

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201401352 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.05.29

(51) Int. Cl. C07K 14/175 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.05.29

(54) ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИРУСА ШМАЛЛЕНБЕРГА (SBV), СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 12170631.1; 13157875.9

(32) 2012.06.01; 2013.03.05

(33) EP

(86) PCT/US2013/043146

(87) WO 2013/181270 2013.12.05

(71) Заявитель:
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Николин Велько, Штадлер Конрад,
Лишевски Аксель (DE), Брикс
Александр, Ниттел Джеффри П. (US),
Тёпфер Катарина Хедвиг (DE)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области вакцин и лекарственных средств для профилактики и лечения инфекционных вирусных заболеваний у жвачных животных. В заявке описан инактивированный вирус Шмалленберга (SBV), который можно применять в качестве вакцины или лекарственного средства для предупреждения или лечения виремии, передачи вируса и клинических симптомов, прежде всего пороков развития у новорожденных жвачных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы и козы, индуцированных SBV.

A1

201401352

201401352

A1

5

10

15 Заявка № 201401352
Заявитель Бёрингер Ингельхайм
Ветмедика ГмбХ, DE

20 ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИРУСА ШМАЛЛЕНБЕРГА (SBV), СПОСОБЫ ЕЕ
ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был
представлен в формате ASCII через EFS-Web и тем самым полностью включен в
25 настоящее описание в качестве ссылки. Указанная копия в формате ASCII
обозначена как 01-2825-PCT-SEQ.txt и имеет размер 33696 байтов.

Предпосылки создания изобретения

Область техники, к которой относится изобретения

Настоящее изобретение относится к области вакцин и лекарственных
30 средств для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Оно
относится, прежде всего, к инаktivированным вирусам, которые можно
применять в качестве вакцины или лекарственного средства для предупреждения
или лечения вирусной, переноса инфекции и клинических симптомов,

вызываемых вирусом Шмалленберга, прежде всего у новорожденных жвачных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы и козы.

Информация о существующем уровне техники

Новый ортобуньявирус, а именно вирус Шмалленберга (SBV), был открыт в Европе в ноябре 2011 г. После того, как он был впервые обнаружен, количество случаев выявления SBV у овец, крупного рогатого скота и коз резко возросло, при этом в ряде европейских стран было выявлено нескольких тысяч случаев недоразвитых SBV-позитивных по данным ПЦР ягнят и телят (1, 2). Вирус был обнаружен методами метагеномики в институте Фридриха Лёффлера (FLI) в образцах, взятых у коров, у которых были выявлены снижение надоя и лихорадка. Исследованные образцы были собраны на ферме вблизи города Шмалленберг (Северный Рейн-Вестфалия, Германия), и поэтому вирус получил название вирус Шмалленберга (SBV). SBV является представителем рода *Orthobunyavirus*, относящегося к семейству *Bunyaviridae*. Он родственен так называемой серогруппе вирусов Симбу (1).

Ортобуньявирусы имеют сегментированный РНК-геном с минус-цепью и в основном передаются насекомыми-переносчиками, такими как мелкие двукрылые насекомые и комары. Три сегмента (S, M и L) генома ортобуньявируса позволяют осуществлять генетическую перегруппировку, которая происходит в естественных условиях и приводит к появлению вирусов с новыми биологическими свойствами (3). Наиболее крупный сегмент L кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу. М-сегменты кодируют вирусные поверхностные гликопротеины Gn и Gc, которые ответственны за слияние с клетками, присоединение вируса и индукцию нейтрализующих антител. Малый S-сегмент кодирует нуклеокапсид N, который также участвует в фиксации комплемента (4). Родственную связь между ортобуньявирусами часто выявляют только путем серологического анализа перекрестной реактивности (5). В эпоху ДНК-секвенирования была проведена дополнительная оценка филогенетических характеристик путем сравнения частичных геномных последовательностей (полноразмерной последовательности N и частичной последовательности Gc гена) (6). Однако доступная и опубликованная информация о геномной последовательности полноразмерных геномов является скудной. Вследствие этого глубокие филогенетические анализы являются затруднительными. Таким

образом, подробная и надежная таксономическая классификация SBV не могла быть выполнена. Предварительные исследования продемонстрировали наличие сходства последовательностей М- и L-сегментов с частичными последовательностями вируса AKAV и Aino (AINOV). Ген N является наиболее близкородственным вирусу Shamonda (SHAV) (1).

SBV подобно вирусу Akabane (AKAV) обладает способностью проникать через плацентарный барьер у беременных коров и овец, инфицировать плод и вызывать приводящие к фатальному исходу врожденные дефекты в течение восприимчивой к инфекции стадии беременности (2). Серогруппа Simbu, получившая название по названию прототипного вируса, представляет собой наиболее крупную серогруппу ортобуньявирусов и включает по меньшей мере 25 вирусов, среди которых находятся важные с медицинской точки зрения вирусы, такие как вирус Акабане, вирус Оропуши, Сатупери или вирус Дугласа, большинство из которых могут вызывать пороки развития у новорожденных жвачных животных, но могут поражать также и людей. Например, вирус Акабане вызывает врожденные дефекты у жвачных животных и он циркулирует в Азии, Океании и Африке, в то время как вирус Оропуши ответствен за большие эпидемии лихорадки Оропуши, зооноза, сходного с лихорадкой Денге, в человеческих популяциях в Южной Африке. Вирус Сатупери дал свое название серогруппе Сатупери, к которой относятся также вирус Дугласа и SBV.

SBV был первым ортобуньявирусом из серогруппы Симбу, обнаруженным в Европе. Вирус, по-видимому, передается членистоногими-переносчиками. Вероятно, важную роль в переносе играют мокрецы. Согласно современному уровню знаний жвачные животные являются восприимчивыми к заражению SBV. У взрослых животных может развиваться слабое заболевание, если оно имеет место. Однако часто происходит транспланцентарное заражение, и оно может приводить к серьезному врожденному пороку развития позвоночного столба (кифоз, лордоз, сколиоз, искривление шеи) и черепа (макроцефалия, укорочение нижней челюсти), а также к разнообразным порокам развития головного мозга (гидроцефалия, порэнцефалия, гипоплазия мозжечка, гапоплазия ствола головного мозга) и спинного мозга у ягнят, козлят и телят. Инфекция быстро распространяется по большим областям Северо-Западной

Европы. К настоящему времени инфекция поразила Бельгию, Германию, Францию, Италию, Люксембург, Нидерланды, Испанию и Великобританию.

Следовательно, SBV представляет собой серьезную угрозу поголовью жвачного скота в Европе, поскольку вакцины в настоящее время отсутствуют.

5 Таким образом, существует выраженная необходимость в новых вакцинах и лекарственных средствах, позволяющих осуществлять быструю индукцию нейтрализующих антител, для профилактики и лечения вызываемой вирусом Шмалленберга инфекции.

Описание изобретения

10 Решение указанной выше технической проблемы достигается с помощью представленных в описании вариантов осуществления изобретения, которые охарактеризованы в формуле изобретения.

Таким образом, различные объекты изобретения осуществляют согласно формуле изобретения.

15 Одним из объектов изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов вируса Шмалленберга (SBV), где иммуногенная композиция предпочтительно содержит SBV.

Так, в композиции, предлагаемой в изобретении, предпочтительно содержится SBV в качестве одного или нескольких антигенов SBV, или один или
20 несколько антигенов SBV предпочтительно представляет(ют) собой SBV, соответственно. Следовательно, иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, представляет собой прежде всего иммуногенную композицию, содержащую вирус Шмалленберга (SBV).

В контексте настоящего описания понятие «антиген» относится, прежде
25 всего, к любой молекуле, фрагменту или субстанции, способной вызывать иммунный ответ. Ответ включает клеточные и/или гуморальные иммунные ответы. В зависимости от требуемой функции композиции в нее следует включать один или несколько антигенов, которые могут быть включены.

В другом предпочтительном объекте изобретения антиген SBV или SBV,
30 содержащийся в иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, является инактивированным.

Таким образом, согласно одному из объектов изобретения иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, предпочтительно представляет собой

иммуногенную композицию, которая содержит инаktivированный вирус Шмалленберга (SBV).

В контексте настоящего описания понятие «инаktivированный» означает, что антиген не вызывает заболевание, когда его вводят млекопитающему-

5 хозяину, или не реплицируется в клетке-хозяине.

В изобретении предложена также иммуногенная композиция, содержащая SBV или антиген SBV, где SBV содержит:

10 малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 97,8%, предпочтительно по меньшей мере на 99% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7,

средний (M) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или

15 большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3.

Предпочтительно указанный SBV содержит указанный малый (S) сегмент РНК, указанный средний (M) сегмент РНК и указанный большой (L) сегмент РНК.

20 Согласно другому объекту изобретения SBV или антиген SBV можно получать путем инаktivации SBV или антигена SBV, где указанный SBV содержит:

25 малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 97,8%, предпочтительно по меньшей мере на 99% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7,

30 средний (M) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или

большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3.

Все последовательности в перечне последовательностей указаны в направлении 5'→3. Последовательности SEQ ID NO: 1-3 и 7 кодируют кДНК, имеющие положительную полярность (+ цепь). Понятие «обратно комплементарная» означает, что последовательность является антипараллельной референс-последовательности.

Предпочтительно указанный SBV содержит указанный малый (S) сегмент РНК, указанный средний (М) сегмент РНК и указанный большой (L) сегмент РНК.

Следует понимать, что в контексте настоящего описания понятие «сегмент РНК» эквивалентно понятиям «сегмент генома» или «сегмент», которые часто применяют в контексте вируса Шмалленберга.

Предпочтительно указанный в настоящем описании малый (S) сегмент РНК имеет последовательность РНК, которая является обратно комплементарной последовательности ДНК, идентичной по меньшей мере на 97,8%, более предпочтительно по меньшей мере на 98,5%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,5% или наиболее предпочтительно на 100% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, или предпочтительно малый (S) сегмент РНК, представленный в настоящем описании, имеет последовательность РНК, которая является обратно комплементарной последовательности ДНК, идентичной по меньшей мере на 97,8%, более предпочтительно по меньшей мере на 98,5%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,5% или наиболее предпочтительно на 100% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7.

Предпочтительно средний (М) сегмент РНК, указанный в настоящем описании, имеет последовательность РНК, которая является обратно комплементарной последовательности ДНК, идентичной по меньшей мере на 83%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% или наиболее предпочтительно на 100% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

Предпочтительно большой (L) сегмент РНК, указанный в настоящем описании, имеет последовательность РНК, которая является обратно

комплементарной последовательности ДНК, идентичной по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% или наиболее предпочтительно на 100% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3.

5 В контексте настоящего описания понятие «иммуногенная композиция» относится, прежде всего, к композиции, которая должна вызывать иммунный ответ у млекопитающего и/или у насекомого, подвергнутого воздействию композиции. Иммунный ответ может включать индукцию антител и/или индукцию Т-клеточного ответа.

10 В контексте изобретения идентичность последовательностей устанавливают на основе попарного сравнительного анализа последовательностей. Для целей настоящего изобретения попарные сравнительные анализы последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW, которая применяется в анализе Mega5 (К. Tamura и др.,
15 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2011, сс. 2731-2739), с использованием задаваемых по умолчанию параметров (штраф за введение бреши 15 и штраф за расширение бреши 6.66; матрица весов для ДНК: ClustalW 1.6; вес перехода 0,5). Идентичности выровненных
20 последовательностей рассчитывали с использованием программы BioEdit, версия 7.0.9.0.

Следует иметь в виду, что в контексте настоящего описания понятие «последовательность, идентичная с» эквивалентно понятию «последовательность, идентичная нуклеотидной последовательности». Так, как
25 указано в настоящем описании, понятие «последовательность идентична SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8» эквивалентно понятию «последовательность идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8», понятие «последовательность идентична SEQ ID NO: 5» эквивалентно понятию «последовательность идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:
30 5», а понятие «последовательность идентична SEQ ID NO: 6» эквивалентно понятию «последовательность идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6».

В контексте настоящего описания подразумевается, прежде всего, что понятие «последовательность идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: X» эквивалентно понятию «последовательность идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: X по длине SEQ ID NO: X» или понятию

5 «последовательность идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: X по всей длине SEQ ID NO: X» соответственно. В этом контексте «X» представляет собой любое целое число от 1 до 8, таким образом, «SEQ ID NO: X» обозначает любую из указанных в настоящем описании SEQ ID NO: .

10 Согласно другому предпочтительному объекту изобретения указанный в настоящем описании SBV содержит:

 сегмент S РНК, отличающийся тем, что сегмент S РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 97,8%, предпочтительно по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8,

15 сегмент М РНК, отличающийся тем, что сегмент М РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 82,2% SEQ ID NO: 5 и/или

 сегмент L РНК, отличающийся тем, что сегмент L РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 93% SEQ ID NO: 6,

20 и где, прежде всего, указанный SBV содержит указанный малый (S) сегмент РНК, указанный средний (М) сегмент РНК и указанный большой (L) сегмент РНК.

Предпочтительно указанный в настоящем описании SBV содержит:

 сегмент S РНК, отличающийся тем, что сегмент S РНК имеет

25 последовательность РНК, идентичную по меньшей мере на 97,8%, более предпочтительно по меньшей мере на 98,5%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,5% или наиболее предпочтительно на 100% SEQ ID NO: 4, или

30 последовательность РНК, идентичную по меньшей мере на 97,8%, более предпочтительно по меньшей мере на 98,5%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,5% или наиболее предпочтительно на 100% SEQ ID NO: 8; и/или

 сегмент М РНК, отличающийся тем, что сегмент М РНК имеет последовательность РНК, идентичную по меньшей мере на 83%, более

предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% или наиболее предпочтительно на 100% SEQ ID NO: 5; и/или

5 сегмент L РНК, отличающийся тем, что сегмент L РНК имеет последовательность РНК, идентичную по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% или наиболее предпочтительно на 100% SEQ ID NO: 6.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «последовательность, идентичная на 100%» эквивалентно понятию «является идентичной».

10 Предпочтительно инактивированный SBV можно получать путем инактивации SBV посредством тепловой обработки или предпочтительно посредством обработки инактивирующим вирус агентом, при этом для инактивации применяют прежде всего азиридиновое производное, наиболее предпочтительно бинарный этиленимин (БЭИ).

15 Согласно предпочтительному объекту изобретения БЭИ добавляют к антигену в конечной концентрации 10мМ или менее, причем при создании изобретения неожиданно было установлено, что конечная концентрация, составляющая менее 4мМ, является достаточной для инактивации антигена. Таким образом, БЭИ предпочтительно добавляют к антигену до достижения конечной концентрации менее 4мМ, более предпочтительно до конечной концентрации от 0,5 до 3,5мМ, наиболее предпочтительно до конечной концентрации от 1 до 3мМ.

20 После добавления БЭИ смесь предпочтительно выдерживают при перемешивании в течение 48 ч или менее, предпочтительно в течение 24 ч или менее, наиболее предпочтительно в течение промежутка времени, составляющего от 6 до 18 ч, например, в течение 12 ч. Температура смеси в процессе перемешивания смеси предпочтительно составляет $37\pm 5^{\circ}\text{C}$, наиболее предпочтительно $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

30 Кроме того, было установлено, что для активации антигена достаточно осуществлять только одну стадию инактивации, например, путем добавления БЭИ к антигену.

