

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991041** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.11.02

(54) **ВАКЦИНА ПРОТИВ СВИНОГО ПАРВОВИРУСА И ВИРУСА СВИНОГО РЕПРОДУКТИВНОГО И РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА И СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) 16197089.2

(32) 2016.11.03

(33) EP

(86) PCT/EP2017/078020

(87) WO 2018/083156 2018.05.11

(71) Заявитель:

**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Клокке Соня (DE), Кул Роберт Томас,
Эдвардс Кертис Роберт, Хаддадин
Фуад Тавфик, Хэйуик Грегори
Брайан, Кайзер Трой Джеймс, Кролл
Джереми (US), Малбург Соня Режина
Кангизану (BR), Ногера Серрат
Марта (ES), Шеффер Меррилл Линн,
Старкс Андреа Дж. Хедрик, Стюарт
Майкл Лэндон, Вон Эрик Мартин,
Чжао Госун (US)**

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение касается вакцины против свиного парвовируса и вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома для защиты субъекта, предпочтительно свиньи, от заболеваний, связанных со свиным парвовирусом и/или вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома. Настоящее изобретение также касается способов получения иммуногенных композиций, а также таких иммуногенных композиций, проявляющих сниженную вируцидную активность.

A1

201991041

201991041

A1

ВАКЦИНА ПРОТИВ СВИНОГО ПАРВОВИРУСА И ВИРУСА СВИНОГО
РЕПРОДУКТИВНОГО И РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА И СПОСОБЫ ЕЕ
5 ПОЛУЧЕНИЯ

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Эта заявка содержит список последовательностей в соответствии со Сводом
федеральных правил 37 C.F.R. 1.821 – 1.825. Таким образом, список
10 последовательностей, прилагаемый к этой заявке, включен путем ссылки в его
полном объеме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

A. Область изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение касается вакцины против свиного
15 парвовируса и вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома,
специфичной к изолятам, которые способны снижать клинические признаки
заболевания, вызванного свиным парвовирусом и/или вирусом свиного
репродуктивного и респираторного синдрома. Во втором аспекте настоящее
изобретение также касается способов получения иммуногенных композиций, а
20 также таких иммуногенных композиций, проявляющих сниженную вируцидную
активность.

B. Описание уровня техники

Вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRSV)
является представителем семейства вирусов *Arteriviridae* и относится, вместе с
25 *Coronaviridae*, к отряду вирусов *Nidovirales*. PRRSV представляет собой
оболочечный вирус с геномом однонитевой, положительно-полярной РНК из
приблизительно 15 тысяч пар нуклеотидов, включающий девять открытых рамок
считывания (ORF), а именно, ORF1a, ORF1ab, ORF2a, ORF 2ab и ORF 3 - ORF7.
ORF 1a и 1ab кодируют большие полипротеины, преобразуемые в вирусные
30 неструктурные белки (nsp) путем ауто- и транс-расщепления вирусных протеаз
nsp1, nsp2 и nsp4 (Snijder and Meulenberg, 1998). ORF4 кодирует второстепенный
гликопротеин (GP4), который после главного гликопротеина (GP5) и двух
других второстепенных гликопротеинов (GP2a и GP3) находится в вирусной

оболочке, причем все вышеупомянутые гликопротеины важны для образования инфекционного вируса.

PRRSV считается одним из наиболее значительных с экономической точки зрения инфекционных агентов у свиней, вызывая долговременную репродуктивную недостаточность у свиноматок и респираторные заболевания у растущих свиней. Часто инфекция PRRSV осложняется вторичными бактериальными инфекциями, обусловленными иммуносупрессивным характером вируса. Кроме того, вирус PRRSV длится неделями, и вирус затем продолжает обнаруживаться в лимфоидных органах в течение нескольких месяцев, что свидетельствует о трудностях или невозможности выведения вируса через иммунный ответ организма-хозяина (Allende et al., 2000).

Существует два отдельных вирусных генотипа PRRSV, вызывающих подобные клинические симптомы, которые расходятся приблизительно на 40 % на уровне нуклеотидной последовательности: генотип I (EU) и генотип II (US). Североамериканским (US) прототипом штамма является VR-2332, а европейским (EU) прототипом штамма является вирус Lelystad.

Свиной парвовирус представляет собой автономный реплицирующийся вирус семейства *Parvovirinae* рода *Protoparvovirus* в пределах семейства *Parvoviridae*, содержащий молекулу однонитевой ДНК из приблизительно 5100 нуклеотидов (Cotmore et al., 2014: Arch Virol.: 159(5): 1239 - 1247; Molitor et al., 1984: Virology: 137(2): 241 - 54.). Только минус-цепь ДНК является упакованной в вирионы. Геном вируса кодирует три капсидных белка (VP1, VP2, VP3) и один неструктурный белок (NS1). Капсид парвовируса имеет диаметр приблизительно 22 - 25 нанометров состоит из субъединиц VP1 и VP2. Эти белки происходят от поочередно сплайсированных вариантов одной и той же молекулы РНК и, таким образом, частично перекрываются в последовательности. Кроме того, свиной парвовирус демонстрирует высокий уровень подобия последовательностей с вирусом панлейкопении кошек, парвовирусом собак и парвовирусом грызунов (Ranz et al., 1989: J. gen. Virol: 70: 2541 - 2553).

Хотя существуют различия в штаммах свиного парвовируса, некоторые являются крайне патогенными, другие – менее патогенными или совсем непатогенными, когда вирус упрочивается или становится эндемичным в данной стране, оказывается, что патогенные штаммы распространяются среди популяции.

Инфекция свиного парвовируса (PPV) является распространенной причиной репродуктивной недостаточности при разведении свиней во всем мире. Серологические исследования демонстрируют, что свиной парвовирус распространен во всех свиноводческих регионах мира, причем до 80 % животных демонстрируют сероконверсию.

Свиной парвовирус (PPV) вызывает репродуктивную недостаточность у свиней, приводящей к смерти и внутриутробной мумификации, мертворождению и другим проявлениям репродуктивной недостаточности у беременных свиноматок. (Joo & Johnson. 1976. Veterinary Bulletin 46, 653 - 660; Mengeling. 1978. J. Am. Vet. Med. Assoc. 172, 1291 - 1294).

PPV вызывает репродуктивную недостаточность, когда восприимчивые (неиммунные) свиньи и свиноматки инфицируются во время беременности. Это единственное время, когда вирус вызывает заболевание. Инфицирование свиней происходит вследствие потребления вируса с пищей или его вдыхания. Затем PPV циркулирует в системе кровообращения, а у беременных свиней проникает сквозь плаценту и инфицирует развивающиеся эмбрионы и плоды. После природного инфицирования развивается активный иммунитет, который может длиться в течение всей жизни свиньи. При приобретении активного иммунитета до беременности развивающиеся поросята не подвергаются опасности. При рождении поросята приобретают материнский иммунитет в молозиве свиноматки, и этот материнский иммунитет сохраняется до 20-недельного возраста. Чем выше уровень активного иммунитета у свиноматки, тем больше материнского иммунитета переходит к ее поросятам. Впоследствии может происходить естественная инфекция PPV.

Заболевание, вызываемое PPV у свиней, часто называется SMEDI (аббревиатура для мертворождения, мумификации, смерти эмбриона и бесплодия). Если инфицирование происходит на 0 - 30 дни беременности, это может привести к эмбриональной смертности, в результате чего уменьшается размер помета. Наиболее явной особенностью, возникающей вследствие инфекции на 30 - 70 дни беременности, является рождение мумифицированных поросят. Мумификация представляет собой процесс стерильного расщепления тканей поросят, погибающих в матке после начала отвердения скелета. Инфицирование PPV также связано с мертворождением и рождением слабых поросят, если инфицирование происходит на поздних стадиях беременности.

Выкидыш также может быть результатом инфицирования PPV, однако он не является распространенным клиническим признаком этого заболевания. В целом инфекция PPV снижает количество поросят, рождаемых одной свиноматкой в год.

5 Имеющиеся в настоящее время вакцины против PPV производят путем выращивания нативного вируса на первичных клетках свиного происхождения или в устойчивых клеточных линиях. После этого инфекционный вирус выделяют и инактивируют химическими агентами для получения в итоге
10 цельноклеточной убитой противовирусной вакцины. Однако такие процессы выращивания нативного инфекционного вируса проблематичны с точки зрения биозащиты и безопасности.

Субъединичные вакцины на основе рекомбинантных белков могут иметь слабую иммуногенность из-за неправильного складывания белка-мишени или
15 ненадлежащего представления перед иммунной системой. Кроме того, цельноклеточные убитые вакцины представляют все антигены нативного вируса, тогда как в субъединичной вакцине существует ограничение конкретной аминокислотной последовательностью.

Рекомбинантные вакцины против PPV уже описывались в источниках существующего уровня техники, однако до настоящего времени лишь
20 цельноклеточные убитые вакцины выпускаются серийно. Таким образом, похоже, что до сих пор не были разработаны оптимальные рекомбинантные субъединичные вакцины против PPV, которые проявили бы свою эффективность и безопасность. Описанные на данный момент рекомбинантные субъединичные вакцины против PPV не испытывались и не контролировались в экспериментах с
25 лабораторным заражением. Рекомбинантные субъединичные вакцины против PPV, прошедшие оценку, не действовали так же, как цельноклеточные вакцины против PPV, или рекомбинантные субъединичные вакцины против PPV не были безопасными (демонстрировали неблагоприятные реакции).

Были идентифицированы полевые изоляты PPV, которые генетически и
30 антигенно отличаются от вакцинных штаммов. Вирус PPV генотипа 2, PPV-27a, является высоковирулентным у беременных свиней после провокационного инфицирования, что было продемонстрировано через высокую смертность среди плодов свиноматок, инфицированных PPV-27a (85 %), по сравнению со свиноматками, инфицированными другими штаммами PPV, например, PPV-

NADL-2. Однако имеющиеся в данное время серийно выпускаемые вакцины против PPV получают на основе инактивированных цельновирусных препаратов штаммов PPV генотипа 1, выделенных около 30 лет назад (Jozwik et al 2009; Journal of General Virology; 90; 2437 - 2441).

5 Другими источниками существующего уровня техники являются следующие:

Adriaan F.G. Antonis. "A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure" Vaccine 24 (2006) 5481 - 5490.

10 Chen Y. Guo W. "A novel recombinant pseudorabies virus expressing parvovirus VP2 gene: Immunogenicity and protective efficacy in swine" Virology Journal 2011, 8:307.

Merenga et al. "Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine" Appl Microbiol Biotechnol. 2002 Jun; 15 59(1): 45 - 50. Epub 2002 Apr 16.

A. Jozwik, J. Manteufel, H.-J. Selbitz и U. Truyen. Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain. Journal of General Virology (2009), 90, 2437 - 2441.

20 В китайской патентной заявке CN 102 488 895 А раскрывается тройная вакцина на основе вирусоподобных частиц, состоящая из свиного цирковируса, свиного парвовируса и PRRSV. Эта тройная VLP-вакцина содержит главный структурный белок PCV-2 белок CAP, белковый эпитоп PPV VP2 и белковый эпитоп PRRSV GP5.

25 В российской патентной заявке RU 2004108484 А раскрывается инактивированная вакцина против PRRSV и PPV. Эта инактивированная вакцина содержит антигенный материал из штамма вируса PRRS, репродуцированный в перевиваемой клеточной культуре Marc-145 и инактивированный аминоэтилэтиленимином (АЕЕИ), и антигенный материал из штамма PPV, 30 репродуцированный в перевиваемой клеточной культуре YPK и инактивированный АЕЕИ.

В китайской патентной заявке CN 104 288 760 А раскрывается вакцинная композиция, включающая иммунное количество антигена свиного цирковируса 2 типа, иммунное количество антигена PRRSV и антигена PPV.

В китайской патентной заявке CN 102 727 881 A раскрывается высокопатогенный штамм PRRS JXAI-R и бигеминальная живая вакцина против PPV.

5 Публикация Puig et al. (<http://info.hipra.com/DOCS/UNISTRRAIN/PUBLICATIONS/ESPHM-2015/1-Clinical-protection.pdf>) касается вакцинации со смешанным введение инактивированной вакцины ERYSENG Parvo и инактивированной вакцины UNISTRRAIN PRRS производства Hipra.

10 В публикации Zeew E.J.L et al. (Journal of General Virology 2007, 88(2): 420 - 427) описывается исследование вирулентности и способность к перекрестной нейтрализации недавних полевых изолятов парвовируса и вирусов вакцины у экспериментально инфицированных беременных свинок.

Патентная заявка США US 2014/0322267 A1 касается белка ORF2 PCV2 подтипа A (PCV2A) для применения в перекрестной защите.

15 Патентная заявка EP 2 460 818 A2 касается иммуногенных композиций PCV2 и способов получения таких композиций.

Патент США US 7,700,285 B1 касается иммуногенных композиций PCV2 и способов получения таких композиций.

Патентная заявка PCT WO 2013/024113 касается вакцин от гриппа H5.

20 Патентная заявка США US 2015/0283229 A1 касается вакцины против вируса эпизоотической диареи свиней.

Недостатки существующего уровня техники, например, состоят в том, что (I) компонент PPV в традиционной убитой вакцине не является полностью инактивированным (который затем может ввести живой PPV в стадо); (II) отсутствует перекрестная защита от гетерологичных штаммов PPV; отсутствует 25 схема вакцинации, которая защищает свиней и свиноматок случного возраста и плоды от связанных с PPV и PRRSV заболеваний репродуктивной системы.

30 Существует потребность в новой комбинации и/или ассоциированных вакцинах против PRRSV и PPV, которые могли бы успешно применяться против инфекций PRRSV и/или PPV. Также существует потребность в новых способах снижения вируцидной активности композиций, которые обычно демонстрируют определенную степень вируцидной активности; а также в иммуногенных композициях со сниженной или отсутствующей вируцидной активностью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Решение вышеупомянутой(ых) технической(их) проблемы (проблем) достигается благодаря представленному описанию и вариантам осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения и раскрываемых авторами пунктах.

5 Таким образом, изобретение в его разных аспектах воплощается в соответствии с формулой изобретения и раскрываемыми авторами пунктами.

Первое рассмотрение настоящего изобретения

В первом рассмотрении настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, которая включает

а) по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV), причем
10 по меньшей мере один антиген PPV является любым антигеном, содержащимся в PPV, и

б) по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), причем по меньшей мере один антиген вируса PRRS является любым антигеном, содержащимся в вирусе PRRS.

15 Настоящее изобретение также касается комплекта, включающего иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию, как описывается и/или заявляется авторами.

Настоящее изобретение также касается применения иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как описывается
20 и/или заявляется авторами, или комплекта, как описывается и/или заявляется авторами, для приготовления медикамента, предпочтительно вакцины.

Преимущество состоит в том, что экспериментальные данные, обеспечиваемые настоящим изобретением, обнаруживают, что компонент субъединичной вакцины против PPV VP2 в соответствии с настоящим
25 изобретением является безопасным и эффективным для профилактики виремии и инфицирования плода PPV. Кроме того, экспериментальные данные, обеспечиваемые настоящим изобретением, обнаруживают, что компонент субъединичной вакцины против PPV VP2 в соответствии с настоящим изобретением обладает широким спектром защиты, поскольку вакцина защищает
30 от гетерологичных североамериканских, а также гетерологичных европейских штаммов для провокационного заражения.

Преимущество состоит в том, что экспериментальные данные, обеспечиваемые настоящим изобретением, обнаруживают, что компонент субъединичной вакцины против PPV VP2 в соответствии с настоящим

изобретением является столь же эффективной, как и цельный убитый вирус. Широкомасштабных процессов инактивации (которые необходимы для инактивации нативных PPV при получении вакцин на основе цельных убитых вирусов) можно избежать путем применения рекомбинантной субъединичной вакцины, состоящей из PPV VP2.

