Leu Tyr Ile Tyr Leu Tyr Leu Pro
195 200 205

Met Glu Glu Asp Arg Leu Leu Met Lys Gly Leu Asp Thr His Ser Thr
210 215 220

Ser Thr Ala Leu Cys Glu Leu Gln Ser Ile Arg Glu Gly Gly Val Phe
225 230 235 240

Glu Leu Arg Gln Gly Asp Met Val Phe Val Asn Val Thr Asp Ser Thr
245 250 255

Ala Val Asn Val Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu
260 265 270

<210> 12
<211> 261
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CD154 людини

<400> 12

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 13
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 людини

<400> 13

Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Cys
1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> Gallus gallus

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 курки

<400> 14

Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> Anas sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 качки

<400> 15

Trp Asn Lys Thr Ser Tyr Ala Pro Met Asn
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 миші

<400> 16

Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> Bos taurus

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 корови

<400> 17

Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 190
<212> БІЛОК
<213> Gallus gallus

<220>
<221> misc_feature
<223> амінокислотна HMGB1 курки

<400> 18

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
50 55 60

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys
100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala
165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp
180 185 190

<210> 19

<211> 111

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид: BS/AI/CD154 = HA/NP/M2e/cCD154: SSS сериновий спейсер

<400> 19

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp

```

                20                25                30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
   35                40                45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
   50                55                60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
   65                70                75                80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
                85                90                95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser
                100                105                110

<210> 20
<211> 302
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид: BS/AI/HMGB1 = HA/NP/M2e/HMGB1

<400> 20

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
1                5                10                15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
                20                25                30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
   35                40                45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
   50                55                60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
   65                70                75                80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
                85                90                95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser Ser
                100                105                110

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
   115                120                125

```

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
130 135 140

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
145 150 155 160

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
165 170 175

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
180 185 190

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
195 200 205

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys
210 215 220

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
225 230 235 240

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
245 250 255

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
260 265 270

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala
275 280 285

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp
290 295 300

<210> 21
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид: BS/AI/CD154

<400> 21

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
20 25 30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn


```

35              40              45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
50              55              60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
65              70              75              80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
85              90              95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser
100            105            110

<210> 22
<211> 290
<212> БІЛЮК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид: BS/AI/HMGB1

<400> 22

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
1              5              10              15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
20            25            30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
35            40            45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
50            55            60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
65            70            75            80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
85            90            95

Ser Ser Ser Ser Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys
100           105           110

Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys
115          120          125

Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys
130          135          140

```

Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe
145 150 155 160

Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys
165 170 175

Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro
180 185 190

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu
195 200 205

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp
210 215 220

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp
225 230 235 240

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu
245 250 255

Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys
260 265 270

Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu
275 280 285

Glu Asp
290

<210> 23
<211> 85
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид: HMGB1 блок a1

<400> 23

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala

50 55 60

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr
85

<210> 24
<211> 54
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид: HMGB1 блок a2

<400> 24

Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
1 5 10 15

Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
20 25 30

Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val
35 40 45

Pro Pro Lys Gly Glu Thr
50

<210> 25
<211> 73
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний пептид: HMGB1 блок b1

<400> 25

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser
20 25 30

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

Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu
50 55 60

Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr

65

70

<210> 26
 <211> 69
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид: HMGB1 блок b2

<400> 26

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu
 1 5 10 15

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp
 20 25 30

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

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu
 50 55 60

Lys Asp Ile Ala Ala
 65

<210> 27
 <211> 21
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид: HMGB1 RAGE-зв'язувальний домен

<400> 27

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg
 20

<210> 28
 <211> 33
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний пептид: домен прозапальної кінетичної активності HMGB1

<400> 28

Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly
 1 5 10 15

Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys
 20 25 30

Lys

<210> 29
 <211> 215
 <212> B1MOK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HMGB1

<400> 29

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
210 215

<210> 30
<211> 205
<212> BIJOK
<213> Danio rerio

<220>
<221> misc_feature
<223> HMGB1 смугастого даніо

<400> 30

Met Gly Lys Asp Pro Thr Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

Tyr Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Glu
20 25 30

Ala Thr Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp
35 40 45

Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys
50 55 60

Leu Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Asn Tyr Ile Pro Pro
65 70 75 80