После осуществления процедуры инактивации оставшийся инактивирующий вирус агент предпочтительно нейтрализуют путем добавления нейтрализующего агента в смесь, предпочтительно в молярном избытке по сравнению с количеством инактивирующего вирус агента, добавленного к антигену. Если для инактивации применяют азиридиновое производное, то для 5 нейтрализации предпочтительно используют нуклеофил, который размыкает трехчленное кольцо. БЭИ предпочтительно нейтрализуют путем добавления тиосульфата натрия, предпочтительно в 1,1-10-кратном молярном избытке, наиболее предпочтительно в 2-8-кратном молярном избытке относительно количества БЭИ, добавленного к антигену. 10

В предпочтительном объекте изобретения иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, содержит SBV в количестве, эквивалентном вирусному титру, составляющему меньшей мере примерно 10^5 TCID₅₀/мл на дозу, предпочтительно от 10^5 до 10^7 TCID₅₀/мл на дозу, более предпочтительно 15 примерно 10^6 TCID₅₀/мл на дозу.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, содержащая SBV в количестве, эквивалентном вирусному титру, составляющему менее $10^{5,5}$ TCID₅₀/мл на дозу, предпочтительно менее 10^5 TCID₅₀/мл на дозу, является 20 достаточной для предупреждения РНК-емии SBV у животного, прежде всего у овцы.

Таким образом, иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, которая предпочтительно содержит SBV в количестве, эквивалентном вирусному титру, составляющему менее $10^{5,5}$ TCID₅₀/мл на дозу, предпочтительно менее 25 10^5 TCID₅₀/мл на дозу, более предпочтительно от 10^3 до 10^5 TCID₅₀/мл на дозу, наиболее предпочтительно от 10^4 до 10^5 TCID₅₀/мл на дозу, является предпочтительной для применения в способе индукции иммунного ответа против SBV и/или предупреждения или снижения виремии или дефектов развития, индуцированных SBV, и/или предупреждения или снижения передачи 30 SBV, предпочтительно у овцы.

В контексте настоящего описания подразумевается, что «РНК-емия» означает, прежде всего, обнаружение РНК (например, методом на основе

амплификации нуклеотидной последовательности или ПЦР с обратной транскрипцией) в образце, полученном из организма животного, прежде всего в образце плазмы, сыворотки или цельной крови.

5 В контексте настоящего изобретения подразумевается, прежде всего, что
виремия, индуцируемая SBV, сопутствует или сопровождается соответственно РНК-емией SBV в образце сыворотки крови животного. Таким образом, виремию, индуцированную SBV, можно исследовать посредством обнаружения специфической РНК SBV в сыворотке животных.

10 Согласно другому предпочтительному объекту изобретения иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, содержит SBV, титр до инактивации которого составляет по меньшей мере примерно 10^6 частиц SBV на миллилитр, предпочтительно TCID₅₀/мл от 10^6 до 10^8 частиц SBV на миллилитр, более предпочтительно примерно 10^7 частиц SBV на миллилитр.

15 В контексте настоящего описания понятие «титр до инактивации» относится прежде всего к количеству суспендированного неактивированного SBV.

В частности, иммуногенная композиция предлагаемая в изобретении, дополнительно содержит один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов, где указанный(ые) один или несколько
20 фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов предпочтительно выбирают из группы, состоящей из растворителей, диспергирующих сред, адъювантов, стабилизаторов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых средств, агентов для придания изотоничности и замедляющих адсорбцию средств.

25 Согласно наиболее предпочтительному объекту изобретения иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, содержит дополнительно один или несколько адъювантов, предпочтительно гидроксид алюминия и/или сапонин, например, Alhydrogel и/или Quil-A, при этом наиболее предпочтительной является комбинация гидроксида алюминия и сапонины.

30 Другой объект изобретения относится к иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, предназначенной для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины.

Следующий объект изобретения относится к иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, предназначенной для применения в способе индукции иммунного ответа против SBV и/или для предупреждения или снижения виремии или пороков развития, индуцированных SBV, и/или для предупреждения или снижения переноса SBV.

Указанный объект изобретения относится, прежде всего, к иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, которая предназначена для применения в способе индукции иммунного ответа против SBV у жвачных животных и/или насекомых, и/или для предупреждения или снижения виремии у жвачных животных, и/или предупреждения или снижения пороков развития, индуцируемых SBV у плода или у новорожденных жвачных животных, и/или для предупреждения или снижения передачи SBV членистоногими-переносчиками, предпочтительно насекомыми, и/или для предупреждения или снижения передачи SBV от беременного животного (матери) плоду.

В контексте настоящего описания понятие «индукция иммунного ответа» касательно антигена или композиции обозначает развитие гуморального и/или клеточного иммунного ответа у животного на антиген, присутствующий в представляющей интерес композиции.

В контексте настоящего описания понятие «предупреждение» или «снижение», или «осуществление предупреждения», или «осуществление снижения» соответственно означает (но, не ограничиваясь только этим) процесс, который включает введение антигена SBV, а именно, антигена SBV, предлагаемого в изобретении, который включен в композицию, предлагаемую в изобретении, животному, где указанный антиген SBV после введения указанному животному вызывает или способен вызывать иммунный ответ у указанного животного против SBV. В целом, такая обработка приводит к снижению клинических признаков заболевания, вызываемого SBV, или клинических признаков, ассоциированных с заражением SBV соответственно. Более конкретно, в контексте настоящего описания понятие «предупреждение» или «осуществление предупреждения» означает, как правило, процесс профилактики, при котором животное подвергают воздействию иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, до индукции или начала процесса заболевания, вызываемого SBV.

В контексте настоящего описания «снижение клинических признаков, ассоциированных с заражением SBV» означает (но, не ограничиваясь только ими) снижение количества зараженных индивидуумов в группе, снижение или уменьшение до нуля количества индивидуумов, у которых проявляются

5 клинические признаки инфекции, или снижение серьезности любых клинических признаков, имеющих у индивидуумов, по сравнению с инфекцией дикого типа. Например, это может относиться к любому снижению патогенной нагрузки, выделения патогена, снижению передачи патогена или снижению любых
10 клинических признаков, симптоматических для заражения SBV, прежде всего, передачи SBV от матери к плоду, или пороков развития, индуцируемых SBV у плода жвачного животного или новорожденного жвачного животного.

Предпочтительно указанные клинические признаки у индивидуумов, которым вводят композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, снижают по меньшей мере на 10% по сравнению с индивидуумами, которым не вводили
15 композицию и которые могут подвергаться заражению. Более предпочтительно, клинические признаки у индивидуумов, которым вводят композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, снижают по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%.

20 Понятие «снижение виремии, индуцируемой SBV» (или в другом варианте «снижение РНК-емии, индуцированной SBV») обозначает (но, не ограничиваясь только этим) снижение количества вируса SBV, попадающего в кровоток животного, при этом уровень виремии, т.е. количество копий РНК SBV на миллилитр сыворотки крови или количество бляшкообразующих колоний на
25 декалитр сыворотки крови снижают в сыворотке крови индивидуумов, которым вводят композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, по меньшей мере на 50% по сравнению с индивидуумами, которым не вводят композицию и которые могут подвергаться заражению. Более предпочтительно уровень
30 виремии снижают у индивидуумов, которым вводят композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 99,9%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,99% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,999%.

В контексте настоящего описания понятие «виремия» означает, прежде всего, состояние, при котором частицы вируса Шмалленберга размножаются и циркулируют в кровотоке животного, прежде всего млекопитающего или насекомого.

5 Понятие «животное» в контексте настоящего описания относится, прежде всего, к млекопитающему или насекомому.

Предпочтительно, указанное в настоящем описании млекопитающее представляет собой жвачное животное. Более предпочтительно указанное в настоящем описании животное выбирают из группы, состоящей из крупного
10 рогатого скота, овец, коз, оленей, лосей, жирафов, бизонов, американских лосей, яков, буйволов, верблюдов, альпак, лам, антилоп, вилорогих антилоп и антилоп нильгау. Наиболее предпочтительно млекопитающее или жвачное животное, указанное в настоящем описании, выбирают из группы, состоящей из крупного рогатого скота, овец и коз.

15 Указанное в настоящем описании насекомое предпочтительно выбирают из группы, состоящей из мелких двукрылых насекомых, прежде всего, относящихся к *Culicoides spp.*, жалящих мух и комаров.

Кроме того, в изобретении предложена композиция вакцины, предназначенной для лечения или предупреждения SBV или для
20 предупреждения или снижения виремии или пороков развития, индуцированных SBV, и/или для предупреждения или снижения передачи SBV, где вакцина содержит иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении.

В частности, в изобретении предложена композиция вакцины, которая содержит иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, для
25 применения в способе индукции иммунного ответа против SBV у жвачных животных и/или насекомых, и/или для предупреждения или снижения виремии у жвачных животных или насекомых, и/или для предупреждения или снижения пороков развития, индуцируемых SBV у плода жвачных животных или новорожденных жвачных животных, и/или для предупреждения или снижения
30 передачи SBV членистоногими-переносчиками, предпочтительно насекомыми.

В контексте настоящего описания понятие «пороки развития» относится, прежде всего, к пороку развития, выбранному из врожденного порока развития позвоночного столба (кифоз, лордоз, сколиоз, искривление шеи) и/или черепа

(макроцефалия, укорочение нижней челюсти), разнообразных пороков развития головного мозга (гидроцефалия, порэнцефалия, гипоплазия мозжечка, гипоплазия ствола головного мозга) и спинного мозга, пороков развития и/или ригидности передних и/или задних конечностей. Более конкретно, понятие

5 «пороки развития» относится к порокам развития у ягнят, козлят и телят.

В изобретении предложен также способ получения инфекционного SBV, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых:

заражают клетки, предпочтительно клетки млекопитающих или насекомых SBV,

10 культивируют зараженные клетки,
собирают SBV, продуцируемый указанными клетками.

В контексте настоящего описания понятие «инфицировать (заражать)» относится, прежде всего, к процессу приведения в контакт клеток с SBV, например, посредством инокуляции.

15 Указанное заражение клеток SBV включает, прежде всего, прикрепление вируса к клетке, проникновение вируса в клетку, декапсидацию вириона в цитоплазме, репликацию и транскрипцию вирусного генома, экспрессию вирусных белков и сборку, и высвобождение новых инфекционных вирусных частиц.

20 В контексте настоящего описания понятие «культивирование» относится, прежде всего, к поддержанию и предпочтительно росту клеток в пригодных условиях.

В контексте настоящего описания понятие «сбор» относится, прежде всего, к сбору супернатанта, который содержит вирусные частицы, например,
25 посредством центрифугирования контейнера, содержащего культуру инфицированных вирусом клеток, и последующей декантации клеточного супернатанта.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что SBV сохраняет инфекционность и, следовательно свой антигенный потенциал, в том
30 случае, когда осуществляют его пересев поочередно в клетки насекомых и клетки млекопитающих.

Таким образом, изобретение относится, в частности, к способу получения предпочтительно инфекционного SBV, прежде всего к вышеуказанному способу,

в котором осуществляют пересев SBV попеременно в клетки насекомых и клетки млекопитающих.

Таким образом, способ получения инфекционного SBV согласно изобретению заключается, прежде всего, в том, что осуществляют стадии, на

5 которых:

- (а) заражают клетки насекомых SBV,
- (б) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (а),
- (в) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (б),
- (г) заражают клетки млекопитающих SBV, собранным на стадии (в),
- 10 (д) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (г), и
- (е) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (д), или осуществляют стадии, на которых:

- (г) заражают клетки млекопитающих SBV,
- (д) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (г),
- 15 (е) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (д)
- (ж) заражают клетки насекомых SBV, собранным на стадии (е),
- (з) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (ж), и
- (и) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (з).

В данном случае нумерация стадий (г)-(и) эквивалентна нумерации (а')-(е')
20 и она была выбрана из соображений ясности, принимая во внимание другие представленные в настоящем описании стадии (начинающиеся с «(к)»).

Предпочтительно способ получения SBV, предлагаемый в изобретении, включает стадии, на которых:

- (а) заражают клетки насекомых SBV,
- 25 (б) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (а),
- (в) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (б),
- (г) заражают клетки млекопитающих SBV, собранным на стадии (в),
- (д) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (г),
- (е) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (г),
- 30 (ж) заражают клетки насекомых SBV, собранным на стадии (е),
- (з) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (ж), и
- (и) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (з).

Более предпочтительно способ получения инфекционного SBV, предлагаемый в изобретении, дополнительно включает стадии, на которых:

- (к) заражают клетки млекопитающих SBV, собранным на стадии (и),
- (л) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (к), и
- 5 (м) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (л), и необязательно
- (н) заражают клетки насекомых SBV, собранным на стадии (м),
- (о) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (н), и
- (п) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (о).

10 Таким образом, согласно одному из объектов изобретения способ получения инфекционного SBV, предлагаемый в изобретении, включает стадии, на которых:

- (а) заражают клетки насекомых SBV,
- (б) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (а),
- 15 (в) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (б),
- (г) заражают клетки млекопитающих SBV, собранным на стадии (в),
- (д) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (г),
- (е) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (г),
- (ж) заражают клетки насекомых SBV, собранным на стадии (е),
- 20 (з) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (ж), и
- (и) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (з),
- (к) заражают клетки млекопитающих SBV, собранным на стадии (и),
- (л) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (к), и
- (м) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (л),
- 25 и необязательно
- (н) заражают клетки насекомых SBV, собранным на стадии (м),
- (о) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (н), и
- (п) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (о).

Клетки насекомых, применяемые в способе получения SBV, предлагаемом в изобретении, предпочтительно представляют собой клетки линии КС.

30 В качестве клеток млекопитающих в способе получения SBV, предлагаемом в изобретении, предпочтительно применяют клетки линии ВНК, прежде всего клетки линии ВНК-21.

Наиболее предпочтительно в способе получения SBV, предлагаемом в изобретении, клетки насекомых представляют собой КС-клетки, а клетки млекопитающих представляют собой ВНК-клетки, прежде всего клетки линии ВНК-21.

5 Кроме того, изобретение относится также к SBV, который можно получать способом получения SBV, предлагаемым в изобретении.

Кроме того, в изобретении предложен способ получения инаktivированного SBV или иммуногенной композиции, предлагаемого/предлагаемой в изобретении, заключающийся в том, что
10 осуществляют стадии, на которых:

(А) заражают клетки SBV, где клетки представляют собой, прежде всего, клетки почки обезьяны, предпочтительно клетки линии Ma104 или линии Ma104-AK, или где клетки представляют собой клетки линии ВНК, предпочтительно клетки линии ВНК-21,

15 (Б) культивируют зараженные клетки,

(В) собирают SBV, продуцированный указанными клетками, и

(Г) инаktivируют указанный SBV путем тепловой обработки или инаktivирующим вирус агентом.

Если в способе получения инаktivированного SBV или иммуногенной
20 композиции, предлагаемого/предлагаемой в изобретении, предпочтительно применяют Ma104-клетки или Ma104-AK-клетки, то этот подход дает преимущество, заключающееся в том, что он позволяет снижать или минимизировать нежелательные реакции, прежде всего аллергические реакции, возникающие при введении животному инаktivированного SBV или
25 иммуногенной композиции, полученного/полученной указанным способом.

В частности, предпочтительно на стадии (А) способа получения инаktivированного SBV, предлагаемого в изобретении, или иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, клетки заражают SBV, который можно получать способом получения SBV, предлагаемым в изобретении.

30 Таким образом, в изобретении предложена также комбинация (I) способа получения инфекционного SBV, предлагаемого в изобретении, и (II) способа получения инаktivированного SBV, предлагаемого в изобретении, или

иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, где указанные способы осуществляют последовательно.

Предпочтительно в способе получения инфекционного SBV, предлагаемого в изобретении, и/или в способе получения инаktivированного SBV или
5 иммуногенной композиции, предлагаемого/предлагаемой в изобретении, клетки заражают SBV с MOI, составляющим 0,00001–0,01, предпочтительно с MOI 0,0001–0,001.