Другими преимуществами лежащего в основе изобретения являются, например, (I) снижение количества инъекций вакцины, которая вводится животным, что улучшает обращение с животными, уменьшая стресс для животных; (II) уменьшение количества занятых; (III) такая же эффективность, как при однократном введении; (IV) синхронизация действия вакцины, поскольку оба компонента направлены против заболевания репродуктивной системы у беременных свиней; (V) профилактика виремии PPV у вакцинированных свинок после провокации гетерологичным штаммом PPV; (VI) снижение количества мертворождений и мумифицированных поросят в вакцинированных группах после провокации PPV; (VII) увеличение общего количества плодов у вакцинированных против PPV свиноматок; (VIII) 100 % вакцинированных против PPV поросят защищены после провокации PPV; (IX) продолжительность иммунитета (DOI): 6 месяцев; (X) и ReproCyc® PRRS EU, и смешанный ReproCyc® PRRS EU + PPV VP2 были эффективны, с учетом снижения вирусной нагрузки и пропорции зараженных вирусом после провокации; (XI) было продемонстрировано отсутствие препятствования эффективности вакцинации против PRRSV; (XII) начало иммунитета в течение четырех недель может быть установлено для ReproCyc® PRRS EU; (XIII) комбинированная вакцина (PPV VP2 10 мкг + Ery) с Ingelvac® PRRS MLV продемонстрировала эффективность в предотвращении виремии и инфицирования плодов PPV на 40-й день беременности (40 dG).

Второе рассмотрение настоящего изобретения

Во втором рассмотрении настоящее изобретение касается способа получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, причем способ включает этапы в следующем порядке:

- (I) обеспечение / получение смеси, включающей
 - первую жидкость,
 - рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, и

- вектор, включающий нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок;

(II) добавление второй жидкости к смеси с этапа (I), причем вторая жидкость отличается от первой жидкости;

5 (III) промывание и, необязательно, окончательное концентрирование рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков в смеси путем дополнительного добавления второй жидкости к смеси, полученной в результате выполнения этапа (II), и удаления части первой и/или второй жидкости из такой
10 комбинированной смеси;

(IV) инактивацию вектора путем добавления инактивирующего агента к смеси, полученной в результате выполнения этапа (III);

(V) нейтрализацию инактивирующего агента путем добавления
15 нейтрализующего агента к смеси, полученной в результате выполнения этапа (IV).

Настоящее изобретение также касается способа, как описывается и/или заявляется авторами, причем смесь с вышеупомянутого этапа (I) получают с применением процедуры, включающей этапы

(а) инфицирования восприимчивых клеток в культуре вектором,
20 включающим нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, причем вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков,
25 экспрессируются вышеупомянутым вектором,

(б) последующего извлечения рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, из клеточной культуры, причем клеточный дебрис предпочтительно отделяют от рекомбинантного белка и/или четвертичных
30 структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков через этап отделения, предпочтительно включающий микрофильтрацию через по меньшей мере один фильтр, более предпочтительно два фильтра, причем по меньшей мере один фильтр предпочтительно имеет размер пор, больший, чем рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества

вышеупомянутых рекомбинантных белков, в частности, имеет размер пор от приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 4 мкм.

В отношении препаратов антигена PPV, при выполнении инактивации бакуловируса при 37 °С после осветления и до диафильтрации наблюдалась высокая степень осаждения (агрегации). Считается, что эта агрегация, хотя она и не связана с антигеном PPV, препятствует кинетике инактивации и вируцидному испытанию. Предварительные данные указывают, что процесс диафильтрации после осветления культуры и до инактивации бакуловируса значительно снижает степень агрегации в собранных вирусоподобных частицах (VLP) PPV во время процесса инактивации. Данные показывают, что степень агрегации усиливается при повышенной температуре (37 °С) и минимизируется при более низких температурах (27 °С или 4 °С) со временем: процесс диафильтрации до инактивации бакуловируса при 37 °С дополнительно устраняет вируцидную активность реакции инактивантов нейтрализующего агента тиосульфата натрия и среды ExCell 420. Утвержденный процесс подтверждает, что инактивированный бакуловирус, экспрессирующий продукт PPV VLP, стабильно является невируцидным для вакцины PRRSV. Такая вакцина против PPV VLP, в частности, обладает долгосрочной устойчивостью после смешивания с PRRSV, судя по отсутствию вируцидного эффекта, что позволяет смешивать его с компонентами PPV и PRRSV незадолго до введения и/или приводить его в коммерческую, готовую для введения форму (например, комбинированную вакцину или комплект).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Представленные далее фигуры составляют часть данного описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может быть лучше пояснено со ссылкой на одну или несколько этих фигур в комбинации с подробным описанием представленных авторами конкретных вариантов осуществления.

ФИГ. 1 показывает вирусемию PRRSV (кПЦР, log₁₀ GE/мл) по группам и дням.

ФИГ. 2 показывает площадь под кривой (AUC) вирусемии PRRSV (кПЦР, log₁₀ GE/мл) по группам.

ФИГ. 3 показывает среднее геометрическое титров PPV HI по группам и дням.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Перед описанием аспектов настоящего изобретения следует заметить, что применяемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также охватывают ссылки на множественное число, если контекст прямо не указывает на иное. Таким образом, например, ссылка на "антиген" включает множество антигенов; ссылка на вирус "вирус" является ссылкой на один или несколько вирусов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и так далее. Если нет другого определения, все применяемые авторами технические и научные термины имеют значения в общепринятом понимании среди специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом воплощении или испытании настоящего изобретения могут применяться любые способы и материалы, подобные описываемым авторами или эквивалентные им, здесь описываются предпочтительные способы, устройства и материалы. Все упомянутые авторами публикации включаются в данное описание путем ссылки с целью описания и раскрытия клеточных линий, векторов и методологий, о которых сообщается в публикациях, которые могут использоваться в связи с изобретением. Ни одно из положений данного описания не следует истолковывать как признание того, что изобретение не имеет права на противопоставление такого раскрытия в силу наличия более раннего изобретения.

Первое рассмотрение в соответствии с настоящим изобретением

В одном аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, которая включает

- (а) по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV), причем по меньшей мере один антиген PPV является любым антигеном, содержащимся в PPV, и
- (б) по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), причем по меньшей мере один антиген вируса PRRS является любым антигеном, содержащимся в вирусе PRRS.

Термин "свиной парвовирус" или "PPV" хорошо известен среди специалистов в данной области. Однако "свиной парвовирус" представляет собой автономный реплицирующийся вирус рода парвовирус в пределах семейства Parvoviridae, содержащий молекулу однонитевой ДНК. Геном вируса кодирует три капсидных белка (VP1, VP2, VP3) и один неструктурный белок

(NS1). Заболевание, вызываемое PPV у свиней, часто называется SMEDI (аббревиатура для мертворождения, мумификации, смерти эмбриона и бесплодия). Термин “Свиной парвовирус” в рамках настоящего изобретения охватывает все штаммы, генотипы и серотипы свиного парвовируса, а также семейства *Parvovirinae* рода *Protoparvovirus* в пределах семейства *Parvoviridae*.

Термины “вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома” или “PRRS вирус” или “PRRSV” хорошо известен среди специалистов в данной области. “Вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома” является представителем семейства вирусов *Arteriviridae*, относится вместе с *Coronaviridae* к отряду вирусов *Nidovirales*, и является оболочечным вирусом с геномом однонитевой, положительно-полярной РНК из приблизительно 15 тысяч пар нуклеотидов, который содержит девять открытых рамок считывания (ORF), а именно, ORF1a, ORF1ab, ORF2a, ORF 2ab и ORF 3 - ORF7. ORF 1a и 1ab кодируют большие полипротеины, преобразуемые в вирусные неструктурные белки (nsp) путем ауто- и транс-расщепления вирусных протеаз nsp1, nsp2 и nsp4 (Snijder и Meulenberg, 1998). ORF4 кодирует второстепенный гликопротеин (GP4), который после главного гликопротеина (GP5) и двух других второстепенных гликопротеинов (GP2a и GP3) находится в вирусной оболочке, причем все вышеупомянутые гликопротеины важны для образования инфекционного вируса. Существует два отдельных вирусных генотипа PRRSV, вызывающих подобные клинические симптомы, которые расходятся приблизительно на 40 % на уровне нуклеотидной последовательности: генотип I (EU) и генотип II (US). Североамериканским (US) прототипом штамма является VR-2332, а европейским (EU) прототипом штамма является вирус Lelystad. Термин “вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома” в рамках настоящего изобретения охватывает все штаммы, генотипы и серотипы PRRSV.

В связи с PRRSV следует понимать, что термины “генотип I” и “генотип II” эквивалентны терминам “генотип 1” и “генотип 2” или терминам “тип 1” и “тип 2”, которые часто употребляются в литературе в контексте PRRSV.

Термины “по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV)” и “по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS)” в рамках настоящего изобретения охватывают каждый антиген, от отдельных антигенов PPV и/или PRRSV до целых вирусов, включающих множество антигенов.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как описывается и заявляется авторами, причем PPV выбирают из группы, к которой относятся: живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PPV, убитый /
5 инактивированный вирус PPV, убитый / инактивированный штамм PPV 014, германские полевые изоляты свиного парвовируса PPV-27a и PPV-143a и вирусы вакцины PPV-NADL-2 и PPV-IDT (MSV) свиного парвовируса PPV-IDT (MSV).

Термины “живой аттенюированный” и “модифицированный живой” в соответствии с настоящим изобретением применяются взаимозаменяемо и в
10 особенности касаются сниженной вирулентности PPV и/или PRRSV, в частности, вируса PPV и/или PRRS дикого типа, которой достигают путем традиционного множественного пассирования клеточных линий PPV и/или PRRSV и/или достигают при помощи генной инженерии, причем “вирулентность” следует понимать как степень патогенности, и “патогенность”
15 касается способности вируса к вызыванию клинических признаков у хозяина или потомства хозяина, например, репродуктивную недостаточность.

Термины “убитый” или “инактивированный” в рамках настоящего изобретения относятся к PPV и/или PRRSV, который не способен инфицировать соответствующий субъект (в отличие от живого вируса), и/или инфективность
20 которого не указывается по сравнению с нативным вирусом. В частности, убитый / инактивированный вирус не может (теряет способность) инфицировать нативные клетки-хозяева.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как описывается и
25 заявляется авторами, причем по меньшей мере один антиген PPV представляет собой одну или несколько субъединиц PPV.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинация, как описывается и заявляется авторами, причем по меньшей мере одна субъединица PPV
30 представляет собой вирусный белок 2 PPV (VP2), причем PPV VP2 предпочтительно является единственным антигеном PPV.

Термин “вирусный белок 2” или “VP2” относится к капсидному белку VP2 свиного парвовируса. Термин “вирусный белок 2” или “VP2” хорошо известен среди специалистов в данной области.

Термин “белок”, “аминокислота” и “полипептид” применяются взаимозаменяемо. Термин “белок” относится к последовательности аминокислотных остатков, состоящей из природных аминокислот, а также их производных. Природные аминокислоты общеизвестны среди специалистов в данной области и описываются в стандартных учебниках по биохимии. В пределах аминокислотной последовательности аминокислотные остатки соединяются пептидными связями. Кроме того, два конца аминокислотной последовательности указываются как карбоксильный конец (С-конец) и аминоконец (N-конец). Термин “белок” охватывает фактически очищенные белки или белковые препараты, дополнительно включающие другие белки. Кроме того, термин также относится к фрагментам белков. Кроме того, он включает химически модифицированные белки. Такие модификации могут быть искусственными модификациями или природными модификациями, такими, как фосфорилирование, гликозилирование, миристилирование и т. п.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как описывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 имеет

- в аминокислотной позиции 228 глутаминовокислотный остаток или глутаматный остаток, и/или
 - в аминокислотной позиции 414 сериновый остаток, и/или
 - в аминокислотной позиции 419 глутаминовый остаток, и/или
 - в аминокислотной позиции 436 треониновый остаток,
- причем нумерация аминокислотных позиций относится к аминокислотной последовательности дикого типа PPV VP2.

Термин “причем нумерация аминокислотных позиций относится к аминокислотной последовательности дикого типа PPV VP2” касается нумерации аминокислотных позиций, относящихся к аминокислотной последовательности белка PPV VP2 полной длины дикого типа. Предпочтительно нумерация аминокислотных позиций согласно данному описанию указывается со ссылкой на белковую последовательность PPV VP2 дикого типа, имеющую 579 аминокислотных остатков, включая метиониновый остаток в (N-концевой) аминокислотной позиции 1. Термин “причем нумерация аминокислотных позиций относится к аминокислотной последовательности дикого типа PPV VP2” охватывает PPV VP2 дикого типа, как указано для примера в SEQ ID NO: 1 (PPV 27a VP2).

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как описывается и заявляется авторами, отличающейся тем, что PPV VP2 также имеет

- в аминокислотной позиции 25 изолейциновый остаток, и/или
- 5 - в аминокислотной позиции 36 сериновый остаток, и/или
- в аминокислотной позиции 37 изолейциновый остаток,

причем нумерация аминокислотных позиций относится к аминокислотной последовательности дикого типа PPV VP2.

10 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как описывается и заявляется авторами, причем нумерация аминокислотных позиций относится к аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1.

15 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как описывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 представляет собой рекомбинантный PPV VP2.

20 Термин "рекомбинантный" в контексте данного описания относится, в частности, к молекуле белка, которая экспрессируется из молекулы рекомбинантной ДНК, такой, как полипептид, образуемый с применением технологий рекомбинантных ДНК. Пример таких технологий включает случай, когда ДНК, кодирующая экспрессируемый белок (например, PPV VP2), вставляют в подходящий вектор экспрессии, предпочтительно вектор экспрессии бакуловируса, который, в свою очередь, используют для трансфекции или, в случае вектора экспрессии бакуловируса, для инфицирования клетки-хозяина для получения белка или полипептида, кодируемого ДНК. Термин "рекомбинантный PPV VP2" в контексте данного описания, таким образом, в частности, относится к молекуле белка, которая экспрессируется из молекулы рекомбинантной ДНК.

30 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как описывается и заявляется авторами, в которой PPV VP2 представляет собой экспрессируемый рекомбинантным бакуловирусом PPV VP2.

Термин "бакуловирус" хорошо известен среди специалистов в данной области. В контексте данного описания "бакуловирус", в частности, означает

систему выработки исследуемого белка в клетках насекомых с применением рекомбинантного бакуловирусного вектора, предназначенного для экспрессии вышеупомянутого белка. Бакуловирусная система экспрессии в целом включает все элементы, необходимые для достижения экспрессии рекомбинантного белка в клетках насекомых, и, как правило, включает инженерию бакуловирусного вектора для экспрессии исследуемого белка, введение подвергнутого инженерии бакуловирусного вектора в клетки насекомых, культивирование клеток насекомых, содержащих подвергнутый инженерии бакуловирусный вектор, в подходящей среде для выращивания, таким образом, чтобы экспрессировался исследуемый белок, и выделение белка. Как правило, инженерия бакуловирусного вектора включает построение и выделение рекомбинантных бакуловирусов, в которых кодирующая последовательность для выбранного гена вставлена за промотором для второстепенного вирусного гена, причем большинство применяемых в настоящее время бакуловирусных систем экспрессии основаны на последовательности вируса ядерного полиэдроса совки калифорнийской люцерновой (AcMNPV) ((*Virology* 202 (2), 586 - 605 (1994), NCBI Accession No.: NC_001623). Бакуловирусные системы экспрессии общеизвестны среди специалистов в данной области и описывались, например, в публикациях “*Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*”, David R. O’Reilly, Lois Miller, Verne Luckow, изд. Oxford Univ. Press (1994), “*The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*”, Linda A. King, R. D. Possee, изд. Chapman & Hall (1992). Типичный неограничивающий пример бакуловирусной системы для получения рекомбинантного белка описывается, например, в документе WO 2006/072065 A2.