Lys Gly Glu Lys Lys Lys Arg Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg
85 90 95

Pro Pro Ser Ala Phe Phe Ile Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Val
100 105 110

Lys Glu Glu Thr Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Arg Leu
115 120 125

Gly Glu Met Trp Asn Lys Ile Ser Ser Glu Glu Lys Gln Pro Tyr Glu
130 135 140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala
145 150 155 160

Tyr Arg Ser Lys Gly Lys Val Gly Gly Gly Ala Ala Lys Ala Pro Ser
165 170 175

Lys Pro Asp Lys Ala Asn Asp Glu Asp Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu
180 185 190

Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu
195 200 205

<210> 31
<211> 53
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний праймер: mazF прямий - MazF ген

<400> 31
ctaaaatctt cagatgatca atcatcctca ctgccgcgtt tccagtcggg aaa 53

<210> 32
<211> 44
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний праймер: mazF зворотний - MazF ген

<400> 32
tgaacgtgac gaacgaccag atttccccct atgcaagggt ttat 44

<210> 33
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний праймер: 5' CotB прямий - 5' CotB

<400> 33
gaaatgctcg atgctgatga 20

<210> 34
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний праймер: 5' CotB зворотний - 5' CotB

<400> 34
ggatgattga tcatctgaag attttag 27

<210> 35
<211> 24

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний праймер: 3' CotB прямий - 3' CotB

 <400> 35
 aaatctggtc gttcgtcacg ttca 24

 <210> 36
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний праймер: 3' CotB зворотний - 3' CotB

 <400> 36
 ttacgtttcc agtgatagtc tatcg 25

 <210> 37
 <211> 186
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний праймер: BS/AI/HMGB1 прямий - BS/AI/HMGB1 5' CotB

 <400> 37
 aaccattctt tcaattgtaa ttgaattttg aatcagtctg cctgatgatg acagttcttc 60
 ataatcatta aaatgcgccg gatagcacag atcatttgcc ggatttgctg atgatgaatc 120
 catgcctggtt ctaaccagtg ctctgtttct ttgatatgtg gatgattgat catctgaaga 180
 ttttag 186

 <210> 38
 <211> 200
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний праймер: BS/AI/HMGB1 зворотний - BS/AI/HMGB1 3' CotB

 <400> 38
 ttacaattga aagaatgggt ctgtcatcat catcactgct gtcaagaatt aatcattttg 60
 aaaaaattca atcatcatca gaagttgaaa caccgattag aaattcatca tcatggatga 120
 caacatcata tgcaccgaca tcatcatcat cagaagttga aacaccgatt agaaataaat 180
 ctggtcgttc gtcacgttca 200

 <210> 39
 <211> 177
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>

<223> Синтетичний праймер: BS/AI/CD154 прямий – BS/AI/CD154 5' CotB

<400> 39
 ttcaaaatga ttaattcttg acagcagtgatgac agaaccattc tttcaattgt 60
 aattgaattt tgaatcagtc tgcctgatga tgacagttct tcataatcat taaaatcgcc 120
 cggatagcac agatcatttg ccggatttgc ggatgattga tcattctgaag atttttag 177

<210> 40
 <211> 194
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний праймер: BS/AI/CD154 зворотний – BS/AI/CD154 3' CotB

<400> 40
 caagaattaa tcattttgaa aaaattcaat catcatcaga agttgaaaca ccgattagaa 60
 attcatcatc actgaaagaa aaatatgaaa aagatattgc agcatataga gcaaaaggca 120
 aagttgatgc aggcacaaaaa gttgttgcaa aagcagaaaa atcaaaaaaa aaatctggtc 180
 gttcgtcacg ttca 194