Наиболее предпочтительно, когда в способе получения SBV, предлагаемого в изобретении, и/или в способе получения инаktivированного SBV или
10 иммуногенной композиции, предлагаемого/предлагаемой в изобретении, клетки культивируют в среде, содержащей 1-10% FCS, более предпочтительно содержащей 2-6% FCS, и/или когда клетки культивируют при температуре 25-38°C, предпочтительно 36-38°C, более предпочтительно примерно при 37°C. Можно также культивировать клетки в отсутствии FCS.

15 Изобретение относится также к SBV, который можно получать способом получения инаktivированного SBV или иммуногенной композиции, предлагаемым в изобретении, и, кроме того, в изобретении предложен также инаktivированный SBV, который можно получать с помощью комбинации (I) способа получения инфекционного SBV, предлагаемого в изобретении, и (II)
20 способа получения инаktivированного SBV, предлагаемого в изобретении, или иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, где указанные способы осуществляют последовательно.

Согласно другому объекту изобретения предпочтительно в способе получения инфекционного SBV, предлагаемого в изобретении, и/или способе
25 получения инаktivированного SBV, предлагаемого в изобретении, или иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, SBV содержит:

малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 97,8%, предпочтительно по меньшей мере на 99% нуклеотидной
30 последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7,

средний (М) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или

большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3,

и/или где указанный SBV содержит

5 сегмент (S) РНК, отличающийся тем, что сегмент (S) РНК имеет последовательность, которая идентична по меньшей мере на 97,8%, предпочтительно по меньшей мере на 99% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8,

10 сегмент (M) РНК, отличающийся тем, что сегмент (M) РНК имеет последовательность, которая идентична по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, и/или

сегмент (L) РНК, отличающийся тем, что сегмент (L) РНК имеет последовательность, которая идентична по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6.

15 В изобретении предложен также SBV, предпочтительно выделенный SBV, который содержит:

малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 97,8%, предпочтительно по меньшей мере на 99% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7,

20 средний (M) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или

25 большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратнo комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3

Кроме того, в изобретении предложен предпочтительно выделенный SBV, прежде всего, указанный выше SBV, который содержит:

30 сегмент (S) РНК, отличающийся тем, что сегмент (S) РНК имеет последовательность, которая идентична по меньшей мере на 97,8%, предпочтительно по меньшей мере на 99% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8,

сегмент (М) РНК, отличающийся тем, что сегмент (М) РНК имеет последовательность, которая идентична по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, и/или

сегмент (L) РНК, отличающийся тем, что сегмент (L) РНК имеет последовательность, которая идентична по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6.

Под объем изобретения подпадает также рассматриваемая композиция, которую можно получать с помощью любого из вышеуказанных способов, где композиция предпочтительно представляет собой иммуногенную композицию, прежде всего, вакцину.

Следующий объект изобретения относится к применению иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или предупреждения инфекции SBV и/или для лечения или предупреждения виремии или пороков развития, индуцируемых SBV, и/или предупреждения или снижения передачи SBV у животного, нуждающегося в указанном лечении.

В изобретении предложен также способ получения иммунного ответа на SBV у животного, заключающийся в том, что указанному животному вводят иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении.

Еще один объект изобретения относится к способу лечения или предупреждения инфекции SBV или лечения или предупреждения виремии или пороков развития, индуцируемых SBV, у животного, нуждающегося в указанном лечении, заключающийся в том, что указанному животному вводят в терапевтически эффективном количестве композицию вакцины, предлагаемую в изобретении.

В изобретении предложен также способ индукции иммунного ответа против SBV и/или предупреждения или снижения виремии или пороков развития, индуцируемых SBV, и/или предупреждения или снижения передачи SBV у животного или в стаде животных, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, животному, нуждающемуся в этом.

В вышеуказанных способах иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, или вакцину, предлагаемую в изобретении, соответственно

предпочтительно вводят в виде однократной дозы или более предпочтительно в виде двух доз.

Пример 1

Подробное описание первого выделения SBV

5 Клетки линии ВНК-21 нашли широкое применение для выращивания ортобуньявирусов. Благодаря этому вирус SBV впервые был успешно выделен с использованием указанной клеточной линии исследователями из FLI в ноябре 2011 г. Кроме ВНК использовали клетки личинок *Culicoides variipennis* (обозначены как КС-клетки, полученные из Коллекции клеточных линий для
10 ветеринарной медицины, Институт Фридриха Лёффлера, Грейфсвальд-Инзель Римс, Германия). КС-клетки инкубировали в течение 10 дней с разрушенной путем обработки ультразвуком кровью, разведенной в среде Шнейдера. Затем клетки лизировали путем замораживания и оттаивания. Лизатом инокулировали монослой клеток почки детеныша хомячка-21 (ВНК, клон 13). Через 1 ч лизат
15 удаляли и заменяли минимальной эссенциальной средой Игла (ЕМЕМ). Через 5 дней проявлялось выраженное цитопатическое действие, и анализ супернатанта культуры на присутствие нового вируса дал положительные результаты, по данным специфической сРТ-qПЦР (изолят 2) величина C_q составляла примерно 14, при этом величина $TCID_{50}$ на мл составляла 3×10^6 .

20 Процесс получения: Общее описание

Процесс получения, описанный ниже, осуществляли, следуя стандартным методам получения, например, его осуществляли в стерильных условиях и после проверки соблюдения правильных технологических условий, таких как воздушная фильтрация.

25 Описание процесса получения:

1. Получение MSV (исходный вакцинный вирус)

Для получения MSV (исходный вакцинный вирус) применяли изолят 2 SBV. Роллер-флаконы, засеянные клетками ВНК-21 (5×10^7 клеток), заражали с величиной MOI, равной 0,0001. После инкубации в течение 54 ч роллер-флаконы
30 замораживали при -20°C , подвергали оттаиванию и центрифугировали при 2000g в течение 5 мин. Собирали супернатант и аликвоты по 1 мл помещали на хранение при -80°C до использования в следующем процессе.

2. Получение антигена SBV

Клетки линии ВНК-21 (рабочая клеточная культура - WCS) хранили в замороженном состоянии в жидком азоте. WCS подвергали оттаиванию и размножали в колбах для клеточных культур (Т-160 см²) с использованием среды ЕМЕМ, дополненной обработанной гамма-излучением 10% FCS. Клетки трипсинизировали с помощью рекомбинантного (не животного происхождения) трипсина. Содержимое одной колбы Т160 обрабатывали трипсином и ресуспендировали в 150 мл среды ЕМЕМ, дополненной 2% FCS. Эту клеточную суспензию использовали для засева одного роллер-флакона (495 см²). Роллер-флаконы, содержащие клеточную суспензию, помещали в инкубатор при 37°C и вращали со скоростью 0,5 об./мин. Через 12-16 ч после посева клетки высевали с плотностью 5×10^7 на флакон. Заражение осуществляли с величиной MOI, составляющей 0,0001. Клетки непрерывно инкубировали при 37°C и вращали со скоростью 0,5 об./мин в течение 50-56 ч до тех пор, пока специфическое цитопатическое действие (ЦПД) SBV не поражало примерно 60-70% клеток. В этот момент времени все роллер-флаконы замораживали при -20°C и затем подвергали оттаиванию в водной бане при 37°C, и помещали на хранение при -80°C до использования в следующем процессе.

Титрование вируса осуществляли согласно следующей процедуре:

Необходимые материалы:

1. Клетки линии ВНК-21 (клон 13)
2. Колбы Т75
3. Плоскодонные 96-луночные планшеты
4. Плоскодонные 48-луночные планшеты
5. 8-канальная матричная пипетка фирмы Thermo + наконечники
6. 8-канальная пипетка 50-1250 фирмы Eppendorf + наконечники
7. Резервуар для многоканальных пипеток
8. Трипсин + ЭДТК
9. Среда ZB5
10. Пипетки 5, 10 и 25 мл
11. Пипеточный дозатор типа Pipetboy
12. Инвертированный микроскоп.

Процедура

- Обрабатывают трипсином содержащиеся в колбе T75 клетки с высокой степенью конфлюэнтности и осторожно ресуспендируют в 20 мл среды (10% FCS).
- 5 • Добавляют 100 мл среды (0% FCS) и хорошо перемешивают.
- Полученную клеточную суспензию сливают в резервуар для многоканальных пипеток.
- С использованием многоканальной пипетки вносят по 100 мкл клеточной суспензии в лунки первых 8 столбцов 96-луночных планшетов.
- 10 • Помещают планшеты в CO₂-инкубатор при 37°C в атмосферу на 6-12 ч для того, чтобы дать клеткам прикрепиться.
- По истечении указанного периода времени подготавливают 48-луночные планшеты и в каждую лунку вносят по 1080 мкл бессывороточной среды.
- Лунки первой колонки инокулируют 120 мкл предназначенного для титрования материала.
- 15 • Сначала перемешивают содержимое в лунках первой колонки, которые инокулировали материалом, с использованием 8-канальной пипетки Эппендорф с программой Р/М (четыре раза осуществляют пипетирование 120 мкл и смешение 620 мкл).
- 20 • Удаляют наконечники.
- Из лунок первой колонки забирают пипеткой (с новыми наконечниками) по 120 мкл, вносят в лунки второй колонки и перемешивают.
- Удаляют наконечники.
- Повторяют указанный процесс, пока не заполнят последнюю колонку.
- 25 • С использованием матричной пипетки аспирируют 800 мкл из первого ряда 48-луночного планшета (который содержит серийный разведения одного образца).
- При присоединении наконечников их необходимо зажимать плотно, но не слишком сильно, иначе функция матрицы не будет выполняться.
- 30 • Распределяют по 100 мкл в 8 рядов 96-луночного планшета.
- Инкубируют при 37°C в течение 3-4 дней.
- Считывают результаты с использованием инвертированного микроскопа.

3. Препараты вакцины

3.1 Процедура инаktivации

Процесс инаktivации конечного антигена длился в общей сложности 72 ч, применяемая концентрация БЭИ составляла 15мМ. Конечный антиген

5 инаktivировали путем добавления 0,1М БЭИ в соотношении 100 мл на 1 литр предназначенного для инаktivации антигена (конечная концентрация 10мМ). После добавления БЭИ смесь гомогенизировали в течение по меньшей мере 15 мин и проверяли значение рН. После осуществления процесса гомогенизации смесь сливали в стерильный контейнер, который выдерживали при

10 перемешивании при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Через 24 ч осуществляли вторую инаktivацию конечного антигена путем добавления 0,1М БЭИ в соотношении 50 мл на 1 литр подлежащего инаktivации антигена (конечная концентрация 5мМ). После второго добавления БЭИ процесс повторяли в тех же самых условиях, которые описаны выше для первого добавления, но смесь выдерживали при

15 перемешивании в течение 48 ч.

3.2 Нейтрализация оставшегося БЭИ

После завершения процесса инаktivации добавляли 1М раствор тиосульфата натрия в соотношении 5 мл на 1 литр инаktivированного антигена (конечная концентрация 5мМ) для нейтрализации БЭИ. После гомогенизации

20 смеси проверяли значение рН. При необходимости осуществляли регулирование рН с помощью соляной кислоты, доводя его значение до $7,2\pm 0,2$.

3.3 Адъюванты

В качестве адъювантов применяли Alhydrogel (гидроксид алюминия) и Quil-A (сапонин).

4. Эксперимент по проверке концепции на крупном рогатом скоте.

Эксперимент осуществляли с использованием восемнадцати (18) голов крупного рогатого скота возрастом 7 месяцев. Животных разделяли на четыре группы по четыре животных в каждой группе, а оставшиеся два животных служили в качестве контролей контакта. Все животные при начале эксперимента

30 были серонегативными по SBV. Первую группу (четыре животных) вакцинировали, применяя вакцину в дозе, соответствующей $\text{TCID}_{50}/\text{мл } 10^6$ SBV, вторую - $\text{TCID}_{50}/\text{мл } 10^5$ SBV, третью - $\text{TCID}_{50}/\text{мл } 10^4$ SBV и, наконец, четвертую группу не вакцинировали, так же как и оставшихся двух животных, служивших в

качестве контролей контакта. В каждой группе 4 животных вакцинировали путем подкожного введения (2 мл) и спустя 3 недели осуществляли ревакцинацию. Всех животных, на которых проводили опыт, за исключением животных, служивших в качестве контролей контакта, подвергали контрольному заражению через две недели после ревакцинации (доза контрольного заражения, соответствующая $TCID_{50} 10^7$ живого вируса/животное). У всех невакцинированных животных развивалась виремия после контрольного заражения SBV, начиная со дня 3 (dpi, дни после заражения), и она продолжалась в течение 2-3 дней. У вакцинированных животных по сравнению с невакцинированными животными уровень виремии был существенно ниже, и он не сопровождался клиническими симптомами после контрольного заражения SBV.

Пример 2

1. Введение

В этом опыте получали несколько препаратов инактивированной вакцины и затем тестировали на овцах и крупном рогатом скоте в отношении их способности индуцировать нейтрализующие антитела и предупреждать виремию после экспериментального контрольного заражения.

Материалы и методы

Вакцины

Получали пять различных прототипов препаратов вакцины (таблица 1); все они представляли собой препараты инактивированного SBV в водном растворе. SBV выращивали либо на двух различных линиях клеток почки детеныша хомячка (ВНК-21) (вакцины «ВНКСТ-НТ», «ВНК13-НТ», «ВНК13-LT»), либо на клетках линии МА-104 (вакцины «МА-НТ» и «МА-LT»).

Концентрацию антигена получали с использованием инфекционного титра SBV до инактивации бинарным этиленимином (БЭИ), применяя либо «длинный» (с использованием 10мМ БЭИ в течение 72 ч при 37°C), либо «короткий» (с использованием 2мМ БЭИ в течение 12 ч при 37°C) протокол.

Вакцины-кандидаты содержали антиген в следующих концентрациях: $TCID_{50}/мл$ (средняя цитопатогенная доза, инфицирующая 50% животных, на мл) 6,1 $\log_{10}$ (МА-НТ) или $TCID_{50}/мл$ 5,7 $\log_{10}$ (ВНКСТ-НТ, ВНК13-НТ, МА-LT) или $TCID_{50}/мл$ 4,7 $\log_{10}$ (ВНК13-LT). В качестве адъювантов применяли

сапонин и гидроксид алюминия (0,125 мкг сапони́на на 1 мл и 6,65 мг гидроксида алюминия на 1 мл для всех препаратов вакцин-кандидатов). Все препараты тестировали в отношении отсутствия бактериального загрязнения и применяли в двух повторностях для осуществления успешной инактивации

5 путем двух пересевов с использованием клеток линии ВНК-21. Значения рН для каждого прототипа вакцины доводили до 6,8-7,2 при 20°C. Вакцины хранили при 4°C до применения.

Таблица 1: Вакцины и группы животных.

Вакцины Название	Линия клеток	Применяемый инфекционный титр	Инактивация	Животные Группа животных	Количество животных
ВНКСТ-НТ	ВНК-21, клон СТ	5,7 log ₁₀ TCID ₅₀ /мл	«длинный» протокол	A (овца)	S01 - S05
ВНК13-НТ	ВНК-21, клон 13	5,7 log ₁₀ TCID ₅₀ /мл	«короткий» протокол	G (корова) B (овца)	C01 - C06 S06 - S10
ВНК13-ЛТ	ВНК-21, клон 13	4,7 log ₁₀ TCID ₅₀ /мл	«короткий» протокол	C (овца)	S11 - S15
МА-НТ	МА-104	6,1 log ₁₀ TCID ₅₀ /мл	«короткий» протокол	D (овца)	S16 - S20
МА-ЛТ	МА-104	5,7 log ₁₀ TCID ₅₀ /мл	«длинный» протокол	H (корова) E (овца)	C07 - C10 S21 - S25
невакцинированный контроль				I (корова) F (овца)	C11 - C16 S26 - S30
				K (корова)	C17 - C22

10 Животные

Двадцать пять не инфицированных SBV овец европейской домашней породы (возрастом 7–9 месяцев) распределяли на 5 групп по 5 животных в каждой, которые одновременно иммунизировали путем подкожного введения одного из прототипов вакцины (см. таблицу 1). Другие 5 овец служили в

15 качестве невакцинированных контролей. Самцов и самок животных распределяли по группам поровну.