Предпочтительные бакуловирусные векторы включают бакуловирус, такой, как BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Calif.) или DiamondBac (Sigma Aldrich), в частности, при условии, что продуцирующие клетки являются клетками насекомых. Хотя предпочтение отдается бакуловирусной системе экспрессии, специалистам в данной области станет понятно, что с точки зрения настоящего изобретения могут применяться и другие системы экспрессии, а именно, экспрессия PPV VP2 в супернатант клеточной культуры. Другие подобные системы экспрессии могут требовать применения сигнальной последовательности с целью вызывания экспрессии PPV VP2 в среды.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 - 16.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, или по меньшей мере 99,9 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 – 16.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 – 16 или включает или состоит из любого фрагмента, который имеет по меньшей мере 210, по меньшей мере 250 или по меньшей мере 300 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 – 16.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 – 16.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90 % идентичности последовательности с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 – 16.

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 10 мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, или по меньшей мере 99,9 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 – 16.

15 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем PPV VP2 кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 – 16.

20 SEQ ID NO: 4 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PPV 27a VP2, которая была подвергнута дальнейшей модификации таким образом, чтобы включать два сайта рестрикционных ферментов ClaI (в аминокислотной позиции 25 находится изолейциновый остаток, в аминокислотной позиции 36 находится сериновый остаток, в 25 аминокислотной позиции 37 находится изолейциновый остаток), чтобы примыкать к кодирующему участку VP2, состоящему из глициновых повторов. Сайты ClaI включали таким образом, чтобы не прерывать кодирующий участок VP2. SEQ ID NO: 2 представляет собой белковую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 3 представляет собой кодон- 30 оптимизированную нуклеотидную последовательность PPV 27a VP2 (без сайтов рестрикционных ферментов ClaI). SEQ ID NO: 1 представляет собой белковую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 3.

Термины “нуклеиновая кислота” или “нуклеиновокислотная последовательность” или “нуклеотидная последовательность” или

“полинуклеотид” применяются в данном описании взаимозаменяемо и относится к полинуклеотидам, включая молекулы ДНК, молекулы РНК, молекулы кДНК или производные. Термин охватывает одонитевые, а также двухнитевые полинуклеотиды. Нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением охватывает выделенные полинуклеотиды (т. е., выделенные из природной среды) и генетически модифицированные формы. Кроме того, также включаются химически модифицированные полинуклеотиды, включая природные модифицированные полинуклеотиды, такие, как гликозилированные или метилированные полинуклеотиды, или искусственные модифицированные, такие, как биотинилированные полинуклеотиды. Кроме того, термины “нуклеиновая кислота” и “полинуклеотид” являются взаимозаменяемыми и относятся к любой нуклеиновой кислоте. Термины “нуклеиновая кислота” и “полинуклеотид” также конкретно включают нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличающихся от биологических оснований (аденина, гуанина, тимина, цитозина и урацила).

Термин “идентичность” или “идентичность последовательностей” известен специалистам в данной области и касается отношения между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, то есть, контрольной последовательностью и данной последовательностью, подлежащей сравнению с контрольной последовательностью. Идентичность последовательностей определяют путем сравнения данной последовательности с контрольной последовательностью после оптимального выравнивания последовательностей для получения наивысшей степени подобия последовательностей, определяемой путем сопоставления между нитями таких последовательностей. После такого выравнивания идентичность последовательностей устанавливается на основе сопоставления соответствующих позиций, например, последовательности являются “идентичными” в конкретной позиции, если эта позиция, нуклеотиды или аминокислотные остатки идентичны. Общее количество таких идентичных позиций затем делят на общее количество нуклеотидов или остатков в контрольной последовательности для определения процента идентичности последовательностей. Идентичность последовательностей легко вычисляют известными способами, включая, помимо прочих, описываемые в публикациях Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New

York (1988), *Biocomputing: Informatics и Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., и Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. и Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), идеи которых включаются в данное описание путем ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательностей разработаны для получения наибольшего соответствия между испытываемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей кодифицированы в общедоступных компьютерных программах, определяющих идентичность последовательностей между данными последовательностями. Примерами таких программ являются, помимо прочих, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403 - 410 (1990)). Программа BLASTX доступна на рынке от NCBI и из других источников (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403 - 410 (1990), идеи которых включаются в данное описание путем ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности с использованием штрафов за делецию по умолчанию с целью получения наивысшего уровня идентичности последовательностей между данной и контрольной последовательностями. В качестве иллюстрации, в случае полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере, например, 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % "идентичности последовательностей" с контрольной нуклеотидной последовательностью, подразумевается, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида является идентичной контрольной последовательности, за исключением того, что данная полинуклеотидная последовательность может включать до 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно – до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов контрольной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде, имеющем нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % идентичности с контрольной

нуклеотидной последовательностью, до 15 %, предпочтительно до 10 %, еще более предпочтительно – до 5 % нуклеотидов в контрольной последовательности могут быть удалены или замещены другим нуклеотидом, или определенное количество нуклеотидов до 15 %, предпочтительно до 10 %, еще более предпочтительно – до 5 % от общего количества нуклеотидов в контрольной последовательности, может быть вставлено в контрольную последовательность. Эти мутации контрольной последовательности могут иметь место в 5'- или 3'-концевых позициях контрольной нуклеотидной последовательности или в любом другом месте между этими концевыми позициями, либо отдельными вставками среди нуклеотидов в контрольной последовательности, либо одной или несколькими смежными группами в пределах контрольной последовательности. Аналогичным образом, в случае полипептида, имеющего данную аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере, например, 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % идентичности последовательностей с контрольной аминокислотной последовательностью, подразумевается, что данная аминокислотная последовательность полипептида является идентичной контрольной последовательности, за исключением того, что данная полипептидная последовательность может включать до 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно – до 5 аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот контрольной аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения данной полипептидной последовательности, которая имеет по меньшей мере 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % идентичности последовательности с контрольной аминокислотной последовательностью, до 15 %, предпочтительно до 10 %, еще более предпочтительно – до 5 % аминокислотных остатков в контрольной последовательности могут быть удалены или замещены другой аминокислотой, или определенное количество аминокислот до 15 %, предпочтительно до 10 %, еще более предпочтительно – до 5 % от общего количества аминокислотных остатков в контрольной последовательности, может быть вставлено в контрольную последовательность. Эти изменения контрольной последовательности могут иметь место в амино- или карбокси-концевой позициях контрольной аминокислотной последовательности или в любом другом месте между этими концевыми позициями, либо отдельными вставками среди

остатков в контрольной последовательности, либо одной или несколькими смежными группами в пределах контрольной последовательности. Предпочтительно позиции остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными замещениями. Однако консервативные замещения не включаются как совпадения при определении идентичности последовательностей.

Термины "идентичность", "идентичность последовательностей" и "процент идентичности" применяются в данном описании взаимозаменяемо. С точки зрения этого изобретения установлено, что для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновокислотных последовательностей последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислоты или нуклеиновой кислоты могут быть включены гэпы для оптимального выравнивания с целью сопоставления со второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностью). Затем сравнивают аминокислоты или нуклеотидные остатки в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных позициях. Когда позиция в первой последовательности занята той же аминокислотой или нуклеотидным остатком, что и соответствующая позиция во второй последовательности, молекулы в этой позиции являются идентичными. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных позиций, общих для этих последовательностей (т. е., % идентичности = количество идентичных позиций / общее количество позиций (т. е., перекрывающихся позиций) x 100). Предпочтительно две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей осуществляют по всей длине двух сравниваемых последовательностей или по длине фрагмента двух последовательностей. Как правило, сравнение осуществляют по всей длине двух сравниваемых последовательностей. Однако идентичность последовательностей может определяться и по участку, например, из двадцати, пятидесяти, ста или более аминокислотных остатков.

Специалистам в данной области известно, что существует несколько различных компьютерных программ для определения гомологии между двумя последовательностями. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями

осуществляют с применением математического алгоритма. В предпочтительном варианте осуществления процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеиновокислотными последовательностями с применением алгоритма Нидлмана-Вунша (J. Mol. Biol. (48): 444 - 453 (1970)), включенного в программу GAP в пакете программ Accelrys GCG (доступен по адресу <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), с применением матрицы Blosum 62 или матрицы PAM250, и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Специалистам в данной области станет понятно, что все эти разные параметры дают несколько различные результаты, однако общий процент идентичности двух последовательностей при применении различных алгоритмов значительно не меняется.

Белковые последовательности или нуклеиновокислотные последовательности в соответствии с настоящим изобретением также могут использоваться как "искомая последовательность" для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации других представителей семейства или родственных последовательностей. Такие поиски выполняют с применением программ BLASTN и BLASTP (версия 2.0) согласно публикации Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 10. Поиск белков BLAST выполняют при помощи программы BLASTP, вес = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам в соответствии с изобретением. Для получения выравнивания с гэпами с целью сравнения применяют Gapped BLAST, как описывается в публикации Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389 - 3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST используют параметры соответствующих программ (например, BLASTP и BLASTN) по умолчанию. См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем PRRS вирус выбирают из группы, к которой относятся: вирус PRRS генотипа 1, вирус PRRS генотипа 2, вирус PRRS генотипа 1, включающий геном, кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по

меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 %, или 100 % идентичности с нуклеиновокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 (последовательность Lelystad дикого типа), вирус PRRS генотипа 2, включающий геном, кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 %, или 100 % идентичности с нуклеиновокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18 (VR2332 последовательность дикого типа).

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем вирус PRRS выбирают из группы, к которой относятся: живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS тип 1 генотип (например, Porcilis PRRS, Unistrain PRRS, Amervac PRRS и т. п.), живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 2 (например, Ingelvac® PRRS MLV, Fosterer PRRS и т. п.), живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, штамм 94881 [(генотип 1), ReproCyc® PRRS EU], убитый / инактивированный вирус PRRS, убитый / инактивированный вирус PRRS, генотип типа 1 (например, Progressis), убитый / инактивированный вирус PRRS, генотип типа 2, штамм вируса Lelystad (CDI-NL-2.91, Institut Pasteur, Париж, Франция, номер депонирования I-1102), субъект(ы) вируса PRRS, или другие штаммы, такие, как депонированные под номерами доступа ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, номером доступа CNCM I-1140, номером доступа CNCM I-1387, номером доступа CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 и VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, или ECACC V93070108, североамериканский вирус PRRS рТ7Р129А (номер доступа ATCC

203488), под номером депонирования ATCC VR-2332, ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 и ATCC VR 2402.

5 Термины "иммуногенная композиция" или "комбинированная вакцина" или "комбинация" касается композиции, которая включает по меньшей мере один антиген, в случае комбинированной вакцины" или "комбинации" – по меньшей мере два антигена, которые обеспечивают иммунный ответ у хозяина, которому вводят "иммуногенную композицию" или "комбинированную вакцину" или "комбинацию". Такой иммунный ответ может быть клеточным и/или
10 антителоопосредованным иммунным ответом на "иммуногенную композицию" или "комбинированную вакцину" или "комбинацию" в соответствии с изобретением. Предпочтительно "иммуногенная композиция" или "комбинированная вакцина" или "комбинация" вызывает иммунный ответ, более предпочтительно – обеспечивает защитный иммунитет от одного или нескольких
15 клинических признаков инфекции PPV и/или PRRSV. Хозяин также описывается как "субъект". Предпочтительно любой из описываемых или упоминаемых хозяев или субъектов является свиньей.

Как правило, "иммунный ответ" включает, помимо прочего, один или несколько из следующих эффектов: выработки или активации антител, В-клеток,
20 хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксичных Т-клеток и/или гамма-дельта-Т-клеток, специфично направленных на антиген или антигены, включенные в "иммуногенную композицию" или "комбинированную вакцину" или "комбинацию" в соответствии с изобретением. Предпочтительно хозяин должен демонстрировать защитный иммунный ответ или
25 терапевтический ответ.

"Защитный иммунный ответ" или "защитный иммунитет" демонстрируется через снижение или отсутствие клинических признаков, которые обычно обнаруживаются у инфицированных хозяев, более быстрое выздоровление и/или
30 снижение продолжительности инфективности или снижение титра патогена в тканях или жидкостях организма или экскрементах инфицированного хозяина.

В случае, если хозяин демонстрирует защитный иммунный ответ, такой, как повышенная сопротивляемость новой инфекции и/или снижение клинической тяжести заболевания, "иммуногенная композиция" или "комбинация" описывается как "вакцина".

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию рецептируют для введения разовой дозой.

5 Объем разовой дозы введения определяется в других разделах данного описания.

Иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию, как раскрывается и заявляется авторами, предпочтительно вводят по месту или системно. Подходящими традиционно применяемыми путями введения являются пероральное или парентеральное введение, такое, как интраназальное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, подкожное, а также ингаляция. Однако, в зависимости от характера и способа действия соединения, иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация, как раскрывается и заявляется авторами, также может
10 вводиться другими путями. Наиболее предпочтительно иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию, как раскрывается и заявляется авторами, вводят внутримышечно.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят внутримышечно.
20

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация является безопасной для свинок и/или свиноматок во время беременности и лактации.
25

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация является безопасной для свинок и/или свиноматок после 30 дней беременности, предпочтительно после 40 дней беременности.
30

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная

вакцина или комбинация также включает по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

5 Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, диспергаторы, покрытия, стабилизаторы, разбавители, консерванты, противомикробные и противогрибковые средства, изотонические агенты, замедляющие адсорбцию агенты, адъюванты, иммуностимуляторы и их комбинации.

10 "Разбавители" могут включать воду, солевой раствор, декстрозу, этанол, глицерин, фосфатно-буферный солевой раствор и т. п. Изотонические агенты могут включать, помимо прочих, хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают, помимо прочих, альбумин и соли щелочных металлов с этилендиаминтетрауксусной кислотой.

В одном аспекте настоящего изобретения фармацевтически приемлемым носителем является карбомер.

15 Предпочтительно иммуногенная композиция также может включать один или несколько других иммуномодуляторов, таких, как, например, интерлейкины, интерфероны или другие цитокины. Количество и концентрация адъювантов и добавок, используемых в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены специалистом в данной области.

20 В некоторых аспектах иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит адъювант. "Адъюванты" в контексте данного описания могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины *например*, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа вода в масле, 25 эмульсию типа масло в воде, эмульсию типа вода в масле в воде. Эмульсия, в частности, может быть на основе легкого жидкого вазелинового масла (согласно требованиям Европейской фармакопеи); изопреноидного масла, такого, как сквалан или сквален; масла, получаемого в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; сложных эфиров кислот или спиртов, 30 которые содержат линейную алкильную группу, более конкретно – растительных масел, этилолеата, пропиленгликольди-(каприлата/капрата), глицерилтри-(каприлата/капрата) или пропиленгликольдиолеата; сложные эфиры разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложные эфиры изостеариновой кислоты. Масло применяют в комбинации с эмульгаторами для

образования эмульсии. Эмульгаторами предпочтительно являются неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбита, маннида (*например*, ангидроманнитолеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блоксополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности продукты типа Pluronic, прежде всего L121. См. Hunter *et al.*, The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, pp 51 - 94 (1995) и Todd *et al.*, Vaccine 15: 564 - 570 (1997). Типичными адъювантами являются эмульсия SPT, описанная на странице 147 публикации "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под редакцией M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на странице 183 той же книги.