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Вакцинний вектор, що включає антигенний поліпептид і поліпептид HMGB1, в якому принаймні частина антигенного поліпептиду і принаймні частина поліпептиду HMGB1 присутні на поверхні вакцинного вектора.
2. Вакцинний вектор за п. 1, в якому антигенним поліпептидом є специфічний для вірусу грипу поліпептид.
- 10 3. Вакцинний вектор за п. 2, в якому антигенним поліпептидом є поліпептид M2e, HA або NP вірусу грипу.
4. Вакцинний вектор за п. 3, в якому антигенний поліпептид вибирають з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 10.
- 15 5. Вакцинний вектор за будь-яким з пп. 1-4, в якому поліпептид HMGB1 вибирають з SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30.
6. Вакцинний вектор за будь-яким з пп. 1-5, який є бактерією.
7. Вакцинний вектор за п. 6, де бактерією є *Bacillus spp.*
8. Вакцинний вектор за будь-яким з пп. 1-7, в якому антигенний поліпептид і/або поліпептид HMGB1 включений в трансмембранний білок.
- 20 9. Вакцинний вектор за п. 8, в якому антигенний поліпептид і/або поліпептид HMGB1 знаходиться в поверхневій петльовій ділянці трансмембранного білка.
10. Вакцинний вектор за п. 8 або 9, де трансмембранним білком є cotB.
11. Вакцинний вектор за будь-яким з пп. 1-10, в якому антигенний поліпептид і поліпептид HMGB1 утворюють гібридний білок.
- 25 12. Композиція, що включає вакцинний вектор за будь-яким з пп. 1-11 і фармацевтично прийнятний носій.
13. Композиція за п. 12, в якій фармацевтично прийнятний носій є прийнятним для орального або інтраназального введення.
- 30 14. Композиція за п. 12 або 13, в якій вакцинний вектор не здатний до реплікації, є інактивованим або убитим.
15. Спосіб посилення імунної відповіді у суб'єкта, що включає введення суб'єкту вакцинного вектора за будь-яким з пп. 1-11 або композиції за будь-яким з пп. 12-14 в кількості, ефективній для посилення імунної відповіді у суб'єкта проти антигенного поліпептиду.
- 35 16. Спосіб за п. 15, в якому вакцинний вектор вводять орально або інтраназально.

17. Спосіб за п. 16, в якому імунною відповіддю є продукція антитіл класу IgA проти антигенного поліпептиду.

18. Спосіб за будь-яким з пп. 15-17, в якому вакцинний вектор не здатний до реплікації в організмі суб'єкта або є інактивованим або убитим перед введенням суб'єкту.

5 19. Вакцинний вектор *Bacillus spp.*, що включає першу полінуклеотидну послідовність, що кодує антигенний поліпептид, присутній на поверхні вакцинного вектора, і другу полінуклеотидну послідовність, що кодує імуностимулюючий поліпептид, в якому антигенний поліпептид і імуностимулюючий поліпептид присутні на поверхні вакцинного вектора, причому антигенним поліпептидом є поліпептид вірусу грипу, а імуностимулюючим поліпептидом є поліпептид

10 HMGB1.

20. Вакцинний вектор за п. 19, в якому перший полінуклеотид і другий полінуклеотид вбудовані в третю полінуклеотидну послідовність, що кодує поверхневу частину трансмембранного білка.

21. Вакцинний вектор за п. 20, в якому трансмембранним білком є *cotB*.

15 22. Вакцинний вектор за будь-яким з пп. 19-21, в якому антигенним поліпептидом є поліпептид M2e вірусу грипу, поліпептид HA вірусу грипу або поліпептид NP вірусу грипу.

23. Вакцинний вектор за п. 22, в якому антигенний поліпептид вибирають з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 10.

20 24. Вакцинний вектор за будь-яким з пп. 19-23, в якому поліпептид HMGB1 вибирають з SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30.