Кроме того, 22 негативных по антителам к SBV самок коров голштинско-фризской породы распределяли на четыре группы по четыре (группа H) или шесть (группы G, I и K) животных в каждой. Животных в группах G, H и I

20 иммунизировали путем подкожного введения вакцин ВНКСТ-НТ, МА-НТ и МА-ЛТ соответственно. Корова́ в группе K служили в качестве невакцинированных

контролей. В день первой вакцинации возраст животных составлял от 8 до 12 месяцев.

В каждом случае животных вакцинировали дважды с интервалом в три недели и после второй вакцинации инокулировали как вакцинированным, так и контрольным животным по $2 \times 0,5$ мл полевого штамма SBV, который пересевали только в его естественного хозяина. На протяжении всего опыта ежедневно измеряли ректальную температуру, и ветеринары обследовали животных в отношении клинических признаков.

Отбор образцов, ОТ-ПЦР в реальном времени и серологический анализ

После первой вакцинации брали образцы сыворотки в дни 0, 3, 4, 7 и затем еженедельно. После второй вакцинации образцы сыворотки брали с недельными интервалами. После контрольного заражения образцы сыворотки брали ежедневно в течение первых восьми дней, а затем в дни 14 и 21. Образцы селезенки, миндалин и мезентериальных и нижнечелюстных лимфатических узлов брали при осуществлении аутопсии в дни 22-29 после контрольного заражения и гомогенизировали в 1 мл MEM.

РНК из сыворотки и образцов ткани, взятых при осуществлении аутопсии, экстрагировали с использованием набора MagAttract Virus Mini M48 для автоматической экстракции (фирма Qiagen, Германия) согласно рекомендациям производителя. Геномную нагрузку SBV определяли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-qПЦР) (7) с использованием внешнего стандарта на основе сегмента S генома. Кроме того, образцы сыворотки анализировали методом ELISA с использованием поступающего в продажу антитела к SBV (ID Screen® Schmallerberg virus Indirect, фирма IDvet, Франция), применяя рекомендованное отсекающее значение 70% для относительной оптической плотности по сравнению с положительным контролем, и с помощью стандартного анализа микронейтрализации.

Результаты

Клинические обследования и посмертные обследования

После осуществления первой вакцинации с использованием прототипов вакцины не было выявлено побочных действий; ни у одного животного не было обнаружено лихорадки или другого клинического признака. После второй

вакцинации у одной коровы, иммунизированной вакциной МА-НТ (группа Н) в течение 2 дней имело место небольшое опухание в области инъекции.

После контрольного заражения у одной невакцинированной коровы развилась лихорадка в день 3, у другой была обнаружена слабая диарея, продолжавшаяся три дня. У одного животного в группе I в течение одного дня имели место назальные выделения.

При аутопсии животных не было выявлено никаких значительных макроскопических повреждений. Мезентериальные лимфатические узлы у всех невакцинированных животных, кроме одного (S30), имели позитивный по данным ПЦР статус; в среднем было обнаружено $2,86E+03$ геномных копий на мг (копий/мг). Кроме того, РНК SBV была обнаружена в нижнечелюстных лимфатических узлах у 3 из 5 невакцинированных овец (S27–S29) и у всех контрольных коров (в среднем $2,68E+01$ копий/мг), в миндалинах у S27–S29 и у C18–C20 (в среднем $9,90E+01$ копий/мг) и в селезенке у 4 из 5 невакцинированных овец (S26–S29; в среднем $4,57E+03$ копий/мг) и у двух контрольных телят (C17, C21; в среднем $1,40E+01$ копий/мг). Ни у одного из вакцинированных животных вирусная РНК не была обнаружена.

Гуморальный иммунный ответ

В день первой вакцинации все животные имели негативный статус по данным обоих серологических анализов.

До осуществления контрольного заражения у невакцинированных животных антитела не были выявлены. Через три недели после заражения было установлено, что все контрольные овцы и коровы, за исключением одного животного (S30), имели позитивный статус по данным анализа нейтрализации. Антитела были обнаружены также методом ELISA у коров и у 2 из 5 невакцинированных овец (S26, S29). Несмотря на более высокую ОП образца по отношению к величине ОП положительного контроля (S/P), по данным ELISA обе контрольные овцы S27 и S28 имели негативный статус.

Через три недели после первой иммунизации вакциной ВНКСТ-НТ, ВНК13-НТ или ВНК13-LT (SBV выращен на ВНК-клетках) все овцы и коровы имели негативный статус по данным ELISA, в то время как у S07, S08, S10 (ВНКСТ-НТ) и S04 (ВНК13-НТ) были выявлены низкие титры антител по данным анализа нейтрализации. После второй вакцинации антитела были

выявлены при проведении по меньшей мере одного серологического анализа, в большинстве случаев было обнаружено значительное увеличение нейтрализующий антител. Через три недели после контрольного заражения 8 из 15 овец (S04, S06, S07, S09, S10, S11, S12, S15) и 5 из 6 коров (C01–C05) имели позитивный статус по данным обоих анализов, 7 овец (S01-S03, S05, S08, S13, S14) и оставшаяся корова (C6) имели позитивный статус только по данным теста на нейтрализацию, а S15 – по данным только ELISA.

После одной иммунизации вакцинами МА-НТ или МА-LT (SBV выращенный на МА-104-клетках) все коровы и все овцы за исключением двух имели негативный статус по данным обоих серологических анализов. По данным анализа нейтрализации S22 и S23 имели титры 1:5 и 1:7 соответственно. После второй вакцинации у S19, S24, C08 и C14 антитела не были обнаружены. S16, S21, C07, C09 и C10 имели позитивный статус по данным обоих серологических анализов, в то время как остальные животные имели позитивный статус по данным только анализа нейтрализации. Через три недели после контрольного заражения все овцы в группе D и 4 из 5 овец в группе E имели позитивный статус по данным анализа нейтрализации, у животного S16 антитела не были обнаружены методом ELISA, а животное S24 имело негативный статус по данным обоих анализов. У всех коров в группе H (высокий титр SBV) оказалось возможным выявить антитела как с помощью ELISA, так и с помощью анализа нейтрализации. Такой же результат был получен для C12 и C13 (группа I, низкий титр SB), C11, C15 и C16 имели позитивный статус только по данным анализа нейтрализации, а у C14 ни один из тестов не выявил присутствие антител.

После второй иммунизации было выявлено повышение средних титров нейтрализующих антител, при этом после контрольного заражения в большинстве случаев нейтрализующие титры оставались на постоянном уровне во всех вакцинированных группах.

ОТ-ПЦР в реальном времени

После первой вакцинации геном SBV не был обнаружен ни у одного животного (данные не представлены), что подтверждает успешность инаktivации SBV, проведенной путем как короткой, так и длинной процедуры инаktivации БЭИ.

После контрольного заражения все невакцинированные овцы, кроме одной (S30), имели позитивный статус по данным ОТ-qПЦР в период между днем 2 и днем 4 (S27-S29) или 5 (S26). У 1 из 6 невакцинированных коров (C19) геном SBV оказалось возможным впервые обнаружить в день 1 после заражения, остальные 5 телят впервые были оценены как имеющие позитивный статус в день 2. Геном SBV можно было обнаружить вплоть до дня 5 (C17, C19-C21), 6 (C22) или 7 (C18). Три из 6 коров, иммунизированных вакциной МА-LT (C12, C13, C16), имели позитивный статус по данным ОТ-qПЦР в день 3, в то время как у животных, вакцинированных вакцинами МА-НТ, РНК-емия (присутствие РНК в крови) не развилась после контрольного заражения.

В образцах сыворотки, взятых у всех вакцинированных овец, у контрольной овцы S30 и у всех коров из групп G и H (группы, обработанные вакциной с высоким титром) вирусная РНК не была обнаружена после контрольного заражения.

Заключение

Было создано пять различных препаратов инаktivированной вакцины, после чего они были протестированы на коровах и овцах. В экспериментах ни у одного из животных не были выявлены значительные побочные действия, и у всех животных имела место сероконверсия после вакцинации. Кроме того, у большинства, но не у всех, животных после вакцинации возникали поддающиеся обнаружению уровни антител, нейтрализующих SBV. Важно отметить, что РНК-емия после контрольного заражения полностью предупреждалась при применении четырех прототипов вакцины и значительно снижалась при применении пятого прототипа. Эти данные позволяют сделать предположение о том, что защита от вирусной инфекции лишь частично опосредуется нейтрализующими антителами, и что существуют дополнительные еще не изученные механизмы, наиболее вероятно ассоциированные с клеточным иммунитетом, которые вносят существенный вклад в клиренс вируса после контрольного заражения SBV. Двумя главными характеристиками инаktivированных вакцин являются: (I) полная инаktivация инфекционного вируса, что продемонстрировано путем осуществления пересевов с использованием клеточных культур и установлением отсутствия РНК-емии после первой иммунизации, и (II) индукция защитного иммунитета. Хотя

нейтрализующие антитела не были обнаружены у каждого из вакцинированных животных до контрольного заражения, РНК-емия полностью предупреждалась при применении четырех прототипов вакцины и значительно снижалась при применении пятого прототипа. В рассматриваемом опыте обнаружение вирусной РНК в лимфоретикулярной системе применяли в качестве диагностического инструмента, отличного от выявления РНК-емии. В отличие от контролей, все вакцинированные животные имели четко выраженный негативный SBV-РНК-статус в лимфоидной системе (в лимфоидных органах в момент проведения аутопсии), а также мезентериальных лимфатических узлов. У одной невакцинированной контрольной овцы не было выявлено ни РНК-емии, ни положительных результатов ОТ-qПЦР-анализа образцов ткани, ни сероконверсии после контрольного заражения, причина таких результатов остается невыясненной. Возможными объяснениями могут являться неудачная инъекция или статус (естественный) устойчивости к заражению SBV.

Тем не менее, отсутствие обнаруживаемой РНК в большинстве обработанных вакциной групп позволяет сделать вывод о том, что даже в том случае, когда нельзя обнаружить вирусные геномы (в сыворотке), это не означает, что вирус, вводимый при контрольном заражении, не может передаваться в плод.

Хотя вакцинация позволяет предупреждать или заметно снижать РНК-емию, антитела не были выявлены у каждого животного в каждом тесте до контрольного заражения. В целом, наблюдалась более выраженная корреляция между результатами анализа методом ELISA и результатами анализа нейтрализации для образцов, взятых у коров, чем для образцов, взятых у овец, прежде всего, после контрольного заражения невакцинированного животного.

Наиболее высокие уровни антител во всех группах овец были выявлены при анализе нейтрализации после контрольного заражения невакцинированных овец. Такой же результат был получен после иммунизации несколькими вакцинами против лихорадки долины Рифт и последующего контрольного заражения (8), однако, в этом случае применяемые вакцины не обеспечивали абсолютный иммунитет, а приводили лишь к снижению виремии. В отличие от этого, прототипы вакцины против SBV, охарактеризованные в опыте, проведенном при

создании настоящего изобретения, полностью предупреждали РНК-емию у овец, несмотря на низкий уровень нейтрализующих антител.

В исследовании, проведенном при создании настоящего изобретения, титры нейтрализующих антител зависели от продуцирующей клеточной линии и вирусного титра до инаktivации. Дозовая зависимость для супернатанта клеточной культуры, используемого для получения вакцины, была описана также для АКAV, она имела место вне зависимости от того, применяли инаktivированные или ослабленные живые вакцины (9; 10). Опубликованы данные о том, что для создания вакцины необходимо количество вируса, составляющее по меньшей мере $10^{5,5}$ TCID₅₀/мл. Когда применяли 2 мл вакцины, содержащей вирус, выращенный на МА-104-клетках, с TCID₅₀/мл, составляющей $6,1 \log_{10}$, то она полностью предупреждала РНК-емию, однако у половины телят, иммунизированных с использованием TCID₅₀/мл, составляющей $5,7 \log_{10}$, вирусный геном можно было обнаруживать в течение одного дня, можно предположить, что сходная минимальная доза может иметь место и в случае SBV. Однако, в случае вакцин, полученных с использованием ВНК-21-клеток, более низкий вирусный титр (TCID₅₀/мл, составляющая $5,7 \log_{10}$) полностью предупреждал РНК-емию у обоих видов животных, для овец требовалась величина TCID₅₀/мл, составляющая лишь $4,7 \log_{10}$.

Таким образом, с помощью рассмотренной предназначенной для проверки концепции характеристики различных вакцин-кандидатов удалось продемонстрировать высокую эффективность четырех из пяти прототипов вакцин против SBV для обоих важных видов-мишеней. В результате продемонстрировано, что удалось разработать убитую вакцину против вируса Шмалленберга, которая является эффективной и безопасной для применения на крупном рогатом скоте и овцах. Результаты, полученные в опыте, проведенном при создании настоящего изобретения, свидетельствуют о том, что вакцину на основе инаktivированного SBV можно успешно применять для поддержания усилий, направленных на контроль распространения SBV, а также для предупреждения заболевания домашних жвачных животных.

Пример 3

Ниже описаны альтернативная процедура инактивации и последующий процесс нейтрализации, которые также позволяют осуществлять получение (дальнейшие стадии производства осуществляли согласно процедуре, описанной в примере 1) эффективной вакцины для успешного предупреждения заражения SBV:

Процедура инактивации

Процесс инактивации конечного антигена продолжали в общей сложности в течение 12 ч, применяемая концентрация БЭИ была равна 2мМ. Конечный антиген инаktivировали путем добавления 0,17М БЭИ в соотношении 11,9 мл на 1 литр подлежащего инаktivации антигена (конечная концентрация 2мМ). После добавления БЭИ смесь выдерживали при перемешивании в течение 12 ч при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Нейтрализация оставшегося БЭИ

После завершения процесса инаktivации добавляли 1М раствор тиосульфата натрия в соотношении 10 мл на 1 литр инаktivированного антигена (конечная концентрация 10мМ) для нейтрализации БЭИ.

Пример 4

Ниже описан альтернативный процесс получения MSV (исходный вакцинный вирус), который также позволяет получать (дальнейшие стадии производства осуществляли согласно процедуре, описанной в примере 1, в то время как процедуру инаktivации осуществляли, как описано в примере 3) эффективную вакцину для успешного предупреждения заражения SBV:

5. Получение MSV (исходный вакцинный вирус)

Для получения MSV (исходный вакцинный вирус) применяли изолят 2 SBV. Роллер-флаконы, засеянные Ma104-Ak (5×10^7 клеток), заражали с величиной MOI, равной 0,0001. После инкубации в течение 54 ч роллер-флаконы замораживали при -20°C , подвергали оттаиванию и центрифугировали при 2000g в течение 5 мин. Супернатант собирали и аликвоты по 1 мл помещали на хранение при -80°C до использования в дальнейшем процессе.