Еще одним примером адъюванта может быть соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильной производной. Оптимальными адъювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, сшитые, в частности, с полиалкенильными сложными эфирами сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны как карбомеры (Pharmurgia Vol. 8, No. 2, June 1996). Специалисты в данной области также могут обратиться к Патенту США № 2,909,462, в котором описываются такие акриловые полимеры, сшитые с полигидроксилированным соединением, имеющим по меньшей мере 3 гидроксильных группы, предпочтительно не более 8, причем атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных групп заменены на ненасыщенные алифатические радикалы, имеющие по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются те, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, *например*, винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие, как метил. Особенно подходящими являются продукты, продаваемые под названием Carbopol; (BF Goodrich, Огайо, США). Они сшиты с аллилсахарозой или с аллилпентаэритритом. Среди них можно упомянуть Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является использование Carbopol 971P. К сополимерам малеинового ангидрида и алкенильной производной относятся сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры

малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде ведет к образованию раствора кислоты, подлежащего нейтрализации, предпочтительно до физиологического уровня pH, с целью получения раствора адъюванта, в которую включают саму иммуногенную, иммунологическую или вакцинную композицию.

Другие подходящие адъюванты включают, помимо прочих, адъювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блоксополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил-липид А адъювант авридин липид-амин, термолабильный энтеротоксин из E. coli (рекомбинантный или иной), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид, или природные или рекомбинантные цитокины или их аналоги или стимуляторы высвобождения эндогенного цитокина и др.

Ожидается, что адъювант может добавляться в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, более предпочтительно – в количестве от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно – в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу, и наиболее предпочтительно – в количестве от приблизительно 1 мг на дозу. В альтернативном варианте адъювант может быть в концентрации от приблизительно 0,01 % до 50 %, предпочтительно в концентрации от приблизительно 2 % до 30 %, более предпочтительно – в концентрации от приблизительно 5 % до 25 %, еще более предпочтительно – в концентрации от приблизительно 7 % до 22 %, и наиболее предпочтительно – в концентрации от 10 % до 20 % по объему готового продукта.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель является карбомером.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация включает от 0,1 мкг до 50 мкг антигена PPV VP2, предпочтительно от 0,5 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, более предпочтительно

– от 1,0 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2 и/или от 3,9 до 7,0 \log_{10} TCID₅₀ вируса PRRS.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, включает приблизительно от 0,1 мкг до 50 мкг антигена PPV VP2. Предпочтительно иммуногенная композиция включает приблизительно от 0,2 мкг до 40 мкг, более предпочтительно – приблизительно от 0,3 мкг и 30 мкг, более предпочтительно – приблизительно от 0,4 мкг до 20 мкг, еще более предпочтительно – приблизительно от 0,5 мкг до 10 мкг, еще более предпочтительно – приблизительно от 1,0 мкг до 10 мкг, причем наиболее предпочтительное количество составляет 0,5 мкг, 0,75 мкг, 1 мкг, 1,25 мкг, 1,5 мкг, 2 мкг, 2,5 мкг, 3 мкг, 3,5 мкг, 4 мкг, 4,5 мкг, 5 мкг, 5,5 мкг, 6 мкг, 6,5 мкг, 7 мкг, 7,5 мкг, 8 мкг, 8,5 мкг, 9 мкг, 9,5 мкг или 10 мкг антигена PPV VP2.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, включает приблизительно от 3,9 до 7,0 \log_{10} TCID₅₀ вируса PRRS.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинация является вакциной.

Термин “вакцина” уже описывался в других разделах данного описания. Однако в случае, если хозяин демонстрирует защитный иммунный ответ, такой, как повышенная сопротивляемость новой инфекции и/или снижение клинической тяжести заболевания, иммуногенная композиция или комбинация описывается как “вакцина”.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения. Преимущество состоит в том, что экспериментальные данные, обеспечиваемые настоящим изобретением, обнаруживают, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация в соответствии с настоящим изобретением обладает широким спектром защиты, поскольку вакцина защищает от гетерологичных

североамериканских, а также гетерологичных европейских штаммов для провокационного заражения.

5 Термины “защищает” и “профилактика” и “предотвращение” применяются в этой заявке взаимозаменяемо. Эти термины определяются в других разделах данного описания.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, защищает от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами.

10 Термин “североамериканские и/или европейские изоляты” хорошо известен среди специалистов в данной области. Термин “североамериканские и/или европейские изоляты” охватывает все изоляты, которые были или будут выделены в Северной Америке и Европе.

15 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, обеспечивает перекрестный иммунитет от североамериканских и/или европейских изолятов.

20 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, эффективна для лечения и/или профилактики клинических признаков, вызванных инфекцией PPV и/или PRRSV у субъекта, который в этом нуждается. Термины “лечение и/или профилактика”, “клинические признаки” и “нуждается” определены в других разделах этого описания.

25 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PPV и/или а гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PRRS.

30 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация защищает от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами PPV и/или от

провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами вируса PRRS.

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов PPV и/или обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов вируса PRRS.

10 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация эффективна для лечения и/или профилактики клинических признаков, вызываемых инфекцией вируса PPV и/или PRRS у субъекта, который в этом нуждается.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает вирусоподобную частицу, включающую PPV VP2, как описывается и заявляется авторами.

20 Термин “вирусоподобная частица” (VLP) охватывает нереплицируемую пустую вирусную оболочку вируса. VLP обычно состоят из одного или более вирусных белков, к которым, помимо прочих, относятся белки, указываемые как капсиды, белки покрытия, поверхности и/или оболочки, или образующие частицы полипептиды, производные от этих белков. VLP могут образовываться спонтанно после рекомбинантной экспрессии белка в соответствующей экспрессирующей системе. Присутствие VLP после рекомбинантной экспрессии вирусных белков обнаруживают с применением традиционных технологий, известных специалистам в данной области, таких, как электронная микроскопия, рентгеновская кристаллография и т. п. См., например, Baker et al., *Biophys. J.* (1991) 60: 1445 - 1456; Hagensee et al., *J. Virol.* (1994) 68: 4503-4505. Например, криоэлектронную микроскопию выполняют на витрифицированных водных образцах данного препарата VLP и изображения записывают при соответствующих условиях экспозиции.

30 Термин “вирусоподобная частица” (VLP) также охватывает VLP, состоящие из множества PPV VP2.

В другом аспекте настоящего изобретения вирусоподобная частица состоит из множества PPV VP2, как описывается и заявляется авторами.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клетку, включающую полинуклеотид или вектор, как описывается авторами. Предпочтительно вектор является бакуловирусом.

Термин “клетка” хорошо известен среди специалистов в данной области. Термин “клетка” охватывает эукариотную клетку, такую, как клетка животного, клетка простейшего, растительная клетка или грибковая клетка. Предпочтительно эукариотная клетка является клеткой млекопитающего, такого, как СНО, ВНК или СОС, или грибковой клеткой, например, *Saccharomyces cerevisiae*, или клеткой насекомого, например, Sf9.

В другом аспекте настоящего изобретения клетка является клеткой насекомого.

“Клетка насекомого” в контексте данного описания означает клетку или клеточную культуру, взятую из вида насекомого. Особенный интерес с точки зрения настоящего изобретения представляют клетки насекомых, взятые из видов *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*.

Предпочтительно клетка насекомого, как упомянуто авторами, является клеткой *Spodoptera frugiperda* (Sf) или клеткой из клеточной линии, взятой из *Spodoptera Frugiperda*, более предпочтительно – выбранной из группы, состоящей из клетки Sf9 и клетки Sf+. Соответственно, клетки насекомых, упомянутые авторами, предпочтительно представляют собой клетки *Spodoptera frugiperda* (Sf) или клетки из клеточной линии, взятой из *Spodoptera frugiperda*, более предпочтительно – выбраны из группы, состоящей из клеток Sf9 и клеток Sf+.

В другом аспекте настоящего изобретения клетку насекомого выбирают из группы, к которой относятся клетки Sf9 и клетки Sf+.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения PPV VP2, как описывается и заявляется авторами, включающий трансфекцию клетки вектором, как описывается авторами.

Термин “вектор” хорошо известен среди специалистов в данной области. Термин “вектор”, известный специалистам в данной области, относится к полинуклеотидной конструкции, как правило, плазмиды или вируса, которые используют для переноса генетического материала в клетку-хозяин. Векторы

могут быть, например, вирусами, плазмидами, космидами или фагами. Вектор в контексте настоящего изобретения может состоять из ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор состоит из ДНК.

5 "Вектор экспрессии" представляет собой вектор, способный направлять экспрессию белка, кодируемого одним или несколькими генами, которые несет вектор, когда он присутствует в соответствующей среде. Векторы предпочтительно способны к самостоятельной репликации. Как правило, вектор экспрессии включает промотор транскрипции, ген и терминатор транскрипции. Экспрессию гена обычно осуществляют под контролем промотора, и ген
10 считается "функционально связанным" с промотором.

В контексте данного описания термин "функционально связанный" применяют для описания связи между регуляторными элементами и геном или его кодирующим участком. Как правило, экспрессию гена осуществляют под контролем одного или нескольких регуляторных элементов, к которым, помимо
15 прочих, относятся, например, конститутивные или индуцибельные промоторы, тканеспецифические регуляторные элементы и энхансеры. Ген или кодирующий участок считается "функционально связанным" или "функционально соединенным" или "функционально ассоциированным" с регуляторными элементами в том смысле, что ген или кодирующий участок находится под
20 контролем или влиянием регуляторного элемента. Например, промотор считается функционально связанным кодирующей последовательностью, если промотор осуществляет транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности.

Векторы и способы получения и/или применения векторов (или
25 рекомбинантов) для экспрессии могут быть идентичными или аналогичными способам, раскрываемым в: патентах США №№ 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, публикациях PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93: 11349-11353, October 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93:
30 11341 - 11348, October 1996; Smith et al., U.S. Pat. No. 4,745,051 (рекомбинантный бакуловир); Richardson, C. D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith et

al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", *Molecular and Cellular Biology*, December, 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156-2165; Pennock et al., "Strong и Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector, "Molecular and Cellular Biology March 1984, Vol. 4, No. 3, p. 406; ЕРА0 370 573; заявке США № 920,197, 5 поданной 16 октября 1986 г.; Патентной публикации ЕР № 265785; Патенте США № 4,769,331 (рекомбинантный герпесвирус); публикациях Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93: 11307 - 11312, October 1996; Andreansky et al., "The 10 application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313 - 11318, October 1996; Robertson et al., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocyte", PNAS USA 93: 11334 - 11340, October 1996; Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371 - 11377, October 1996; Kitson et al., J. Virol. 65, 3068 - 3075, 1991; патентах США №№ 5,591,439, 5,552,143; WO 15 98/00166; акцептованных заявках США, сер. №№ 08/675,556 и 08/675,566, обе из которых были поданы 3 июля 1996 г. (рекомбинантный аденовирус); публикации Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," *Seminars in Virology* (Vol. 3) p. 237 - 52, 1993; Ballay et al. *EMBO Journal*, vol. 4, p. 3861 - 65, Graham, Tibtech 20 8, 85-87, April, 1990; Prevec et al., *J. Gen Virol.* 70, 42434; PCT WO 91/11525; Felgner et al. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550 - 2561, *Science*, 259: 1745-49, 1993; и McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, October 25 1996; и патентах США №№ 5,591,639, 5,589,466, и 5,580,859, а также WO 90/11092, WO 93/19183, WO 94/21797, WO 95/11307, WO 95/20660; публикациях Tang et al., *Nature*, и Furth et al., *Analytical Biochemistry*, касающихся векторов экспрессии ДНК, и др. См. также публикации WO 98/33510; Ju et al., *Diabetologia*, 41: 736-739, 1998 (лентивирусная экспрессирующая система); 30 Sanford et al., U.S. Pat. No. 4,945,050; Fischbach et al. (Intracel); WO 90/01543; Robinson et al., *Seminars in Immunology* vol. 9, pp. 271 - 283 (1997), (системы ДНК-векторов); Szoka et al., Патенте США № 4,394,448 (способ вставки ДНК в живые клетки); McCormick et al., Патенте США № 5,677,178 (применение

цитопатических вирусов); и Патенте США № 5,928,913 (векторы для доставки генов); а также других упомянутых авторами документах.

Термины "регуляторный элемент" и "элемент контроля экспрессии" применяются взаимозаменяемо и относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые влияют на экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Эти термины применяются в широком смысле и охватывают все элементы, способствующие транскрипции или регулирующие ее, включая промоторы, основные элементы, необходимые для фундаментального взаимодействия РНК-полимеразы и факторов транскрипции, расположенные против хода транскрипции элементы, энхансеры и элементы ответа. Типичными регуляторными элементами в прокариотах являются промоторы, операторные последовательности и участки связывания рибосом. Регуляторные элементы, применяемые в эукариотных клетках, могут включать, помимо прочих, транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности, такие, как промоторы, энхансеры, сигналы сплайсинга, сигналы полиаденилирования, терминаторы, сигналы разрушения белка, элемент внутренней посадки рибосомы (IRES), 2A последовательности и т. п., которые обеспечивают и/или регулируют экспрессию кодирующей последовательности и/или образование кодированного полипептида в клетке-хозяине.

В контексте данного описания термин "промотор" означает нуклеотидную последовательность, обеспечивающую возможность связывания РНК-полимеразы и направляет транскрипцию гена. Как правило, промотор расположен в 5'-некодирующем участке гена, приближенном к сайту инициации транскрипции гена. Элементы последовательности в пределах промоторов, которые выполняют функцию инициации транскрипции, часто характеризуются консенсусными нуклеотидными последовательностями. Примерами промоторов, помимо прочих, могут быть промоторы из бактерий, дрожжей, растений, вирусов и млекопитающих (включая человека). Промотор может быть индуцибельным, репрессируемым и/или конститутивным. Индуцибельные промоторы иницируют повышенный уровень транскрипции из ДНК под их контролем в ответ на некоторые изменения в условиях культивирования, например, изменение температуры.

В контексте данного описания термин "энхансер" относится к типу регуляторного элемента, который может повышать эффективность транскрипции, независимо от расстояния или ориентации энхансера относительно сайта начала транскрипции.

5 Образование вирусного вектора может осуществляться с применением любых подходящих технологий инженерии, общеизвестных среди специалистов в данной области, включая, помимо прочих, стандартные технологии расщепления рестрикционной эндонуклеазы, лигирования, трансформации, очистки плазмиды и секвенирования ДНК, например, как описывается в
10 публикации Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)).

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения PPV VP2, как описывается авторами, включающий трансфекцию клетки, предпочтительно клетки насекомого, бакуловирусом, как описывается авторами.

15 Композиции, в случае потребности, могут быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну или несколько единичных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может включать, например, металлическую или пластиковую пленку, например, блистерная упаковка. К упаковке или дозирующему устройству могут
20 прилагаться инструкции по введению, предпочтительно по введению животным, в частности, свиньям. К контейнеру(ам) может прилагаться записка в форме, предписываемой правительственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, причем в записке отражается разрешение со стороны данного органа на
25 производство, использование или продажу с целью введения человеку.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, причем по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген вируса свиного
30 репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) содержатся вместе в одном контейнере или отделены друг от друга пространством, предпочтительно содержатся в двух или более отдельных контейнерах.