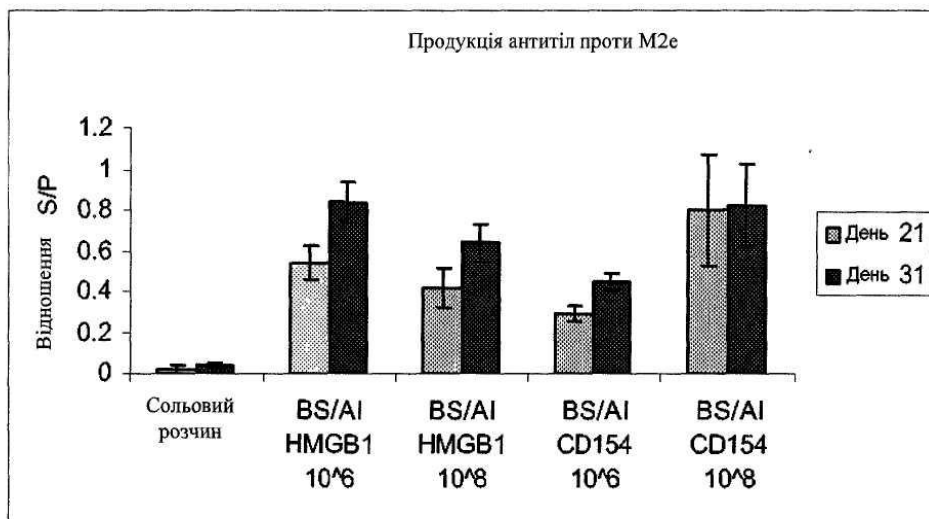
25. Спосіб посилення імунної відповіді у суб'єкта, що включає введення суб'єкту вакцинного вектора *Bacillus spp.* за будь-яким з пп. 19-24 в кількості, ефективній для посилення імунної відповіді у суб'єкта проти антигенного поліпептиду.

26. Спосіб за п. 25, в якому вакцинний вектор вводять орально або інтраназально.

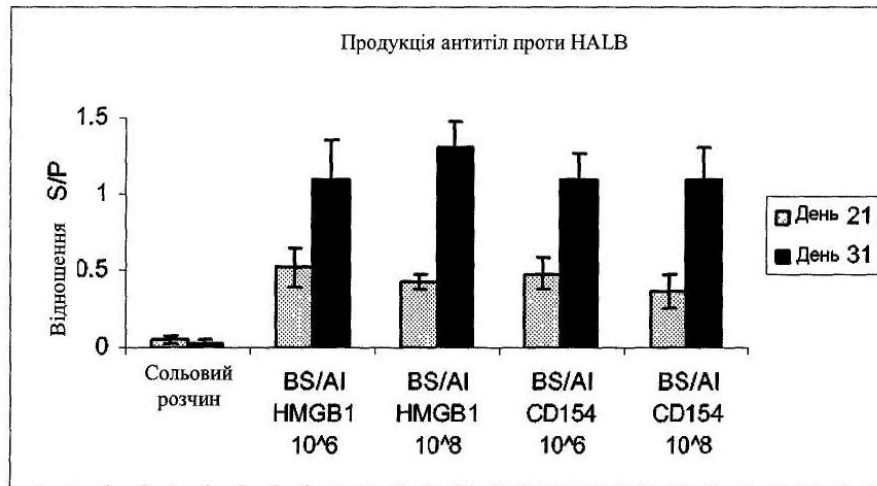
25 27. Спосіб за п. 26, в якому імунною відповіддю є продукція антитіл класу IgA проти антигенного поліпептиду.

28. Спосіб за будь-яким з пп. 25-27, в якому вакцинний вектор не здатний до реплікації в організмі суб'єкта або є інактивованим або убитим перед введенням суб'єкту.

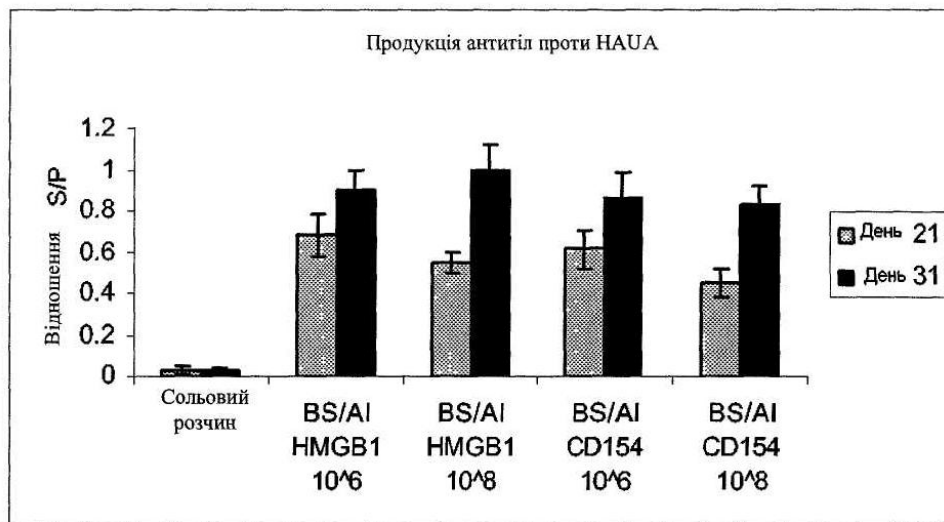
29. Спосіб зниження пов'язаної з вірусом грипу А захворюваності у суб'єкта, що включає введення суб'єкту вакцинного вектора за будь-яким з пп. 1-11 і 19-24 або композиції за будь-яким з пп. 12-14 в кількості, ефективній для зниження пов'язаної з вірусом грипу А захворюваності у суб'єкта.