6. Получение антигена SBV

Ma104-Ak (рабочий банк клеток - WCS) хранили в замороженном состоянии в жидком азоте. WCS подвергали оттаиванию и размножали в колбах

для культур ткани (Т-160 см²) с использованием среды ЕМЕМ, дополненной обработанной гамма-излучением 10% FCS. Клетки трипсинизировали с использованием рекомбинантного (не животного происхождения) трипсина. Содержимое одной Т160-колбы обрабатывали трипсином и ресуспендировали в 150 мл среды ЕМЕМ, содержащей 2% FCS. Эту клеточную суспензию высевали в один роллер-флакон (495 см²). Роллер-флаконы, содержащие клеточную суспензию, помещали в инкубатор при 37°C и вращали со скоростью 0,5 об./мин. Через 12-16 ч после посева клетки высевали с плотностью 5×10^7 на флакон. Заражение осуществляли с величиной MOI, составляющей 0,001. Зараженные клетки непрерывно инкубировали при 37°C и вращали со скоростью 0,5 об./мин в течение 72-96 ч до тех пор, пока специфическое цитопатическое действие (ЦПД) SBV не поражаало примерно 60-70% клеток. В этот момент времени все роллер-флаконы замораживали при -20°C, затем подвергали оттаиванию в водяной бане при 37°C и помещали на хранение при -80°C до использования в дальнейшем процессе.

В перечне последовательностей:

SEQ ID NO: 1 соответствует полной геномной последовательности сегмента S инфекционного вируса Шмалленберга (BH80/11-4),

SEQ ID NO: 2 соответствует полной геномной последовательности сегмента М инфекционного вируса Шмалленберга (BH80/11-4),

SEQ ID NO: 3 соответствует полной геномной последовательности сегмента L инфекционного вируса Шмалленберга (BH80/11-4),

SEQ ID NO: 4 соответствует последовательности РНК, антипараллельной (т.е. полностью комплементарной и инвертированной) SEQ ID NO: 1,

SEQ ID NO: 5 соответствует последовательности РНК, антипараллельной SEQ ID NO: 2,

SEQ ID NO: 6 соответствует последовательности РНК, антипараллельной SEQ ID NO: 3,

SEQ ID NO: 7 соответствует SEQ ID NO: 1, в которой нуклеотид в положении 9 представляет собой «а» вместо «g», и

SEQ ID NO: 8 соответствует последовательности РНК, антипараллельной SEQ ID NO: 7, и, таким образом, соответствует SEQ ID NO: 4, в которой нуклеотид в положении 831 представляет собой «и» вместо «с».

Ссылки:

Все процитированные в настоящем описании ссылки полностью включены в него в качестве ссылки.

1. B. Hoffmann, M. Scheuch, D. Höper, R. Jungblut, M. Holsteg, H. Schirrmeier, M. Eschbaumer, K.V. Goller, K. Wernike, M. Fischer, A. Breithaupt, T.C. Mettenleiter, M. Beer, Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 2012, cc. 469-472.
2. M.-M. Gariglinany и др., Schmallerberg Virus in calf born at term with porencephaly, Belgium *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 2012, doi: 10.3201/eid1806.120104.
3. M.D. Bowen и др., A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia, *Virology*. **291**, 2001, cc. 185-190.
4. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, под ред. A.M. Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz, изд-во Elsevier, San Diego, USA, 2011, cc. 725-731.
5. R.M. Kinney, C.H. Calisher, Antigenic relationships among Simbu serogroup (Bunyaviridae) viruses, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**, 1981, cc. 1307-1318.
6. M.F. Saeed, L. Li, H. Wang, S.C. Weaver, A.D. Barrett, Phylogeny of the Simbu serogroup of the genus Bunyavirus, *J. Gen. Virol.* **82**, 2001, cc. 2173-2181.
7. Bilk S., Schulze C., Fischer M., Beer M., Hlinak A., Hoffmann B., Organ distribution of Schmallerberg Virus RNA in malformed newborns, *Veterinary microbiology*, 30 марта 2012 г.
8. Kortekaas J., Antonis A.F., Kant J., Vloet R.P., Vogel A., Oreshkova N. и др., Efficacy of three candidate Rift Valley fever vaccines in sheep, *Vaccine*, 30(23), 14 мая 2012 г., cc. 3423-3429.
9. Kurogi H., Inaba Y., Takahashi E., Sato K., Goto Y., Satoda K. и др., Development of inactivated vaccine for Akabane disease, *National Institute of Animal Health quarterly*; 18(3-4), зима 1978 г., cc. 97-108.
10. Kurogi H., Inaba Y., Akashi H., Takahashi E., Sato K., Satoda K. и др., Immune response of various animals to Akabane disease live virus vaccine, *National Institute of Animal Health quarterly*; 19(1-2), лето 1979 г. cc. 23-31.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Бёрингер Ингельхайм Ветмедика ГМБХ
- 5 <120> Вакцина против вируса Шмалленберга (SBV), способы ее
получения и применения
- <130> P01-2825
- 10 <160> 8
- <170> PatentInФ version 3.3
- 15 <210> 1
<211> 839
<212> ДНК
<213> вирус Шмалленберга
- 20 <400> 1
agtagtgagc tccactatta actacagaaa tatgtcaagc caattcattt ttgaagatgt 60
accacaacgg aatgcagcta catttaaccc ggaggtcggg tatgtggcat ttattggtaa 120
gtatgggcaa caactcaact tcggtgttgc tagagtcttc ttcctcaacc agaagaaggc 180
25 caagatgggtc ctacataaga cggcacaacc aagtgtcgat cttacttttg gtgggggtcaa 240
atttacagtg gttaataacc attttcccca atatgtctca aatcctgtgc cagacaatgc 300
30 cattacactt cacaggatgt caggatatct agcacgttgg attgctgata catgcaaggc 360
tagtgtcctc aaactagctg aagctagtgc tcagattgtc atgccccttg ctgagggttaa 420
gggatgcacc tgggccgatg gttatacaat gtatcttgga tttgcacctg gggccgaaat 480
35 gttccttgat gcttttgact tctatccact agttattgaa atgcataggg tcctcaagga 540
caatatggat gtaaatttta tgaaaaagt cctccgccaa cgctatggaa caatgactgc 600
40 tgaagaatgg atgactcaga aaataacaga aataaaagct gcttttaatt ctgttgga 660
gcttgccctg gccaaatctg gattctctcc tgctgctaga accttcttgc agcaattcgg 720
tatcaacatc taaacctctt catcacagat cttcaatttc cgtgcaatat gtctatgtat 780
45 tgcacaccat tatactgcaa ggcttctgtt aagatagtta ataagtgag aacactact 839
- 50 <210> 2
<211> 4373
<212> ДНК
<213> вирус Шмалленберга

<400> 2
agtagtgaac taccacaatc aaaatgcttc tcaacattgt cttgatatct aacttagcct 60
5 gtttagcttt tgcactccca cttaaggaag gcactagagg gtctaggtgc ttcctgaatg 120
gcgaactggg taaaactggt aacacatcaa aggtcgtttc agaatgctgt gtgaaagacg 180
acatatctat cattaaatca aatgctgaac attataaatc aggagatcgg ttggctgctg 240
10 taataaaata ttatcgttta tatcagggtga aggattggca ttcttgcaat ccaatttatg 300
atgaccacgg ttcctttatg atattagata tagataatac tggcacatta atccctaaaa 360
15 tgcatacatg cagagttgaa tgcgaaatag cactgaataa agatactggc gaagttatat 420
tgaattcata tcgaattaac cactaccgaa tctcgggcac aatgcatgta tcaggttggg 480
ttaaaaacaa aattgagatt cctttggaaa acacatgcga atccattgag gtaacatgtg 540
20 gattaaaaac acttaatttt catgcatgtt tccataccca taagtcatgc acccgctatt 600
ttaaaggatc aatcctgccg gaattgatga tcgaatcatt ttgtacgaat cttgaattaa 660
25 tactgctagt aactttcata ttagttgggt ctgtcatgat gatgatattg acgaaaacat 720
atatagtata tgtgttcatt cctatatattt atccatttgt gaaattatat gcttatatgt 780
acaacaaata ttttaaattg tgtaaaaatt gcctgttagc agtacatccc ttacaaatt 840
30 gcccatcgac atgcatctgt ggaatgattt aactaccac tgaatcactc aaattgcatc 900
gcatgtgtaa caattgttct ggctataaag cattgccgaa aacaaggaaa ttgtgtaaaa 960
35 gtaaaatata caatatagtg ctatgtgtga taacatcact gatatttttc tcatttatca 1020
cacctatata gagtcaatgt atcgatatag aaaaactgcc agacgagtat attacatgta 1080
aaagagagct agctaataac aaaagcttga caattgatga cacatatagc tttatatatt 1140
40 cctgtacatg cataattgtg ttaatattac ttaaaaaggc agcaaagtat atcttgact 1200
gcaactgcag cttttgtggg atggtacatg aacgacgtgg attgaagata atggacaact 1260
45 ttacaaacaa gtgcctaagt tgtgtatgcg cagaaaacaa gggcttaaca attcacagag 1320
cctctgagaa atgtctgttc aaatttgaat caagttataa taggaccggg ttgataatct 1380
ttatgcttct gttagtccca acaattgtaa tgacgcaaga aactagtatt aactgcaaaa 1440
50 acattcaatc aactcagctt acaatagagc acctgagtaa gtgcatggca ttttatcaaa 1500

ataaaacaag ctcaccagtt gtaatcaatg aaataatttc agatgcttca gtagacgaac 1560
aagaattaat aaaaagttta aacttgaact gtaatgtcat agataggttt atttccgaat 1620
5 ctagtggttat tgagactcaa gtttattatg agtatataaa atcacagttg tgccctctcc 1680
aagtgcata gaattttcact atcaattcag caagtaacat acaatggaaa gcaactggccc 1740
gaagtttcac cttaggagtg tgcaatacga atcctcataa acatatatgt agatgcttgg 1800
10 agtctatgca aatgtgcaca tcaaccaaga cagaccacgc tagggaaatg tcaatatatt 1860
atgatggtca tccagatcgc tttgagcatg acatgaaaat aatattgaat ataatgagat 1920
15 atatatgtccc tggattaggt cgagtccttg ttgatcaaat caaacaaca aaagactacc 1980
aagctttacg ccacatacaa ggtaagcttt ctctaaatc gcagtcaaat ttacaactta 2040
aaggatttct ggaatttggt gattttatcc ttggtgcaaa cgtgacaata gaaaaaacc 2100
20 ctcaaacatt aactacatta tctttgataa aaggagccca cagaaacttg gatcaaaaag 2160
atccaggtcc aacaccaata ctggtatgca aatcaccaca aaaagtggta tgctactcac 2220
25 cacgtggtgt cacacacca ggagattata tatcatgcaa atctaagatg tataagtggc 2280
catctttagg ggtatacaaa cataatagag accagcaaca agcctgcagc agtgacacac 2340
attgcctaga gatgtttgaa ccagcagaaa gaacaataac tacaaaaata tgcaaagtaa 2400
30 gtgatatgac ttattcagaa tcgcatata gtactggaat accatcatgc aacgtgaaga 2460
gatttggatc atgtaatgta aggggtcatc aatggcaaat tgcagaatgc tcaaatggct 2520
35 tattttacta tgtttcagct aaagcccatt cgaaaactaa cgatataaca ctgtactgtt 2580
tatcagcaaa ttgcctggac ttgcgttatg cattcagatc cagtagttgt tcagatatag 2640
tatgggatac aagttatcga aataaattaa cacctaaatc tattaatcat ccagatattg 2700
40 aaaactacat agcagcgctt cagtcagata ttgcaaatga tttaactatg cactacttta 2760
aaccattaaa aaaccttcca gcaataattc ctcaatacaa acaatgaca ttgaatgggg 2820
45 acaaggatc aaatggtatt agaaatagtt atatcgagtc gcacatccct gcaattaatg 2880
gtttatcagc agggattaat attgccatgc caaatggaga aagcctcttt tccattatta 2940
tctatgtcag aagagtaata aataaagcat cgtatcgatt tctatatgaa acaggaccca 3000
50 caattggaat aaatgccaag cacgaagagg tatgtaccgg gaagtgccca agccaatac 3060

cacatcaaga tgggtggggtc acattctcaa aggaaagatc aagtaattgg ggctgtgaag 3120
 aatgggggttg cttggcaata aatgatgggtt gtttatatgg gtcattgtcaa gacataataa 3180
 5 ggcctgaata taagatatatc aagaagtcta gtattgaaca aaaggatggtt gaagtttgta 3240
 taaccatggc ccatgaatca ttctgcagta ccgttgatgt tctccaacct ttaattagcg 3300
 acaggataca attagatatc caaacgattc aaatggactc tatgccaaat ataattgcag 3360
 10 tcaagaatgg gaaagtttat gttggagata tcaatgactt aggttcgaca gcaaagaaat 3420
 gtggctcagt ccaattatat tctgaaggga tcattggatc gggaacccca aaatttgatt 3480
 15 atgtttgcca tgcattcaat cgtaaagatg tcattccttcg aagatgcttt gataactcat 3540
 atcagtcttg tcttctcttg gaacaagata atacattaac tattgcttct accagtcata 3600
 tggaagtgca taaaaaagtt tcaagcgtgg gtacaatcaa ttataaaatt atgttagggg 3660
 20 attttgacta caatgcatat tcaacacaag caacagtcac aatagatgag atcaggtgtg 3720
 gtggttgta tggctgcct gaaggaatgg cttgcgcact caaattgagt accaatacca 3780
 25 tcgggagttg ttcaataaaa agtaactgcg atacatacat taaaataata gcagtcgac 3840
 cgatgcagag cgagtattcc attaagttaa actgccact agcaacagag acagtttcag 3900
 taagtgtgtg ctcagcttct gcttacacaa aaccttcaat atctaaaaat caacaaaaa 3960
 30 ttgttttgaa ttccttagat gaaacatctt acatcgagca acatgataaa aagtgttcta 4020
 catggctttg cagagtttat aaagaaggga ttagcgtaat atttcagcct ctatttgga 4080
 35 acctatcttt ctattggaga ctgacaatat atataataat ctctttgatt atgctaattc 4140
 tgtttctata catattaata cactgtgca aacggctaaa aggtttattg gaatacaatg 4200
 agagaatata ccaaatggaa aataaattta agtgataagc cttataacaa tgagcaatta 4260
 40 taaatgaata aataaaaaa ataaaagata aacaaataac aacatatata tgtggttaca 4320
 catatatatg taattattca gctgagaagt tttcatgtg gtagaacact act 4373
 45
 <210> 3
 <211> 6882
 <212> ДНК
 <213> вирус Шмалленберга
 50
 <400> 3
 agtagtgtac ccctaattac aatcactatg gagacataca agattaacat ttttagagat 60