В другом аспекте настоящее изобретение касается комплекта, включающего иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию, как раскрывается и заявляется авторами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается комплекта, как раскрывается и заявляется авторами, в котором по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) содержатся отдельно друг от друга в двух или более отдельных контейнерах, предпочтительно независимо друг от друга в лиофилизированной или замороженной форме, и комплект также включает инструкцию с руководством по смешиванию разделенных пространством по меньшей мере одного антигена PPV и по меньшей мере одного антигена вируса PRRS, причем такая инструкция с руководством предпочтительно содержит указания по комбинированию содержимого контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген PPV, с содержимым контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген вируса PRRS, причем такая инструкция с руководством более предпочтительно содержит указания о том, что по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) должны вводиться субъекту одновременно, более предпочтительно по отдельности одновременно в одном или различных местах введения, последовательно (в любом порядке), и/или с регулированием по времени.

В другом аспекте настоящее изобретение касается комплект, как раскрывается и заявляется авторами, причем комплект также включает указания по лечению и/или профилактике заболеваний у свиней и/или также включает указания по лечению и/или профилактике инфекций вируса PPV и/или вируса PRRS, причем такой комплект предпочтительно также включает указания по ассоциированному применению компонента PPV (предпочтительно в качестве отдельного компонента комплекта) и компонента PRRSV (предпочтительно в качестве отдельного компонента комплекта) иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется авторами, и включенные в такой комплект.

Термин “ассоциированное применение” в рамках настоящего изобретения касается применения двух вакцин или компонентов вакцины PRRSV и PPV

(каждый из которых независимо от других также указывается как “отдельный компонент комплекта”) путем смешивания двух вакцин перед введением в одном месте инъекции или введением двух вакцин в одно время, но в разных местах введения. Предпочтительно такие две вакцины вводят одновременно, более
5 предпочтительно по отдельности одновременно в одном или различных местах введения, последовательно (в любом порядке), и/или с регулированием по времени.

В другом аспекте настоящего изобретения PPV и/или PRRSV в соответствии с настоящим изобретением был инактивирован, в результате чего
10 был получен цельный инактивированный вирус с вирусным белком 2 (VP2), как описывается авторами.

С точки зрения настоящего изобретения может применяться любой традиционный способ инактивации. Таким образом, инактивация может выполняться с применением способов химической и/или физической обработки,
15 которые известны специалистам в данной области. Предпочтительные способы инактивации включают добавление циклизированного бинарного этиленамина (BEI), включающее добавление раствора 2-бромозэтиленамингидробромида (BEA), который был циклизирован до бинарного этиленамина (BEI). Предпочтительные дополнительные средства химической инактивации
20 включают, помимо прочих, Triton X-100, дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметиламмония, β -пропиолактон, тимеросал, фенол и формальдегид (формалин). Однако инактивация также может включать этап нейтрализации. Предпочтительные средства нейтрализации включают, помимо прочих, тиосульфат натрия, бисульфат натрия и т. п.

Предпочтительные условия инактивации формалином включают концентрацию формалина приблизительно от 0,02 % (объем/объем) до 2,0 % (объем/объем), более предпочтительно – приблизительно от 0,1 % (объем/объем) до 1,0 % (объем/объем), еще более предпочтительно – приблизительно от 0,15 % (объем/объем) до 0,8 % (объем/объем), еще более предпочтительно –
30 приблизительно от 0,16 % (объем/объем) до 0,6 % (объем/объем), и наиболее предпочтительно приблизительно от 0,2 % (объем/объем) до 0,4 % (объем/объем). Время инкубации зависит от резистентности PPV и/или PRRSV. Как правило, процесс инактивации выполняют до тех пор, пока не перестанет

обнаруживаться рост PPV и/или PRRSV в соответствующей системе культивирования.

Предпочтительно инактивированный PPV и/или PRRSV в соответствии с настоящим изобретением инактивируют формалином, предпочтительно с применением описанной выше концентрации.

Предпочтительно инактивированный PPV и/или PRRSV в соответствии с настоящим изобретением является инактивированным циклизированным бинарным этиленамином (BEI), включая добавление раствора 2-бромэтиленамингидробромида (BEA), который был циклизирован до бинарного этиленамина (BEI).

Инактивированный PPV и/или PRRSV в соответствии с изобретением может быть включен в липосомы с применением известной технологии, такой, как описываемая в публикациях Nature, 1974, 252, 252 - 254 или Journal of Immunology, 1978, 120, 1109 - 1113. В другом варианте осуществления изобретения инактивированный PPV в соответствии с изобретением может быть конъюгирован с подходящими биологическими соединениями, такими, как полисахариды, пептиды, белки и т. п., или их комбинация.

Термин "иммунизация" относится к активной иммунизации путем введения иммуногенной композиции субъекту, подлежащему иммунизации, таким образом, чтобы вызывался иммунный ответ против антигена, включенного в такую иммуногенную композицию.

Предпочтительно в результате иммунизации обеспечивается снижение частоты случаев конкретной инфекции PPV и/или PRRSV в стаде или уменьшение тяжести клинических признаков, вызываемых или связанных с конкретной инфекцией PPV и/или PRRSV.

Кроме того, результатом иммунизации субъекта, который в ней нуждается, иммуногенными композициями, обеспечиваемыми настоящим изобретением, является предотвращение заражения субъекта инфекцией PPV и/или PRRSV. В еще более предпочтительном варианте результатом иммунизации является эффективный, длительный иммунологический ответ против инфекции PPV и/или PRRSV. Следует понимать, что вышеупомянутый период времени должен длиться более 1 месяца, предпочтительно свыше 2 месяцев, более предпочтительно – свыше 3 месяцев, более предпочтительно – свыше 4 месяцев, более предпочтительно – свыше 5 месяцев, более предпочтительно – свыше 6

месяцев. Следует понимать, что иммунизация может не быть эффективной у всех иммунизированных субъектов. Однако термин требует, чтобы значительная часть субъектов в стаде была эффективно иммунизирована.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения предполагается стадо субъектов, в котором в нормальных условиях, т. е., без иммунизации, проявляются клинические признаки вызываемых или связанных с а PPV и/или Инфекция PRRSV. Эффективно ли иммунизированы субъекты стада, можно определить без лишних усилий со стороны специалистов в данной области. Предпочтительно иммунизация считается эффективной, если клинические признаки у по меньшей мере 33 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90 %, еще более предпочтительно – у по меньшей мере 95 %, наиболее предпочтительно – у 100 % субъектов данного стада снижаются по частоте или тяжести по меньшей мере на 10 %, более предпочтительно – по меньшей мере на 20 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 30 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 40 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 50 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 60 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 70 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 80 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 90 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 95 %, наиболее предпочтительно – на 100 %, по сравнению с субъектами, которые либо не были иммунизированы, либо были иммунизированы иммуногенной композицией, которая имела в наличии до настоящего изобретения, но впоследствии были инфицированы конкретным PPV.

В другом аспекте настоящее изобретение касается применения иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации или комплект, как описывается и заявляется авторами для приготовления медикамента, предпочтительно вакцины.

В другом аспекте настоящее изобретение касается применения иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации или комплект, как описывается и заявляется авторами, для лечения и/или профилактики инфекции вируса PPV и/или вируса PRRS, снижения, профилактики или лечения клинических признаков, вызванных инфекцией PPV

и/или вирус PRRS, или для лечения и/или профилактики заболевания, вызванного инфицированием PPV и/или вирус PRRS.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа иммунизации субъекта, включающего введение такому субъекту иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа лечения и/или предотвращения клинических признаков, вызываемых инфекцией вируса PPV и/или PRRS, предпочтительно свиного репродуктивного и респираторного синдрома, предпочтительно у свиней, у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа снижения репродуктивной недостаточности у субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа снижения смертности эмбриона и плода у субъекту по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа активной иммунизации племенных свиней (свиноматок и свинок) для защиты эмбрионов и плодов от инфекции свиного парвовируса, причем способ включает введения таким свиным (свиноматкам и свинкам) терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем вышеупомянутый субъект выбирают из группы, к которой относятся свиньи, крупный рогатый скот, кошки или собаки, предпочтительно свинья, более предпочтительно свиноматка и/или свинка.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, согласно которым иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию (или отдельные компоненты комплекта) вводят однократно или двумя или более дозами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию (или отдельные компоненты комплекта) вводят внутримышечно.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию (или отдельные компоненты комплекта) вводят свинкам и/или свиноматкам, предпочтительно свинкам и/или свиноматкам по меньшей мере 3-недельного возраста, более предпочтительно свинкам и/или свиноматкам перед беременностью, еще более предпочтительно – свиноматкам во время беременности и лактации.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) является безопасной для свинок и/или свиноматок во время беременности и лактации и свинок перед беременностью.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) является безопасной для свиноматок и/или свинок после 30 дней беременности, предпочтительно после 40 дней беременности.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) включает от 0,1 мкг до 50 мкг антигена PPV VP2, предпочтительно

от 0,5 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, более предпочтительно – от 1,0 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2 и/или от 3,9 до 7,0 log₁₀TCID₅₀ вируса PRRS.

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения PPV и/или а гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PRRS.

10 В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) защищает от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами PPV и/или от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами вируса PRRS.

15 В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов PPV и/или обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов вируса PRRS.

20 В другом аспекте настоящее изобретение касается способов, как описывается и заявляется авторами, причем в результате выполнения вышеупомянутого способа обеспечивается улучшение по меньшей мере одного параметра эффективности выбранного из группы, к которой относятся: 25 сниженная переходная лейкопения и репродуктивная недостаточность, характеризующиеся инфицированием и гибелью эмбриона и/или плода, или их комбинации, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида.

30 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения согласно способу иммунизации субъекта, включающему введение вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта) такому субъекту.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения согласно способу лечения и/или предотвращения клинических признаков, вызываемых инфекцией вируса PPV и/или PRRS, предпочтительно свиного репродуктивного и респираторного синдрома, предпочтительно у свиней, у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта).

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения согласно способу снижения репродуктивной недостаточности у субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта).

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения согласно способу снижения смертности эмбриона и плода у субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта).

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения согласно способу активной иммунизации племенных свиней (свиноматок и свинок) для защиты эмбрионов и плодов от инфекции свиного парвовируса, причем способ включает введение таким свиньям (свиноматкам и

свинкам) вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта).

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем вышеупомянутый субъект выбирают из группы, к которой относятся свиньи, крупный рогатый скот, кошки или собаки, предпочтительно свиньи, более предпочтительно – свиноматки и/или свинки.

10 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные
15 компоненты комплекта) вводят однократно или двумя или более дозами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенную
20 композицию или комбинированную вакцину или комбинацию (или отдельные компоненты комплекта) вводят внутримышечно.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для
25 применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию (или отдельные компоненты комплекта) вводят свинкам и/или свиноматкам, предпочтительно свиноматкам, по меньшей мере 3-недельного возраста, более предпочтительно – свиноматкам перед беременностью, еще более предпочтительно – свиноматкам
30 во время беременности и лактации.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная

композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) является безопасной для свинок и/или свиноматок во время беременности и лактации.

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) является безопасной для свинок и/или свиноматок после 10 30 дней беременности, предпочтительно после 40 дней беременности.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная 15 композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) включает от 0,1 мкг до 50 мкг антигена PPV VP2, предпочтительно от 0,5 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, более предпочтительно – от 1,0 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, и/или от 3,9 до 7,0 \log_{10} TCID₅₀ вируса PRRS.

20 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные 25 компоненты комплекта) защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения PPV и/или защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PRRS.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных 30 компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) защищает от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами PPV и/или защищает от

провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами вируса PRRS.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта) обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов PPV и/или обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов вируса PRRS.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации (или отдельных компонентов комплекта), как описывается и заявляется авторами, для применения, как описывается и заявляется авторами, причем в результате выполнения вышеупомянутого способа обеспечивается улучшение по меньшей мере одного параметра эффективности выбранного из группы, к которой относятся: сниженная переходная лейкопения и репродуктивная недостаточность, характеризующиеся инфицированием и гибелью эмбриона и/или плода, или их комбинации, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида.

Термин “лечение и/или профилактика” касается снижения частоты случаев конкретной инфекции PPV и/или инфекции PRRSV в стаде или снижения тяжести клинических признаков вызываемых или связанных с конкретной инфекцией PPV и/или PRRSV. Таким образом, термин “лечение и/или профилактика” также касается уменьшения количества животных в стаде, инфицированных конкретным PPV и/или PRRSV (= снижения частоты случаев конкретной инфекции PPV и/или инфекции PRRSV) или снижения тяжести клинических признаков, обычно связанных с инфекцией PPV и/или PRRSV, или вызываемых ею, в группе животных, которые получили эффективное количество иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как предусмотрено в данном описании, по сравнению с группой животных, которые не получали такой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации.

“Лечение и/или профилактика”, как правило, включает введение эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации в соответствии с настоящим изобретением субъекту или стаду субъектов, которые нуждаются в таком лечении / профилактике, или для которых такое лечение / профилактика являются благоприятными. Термин “лечение” касается введения эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации после того, как субъект или по меньшей мере некоторые животные из стада уже были инфицированы таким PPV и/или PRRSV, и такие животные уже проявляли некоторые клинические признаки вызываемых или связанных с такой инфекцией PPV и/или PRRSV. Термин “профилактика” касается введения субъекту перед любым инфицированием такого субъекта PPV и/или PRRSV или ситуацию, когда хотя бы такое животное или ни одно из животных в группе животных не проявляет никаких клинических признаков, вызываемых инфицированием таким PPV, или связанных с ним и/или PRRSV. Термины “профилактика” и “предотвращение” применяются в этой заявке взаимозаменяемо.

Термин "эффективное количество" в контексте данного описания означает, помимо прочего, количество антигена, которое вызывает или способно вызвать иммунный ответ у субъекта. Такое эффективное количество способно снижать частоту случаев конкретной инфекции PPV и/или инфекции PRRSV в стаде или снизить тяжесть клинических признаков конкретной инфекции PPV и/или инфекции PRRSV.

Предпочтительно клинические признаки снижаются по частоте или тяжести по меньшей мере на 10 %, более предпочтительно – по меньшей мере на 20 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 30 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 40 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 50 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 60 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 70 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 80 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 90 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 95 %, наиболее предпочтительно – на 100 %, по сравнению с субъектами, которые не получали лечения или получали иммуногенную композицию, или комбинированная вакцина или комбинация которая имелась в наличии до

настоящего изобретения, но впоследствии были инфицированы конкретным PPV и/или PRRSV.

5 Термин “клинические признаки” в контексте данного описания касается наличия у субъекта признаков инфекции PPV и/или PRRSV. Клинические
признаки инфекции зависят от выбранного патогена. Примеры таких
клинических признаков включают, помимо прочих, сниженная переходная
лейкопения и репродуктивная недостаточность, характеризующиеся
инфицированием и гибелью эмбриона и/или плода, или их комбинации.
10 Примеры прямо наблюдаемых клинических признаков включают уменьшенный
размер помета, повышенную мумификацию эмбриона или плода на выводок,
аутолизацию эмбриона или плода, уменьшенный размер эмбриона или плода,
уменьшенный вес эмбриона или плода и т. п., или их комбинации. Другие
примеры таких клинических признаков включают, помимо прочих, повышенную
15 вирусемию, повышенную вирусную нагрузку в тканях-мишенях и крови,
повышенную передачу / распространение PPV на однопометников и т. п., или их
комбинации.

Предпочтительно клинические признаки, которые снижаются по частоте
случаев или тяжести у подвергнутого лечению субъекта по сравнению с
субъектами, которые либо не подвергались лечению, либо подвергались
20 лечению иммуногенной композицией, которая имелась в наличии до настоящего
изобретения, но впоследствии были инфицированы конкретным PPV и/или
PRRSV, касаются переходной лейкопении и репродуктивной недостаточности,
характеризующихся инфицированием и гибелью эмбриона и/или плода, или их
комбинации.