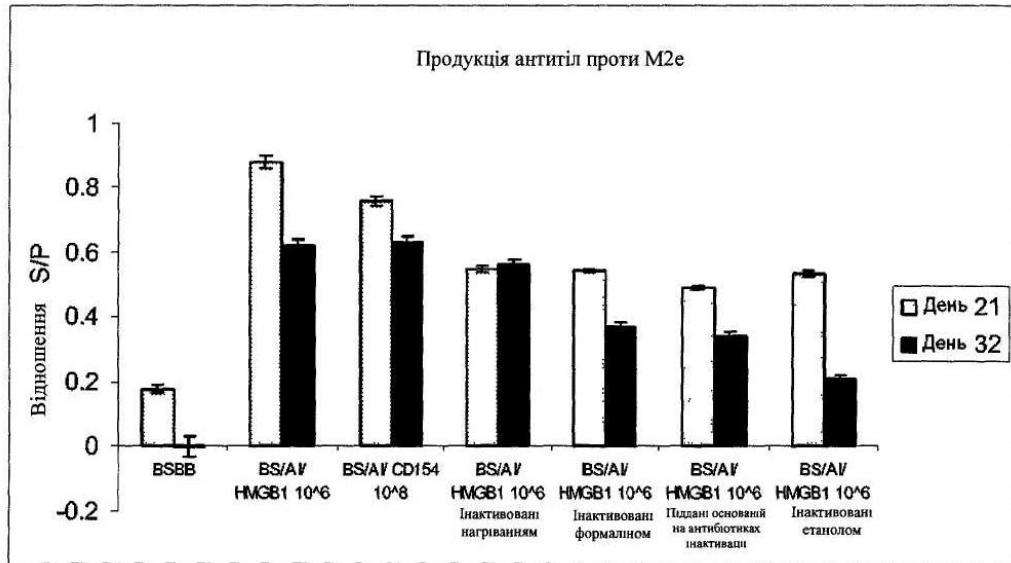
Фіг. 1



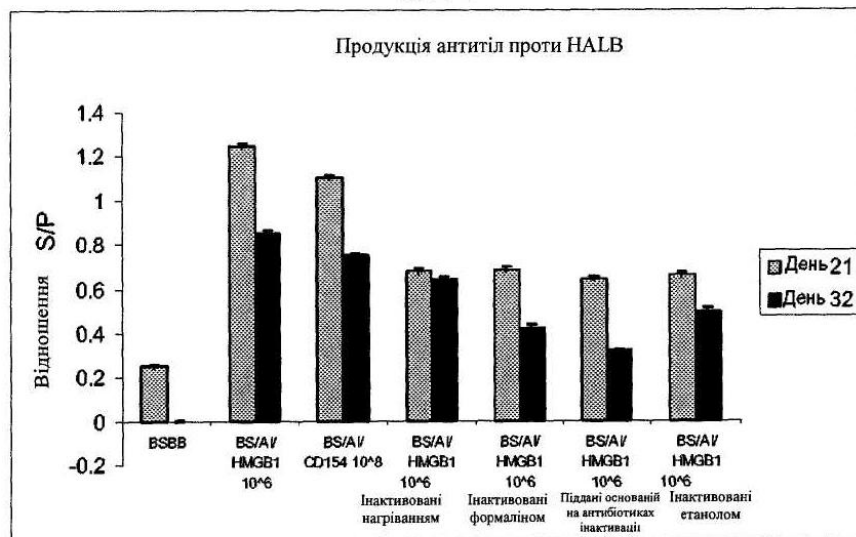
Фіг. 2



Фіг. 3