aggatcaacc agtgtcgaag tgctgaagaa gccaaagaca ttgttgctga tcttctcatg 120

5 gctagacatg actactttgg tagagaggta tgttattacc tggatatcga attccggcag 180

gatgttccag cttacgacat acttcttgaa tttctgccag ctggcactgc tttcaacatt 240

cgcaattgta caccagacaa ttttatcatt cacaatggca agctttatat cattgactat 300

10 aaagtatcaa ctgatcatgc atatggtcaa aaaacttatg aaaagtacac ccagatcttt 360

ggagacgcat tgtcagaatt gccgtttgat tttgaagttg tgatcatccg tgctgaccct 420

15 ctgcgagata ctatccatgt taattcaaat caattcttgg aaatatttgg gccgctcaac 480

ataaaccttg attttacttg gttctttaat ttgcgatccc tgatatatga gaaatataag 540

gatgacgaca gattcctaga aattgtgaat caaggtgaat ttacgatgac tggaccctgg 600

20 attgatgagg ataccccgga gctctattca caccctgtct ttttggaatt ctatgattct 660

ttagatgaga tggctaaact gacattccat gagtctatga catttgatgc aactcgcggt 720

gagaaatgga atcaaaatct acaaaaggtt ataaatagat atggcaatga ttataacatt 780

25 tttgtgaaag aggccgctgc aggaatcttt agatgtgaag ggaactaccc aaaaccaaatt 840

catgatgaaa tcacaatcgg ttggaatcaa atggttcaaa gagtgagtac tgagagaaac 900

30 ctgactcaag atgtcagcaa gcaaaaacca tctattcatt tcatatgggg tcaacctgac 960

gaaacatcaa atgcgacaac accaaaacta atcaagattg caaaagcact ccaaaatatt 1020

tctggcgagt ctacatatat aagcgatttc agagcattgg gtatgcttat ggacttttct 1080

35 gagaacacag ctttatatga agcacacact agcaaactaa aaagtatggc aagacagaca 1140

tcgaaaagaa ttgatactaa actggaacca atcaaaatag gcacggcgac aatttattgg 1200

40 gaacagcagt ttaaactgga tactgaaata atgaatacaa aagacaaatc acatttgcta 1260

aaagattttc ttggcatagg gggtcacgtg caattttcaa aaaagaccat tgacgatttg 1320

gatactgaca aacctactat attagatttc aacaaaaagg aagtcattga tttttgcaaa 1380

45 ttccagtatg aaaatgtaaa gaaaatacta tccggagata ataactaga gcgtatagga 1440

tgttatttag aagaatatgg tgcaaatatt gcatcatgtt caaaggatac atgggatcag 1500

50 attaaccaga tagggaagtc aaattactgg gcttgtatta aagatttttc agtcttgatg 1560

aaaaatatgt tggcagtttc tcaatataat aggacaata cttttcgtgt agtgtgttgt 1620

gcaaacaata atctgttttg gtttgtaatg ccttcttctg atattaaagc aaagcgatcc 1680

5 acacttgttt acttcttagc tgtgttgcat tctactcttc agaattgtgat gcaccacggt 1740

gcattgcatg cgacatttaa aactgggtca aaatacctta gtatctctaa aggaatgcgt 1800

ttagataaag aacgatgtca acgcatagtt agttcaccgg gactttttat gttgactaca 1860

10 ttgatgtttg caggagacaa tccgacactc aatttgactg atgtcatgaa ttttacattc 1920

cacacttccc tgtctataac caaagctatg ctgtcattga cagaaccatc aagatatatg 1980

15 ataatgaatt cattagccat atccagtcac gttagagatt atatagcaga aaaatttggc 2040

ccttatacaa agaccagctt ctctgtagta atggcaaact tgattaaaag gggatgttat 2100

atggcatata atcaaagaga taaagtagac atgaggaata tctgcctaac agattatgaa 2160

20 ataactcaaa aagggtgtgag agataacaga gacctatcat caatctgggt tgaaggctat 2220

gtatcactaa aagaatatat taaccaaata tatctaccat tttacttcaa ttcaaaaggt 2280

ttgcatgaaa agcatcatgt tatgatagat ctggctaaga caatcttaga tatagaaagg 2340

25 gaccagagat taaatatccc aggaatatgg tctacaacac ctagaaaaca aactgcaaat 2400

ttaaatataa ctatctatgc agttgcaaaa aatctaataa tggacactgc tagacataat 2460

30 tatattagat cacggataga aaacacaaac aacttaaata gatcgatatg cactatttct 2520

acattcacca gctctaaatc atgtattaaa gtaggcgact ttgagaaaga aaaaagctca 2580

gcaacaaaaa aggctgcaga ttgcatgtca aaagagataa agaagtatac aattgcaaac 2640

35 ccagaatttg ttgatgaaga gttactaaat gcaactataa gacattcacg ctatgaagac 2700

ttaaaaaaag caatcccgaa ttatattgac attatgtcaa ctaaagtatt tgattctctg 2760

40 taccagaaaa taaaaaggaa ggagatagat gataaaccca ctgtgtatca tatactctct 2820

gctatgaaga atcacacaga ttttaagttt acattcttta acaaaggcca aaaaacagca 2880

aaggataggg aaatattcgt aggcgaattt gaggcaaaaa tgtgcttgta tttagtggag 2940

45 aggatatcta aagaacgctg taagttgaat ccagatgaga tgattagtga accaggcgat 3000

tctaaattga aaaaattaga agagcttgca gagtctgaaa tacgattcac agcagcaact 3060

50 atgaaacaga tcaaagaacg ctatttagca gaaatgggag aagcaagcca tatgatcgca 3120

tataaaccac attctgttaa gattgaaatc aatgcagaca tgtcaaaatg gagtgcccaa 3180

gatgttttat tcaaataattt ctggttgttt gcattagatc ccgcacttta tctgcaagaa 3240
5 aaagaaagga tattgtactt cctatgcaat tatatgcaaa aaaagctaatt tctgcctgat 3300
gaaatgctct gtagcatcct tgaccaacgt atcaaacaatg aggatgatat aatatatgaa 3360
atgaccaatg gcttatcgca aaattgggtc aatattaaac ggaactggct gcaggggaat 3420
10 ctcaattaca caagtagcta cctacattca tgttctatga atgtttataa ggatattcta 3480
aagagagcag ccactttact agaaggggaa gtttttagtca attctatggt tcattctgat 3540
15 gacaatcaca cttcaatagt gatgatccaa gataaattag atgatgatat tgttattgaa 3600
ttttctgcaa aactatttga aaaaatatgt ctaacttttg gaaatcaagc aaatatgaag 3660
aagacatata taacaaattt cataaaggag ttcgtttcac tttttaatat ttatgggtgag 3720
20 ccattttctg tttatggctg ctttattttg acatctgttg gcgattgtgc ttttcttgga 3780
ccatatgagg atgttgccag taggttgtct gcaacgcaga cagcaattaa gcatggagca 3840
cctccatcac ttgcatggac tgctattgca ttaactcagt ggataacaca tagcacatat 3900
25 aacatgcttc caggtcaaatt caatgatcct acttcatctt tacctagtca tgatagattt 3960
gagctgccta tagaattgtg tggcttaata aattcagaat taccactat agctatagca 4020
30 ggtttggaag cagataatct aagttattta gttaggttat caaaaagaat gtcccctata 4080
catctttgcc gtgaaccaat ccagcatcaa tatgagaata tacatacatg ggatataagt 4140
aaactgacac aatgtgatat tttcagactt aagcttttaa gatacatgac gttagactca 4200
35 actatgtcat ctgatgatgg aatgggcgaa actagtgaat tgagatctag gtctcttctg 4260
acaccaagaa aattcactac tgcaagttcg ttatctagat tgcattcata tgctgattat 4320
40 caaaaaacaa tacaagacca acagaaaatt gaagaattat ttgaatattt tatagccaac 4380
cctcaactat tggttacaaa aggtgagact tgtgaagagt tctgtatgtc tgtattgttc 4440
agatacaaca gtcgtaaatt taaagaatca ttgtctattc aaaaccagc tcagctcttc 4500
45 atagaacaag tattgtttgc aaataaacca atgatagact atacaagtat tcatgatagg 4560
ttgtttggta tacaagatga cccaaatata aatgatgcta catgtattat tggcaagaag 4620
50 acttttgttg aaacatatca gcaataaaaa attgatgtag aaaaatttac acttgatgta 4680
gaggatataa agacgatata tagcttctgt ataatgaacg accctatatt agttgcttgt 4740

gcaaacaact tgttaatttc aatacagga gtggagatgc aacgattggg tatgacatgc 4800

5 tgttatatgc cggagattaa gagccttaaa gtaatttatc atagtcctgc tctcgtatta 4860

cgtgccttatg taacagataa ctatgagcaa aaagggatgg agccagatga aatgcggaga 4920

gatatatatc atttagaaga atttatagag aagacaaaat tgaggacaaa tatgcaaggg 4980

10 agaattgcaa ataatgaaat taagttaatg aagcgagatt tgaaatttga agtgcaggaa 5040

ttgactaaat tctatcagat ctgttatgaa tatgtgaaat caacagaaca caaaattaaa 5100

15 atattcatcc ttccaaaaaa ggcttacact cccattgatt tctgctcatt agtaacaggt 5160

aatctgatat cagacaacaa atggatgggt gttcactatt taaaacaaat aactgtccca 5220

gcaaagaagg cacaatatgc cacatctata gatctgaaa tacaatatgc ctacgaatgt 5280

20 ttcaggctaa ttgcacattt tgctgatatg ttcctaaatg atgactccaa aaaagcttat 5340

attaatgcaa ttattaacac atatacatc aaggatgttc aagtatccag tctctacaag 5400

aaaatcaaaa attcgagact acgttcaaaa attataccat tattatatca cctgggagat 5460

25 ttgcaacaaa tagacgttga cagatttgat gcagaaaaag cagaagagca gatcacatgg 5520

aataactggc aaacatctcg agaatttact actggtccaa ttgatctatc aatcaaaggt 5580

30 tatggacggg caataaggat cgtaggtgag gacaacaagc ttacagctgc agaaatgcaa 5640

ttgtcaagag tgagaagtga tatagtatca aggcatggac aggctttatt gaacaaacct 5700

catgggctaa aattagagaa aatggaacca gtgactgac taaatcctaa attatggtat 5760

35 attgcatacc aattgcgtga gaaaaagcgg tatcactatg gggctcttag tacatcttat 5820

atagaagagc ataactcaag gatagaagca tctcggatac gtaagactaa taaatggata 5880

40 ccagtttgcc ctattgctat atcaaaacaa tcatctgatg gaaagcctag tcttgcaaaa 5940

atccctatgt taaatattgg ggagattaaa tttacaaaac tacagattgc agtagatgat 6000

catgcaatga ttaggaaagc cccatttagt aagatgggtg tctttgatgg cccaccata 6060

45 cagagcgggtg gcattgacat tgaaaagctt atgaagaacc aaaatattct caatttgagg 6120

ttagataata tacagagtat aacattatta gatttgtgcc gcatattttc atgccgaggg 6180

50 tctaaagtgg atcaagatgc atttgaattc ttatctgatg aacctttgga tgaagatggt 6240

attgatgaat tagatagctc acctgcatta gtggtatctt acacaaagaa atcaacaaa 6300

5 tccaatagtt tcaaaaatgt tatagttaga gcattgataa gagaatgtga tatatttgaa 6360
 gatataatgg acataacaga cgatggattc acatctgata gcaatctaga ggtgtttagaa 6420
 aacttaacat ggatttttaa tatgctcgca acaaatcagt ggtctacaga actgtttagca 6480
 tgcatacaca tgtgtttata tcgcaatgag atggatcata tctatcacia ttttcaagtt 6540
 10 ccagaaatat ttgtcgacaa tccaatctca ttaaagttaa agtgggatga agtaattatg 6600
 ttcttaaaca tactgcgaga cagagattac aaatttgagc catgggtgtc tatactgaat 6660
 15 cattccttaa ctaaagctat agagtatgct tacaaaaaga tgggaagagga gaggaagcag 6720
 aatcaacag gcatcaacaa attcttaaag ggtaaaaaaa tgggtggcag atcaaagttt 6780
 gatttccagt agcttgatct taaataatac ataatctttg ccccaaactt gtattatata 6840
 20 aataattcta aagtagtttc atgtaattag gggcacacta ct 6882

 25 <210> 4
 <211> 839
 <212> РНК
 <213> вирус Шмалленберга

 <400> 4
 30 aguaguguuc uccacuuuuu aacuaucuuu acagaagccu ugcaguauaa uggugugcaa 60
 uacauagaca uauugcacgg aaauugaaga ucugugauga agagguuuag auguugauac 120
 cgaauugcug caagaagguu cuagcagcag gagagaaucc agauuuggcc caggcaagcu 180
 35 guccaacaga auuaaaagca gcuuuuuuuu cuguuuuuuu cugagucauc cauucuucag 240
 cagucuuugu uccauagcgu uggcggagga cuuuuuucau aaaaauuaca uccauuuugu 300
 ccuugaggac ccuugcauu ucaauaacua guggauagaa gucaaaagca ucaaggaaca 360
 40 uuucggcccc aggugcaauu ccaagauaca uuguauaacc aucggcccag gugcaucccu 420
 uaaccucagc aaggggcaug acaaucugag cacuagcuuc agcuaguug aggacacuag 480
 45 ccuugcaugu aucagcaauc caacgugcua gauauccuga cauccuguga aguguaaugg 540
 cauugucugg cacaggauuu gagacauuu ggggaaaug guauuaacc acuguaauu 600
 ugaccccacc aaaaguaaga ucgacacuug guugugccgu cuuanguagg accaucuugg 660
 50 ccuucuucug guugaggaag aagacucuag caacaccgaa guugaguugu ugcccauacu 720

	uaccsaauaaa ugccacauac ccgaccuccg gguuaaaugu agcugcauuc cguuguggua	780
	cauciucsaau aaugaauugg cuugacauau uucuguagu uauaguggag cucacuacu	839
5	<210> 5 <211> 4373 <212> РНК <213> вирус Шмалленберга	
10	<400> 5 aguaguguuc uaccasauga aaaacuucuc agcugaauaa uuacauauau auguguaacc	60
15	acauauauau guuguaauuu guuuauuuuu uauuguuuuu auuuauucan uuauauuugc	120
	ucauuguuau aaggcuuau acuuuuuuuu auuuuccauu ugguauauuc ucucuuugua	180
	uuccsaauaaa ccuuuuagcc guuugcacag ugguauuaau auguauagaa acagaauuag	240
20	cauaaucaaa gagauuaaua uauauauugu cagucuccaa uagaaagaua gguugccaaa	300
	uagaggcuga aaauuuacgc uauucccuuc uuuaauaacu cugcaaagcc auguagaaca	360
25	cuuuuuauca uguugcucga uguaagaugu uucaucuaag gaauucaaaa cauuuuuugg	420
	uugaauuuua gauauugaag guuuugugua agcagaagcu gagcacacac uuacugaaac	480
	ugucucuguu gcuagugggc aguuuaacu aauggaauac ucgcucugca ucggaucgac	540
30	ugcuauuuuu uuaauguauug uaucgcagu acuuuuuuuu gaacaacucc cgaugguauu	600
	gguacucaau uugagugcgc aagccauucc uucagggcag ccuaaacaac caccacaccu	660
35	gaucucaucu auugugacug uugcuugugu ugaauaugca uuguagucan auccccuaa	720
	cauaauuuua uaaugauug uaccacgcu ugaacuauuu uuaugcacuu ccuaugacu	780
	gguagaagca auaguuauug uauuaucuug uuccaagaga agacaagacu gauaugagu	840
40	aucaaagcau cuucgaagga ugacaucuuu acgauugaau gcauggcaaa cauaaucaaa	900
	uuuugggguu cccgauccaa ugaucccuuc agaauauauu uggacugagc cacauuucuu	960
45	ugcugucgaa ccuaagucan ugauaucucc aacauaaacu uucccauuc uacugcaau	1020
	uauauuuggc auagagucca uuugaaucu uuggauaucu aauguauc uugcgcuaau	1080
	uaaagguugg agaacaucan cggucugca gaugauuca ugggccaugg uuauacaac	1140
50	uuaacauc uuuguuca uacuagacu cuuguauauc uuauauucag gccuuuuau	1200
	gucugacau gaccacaua aacaaccauc auuuauugcc aagcaacccc auucucaca	1260