25 Термин “нуждающийся” или “нуждается” в контексте данного описания
означает, что введение / лечение связано со стимулированием или улучшением
состояния здоровья или клинических признаков или любым другим
положительным медицинским воздействием на здоровье животных (включая их
эмбрионы и плоды), которые получают иммуногенную композицию в
30 соответствии с настоящим изобретением.

Термин “снижение” или “сниженный” или “уменьшение” или “уменьшать”
применяются в этой заявке взаимозаменяемо. Термин “снижение” означает, что
клинический признак снижается по меньшей мере на 10 %, более
предпочтительно – по меньшей мере на 20 %, еще более предпочтительно – по

меньшей мере на 30 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 40 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 50 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 60 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 70 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 80 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 90 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 95 % наиболее предпочтительно – на 100 % по сравнению с субъектами, не подвергнутыми лечению (иммунизации), но впоследствии инфицированными конкретным PPV и/или PRRSV.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация (или отдельные компоненты комплекта), как описывается и заявляется авторами вводят однократно. Следует понимать, что разовую дозу вводят лишь один раз.

Объем дозы на субъекта зависит от способа вакцинации и возраста субъекта. Предпочтительно разовая доза имеет общий объем приблизительно от 0,2 мл до 2,5 мл, более предпочтительно – приблизительно от 0,2 мл до 2,0 мл, еще более предпочтительно – приблизительно от 0,2 мл до 1,75 мл, еще более предпочтительно – приблизительно от 0,2 мл до 1,5 мл, еще более предпочтительно – приблизительно от 0,4 мл до 1,25 мл, еще более предпочтительно – приблизительно от 0,4 мл до 1,0 мл, причем наибольшее предпочтение отдается разовой дозе 0,5 мл или 1,0 мл. Наиболее предпочтительно разовая доза имеет общий объем 0,5 мл, 1 мл, 1,5 мл или 2 мл.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию (или отдельные компоненты комплекта), как описывается и заявляется авторами, вводят двумя или более дозами.

Однако иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация может вводиться двумя или более дозами, причем первую дозу вводят перед введением второй (бустерной) дозы. Предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 15 дней после первой дозы. Более предпочтительно вторую дозу вводят между 15 и 40 днями после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 17 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят между 17 и 30 днями после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере 19 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую

дозу вводят между 19 и 25 днями после первой дозы. Наиболее предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 21 день после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят приблизительно через 21 день после первой дозы или через 21 день после первой дозы. В предпочтительном аспекте 5 двухразового режима введения и первую, и вторую дозы иммуногенной композиции вводят в одинаковом количестве. Предпочтительно каждую дозу вводят в указанном выше предпочтительном количестве, причем наиболее предпочтительной является доза 1 мл или 2 мл для первой и второй дозы. Помимо режима первой и второй дозы, альтернативный вариант осуществления 10 включает дополнительные последующие дозы. Например, в этих аспектах может вводиться третья, четвертая или пятая доза. Предпочтительно последующие третью, четвертую и пятую дозы в этом режиме вводят в таком же количестве, что и первую дозу, с интервалом времени между дозами, соответствующим времени между вышеупомянутыми первой и второй дозами. Вышеупомянутые 15 режимы введения предпочтительно применяют только к свинкам. Свиноматкам предпочтительно вводят только иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию в форме однократного введения.

В одном аспекте настоящего изобретения субъект выбирают из группы, к которой относятся свинья, крупный рогатый скот, кошка и собака.

20 Предпочтительно субъектом является свинья. Следует понимать, что свинья подразумевает животных как женского, так и мужского пола. Сперма может содержать PPV, поэтому самки и самцы племенных животных охватываются определением “свинья”. Таким образом, определение “свинья” включает животных мужского пола, таких, как хряки, а также животных 25 женского пола, таких, как свинки и свиноматки.

Термин “свинка” в контексте данного описания предпочтительно относится к свинье до и во время первой супоросности / беременности. В отличие от него, термин “свиноматка” в контексте данного описания предпочтительно относится к свинье после первого опороса – как положительного результата ее первой 30 супоросности / беременности.

Объем дозы на субъекта зависит от способа вакцинации и возраста субъекта. Предпочтительно общий объем составляет приблизительно от 0,2 мл до 5 мл, более предпочтительно – приблизительно от 0,5 мл до 3,0 мл, еще более предпочтительно – приблизительно от 1,0 мл до 2,5 мл, еще более

предпочтительно – приблизительно от 1,0 мл до 2,0 мл. Наиболее предпочтительный объем составляет 1 мл, 1,5 мл, 2 мл или 2,5 мл на дозу.

Иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию (или отдельные компоненты комплекта) предпочтительно вводят по месту или системно. Подходящими традиционно применяемыми путями введения являются пероральное или парентеральное введение, такое, как интраназальное, внутривенное, внутрикожное, чрескожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, подкожное, а также ингаляция. Однако, в зависимости от характера и способа действия соединения, иммуногенная композиция также может вводиться другими путями. Например, к таким путям относятся внутрикожный, внутривенный, внутрисосудистый, внутриартериальный, внутрибрюшинный, интратекальный, интратрахеальный, внутрикожный, интракардиальный, внутридолевой, внутримозговой, внутрилегочный, ректальный и вагинальный. Однако более предпочтительную иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят подкожно или внутримышечно. Наиболее предпочтительно иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят внутримышечное.

Авторами описываются следующие пункты:

1. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация, которая включает

(а) по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV), причем по меньшей мере один антиген PPV является любым антигеном, содержащимся в PPV, и

(б) по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), причем по меньшей мере один антиген вируса PRRS является любым антигеном, содержащимся в вирусе PRRS.

2. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 1, отличающаяся тем, что PPV выбирают из группы, к которой относятся: живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PPV, убитый / инактивированный вирус PPV (например, Porcilis Parvo), убитый / инактивированный штамм PPV 014, германские полевые изоляты свиного парвовируса PPV-27a и PPV-143a и вирусы вакцины свиного парвовируса PPV-NADL-2 и PPV-IDT (MSV).

3. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 2, отличающаяся тем, что по меньшей мере один антиген PPV представляет собой одну или несколько субъединиц PPV.

5 4. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 3, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна субъединица PPV представляет собой вирусный белок 2 PPV (VP2).

10 5. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 4, отличающаяся тем, что PPV VP2 является единственным антигеном PPV.

6. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 4 по 5, отличающаяся тем, что PPV VP2 имеет

15 - в аминокислотной позиции 228 глутаминовокислотный остаток или глутаматный остаток, и/или

- в аминокислотной позиции 414 сериновый остаток, и/или

- в аминокислотной позиции 419 глутаминовый остаток, и/или

- в аминокислотной позиции 436 треониновый остаток,

20 причем нумерация аминокислотных позиций относится к аминокислотной последовательности дикого типа PPV VP2.

7. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 6, отличающаяся тем, что PPV VP2 также имеет

- в аминокислотной позиции 25 изолейциновый остаток, и/или

- в аминокислотной позиции 36 сериновый остаток, и/или

25 - в аминокислотной позиции 37 изолейциновый остаток.

8. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 6 по 7, отличающаяся тем, что нумерация аминокислотных позиций относится к аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1.

30 9. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 4 по 8, отличающаяся тем, что PPV VP2 представляет собой рекомбинантный PPV VP2.

10. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 9, отличающаяся тем, что PPV VP2 представляет собой экспрессируемый рекомбинантным бакуловирусом PPV VP2.

5 11. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 4 по 10, отличающаяся тем, что PPV VP2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 – 16.

10 12. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 11, отличающаяся тем, что PPV VP2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1
15 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, или по меньшей мере 99,9 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 – 16.

20 13. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 12, отличающаяся тем, что PPV VP2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 – 16 или включает или состоит из любого фрагмента, который имеет по меньшей мере 210, по меньшей мере 250 или по меньшей мере 300
25 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 – 16.

14. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 13, отличающаяся тем, что PPV VP2 включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2
30 или SEQ ID NO: 5 – 16.

15. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 4 по 14, отличающаяся тем, что PPV VP2 кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90 % идентичности

последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 – 16.

16. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 15, отличающаяся тем, что PPV VP2 кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, или по меньшей мере 99,9 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 – 16.

17. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 16, отличающаяся тем, что PPV VP2 кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 – 16.

18. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 16, отличающаяся тем, что вирус PRRS выбирают из группы, к которой относятся: вирус PRRS генотипа 1, вирус PRRS генотипа 2, вирус PRRS генотипа 1, включающий геном, кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 %, или 100 % идентичности с нуклеиновокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 (последовательностью Lelystad дикого типа), вирус PRRS генотипа 2, включающий геном, кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей

мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 % или 100 % идентичности с нуклеиновокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18 (последовательностью VR2332 дикого типа).

19. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 18, отличающаяся тем, что вирус PRRS выбирают из группы, к которой относятся: живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 1 (например, Porcilis PRRS, Unistrain PRRS, Amervac PRRS), живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 2 (например, Ingelvac® PRRS MLV, Fosterer PRRS), живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS штамм 94881 [(генотип 1), ReproCyc® PRRS EU], убитый / инактивированный вирус PRRS, убитый / инактивированный вирус PRRS, генотип типа 1 (например, Progressis), убитый / инактивированный вирус PRRS, генотип типа 2, штамм вируса Lelystad (CDI-NL-2.91, Institut Pasteur, Париж, Франция, номер депонирования I-1102), субъект(ы) вируса PRRS, или другие штаммы, такие, как депонированные под номерами доступа ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, номером доступа CNCM I-1140, номером доступа CNCM I-1387, номером доступа CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, и VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, или ECACC V93070108, североамериканский вирус PRRS рТ7Р129А (номер доступа ATCC 203488), под номером депонирования ATCC VR-2332, ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, и ATCC VR 2402.

20. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 19, отличающаяся тем, что по меньшей мере один антиген PPV представляет собой одну или несколько субъединиц PPV, в которой предпочтительно по меньшей мере один антиген PPV представляет собой вирусный белок 2 PPV (VP2), более предпочтительно – PPV VP2 является единственным антигеном PPV, и по меньшей мере один антиген вируса PRRS представляет собой живой аттенюированный / модифицированный

живой вирус PRRS, предпочтительно живой аттенюированный /
модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 1 (например, Porcilis
PRRS, Unistrain PRRS, Amervac PRRS), более предпочтительно живой
аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, штамм 94881
5 [(генотип 1), ReproCyc® PRRS EU] и живой аттенюированный /
модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 2 (например, Ingelvac®
PRRS MLV, Fosterera PRRS).

21. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по любому из пунктов с 1 по 20, отличающаяся тем, что
10 иммуногенная композицию или комбинированную вакцину или комбинацию
рецептируют для введения в форме разовой дозы или двумя дозами.

22. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по любому из пунктов с 1 по 21, отличающаяся тем, что
иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию
15 вводят внутримышечно.

23. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по любому из пунктов с 1 по 22, отличающаяся тем, что
иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация
является безопасной для свинок и/или свиноматок во время беременности и
20 лактации.

24. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по пункту 23, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция
или комбинированная вакцина или комбинация является безопасной для свинок
и/или свиноматок после 30 дней беременности, предпочтительно после 40 дней
25 беременности.

25. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по любому из пунктов с 1 по 24, отличающаяся тем, что
иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация также
включает по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

30 26. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по пункту 25, отличающаяся тем, что по меньшей мере один
фармацевтически приемлемый носитель является карбомером.

27. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по любому из пунктов с 4 по 26, отличающаяся тем, что

иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация включает от 0,1 мкг до 50 мкг антигена PPV VP2, предпочтительно от 0,5 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, более предпочтительно – от 1,0 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, и/или от 3,9 до 7,0 \log_{10} TCID₅₀ вируса PRRS.

5 28. Иммуногенная композиция или комбинация по любому из пунктов с 1 по 27, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинация является вакциной.

10 29. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 28, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PPV и/или а гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PRRS.

15 30. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 29, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация защищает от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами PPV и/или от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами вируса PRRS.

20 31. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 30, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов PPV и/или обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов вируса PRRS.

25 32. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 31, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация эффективна для лечения и/или профилактики клинических признаков, вызываемых инфекцией вируса PPV и/или PRRS у субъекта, который в этом нуждается.

30 33. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 31, отличающаяся тем, что по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген

вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) содержатся вместе в одном контейнере или отделены друг от друга пространством, предпочтительно содержатся в двух или более отдельных контейнерах.

5 34. Комплект, включающий иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию по любому из пунктов с 1 по 33.

10 35. Комплект по пункту 34, отличающийся тем, что по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) содержатся отдельно друг от друга в двух или более отдельных контейнерах, предпочтительно независимо друг от друга в лиофилизированной или замороженной форме, и комплект также включает инструкцию с руководством по смешиванию разделенных пространством по меньшей мере одного антигена PPV и по меньшей мере одного антигена вируса PRRS, причем такая инструкция с руководством предпочтительно содержит указания по комбинированию
15 содержимого контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген PPV, с содержимым контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген вируса PRRS, причем более предпочтительно жидкое содержимое контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген PPV, используют в качестве разбавителя для лиофилизированного содержимого
20 контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген вируса PRRS.

36. Комплект по любому из пунктов с 34 по 35, отличающийся тем, что комплект также включает указания по лечению и/или профилактике заболеваний у свиней и/или также включает указания по лечению и/или профилактике инфекций вируса PPV и/или вируса PRRS, причем такой комплект
25 предпочтительно также включает указания по ассоциированному применению компонента PPV и компонента PRRSV иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации по любому из пп. с 1 по 33.

37. Применение иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации по любому из пунктов с 1 по 33 или комплекта по
30 любому из пунктов с 34 по 36 для приготовления медикамента, предпочтительно вакцины.

38. Применение по пункту 37 для приготовления медикамента для лечения и/или профилактики инфекции вируса PPV и/или вируса PRRS, снижения, профилактики или лечения клинических признаков, вызванных

инфекцией PPV и/или вирусом PRRS, или для лечения и/или профилактики заболевания, вызванного инфицированием PPV и/или вирусом PRRS.

39. Способ иммунизации субъекта, включающий введение такому субъекту иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации по любому из пунктов с 1 по 33.

40. Способ лечения и/или предотвращения клинических признаков, вызываемых инфекцией вируса PPV и/или PRRS, предпочтительно свиного репродуктивного и респираторного синдрома, предпочтительно у свиней, у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации по любому из пунктов с 1 по 33.

41. Способ снижения репродуктивной недостаточности у субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации по любому из пунктов с 1 по 33.

42. Способ снижения смертности эмбриона и плода у субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации по любому из пунктов с 1 по 33.

43. Способ по любому из пунктов с 39 по 42, отличающийся тем, что вышеупомянутый субъект выбирают из группы, к которой относятся свиньи, крупный рогатый скот, кошки или собаки, предпочтительно свинья, более предпочтительно свиноматка и/или свинка.

44. Способ по любому из пунктов с 39 по 43, отличающийся тем, что иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят одной или двумя или более дозами.

45. Способ по любому из пунктов с 39 по 44, отличающийся тем, что иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят внутримышечно.

46. Способ по любому из пунктов с 39 по 45, отличающийся тем, что иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят свинкам и/или свиноматкам, предпочтительно свиноматкам по меньшей

мере 3-недельного возраста, более предпочтительно свиноматкам перед беременностью, еще более предпочтительно – свиноматкам во время беременности и лактации.

5 47. Способ по любому из пунктов с 39 по 46, отличающийся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация является безопасной для свинок и/или свиноматок во время беременности и лактации.