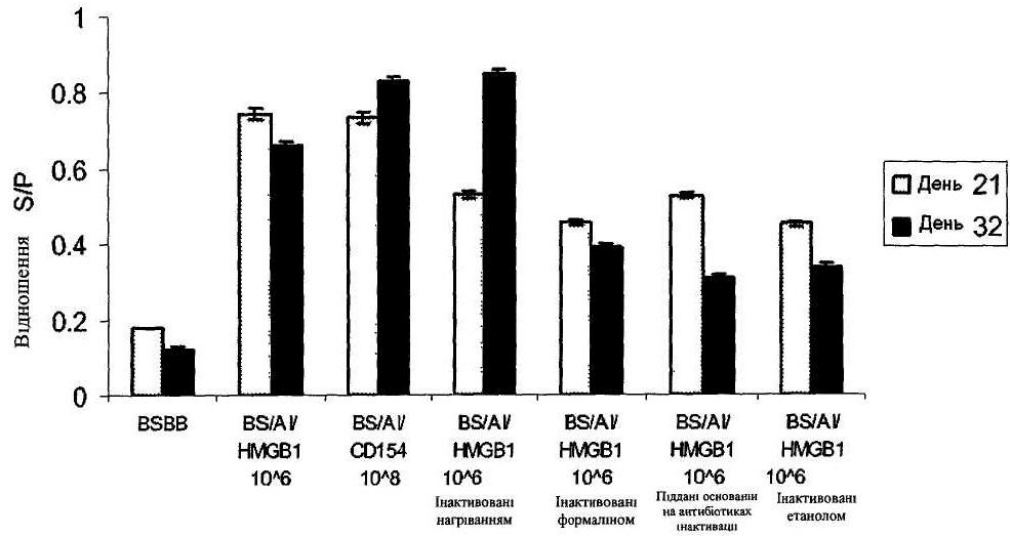


Фіг. 4

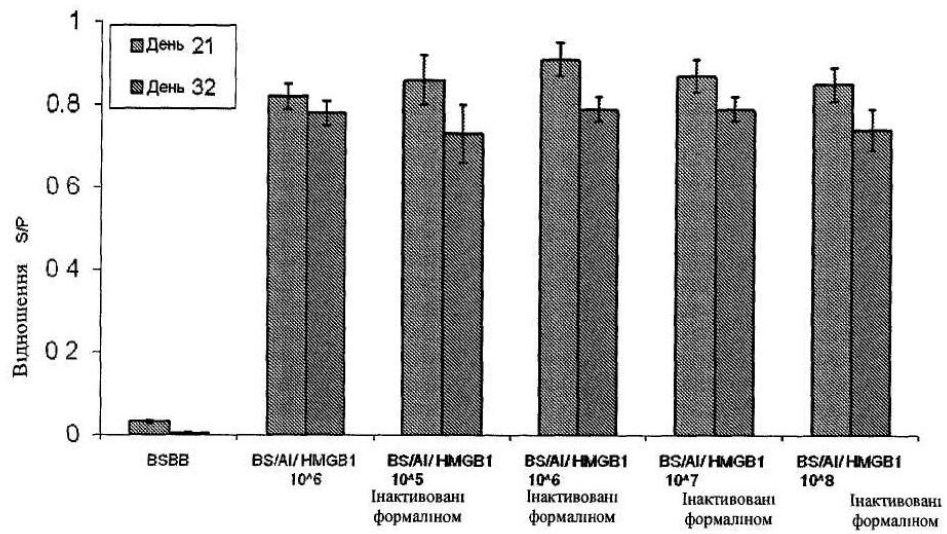


Фіг. 5

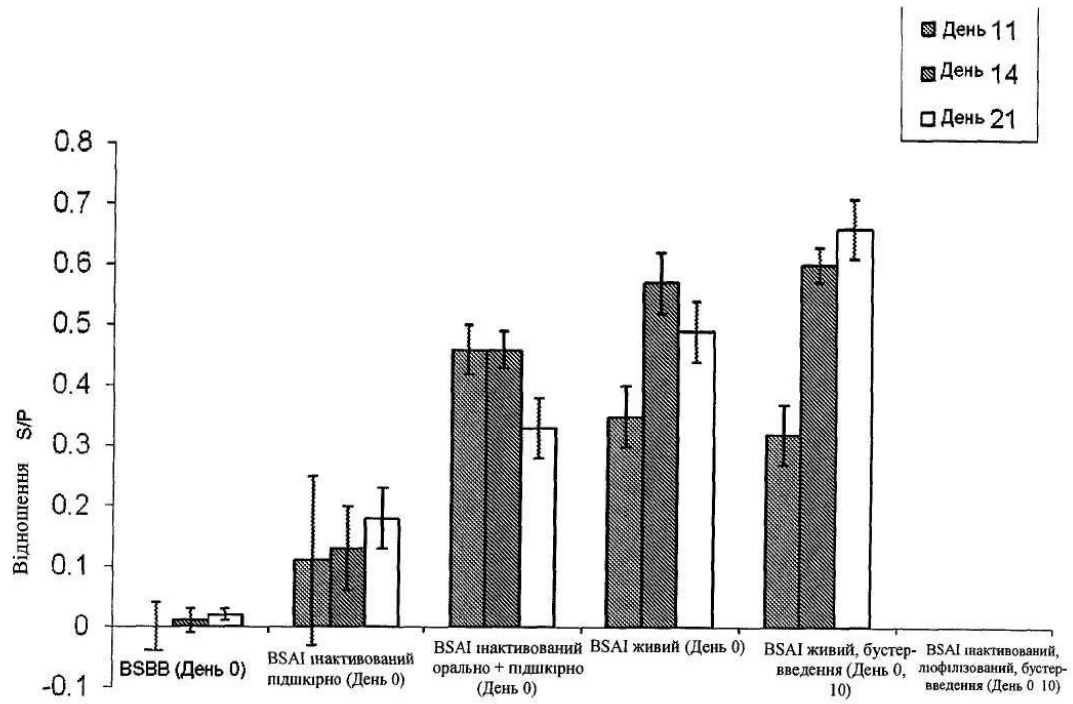