	gccccaaaua cuugaucuuu ccuugagaa ugugaccaa ccaucuugau gugguauugg	1320
5	gcuugggcac uucccgguac auaccucuuc gugcuuggca uuuauuccaa uugugggucc	1380
	uguuucauau agaaaucgau acgaugcuu auuuauuacu cuucugacau agauaauau	1440
	ggaaaagagg cuuucuccau uuggcauggc aaauuaaaucc ccugcugaua aaccuuuau	1500
10	ugcagggauug ugcgacucga uauaacuau ucuaauacca uuugauaccu ugucuccauu	1560
	caaugucauu guuuuguauu gaggaauuau ugcuggaagg uuuuuuauug guuuuaua	1620
15	gugcauaguu aaaucauuug caauaucuga cugaagcgcu gcuauguagu uuucaauauc	1680
	uggaugauua auagauuuag guguaauuu auuucgauaa cuuguauccc auacuauauc	1740
	ugaacaacua cuggaucuga augcauaacg caaguccagg cauuuugcug auaaacagua	1800
20	caguguuaua ucguuaguuu ucgaauuggc uuuagcugaa acauaguaua auagccauu	1860
	ugagcauucu gcauuuugcc auugaugacc ccuacauua caugauccaa aucucuucac	1920
25	guugcaugau gguaauccag uacuauaug cgauucugaa uaagucauau cacuuacuuu	1980
	gcuaauuuuu guaguauuug uucuuucugc ugguucaaac aucucuaggc aauguguguc	2040
	acugcugcag gcuuguugcu ggucucuauu auguuuguau accccuaaag auggccacuu	2100
30	auacaucuua gauuugcaug auauauaau uccugggugu gugacaccac guggugagua	2160
	gcuaaccacu uuuuguggug auuugcauac caguauuggu guuggaccug gaucuuuuug	2220
35	auccaaguuu cugugggcuc cuuuuaucaa agauaangua guuaanguuu gagggguuuu	2280
	uucuauguc acguuugcac caaggauaaa aucaacaaau uccagaauc cuuuuaguug	2340
	uaauuuugac ugcauuuag gagaaagcuu accuugauug uggcguaaag cuugguaguc	2400
40	uuuuguuugu uugauuugau caagcaagac ucgaccuau ccagggacua uauaucuau	2460
	uauauucaau auuauuuuca ugucaugcuc aaagcgauuc ggaugaccu cauaauauau	2520
45	ugacauuucc cuagcguggu cugucuuggu ugaugugcac auuugcauag acuccaagca	2580
	ucuacauua uguuuauag gauucguauu gcacacuccu aaggugaaac uucgggccag	2640
	ugcuuuccau ugauguuac uugcugaauu gauagugaaa auaucaugca cuuggagagg	2700
50	gcacaacugu gauuuuauau acucauaaua aacuugaguc ucauaaacac uagauucgga	2760
	aaauaaccua ucuauagacu uacaguucua guuuuauuuu uuuauuuuuu cuuguucguc	2820

	uacugaagca ucugaaauua uuucaugau uacaacuggu gagcuuguuu uauuuugaua	2880
5	aaaugccaug cacuuacuca ggugcucuau uguaagcuga guugauugaa uguuuuugca	2940
	guuaauacua guuucuugcg ucauuacaau uguugggacu aacagaagca uaaagauuau	3000
	caacccgguc cuauuauaac uugauucaa uuugaacaga cauucucag aggcucugug	3060
10	aaugguuag ccuuguuuu cugcgcauac acaacuagg cacuuguuug uaaaguuguc	3120
	cauuaucuc aauccacguc guucauguac cauaccaca aagcugcagu ugcaguacaa	3180
15	gauauacuuu gcugccuuuu uaaguaauu uaacacauu augcauguac aggaauauu	3240
	aaagcuauu gugucauaa uugucaagcu uuugauaua gcuagcucuc uuuuacaugu	3300
	aaauacucg ucuggcaguu uuucuauuc gauacauuga cucgauauag gugugauaaa	3360
20	ugagaaaaau aucagugaug uauacacaca uagcacuaa uuggauuuu uacuuuuaca	3420
	cauuuuccuu guuuucggca augcuuuua gccagaacaa uuguuacaca ugcgauacaa	3480
25	uuugagugau ucagugguag uguaaaucuu uccacagaug caugucgaug ggcauuugu	3540
	aaagggauu acugcuaaca ggcauuuuu acacaauua aaauuuugu uguacauua	3600
	agcauauau uucacaaaug gaaaaauu aggaaugaac acauauacua uauauguuu	3660
30	cgucaauuc aucaucauga cagacccaac uauaugaaa guuacuagca guauaaauuc	3720
	aagauucgua caaaugauu cgaucauaa uuccggcagg auugaucuu uaaaaagcg	3780
35	ggugcaugac uuaugggau ggaaacaugc augaaaaua aguguuuuu auccacaugu	3840
	uaccucaaug gauucgcaug uguuuuccaa aggaucuca auuuuguuuu uaaaccaacc	3900
	ugauacaugc auugugcccg agauucgguu gugguuauu cgauaugaau ucauuauaac	3960
40	uucgccagua ucuuuauca gugcuauuuc gcauucacu cugcauguau gcauuuagg	4020
	gauuaaugug ccaguauuau cuauaucua uaucauaaag gaaccguggu caucauaau	4080
45	uggauugcaa gaaugccaau ccuucaccug auauaaacga uauuuuuu uacagcagc	4140
	caaccgaucu ccugauuuu auuguucagc auuugauuu augauagaua ugucgucuu	4200
	cacacagcau ucugaaacga ccuuugaugu guuaacaguu uuaaccaguu cgccauucag	4260
50	gaagcaccua gaccucuaug ugccuuccuu aagugggagu gcaaaagcua aacaggcuua	4320
	guuagauauc aagacaugu ugagaagcau uuugauugug guaguucacu acu	4373

5	<210>	6		
	<211>	6882		
	<212>	PHK		
	<213>	вирус Шмалленберга		
10	<400>	6		
	aguagugugc	cccuauuac augaaacuac uuugaauua uuuaauaa acagauuugg	60	
	ggcaaagauu	auguaauuu uaagaucag cuacugaaa ucaaacuug aucugccacc	120	
15	cauuuuuuua	cccuuaaga auuuguugau gccuguugau uucugcuucc ucuccucuuc	180	
	caucuuuuug	uaagcauacu cuauagcuu aguaaggaa ugaucagua uagacaccca	240	
	uggcucaaa	uuguaaucuc ugucucgcag uauguuuag aacauaaua cuucauccca	300	
20	cuuuacauuu	aaugagaug gauugucgac aaauuuucu ggaacuugaa aaugugaua	360	
	gauaugaucc	aucucauugc gauauaaaca caugugaug caugcuaaca guucuguaga	420	
	ccacugauuu	guugcgagca uauuuaaaa ccauguuag uuuucuaaca ccucugauu	480	
25	gcuaucagau	gugaauccau cgucuguuau guccauuua ucuucaaaua uaucacauuc	540	
	ucuuaucuu	gcucuaacua uaacauuuu gaaacuauug gauuugguug auuucuuguu	600	
	guaagauacc	acuaaugcag gugagcuauc uauuucuaa auuacauuu cauccaaagg	660	
30	uucacagau	aagaaucaa augcaucuug auccacuua gaccucggc augaaaaau	720	
	gcggcacaaa	ucuaauaau uuauacucug uauuuuauu aaccucaaau ugagaauuu	780	
35	uugguucuuc	auaagcuuuc caaugucaau gccaccgcuc ugaugggug ggccaucaaa	840	
	gaacaccauc	uuacuaaau gggcuuuccu aaucuuugca ugaucucua cugcaaucug	900	
	uaguuuugua	auuuuauu ccccauuuu uaacauaggg auuuuugca gacuaggcuu	960	
40	uccaucagau	gauuguuuug auauagcaau agggcaaacu gguauccau uauuagucu	1020	
	acguauccga	gaugcuucua uccuugagu augcucuucu auauaagau uacuaaagac	1080	
45	cccuauguga	uaccgcuuuu ucucacgcaa uugguugca auauaccau auuuaggau	1140	
	uagaucaguc	acugguucca uuuucucua uuuuagcca ugagguugu ucaauaagc	1200	
	cuguccaugc	cuugauacua uaucacuuc cacucuugac aaugcauuu cugcagcugu	1260	
50	aagcuuguug	uccucaccua cgauccuuu ugaccgucca uaaccuuuga uugauagauc	1320	

	aauuggacca guaguaaaau cucgagaugu uugccaguua uuccauguga ucugcucuuc	1380
	ugcuuuuucu gcaucaaauuc ugucaacguc uauuuguugc aaaucgccca ggugauauaa	1440
5	uaaugguaua auuuuugaac guagucucga auuuuugauu uucuuguaga gacuggauac	1500
	uugaacaucc uuguauguau auguguuaau aaugcauua auauaagcuu uuuuggaguc	1560
10	aucuuuagg aacauaucag caaaaugugc aaauagccug aaacauucgu aggcuaauug	1620
	uauuuccaga ucuauagaug uggcuauuug ugccuucuuu gcugggacag uauuuuguuu	1680
	uaauuaguga acaaccaucc auuuguuguc ugauaucaga uuaccuguua cuaaugagca	1740
15	gaaaucaaug ggaguguaag ccuuuuuugg aaggaugaau auuuuaauuu uguguucugu	1800
	ugauuucaca uauucauaac agaucugaua gaauuuaguc aaauccugca cuucaaauuu	1860
20	caauucucgc uucauuuacu uaauuucuu auuugcauu cucccuugca uauuuguccu	1920
	cauuuuuguc uucucuauaa auucuucuaa augauauaua ucucuccgca uucaucugg	1980
	cuccaucccu uuugucucu aguuauucgu uacauaagca cguauuacga gagcaggacu	2040
25	augauaaauu acuuuaaggc ucuuaaucuc cggcauauaa cagcauguca uacccaaucg	2100
	uugcaucucc acucccugua uugaaauuaa caaguuguuu gcacaagcaa cuaauauagg	2160
30	gucguucauu auacagaagc uauauaucgu cuuuauaucc ucuacaucaa guguaauuuu	2220
	uucuacauca auuuuuuuu gcugauaugu uucaacaaa gucuucugc caauauaca	2280
	uguagcauca uuuaauuug ggucaucuug uauaccaaac aaccuaucau gaauacuugu	2340
35	auagucuauc auugguuuu uugcaaacia uacuuguucu augaagagcu gagcuggguu	2400
	uugaauagac aaugauucuu uaaaauacg acuguuguau cugaacaaua cagacauaca	2460
40	gaacucuua caagucucac cuuuuguuac caauaguuga gggguuggcu uaaaaauuc	2520
	aaauuuucu ucauuuuucu guuggucuug uauuguuuuu ugauaaucag cauaugaaug	2580
	caaucuagau aacgaacuug caguagugaa uuucuuuggu gucagaagag accuagaucu	2640
45	cauuucacua guuucgcca uuccaucauc agaagacaua guugagucua acgucaugua	2700
	ucuuuuuagc uuaagucuga aaauaucaca uugugucagu uuacuauau ccauguaug	2760
50	uauauucua uauugaugcu ggauugguuc acggcaaaga uguauagggg acuuuuuuu	2820
	ugauaaccua acuaauaac uuagauuauc ugcuuccaaa ccugcuauag cuauaguggg	2880

	uaauucugaa uuuaauaagc cacacaauuc uauaggcagc ucaaaucuaa caugacuagg	2940
	uaaagaugaa guaggaucau ugauuugacc uggaagcaug uuauaugugc uauguguuau	3000
5	ccacugaguu aaugcaauag caguccaugc aagugaugga ggugcuccau gcuuaauugc	3060
	ugucugcguu gcagacaacc uacuggcaac auccucauau gguccaagaa aagcacaau	3120
10	gccaacagau gucaaaaaua agcgaccaua aacagaaaau ggcucaccau aaauuuuaa	3180
	aagugaaacg aacuccuuua ugaaaauugu uauauauguc uucuucuaa uugcuugauu	3240
	uccaaaaguu agacauauuu uuucaaaauag uuugcagaa aaucuaaua caauaucauc	3300
15	aucuaauua ucuuggauca ucacuaauga agugugauug ucaucagaau gaaccuaga	3360
	auugacuaaa acuuccccuu cuagaaaagu ggcugcucuc uuuaagaaau ccuaauaac	3420
20	auucauagaa caugaaugua gguagcuacu uguguaauug agauucccu gcagccaguu	3480
	ccguuaaua uugacccaau uuugcgauaa gccauugguc auuucuaaua uuauaucauc	3540
	cucauguuug auacguuggu caaggauugc acagagcauu ucaucaggca gaauuagcuu	3600
25	uuuuugcaua uaaugcaua ggaaguacaa uauccuuuc uuuucuuugc gaauaagugc	3660
	gggaucuaau gcaacaacc agaaaauuu gaauaaaaca ucuugggcac uccauuuuga	3720
30	caugucugca uugauuucaa ucuaaacaga augugguua uaugcgauca uauggcuuugc	3780
	uucucccau ucugcuaua agcgauuuu gaucuguuuc auaguugcug cugugaaucg	3840
	uauuucagac ucugcaagcu cuucuaauuu uuucaauua gaucgccug guucacuaau	3900
35	caucucauc ugaauucau uacagcguc uuuaagauuc cucuccacua aaucacagca	3960
	cauuuuugc ucaaaauugc cuacgaaua uucccuaucc uuugcuguu uuuggccuuu	4020
40	guuaaagaau guaaacuua aaucugugug auucuaaua gcagagagua uaugauacac	4080
	aguggguua ucaucuauc ccuuccuuu uauuuucug uacagagaau caauuacuuu	4140
	aguugacua augucaaua aaucgggau ugcuuuuuu aagucuauc agcgugaug	4200
45	ucuaauaguu gcauuuagua acucuauc acaaaauuc ggguuugca uuguauacu	4260
	cuuaucuc uuugacaugc aaucugcagc cuuuuuugu gcugagcuu uuucuuuc	4320
	aaagucgcc acuuuaauac augauuuga gcuggugaau guagaaauag ugcuaucga	4380
50	ucuaauaag uuguuugugu uuucuaucg ugaucuaaua uauuauguc uagcagugc	4440

	cauuauuaga uuuuuugcaa cugcauagau aguauauuu aaauuugcag uuuguuuucu	4500
	agguguugua gaccauauuc cugggauauu uaaucucugg ucccuuucua uaucuaagau	4560
5	ugucuagcc agaucuauca uaacaugaug cuuuucaugc aaaccuuuug aaugaagua	4620
	aaaugguaga uauauuuggu uaauauauuc uuuuagugau acauagccuu caaaccagau	4680
10	ugaugauagg ucucuguuau cucucacacc uuuuugagu uuuucauaau cuguuaggca	4740
	gauauuccuc augucuacuu uaucucuug auuauaugcc auuaacauc cccuuuuau	4800
	caaguugcc auuacuacag agaagcuggu cuuuguauaa gggccaaaau uuucugcuau	4860
15	auaaucucua acaugacugg auauggcuaa ugaauucauu aucauauauc uugaugguuc	4920
	ugucaaugac agcauagcuu ugguuauaga cagggaagug uggaauguaa aauncaugac	4980
20	aucagucaaa uugagugucg gauugucucc ugcaaacauc aauguaguca acuaaaaag	5040
	ucccgguagaa cuaacuauuc guugacaucg uucuuuauuc aaacgcauuc cuuagagau	5100
	acuaagguau uuugaaccag uuuuaaangu cgcaugcaau gcaccguggu gcaucacauu	5160
25	cugaggagua gaaugcaaca cagcuaagaa guaaacaagu guggaucgcu uugcuuaau	5220
	aucagaagaa ggcauuacaa acccaaacag auuauuguuu gcacaacaca cuacacgaaa	5280
30	aguauuguc cuauuauuu gagaaacugc caacauauuu uucaucaaga cugaaaauc	5340
	uuuaauacaa gcccaguaau uugacuucc uaucugguua aucugaucc auguauccuu	5400
	ugaacaugau gcaauuuug caccuauuuc uucuaauaa cauccuauac gcucuagauu	5460
35	auuauuccg gauaguauu ucuuuacau uucauacugg aaauugcaaa aauncaugac	5520
	uuccuuuuug uugaaaucua auauaguagg uuugucagua uccaaaucgu caauggucuu	5580
40	uuuugaaaau ugcacgugac ccccuaugcc aagaaaauc uuuagcaau gugauuuguc	5640
	uuuuguauuc auuauuucag uauccaguuu aaacugcugu ucccauauaa uugucgccgu	5700
	gccuauuuug auugguucca guuugauuc aaauuuuuc gaugucuguc uugccauacu	5760
45	uuuugauuug cuagugugug cuucauauaa agcuguguuc ucagaaaagu ccuaagcau	5820
	acccaugcu cugaauugc uuauauaug agacucgcca gaaauuuuu ggagugcuuu	5880
50	ugcaaucuug auuaguuuug guguuugcgc auuugauguu ucgucagguu gaccccauau	5940
	gaaaugaaua gaugguuuuu gcuugcugac aucuugaguc agguuucucu caguacucac	6000