10 48. Способ по любому из пунктов с 39 по 47, отличающийся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация является безопасной для свиноматок и/или свинок после 30 дней беременности, предпочтительно после 40 дней беременности.

15 49. Способ по любому из пунктов с 39 по 48, отличающийся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация включает от 0,1 мкг до 50 мкг антигена PPV VP2, предпочтительно от 0,5 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, более предпочтительно – от 1,0 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, и/или от 3,9 до 7,0 \log_{10} TCID₅₀ вируса PRRS.

20 50. Способ по любому из пунктов с 39 по 49, отличающийся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PPV и/или а гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PRRS.

25 51. Способ по любому из пунктов с 39 по 50, отличающийся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация защищает от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами PPV и/или от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами вируса PRRS.

30 52. Способ по любому из пунктов с 39 по 51, отличающийся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов PPV и/или обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов вируса PRRS.

53. Способ по любому из пунктов с 39 по 52, отличающийся тем, что в результате выполнения вышеупомянутого способа обеспечивается улучшение по меньшей мере одного параметра эффективности выбранного из группы, к

которой относятся: сниженная переходная лейкопения и репродуктивная недостаточность, характеризующиеся инфицированием и гибелью эмбриона и/или плода, или их комбинации, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида.

5 54. Способ по любому из пунктов с 39 по 53, отличающийся тем, что по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) вводят субъекту одновременно, предпочтительно по отдельности одновременно в одном или различных местах введения, последовательно (в любом порядке),
10 и/или с регулированием по времени.

55. Способ по любому из пунктов с 39 по 54 для активной иммунизации племенных свиней (свиноматок и свинок) для защиты эмбрионов и плодов от инфекции свиного парвовируса, включающий введение таким свиньям (свиноматкам и свинкам) иммуногенной композиции или комбинированной
15 вакцины или комбинации по любому из пп. с 1 по 33.

56. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения согласно способу иммунизации субъекта, включающему введение вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации такому субъекту.

20 57. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения согласно способу лечения и/или предотвращения клинических признаков, вызываемых инфекцией вируса PPV и/или PRRS, предпочтительно свиного репродуктивного и респираторного синдрома, предпочтительно у свиней, у субъекта, который в
25 этом нуждается, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации.

58. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения согласно способу
30 снижения репродуктивной недостаточности у субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации.

59. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения согласно способу снижения смертности эмбриона и плода у субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем способ
5 включает введение субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации.

60. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из
10 пунктов с 56 по 59, отличающаяся тем, что вышеупомянутый субъект выбирают из группы, к которой относятся свиньи, крупный рогатый скот, кошки или собаки, предпочтительно свинья, более предпочтительно свиноматка и/или свинка.

61. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
15 комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 60, отличающаяся тем, что иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят однократно или двумя или более дозами.

62. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
20 комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 61, отличающаяся тем, что иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят внутримышечно.

63. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из
25 пунктов с 56 по 62, отличающаяся тем, что иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию вводят свинкам и/или свиноматкам, предпочтительно свиноматкам по меньшей мере 3-недельного возраста, более предпочтительно – свиноматкам перед беременностью, еще более предпочтительно – свиноматкам во время беременности и лактации.

30 64. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 63, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация является безопасной для свинок и/или свиноматок во время беременности и лактации.

65. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 64, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация является безопасной для свинок и/или свиноматок после 30 дней беременности, предпочтительно после 40 дней беременности.

66. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 65, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация включает от 0,1 мкг до 50 мкг антигена PPV VP2, предпочтительно от 0,5 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, более предпочтительно – от 1,0 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, и/или от 3,9 до 7,0 \log_{10} TCID₅₀ вируса PRRS.

67. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 66, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PPV и/или защищает от гомологичного и/или гетерологичного провокационного заражения вирусом PRRS.

68. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 67, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация защищает от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами PPV и/или защищает от провокационного заражения североамериканскими и/или европейскими изолятами вируса PRRS.

69. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 68, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов PPV и/или обеспечивает перекрестную защиту от североамериканских и/или европейских изолятов вируса PRRS.

70. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 69, отличающаяся тем, что в результате выполнения вышеупомянутого способа обеспечивается улучшение по меньшей мере одного параметра эффективности выбранного из группы, к которой относятся: переходная лейкопения и репродуктивная недостаточность, характеризующиеся инфицированием и гибелью эмбриона и/или плода, или их комбинации, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида.

71. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения по любому из пунктов с 56 по 70, отличающаяся тем, что по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) вводят субъекту одновременно, предпочтительно по отдельности одновременно в одном или различных местах введения, последовательно (в любом порядке), и/или с регулированием по времени.

72. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 33 для применения согласно способу активной иммунизации племенных свиней (свиноматок и свинок) для защиты эмбрионов и плодов от инфекции свиного парвовируса, который включает введение вышеупомянутой иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации такими свиньям (свиноматкам и свинкам).

Второе рассмотрение настоящего изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение касается способа получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, причем способ включает этапы в следующем порядке:

(I) обеспечение / получение смеси, включающей

- первую жидкость,
- рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, и
- вектор, включающий нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок;

(II) добавление второй жидкости к смеси с этапа (I), причем вторая жидкость отличается от первой жидкости;

(III) промывание и, необязательно, окончательное концентрирование рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков в смеси путем дополнительного добавления второй жидкости к смеси, полученной в результате выполнения этапа (II), и удаления части первой и/или второй жидкости из такой комбинированной смеси;

(IV) инактивацию вектора путем добавления инактивирующего агента к смеси, полученной в результате выполнения этапа (III);

(V) нейтрализацию инактивирующего агента путем добавления нейтрализующего агента к смеси, полученной в результате выполнения этапа (IV).

С точки зрения настоящего изобретения “первая жидкость” относится к жидким, водным или текучим средам, как правило, используемым в комбинации с клетками, антигенами, иммуногенными композициями, вакцинами и т. п. Предпочтительно первая жидкость включает среды из антигенной композиции; более предпочтительно первая жидкость включает или предпочтительно состоит из сред для культивирования клеток, применяемых для получения рекомбинантных белков в культивируемых клетках-хозяевах. Вышеупомянутые культивируемые клетки-хозяева могут быть бактериями, дрожжами, клетками насекомых, клетками животных и клетками млекопитающих, причем особенно предпочтительными являются клетки насекомых и млекопитающих. Таким образом, первая жидкость может включать или состоять из сред для культивирования бактерий, дрожжей, клетки насекомых, клеток животных или клеток млекопитающих. Предпочтительно среда для клеток представляет собой бессывороточную среду для клеток, наиболее предпочтительно культуральной средой является бессывороточная среда Excell 420 при использовании клеток насекомых.

“Вторая жидкость” в соответствии с настоящим изобретением означает любую жидкость, обычно используемую в комбинации с клетками, антигеном, иммуногенными композициями, вакцинами и т. п., которая отличается от первой жидкости. Предпочтительно вторая жидкость представляет собой водный раствор, еще более предпочтительно – фармацевтически приемлемый раствор, еще более предпочтительно – буфер, такой, как солевой раствор или фосфатный буфер и т. п. Наиболее предпочтительно вторая жидкость характеризуется

отсутствием виروцидности для любого живого вируса или живых бактерий, при культивировании или хранении живого вируса или живых бактерий в такой жидкости.

5 “Часть” с точки зрения настоящего изобретения означает любое количество, которое не включает все количество. Например, часть жидкости во всяком случае должна составлять меньше, чем 100 % объема этой жидкости, например, 90 % жидкости, 80 % жидкости, 70 % жидкости, и любое количество, большее, чем 0 %, и меньшее, чем 100 %.

10 “Рекомбинантный белок” с точки зрения настоящего изобретения означает любой рекомбинантный белок, предпочтительно белок PPV VP2, более предпочтительно – включающий или состоящий из последовательности, которая имеет по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95
15 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 %, или 100 % идентичности с последовательностью SEQ ID
20 NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NOS 5 – 16.

“Четвертичные структуры” а также “четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков” с точки зрения настоящего изобретения означают трехмерное расположение множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, таких, как вирусоподобные частицы
25 и/или гомотримеры.

“Вектор”, а также “вектор, включающий нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок” с точки зрения настоящего изобретения означает подходящий вектор экспрессии, предпочтительно вектор экспрессии бакуловируса, который, в свою очередь,
30 используют для трансфекции или, в случае вектора экспрессии бакуловируса, для инфицирования клетки-хозяина для получения белка или полипептида, кодируемого ДНК.

Векторы и способы получения и/или применения векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут быть идентичными или аналогичными

способам, раскрываемым в: патентах США №№ 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, публикациях PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, 5 "PNAS USA 93: 11349 - 11353, October 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341 - 11348, October 1996; публикации Smith et al., Патенте США № 4,745,051 (рекомбинантный бакуловироз); Richardson, C. D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith et 10 al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, December, 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156 - 2165; Pennock et al., "Strong и Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector, "Molecular and Cellular Biology March 1984, Vol. 4, No. 3, p. 406; ЕРА0 370 573; заявке США № 920,197, 15 поданной 16 октября 1986 г.; Патентной публикации ЕР № 265785; Патенте США № 4,769,331 (рекомбинантный герпесвирус); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93: 11307 - 11312, October 1996; Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain 20 tumors," PNAS USA 93: 11313 - 11318, October 1996; Robertson et al., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocyte", PNAS USA 93: 11334 - 11340, October 1996; Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, October 1996; Kitson et al., J. Virol. 65, 3068-3075, 1991; патентах США №№ 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; 25 акцептованных заявках США, сер. №№ 08/675,556 и 08/675,566, обе из которых были поданы 3 июля 1996 г. (рекомбинантный аденовирус); публикации Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology (Vol. 3) p. 237 - 52, 1993; Ballay et al. EMBO Journal, vol. 4, p. 3861 - 65, Graham, Tibtech 8, 85 - 87, April, 1990; Prevec et al., J. Gen Virol. 70, 42434; PCT WO 91/11525; 30 Felgner et al. (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550 - 2561, Science, 259: 1745 - 49, 1993; и McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414 - 11420, October 1996; и патентах США №№ 5,591,639, 5,589,466, и 5,580,859, а также WO

90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; публикациях Tang et al., Nature, и Furth et al., Analytical Biochemistry, касающихся векторов экспрессии ДНК, и др. См. также публикации WO 98/33510; Ju et al., Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (лентивирусная экспрессирующая система);
 5 Sanford et al., Патент США № 4,945,050; Fischbach et al. (Intracel); WO 90/01543; Robinson et al., Seminars in Immunology vol. 9, pp. 271 - 283 (1997), (системы ДНК-векторов); Szoka et al., Патент США № 4,394,448 (способ вставки ДНК в живые клетки); McCormick et al., Патент США № 5,677,178 (применение цитопатических вирусов); и Патент США № 5,928,913 (векторы для доставки
 10 генов); а также других упомянутых авторами документах.

Предпочтительными клетками являются восприимчивые к инфицированию соответствующим рекомбинантным вирусным вектором, которые содержат ДНК рекомбинантного белка и экспрессируют рекомбинантный белок. Предпочтительно клетки являются клетки насекомых, более предпочтительно к
 15 ним относятся клетки насекомых, продаваемые под торговой маркой SF+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT). Предпочтительно клеточные культуры имеют число клеток приблизительно $0,3 - 2,0 \times 10^6$ клеток/мл, более предпочтительно – приблизительно $0,35 - 1,9 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно – приблизительно $0,4 - 1,8 \times 10^6$ клеток/мл, еще более
 20 предпочтительно – приблизительно $0,45 - 1,7 \times 10^6$ клеток/мл, и наиболее предпочтительно – приблизительно $0,5 - 1,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Предпочтительные вирусные векторы включают бакуловирус, например, BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), в частности, при условии, что продуцирующие клетки являются клетками насекомых. Хотя
 25 предпочтение отдается бакуловирусной системе экспрессии, специалистам в данной области станет понятно, что другие системы экспрессии, включая вышеописанные, также могут применяться в соответствии с целями настоящего изобретения, то есть, для экспрессии рекомбинантного белка.

Соответствующие среды для роста также могут определяться
 30 специалистами в данной области, причем предпочтительными средами для роста являются бессывороточные среды для клеток насекомых, такие, как Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) и т. п.

Рекомбинантный вирусный вектор, содержащий последовательности ДНК рекомбинантного белка, предпочтительно имеет множественность заражения

(MOI) приблизительно 0,03 – 1,5, более предпочтительно – приблизительно 0,05 – 1,3, еще более предпочтительно – приблизительно 0,09 – 1,1, и наиболее предпочтительно – приблизительно 0,1 – 1,0, при использовании для инфицирования восприимчивых клеток. Предпочтительно вышеупомянутые
5 показатели MOI касаются 1 мл жидкости для культивирования клеток. Предпочтительно описываемый авторами способ включает инфекцию $0,35 - 1,9 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно – приблизительно $0,4 - 1,8 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно – приблизительно $0,45 - 1,7 \times 10^6$ клеток/мл, и наиболее предпочтительно – приблизительно $0,5 - 1,5 \times 10^6$
10 клеток/мл, рекомбинантным вирусным вектором, содержащим ДНК рекомбинантного белка и экспрессирующим рекомбинантный белок, имеющий MOI (множественность заражения) приблизительно 0,03 – 1,5, более предпочтительно – приблизительно 0,05 – 1,3, еще более предпочтительно – приблизительно 0,09 – 1,1, и наиболее предпочтительно – приблизительно 0,1 –
15 1,0.

Часть первой жидкости может быть удалена из комбинированной смеси с этапа (III), содержащей рекомбинантный белок, на этапе фильтрации с применением фильтра. Однако может применяться любой другой способ, известный специалистам в данной области, для удаления части любой жидкости,
20 включая первую и, в соответствующих случаях, часть второй жидкости, из комбинированной смеси с этапа (III). Такой способ, например, включает, помимо прочего, центрифугирование и/или хроматографию. Однако фильтрация является наиболее предпочтительной. Предпочтительный способ фильтрации для удаления вышеупомянутой части первой жидкости или любой другой
25 жидкости, в соответствующих случаях, включает ультра- и/или диафильтрацию. Ультра- и диафильтрация являются стандартными способами, известными специалистам в данной области, подробно описываемыми, например, в публикации *Protein Purification Methods - A Practical Approach* – editors: E.L.V. Harris and S. Angel, Oxford University Press 1995 (содержание и идеи которой
30 включены в данное описание путем ссылки). В частности, в Главе 3 этого пособия описывается несколько способов и типов оборудования, которые могут применяться специалистами в данной области, в качестве примеров применения в соответствии с настоящим изобретением.

“Инактивирующий агент” с точки зрения настоящего изобретения касается любого агента, который может применяться согласно любому традиционному способу инактивации. Инактивация может выполняться с применением способов химической и/или физической обработки, которые известны специалистам в данной области. Предпочтительные способы инактивации включают добавление циклизированного бинарного этиленамина (ВЕI), включающее добавление раствора 2-бромэтиленамингидробромида (ВЕА), который был циклизирован до бинарного этиленамина (ВЕI). Предпочтительные дополнительные средства химической инактивации включают, помимо прочих, Triton X-100, дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметиламмония, β -пропиолактон, тимеросал, фенол и формальдегид (формалин).