Продукція антитіл проти HАUА



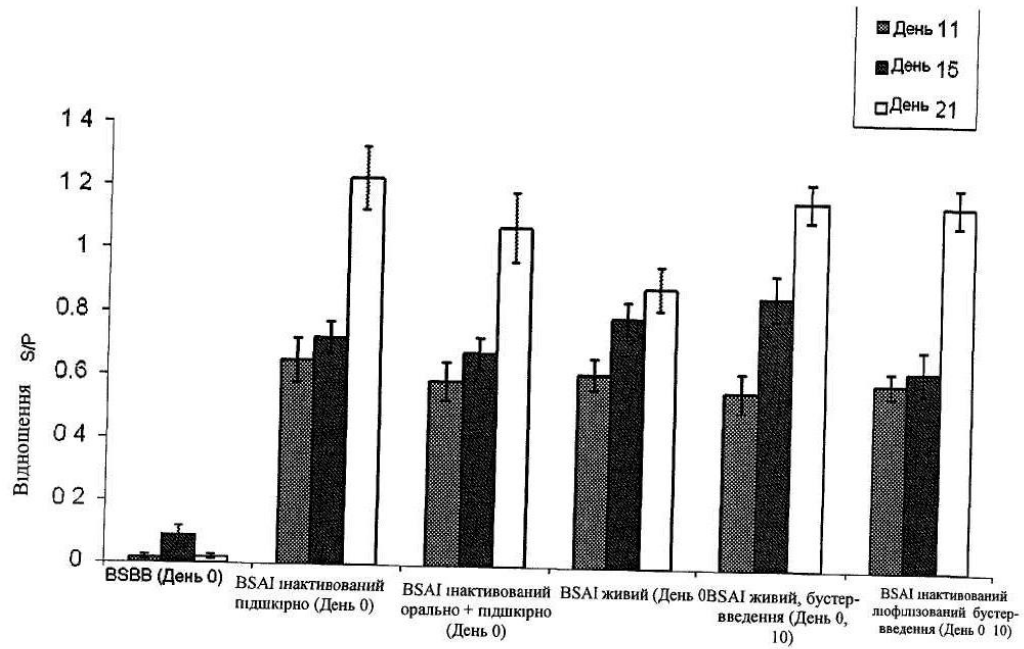
Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601