	ucuuugaacc auuugauucc aaccgauugu gauuucanca ugauuugguu uuggguaguu	6060
	cccuucacau cuaaagauuc cugcagcggc cucuuucaca aaaauguuau aaucauugcc	6120
5	auaucuauuu auaaccuuuu guagauuuug auuccauuuc ucaccgcgag uugcaucaa	6180
	ugucauagac ucauggaug ucaguuuagc caucucaucu aaagaaucau agaauuccaa	6240
10	aaagacaggg ugugaauaga gcuccggggg uuccucauca auccaggguc cagucaucgu	6300
	aaauucaccu ugauucacaa uuucuaggaa ucugucguca uccuuauuu ucucauauau	6360
	cagggauccg aaauuaaaga accaaguaaa aucaagguuu auguugagcg gcccaauau	6420
15	uuccaagaau ugauuugaau uaacauggau agauucucg agagggucag cacggaugau	6480
	cacaacuca aaaucaaacg gcaauucuga caaugcgucu ccaaagaucu ggguguacuu	6540
20	uucuaaaguu uuugaccu augcaugauc aguugauacu uuauagucua ugauuaaag	6600
	cuugccauug ugaauaaua auuugucugg uguacaauug cgaauugua aagcagugcc	6660
	agcuggcaga aaaucaaga guaugucgua agcuggaaca uccugccgga auucgauauc	6720
25	cagguaauaa cauaccucuc uaccaaagua gucaugucua gccaugagaa gaucagcaac	6780
	aaugucuuug gcuuciuucag cacuucgaca cugguugauc cuaucucuaa aaauuuauu	6840
30	cuuguauguc uccauaguga uuguaauuag ggguaacacua cu	6882
	<210> 7	
	<211> 839	
	<212> ДНК	
35	<213> вирус Шмалленберга	
	<400> 7	
	agtagtgaac tccactatta actacagaaa tatgtcaagc caattcattt ttgaagatgt	60
40	accacaacgg aatgcagcta catttaaccc ggaggtcggg tatgtggcat ttattggtaa	120
	gtatgggcaa caactcaact tcggtgttgc tagagtcttc ttcctcaacc agaagaaggc	180
45	caagatggtc ctacataaga cggcacaacc aagtgtcgat cttacttttg gtgggggtcaa	240
	atttacagtg gtttaataacc attttcccca atatgtotca aatcctgtgc cagacaatgc	300
	cattacactt cacaggatgt caggatatct agcacgttgg attgctgata catgcaaggc	360
50	tagtgtcttc aaactagctg aagctagtgc tcagattgtc atgccccttg ctgagggttaa	420
	gggatgcacc tgggccgatg gttatacaat gtatcttggg tttgcacctg gggccgaaat	480

	gttccttgat gcttttgact tctatccact agttattgaa atgcataggg tcctcaagga	540
5	caatatggat gtaaatttta tgaaaaaagt cctccgccaa cgctatggaa caatgactgc	600
	tgaagaatgg atgactcaga aaataacaga aataaaagct gcttttaatt ctgttgga	660
	gcttgcttgg gccaaatctg gattctctcc tgctgctaga accttcttgc agcaattcgg	720
10	tatcaacatc taaacctctt catcacagat cttcaatttc cgtgcaatat gtctatgtat	780
	tgcacaccat tatactgcaa ggcttctgtt aagatagtta ataagtggag aacactact	839
15	<210> 8 <211> 839 <212> РНК <213> вирус Шмалленберга	
20	<400> 8 aguaguguuc uccacuuuuu aacuaucuaa acagaagccu ugcaguuuaa uggugugcaa	60
	uacauagaca uauugcacgg aaauugaaga ucugugauga agagguuuag auguugauac	120
25	cgaauugcug caagaagguu cuagcagcag gagagaaucc agauuuggcc caggcaagcu	180
	guccaacaga auuaaaagca gcuuuuuuuu cuguuuuuuu cugagucauc cauucuucag	240
30	cagucuuugu uccauagcgu uggcggagga cuuuuuucau aaaaauuaca uccauuuugu	300
	ccuugaggac ccuagcauu ucauaacua guggauagaa gucaaaagca ucaaggaaca	360
	uuucggcccc aggugcaauu ccaagauaca uuguuaaacc aucggcccag gugcaucccu	420
35	uaaccucagc aaggggcaug acaaucugag cacuagcuuc agcuaguug aggacacuag	480
	ccuugcaugu aucagcaauc caacgucua gauauccuga cauccuguga aguguaaugg	540
40	cauugucugg cacaggauuu gagacauuu ggggaaaug guuauaacc acuguaauu	600
	ugacccacc aaaaguaaga ucgacacuug guugugccgu cuuaguagg accaucuugg	660
	ccuucuucug guugaggaag aagacucuag caacaccgaa guugaguugu ugcccauacu	720
45	uaccaauaaa ugccacauac ccgaccuccg gguuaaaugu agcugcauuc cguuguggua	780
	caucuuaaaa aaugaauugg cuugacauau uucuguagu aauaguggag uucacuacu	839

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов вируса Шмалленберга (SBV).

5

2. Иммуногенная композиция по п. 1, где иммуногенная композиция содержит SBV.

10

3. Иммуногенная композиция по п. 1, в которой антиген SBV или SBV является инактивированным.

4. Иммуногенная композиция по п. 1, в которой SBV содержит:

15

(а) малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 97,8% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7;

20

(б) средний (М) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2;

(в) большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3; или
(г) их комбинацию.

25

5. Иммуногенная композиция по п. 1, в которой SBV может быть получен путем инактивации SBV, содержащего:

30

(а) малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 97,8% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7;

(б) средний (М) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2;

(в) большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая
обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по
меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3; или
(г) их комбинацию.

5

6. Иммуногенная композиция по п. 1, в которой указанный SBV содержит:

(а) сегмент S РНК, отличающийся тем, что сегмент S РНК имеет
последовательность, идентичную по меньшей мере на 97,8% SEQ ID NO: 4 или
SEQ ID NO: 8;

10

(б) сегмент М РНК, отличающийся тем, что сегмент М РНК имеет
последовательность, идентичную по меньшей мере на 82,2% SEQ ID NO: 5;

(в) сегмент L РНК, отличающийся тем, что сегмент L РНК имеет
последовательность, идентичную по меньшей мере на 93% SEQ ID NO: 6; или
(г) их комбинацию.

15

7. Иммуногенная композиция по п. 3, в которой SBV инактивирован путем
тепловой обработки или путем обработки инактивирующим вирус агентом.

20

8. Иммуногенная композиция по п. 7, в которой инактивирующий вирус
агент представляет собой азиридиновое производное.

9. Иммуногенная композиция по п. 8, в которой азиридиновое производное
представляет собой бинарный этиленимин (БЭИ).

25

10. Иммуногенная композиция по п. 2, содержащая SBV в количестве,
которое эквивалентно вирусному титру, составляющему по меньшей мере
примерно 10^5 TCID₅₀/мл на дозу.

30

11. Иммуногенная композиция по п. 2, в которой титр SBV до инактивации
составляет по меньшей мере примерно 10^6 частиц SBV на миллилитр.

12. Иммуногенная композиция по п. 1, дополнительно содержащая один
или несколько фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов.

13. Иммуногенная композиция по п. 12, в которой указанный(е) один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов выбраны из группы, состоящей из растворителей, диспергирующих сред, адъювантов, стабилизаторов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых средств, агентов для придания изотоничности и замедляющих адсорбцию средств.

14. Иммуногенная композиция по п. 1, дополнительно содержащая гидроксид алюминия, сапонин или их комбинацию.

15. Композиция вакцины, предназначенная для лечения или предупреждения SBV, содержащая иммуногенную композицию по п. 1.

16. Композиция вакцины, предназначенная для предупреждения или снижения виремии или пороков развития, индуцируемых SBV, которая содержит иммуногенную композицию по п. 1.

17. Композиция вакцины, предназначенная для предупреждения или снижения передачи SBV, которая содержит иммуногенную композицию по п. 1.

18. Способ получения SBV, включающий стадии, на которых:

(а) заражают клетки SBV;

(б) культивируют зараженные клетки; и

(в) собирают SBV, продуцируемый указанными клетками.

19. Способ получения SBV по п. 18, в котором осуществляют пересев SBV попеременно в клетки насекомых и клетки млекопитающих, и который дополнительно заключается в том, что осуществляют стадии, на которых:

(а) заражают клетки насекомых SBV,

(б) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (а),

(в) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (б),

(г) заражают клетки млекопитающих вирусными частицами, собранными на стадии (в),

(д) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (г), и

(е) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (д).

5

20. Способ получения SBV по п. 19, где способ дополнительно включает стадии, на которых:

(г) заражают клетки млекопитающих SBV,

(д) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (г),

10 (е) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (д)

(ж) заражают клетки насекомых вирусными частицами, собранными на стадии (е),

(з) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (ж), и

(и) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (з).

15

21. Способ по п. 18, включающий стадии, на которых:

(а) заражают клетки насекомых SBV,

(б) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (а),

(в) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (б),

20 (г) заражают клетки млекопитающих SBV, собранным на стадии (в),

(д) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (г),

(е) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (д);

(ж) заражают клетки насекомых SBV, собранным на стадии (е),

(з) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (ж), и

25 (и) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (з).

22. Способ по п. 21, дополнительно включающий стадии, на которых:

(к) заражают клетки млекопитающих SBV, собранным на стадии (и),

(л) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (к), и

30 (м) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (л).

23. Способ по п. 22, дополнительно включающий стадии, на которых:

(н) заражают клетки насекомых SBV, собранным на стадии (м),

- (о) культивируют зараженные клетки, полученные на стадии (н), и
- (п) собирают SBV, продуцированный указанными клетками на стадии (о).

24. Способ по п. 19, в котором клетки насекомых представляют собой КС-клетки, а клетки млекопитающих представляют собой ВНК-клетки.

25. Способ по п. 24, в котором клетки млекопитающих представляют собой ВНК-21-клетки.

26. Способ получения инактивированного SBV или иммуногенной композиции по п. 3, включающий стадии, на которых:

- (А) заражают клетки SBV;
- (Б) культивируют зараженные клетки;
- (В) собирают SBV, продуцируемый указанными клетками; и

(Г) инактивируют указанные вирусные частицы путем тепловой обработки или с помощью инактивирующего вирус агента.

27. Способ по п. 26, в котором клетки представляют собой клетки почки обезьяны или ВНК-клетки.

28. Способ по п. 27, в котором клетки почки обезьяны представляют собой Ma104-клетки или Ma104-АК-клетки, а ВНК-клетки представляют собой ВНК-21-клетки.

29. Способ по п. 26, в котором клетки заражают SBV с величиной MOI, составляющей 0,00001–0,01.

30. Способ по п. 26, в котором клетки заражают SBV с величиной MOI, составляющей 0,0001–0,001.

31. Способ по п. 26, в котором клетки культивируют в среде, содержащей примерно 0% FCS.

32. Способ по п. 26, в котором клетки культивируют в среде, содержащей примерно 1-10% FCS.

5 33. Способ по п. 26, в котором клетки культивируют в среде, содержащей примерно 2-6% FCS.

34. Способ по п. 26, в котором клетки культивируют при температуре 25-38°C.

10 35. Способ по п. 26, в котором SBV содержит:

(а) малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 97,8% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7;

15 (б) средний (М) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2;

(в) большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по 20 меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3; или (г) их комбинации.

36. Способ по п. 26, в котором SBV содержит:

25 (а) сегмент S РНК, **отличающийся тем**, что сегмент S РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 97,8% SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8;

(б) сегмент М РНК, **отличающийся тем**, что сегмент М РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 82,2% SEQ ID NO: 5;

30 (в) сегмент L РНК, **отличающийся тем**, что сегмент L РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 93% SEQ ID NO: 6; или (г) их комбинации.

37. SBV, содержащий:

(а) малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 97,8% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7;

5 (б) средний (M) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 82,2% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2;

(в) большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, которая
10 обратно комплементарна нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3; или

(г) их комбинации.

38. SBV, содержащий:

15 (а) сегмент S РНК, отличающийся тем, что сегмент S РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 97,8% SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8;

(б) сегмент M РНК, отличающийся тем, что сегмент M РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 82,2% SEQ ID NO: 5;

20 (в) сегмент L РНК, отличающийся тем, что сегмент L РНК имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 93% SEQ ID NO: 6; или (г) их комбинации.

39. Рассматриваемая композиция, которую можно получать способом по п.
26.

25 40. Композиция по п. 39, где композиция, представляет собой иммуногенную композицию.

41. Композиция по п. 39, где композиция представляет собой вакцину.

30 42. Способ получения иммунного ответа на SBV у животного, включающий введение указанному животному иммуногенной композиции по п. 1.

43. Способ лечения или предупреждения вызываемой SBV инфекции у животного, нуждающегося в таком лечении, включающий введение указанному животному в терапевтически эффективном количестве иммуногенной композиции по п. 1.

5

44. Способ лечения или предупреждения виремии или пороков развития, индуцируемых SBV, включающий введение указанному животному в терапевтически эффективном количестве иммуногенной композиции по п. 1.

10

45. Способ индукции иммунного ответа против SBV в стаде животных, включающий стадию, на которой вводят иммуногенную композицию по п. 1 указанным животным, нуждающимся в этом.

15

46. Способ лечения или предупреждения виремии или пороков развития, индуцируемых SBV, в стаде животных, включающий стадию, на которой вводят иммуногенную композицию по п. 1 указанным животным, нуждающимся в этом.

20

47. Способ предупреждения или снижения передачи SBV в стаде животных, включающий стадию, на которой вводят иммуногенную композицию по п. 1 указанным животным, нуждающимся в этом.

48. Способ по п. 42, в котором иммуногенную композицию вводят в виде одной дозы или в виде двух доз.

25

49. Способ по п. 43, в котором иммуногенную композицию вводят в виде одной дозы или в виде двух доз.

50. Способ по п. 44, в котором иммуногенную композицию вводят в виде одной дозы или в виде двух доз.

30

51. Способ по п. 45, в котором иммуногенную композицию вводят в виде одной дозы или в виде двух доз.

52. Способ по п. 46, в котором иммуногенную композицию вводят в виде одной дозы или в виде двух доз.

53. Способ по п. 47, в котором иммуногенную композицию вводят в виде
5 одной дозы или в виде двух доз.