“Нейтрализующий агент” с точки зрения настоящего изобретения означает любой агент, способный нейтрализовать описываемые авторами инактивирующие агенты, таким образом, чтобы инактивирующий агент терял способность к инактивации вектора. Агентом, нейтрализующим инактивирующий агент, предпочтительно является тиосульфат натрия, бисульфат натрия и т. п.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, причем смеси с этапа (I) получают с применением процедуры, включающей этапы

(а) инфицирования восприимчивых клеток в культуре вектором, включающим нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, причем вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, экспрессируются вышеупомянутым вектором,

(б) последующего извлечения рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, из клеточной культуры, причем клеточный дебрис предпочтительно отделяют от рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков через этап отделения, предпочтительно включающий микрофльтрацию через по меньшей мере один фильтр, более предпочтительно два фильтра, причем по

меньшей мере один фильтр предпочтительно имеет размер пор, больший, чем рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, в частности, имеет размер пор от приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 4 мкм.

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому клеточную культуру на этапе (а) поддерживают при 27 ± 2 °С, предпочтительно во время экспрессии рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, вышеупомянутым вектором, и/или
10 извлечение на этапе (б) происходит через 6 - 8 дней, предпочтительно 8 дней после инокуляции клеток вектором.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, в котором этап отделения включает или состоит из:

15 - микрофльтрации через по меньшей мере один фильтр, имеющий размер пор приблизительно 2 мкм до приблизительно 4 мкм, и/или
- микрофльтрации через по меньшей мере один фильтр, имеющий размер пор приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 0,8 мкм.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как
20 описывается и заявляется авторами, согласно которому вышеупомянутая первая жидкость включает часть среды для культивирования клеток или состоит из среды для культивирования клеток, и среда для культивирования клеток предпочтительно является средой для культивирования клеток насекомых.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как
25 описывается и заявляется авторами, согласно которому вышеупомянутый рекомбинантный белок выбирают из группы, к которой относятся:

- белок PPV VP2, предпочтительно включающий или состоящий из последовательности, которая имеет по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по
30 меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по

меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 %, или 100 % идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NOS: 5 – 16.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков являются вирусоподобными частицами, или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, являются гомотримерами.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому вектор является рекомбинантным вирусом, предпочтительно бакуловирусом, и/или нуклеиновокислотная последовательность является последовательностью ДНК.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, является рекомбинантным бакуловирусом, причем вышеупомянутый бакуловирус включает последовательность ДНК, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому на этапе (III) вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, промывают, используя по меньшей мере 2х, предпочтительно от 2х до 3х, второй жидкости и необязательно доводят до конечной концентрации по сравнению с первоначальным объемом вышеупомянутого рекомбинантного белка и/или вышеупомянутых четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков в смеси с этапа (I). Более предпочтительно на этапе (III) такой(ие) этап(ы) промывания, т. е., процесс диафильтрации, выполняют при температуре ниже 37 °С., более предпочтительно при температуре ниже 30 °С, еще более предпочтительно – при температуре ниже 20 °С, еще более предпочтительно – при температуре ниже 10

°С, например, при температуре от 4 °С до 29 °С, например, 27 °С или 4 °С. Таким образом, степень осаждения (агрегации) значительно снижается.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому на этапе (III) часть 5 первой и/или второй жидкости удаляют из смеси путем фильтрации, причем предпочтительно применяют фильтр или полый фильтр, включающий полупроницаемую мембрану, имеющую средний размер пор, меньший, чем вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или вышеупомянутые четвертичные 10 структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, и/или препятствующий прохождению большинства, предпочтительно практически всех белков размером от 20 кДа до 500 кДа, сквозь полупроницаемую мембрану.

Фильтр может быть любым традиционным фильтром, применяемым в данной области. Предпочтительно вышеупомянутый фильтр включает 15 полупроницаемую мембрану. В другой предпочтительной форме вышеупомянутая полупроницаемая мембрана имеет средний размер пор, меньший, чем рекомбинантный белок, что препятствует прохождению по меньшей мере 90 % вышеупомянутого рекомбинантного белка сквозь поры вышеупомянутой полупроницаемой мембраны и позволяет удерживать 20 рекомбинантный белок при помощи фильтра.

В еще одном аспекте вышеупомянутый фильтр имеет средний размер пор, препятствующий прохождению по меньшей мере 90 % белков размером от 20 кДа до 500 кДа, более предпочтительно вышеупомянутый фильтр имеет средний 25 размер пор, препятствующий прохождению по меньшей мере 90 % белков размером от 50 кДа до 400 кДа, и наиболее предпочтительно вышеупомянутый фильтр имеет средний размер пор, препятствующий прохождению по меньшей мере 90 % белков размером от 75 кДа до 300 кДа. Этот размер пор предпочтителен, когда рекомбинантный белок производится как цельный вирус или вирусоподобные частицы. В еще одном аспекте вышеупомянутая 30 полупроницаемая мембрана включает материал, выбранный из группы, к которой относятся полисульфон, полиэфирсульфон и регенерированная целлюлоза. Однако может применяться и любой другой материал, позволяющий удалять часть первой жидкости и, в случае многоэтапного процесса, удалять смесь первой и второй жидкости из рекомбинантного белка. Вышеупомянутый

фильтр может быть выбран из группы, к которой относится картридж для ультрафильтрации с полволоконной мембраной, плоские листы или кассета, причем особенно предпочтителен картридж для ультрафильтрации с полволоконной мембраной.

5 Предпочтительно второй жидкостью, используемой согласно любому из описанных способов, является буфер, предпочтительно а физиологически приемлемый буфер, причем особенно предпочтителен солевой раствор.

10 В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому вторая жидкость является буферным раствором, предпочтительно промывочным фосфатно-буферным солевым раствором (WPBS).

15 Этап концентрирования и этап добавления жидкости согласно способу, как описывается авторами, выполняют по сути одновременно или, в альтернативном варианте, этап концентрирования и этап добавления жидкости выполняют последовательно.

20 Если этап концентрирования и этап добавления жидкости выполняют последовательно, порядок этапов не имеет значения. Например, в еще одном аспекте этап добавления жидкости выполняют перед вышеупомянутым этапом концентрирования, а в альтернативном аспекте этап концентрирования выполняют перед вышеупомянутым этапом добавления жидкости. Этап добавления жидкости и этап концентрирования, независимо от порядка, в котором их выполняют, могут выполняться многократно. Например, каждый из этих соответствующих этапов может выполняться по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере 10, и столько раз, сколько необходимо. В одном аспекте этап концентрирования и этап добавления жидкости выполняют по меньшей мере дважды. В другом аспекте и этап концентрирования, и этап добавления жидкости выполняют по меньшей мере трижды.

30 Этап концентрирования согласно предлагаемым авторами способам выполняют таким образом, чтобы рекомбинантный белок концентрировался от 3X до 50X по сравнению с объемом вышеупомянутой первой жидкости. Более предпочтительно вышеупомянутый этап концентрирования выполняют таким образом, чтобы рекомбинантный белок концентрировался от 4X до 20X по сравнению с объемом вышеупомянутой первой жидкости. Наиболее

предпочтительно вышеупомянутый этап концентрирования выполняют таким образом, чтобы рекомбинантный белок концентрировался от 7X до 10X по сравнению с объемом первой жидкости.

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому объем второй жидкости, добавляемый на этапе (II), приблизительно равен объему первой и/или второй жидкости, удаляемому на этапе (III). Другими словами, этап концентрирования не выполняется и/или не требуется.

10 В случае, если вирусные векторы, такие, как рекомбинантный поксвирус, аденовирус или бакуловир, применяют для получения рекомбинантного белка, рекомендуется инактивировать вирусную нуклеиновую кислоту путем соответствующей инактивационной обработки. Такая инактивация может производиться в любое время во время очистки рекомбинантного белка. Таким образом, инактивация может производиться сразу после сбора жидкости с
15 клеточной культурой, содержащей рекомбинантный белок, или после микрофилтрации рекомбинантного белка, если производится микрофилтрация, до или после этапа очистки, например, до или после гель-филтрации и до или после анионообменной хроматографии, если она производится.

20 С точки зрения настоящего изобретения может применяться любой традиционный способ инактивации. Таким образом, инактивация может выполняться путем химической и/или физической обработки. В предпочтительных формах определяют объем собранных жидкостей и температуру доводят до приблизительно 32 °C – 42 °C, более предпочтительно – приблизительно 34 °C – 40 °C, и наиболее предпочтительно – приблизительно 35
25 °C – 39 °C. Предпочтительные способы инактивации включают добавление циклизированного бинарного этиленамина (ВЕI), предпочтительно в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ, предпочтительно от приблизительно 2 мМ до приблизительно 10 мМ, еще более предпочтительно – от приблизительно 2 мМ до приблизительно 8 мМ, еще более предпочтительно – от приблизительно 3 мМ до приблизительно 7 мМ, наиболее
30 предпочтительно – от приблизительно 5 мМ. Например, инактивация включает добавление раствора 2-бромозетиленамингидробромида (ВЕА), предпочтительно приблизительно 0,4 М, который был циклизирован до 0,2 М бинарного этиленамина (ВЕI) в 0,3 N NaOH, к жидкостям для достижения конечной

концентрации приблизительно 5 мМ ВЕI. Предпочтительно жидкости затем непрерывно перемешивают в течение 2 – 96 часов и инактивированные собранные жидкости хранят замороженными при температуре – 40 °С или ниже или приблизительно 1 °С – 7 °С. После завершения инактивации добавляют раствор тиосульфата натрия, предпочтительно при 1,0М, для нейтрализации
5 любого остаточного ВЕI. Предпочтительно тиосульфат натрия добавляют в эквивалентном количестве по отношению к ВЕI, добавляемому перед инактивацией. Например, в случае добавления ВЕI до конечной концентрации 5 мМ добавляют 1,0М раствора тиосульфата натрия для достижения конечной
10 минимальной концентрации 5 мМ для нейтрализации любого остаточного ВЕI.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому инактивирующий агент является соединением азиридина, предпочтительно бинарным этиленамином (ВЕI), и/или инактивирующий агент добавляют в молярном избытке по
15 отношению к вектору.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому нейтрализующим агентом является тиосульфат натрия, и/или нейтрализующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к инактивирующему агенту.
20

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому вышеупомянутый способ также включает этап смешивания смеси, оставшейся после этапа (v), с другим компонентом, выбранным из группы, к которой относятся фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, разбавители, инертные наполнители и их
25 комбинации.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому вируцидную активность смеси, полученной в результате выполнения вышеупомянутого способа, снижают по меньшей мере на 10 % по сравнению со смесью, к которой был применен вышеупомянутый способ, и/или иммуногенная композиция,
30 полученная вышеупомянутым способом, вызывает потерю менее чем 1 log TCID₅₀ на мл живого вируса, когда живой вирус смешивают с иммуногенной композицией в течение двух или более часов.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому живой вирус является вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому способ также включает этап (vi) сбора рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, оставшихся после этапа (v), в частности, также включающего этап очистки собранного материала, включающего рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие
10 из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, с применением хроматографической процедуры, предпочтительно эксклюзионной хроматографии.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому способ также включает
15 этап комбинирования собранного (очищенного) рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, с по меньшей мере одним дополнительным антигеном.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа, как описывается и заявляется авторами, согласно которому по меньшей мере один
20 дополнительный антиген является вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

В еще одном аспекте способ также включает этап сбора рекомбинантного белка, полученного после удаления по меньшей мере части вышеупомянутой первой жидкости из вышеупомянутого рекомбинантного белка.

25 В контексте данного описания термины “сбор” или “собирать” касаются сбора или извлечения рекомбинантного белка. Для извлечения рекомбинантного белка может применяться любой традиционный способ, известный специалистам в данной области, либо при получении рекомбинантного белка для применения в связи со способами и композициями в соответствии с настоящим изобретением, либо при применении к рекомбинантному белку описанных авторами способов.
30 Согласно особенно предпочтительному способу сбора, часть вышеупомянутой первой жидкости удаляют из вышеупомянутого рекомбинантного белка через этап фильтрации и рекомбинантный белок извлекают или собирают из осадка на фильтре. В более предпочтительной форме рекомбинантный белок собирают или

извлекают из осадка на полупроницаемой мембране, имеющей описанный авторами размер пор.

5 Рекомбинантный белок, остающийся после применения к нему предлагаемых авторами способов, предпочтительно после сбора с осадка на фильтре, смешивают с другим компонентом, выбранным из группы, к которой относятся фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, разбавители, инертные наполнители и их комбинации. Предпочтительно вышеупомянутый другой компонент является адъювантом, еще более предпочтительно – вышеупомянутый адъювант является полимером акриловой или метакриловой 10 кислоты, и еще более предпочтительно - вышеупомянутый адъювант является карбомером.

В еще одном аспекте данной заявки вышеописанный способ также включает этап смешивания рекомбинантного белка, полученного после этапов инактивации и нейтрализации другим компонентом, выбранным из группы, к 15 которой относятся фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, разбавители, инертные наполнители и их комбинации. Перед смешиванием очищенного рекомбинантного белка с адъювантом, также рекомендуется диализировать очищенный рекомбинантный белок на фосфатно-буферном солевом растворе, pH 7,4, или любом другом физиологическом буфере.

20 В контексте данного описания "фармацевтически приемлемый носитель" и "приемлемый с ветеринарной точки зрения носитель" включает любые и все растворители, диспергаторы, покрытия, стабилизаторы, разбавители, консерванты, противомикробные и противогрибковые средства, изотонические агенты, замедляющие адсорбцию агенты и т. п.

25 "Адъюванты" в контексте данного описания могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа вода в масле, эмульсию типа масло в воде, эмульсию типа вода в масле в воде. Эмульсия, в частности, может быть на 30 основе легкого жидкого вазелинового масла (согласно требованиям Европейской фармакопеи); изопреноидного масла, такого, как сквалан или сквален; масла, получаемого в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; сложных эфиров кислот или спиртов, которые содержат линейную алкильную группу, более конкретно – растительных масел, этилолеата,

пропиленгликольди-(каприлата/капрата), глицерилтри-(каприлата/капрата) или пропиленгликольдиолеата; сложные сложных эфиров разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложных эфиров изостеариновой кислоты. Масло применяют в комбинации с эмульгаторами для образования эмульсии.

5 Эмульгаторами предпочтительно являются неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбита, маннида (например, ангидроманнитолеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые

10 необязательно являются этоксилированными, и блоксополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности продукты типа Pluronic, прежде всего L121. См. Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). JohnWiley and Sons, NY, pp 51 - 94 (1995) и Todd et al., *Vaccine* 15: 564 - 570 (1997). Например, существует возможность

15 использования эмульсии SPT, описанной на странице 147 публикации "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под редакцией M. Powell и M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на странице 183 той же книги. Другие подходящие адъюванты включают, помимо прочих, адъювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блоксополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-

20 M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил-липид А адъювант авридин липид-амин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или иной), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид и многие другие. Среди сополимеров малеинового ангидрида и алкенильной производной включаются сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде ведет к

25 образованию раствора кислоты, подлежащего нейтрализации, предпочтительно до физиологического уровня рН, с целью получения раствора адъюванта, в которую включают саму иммуногенную, иммунологическую или вакцинную композицию.

Еще одним примером адъюванта может быть соединение, выбранное из

30 полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильной производной. Оптимальными адъювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, сшитые, в частности, с полиалкенильными сложными эфирами сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны как карбомеры (Phameугора

Vol. 8, No. 2, June 1996). Специалисты в данной области также могут обратиться к Патенту США № 2,909,462, в котором описываются такие акриловые полимеры, сшитые с полигидроксилированным соединением, имеющим по меньшей мере 3 гидроксильных группы, предпочтительно не более 8, причем атомы водорода по меньшей мере трех гидроксиллов заменены на ненасыщенные алифатические радикалы, имеющие по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются те, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие, как метил. Особенно подходящими являются продукты, продаваемые под названием Carborol; (BF Goodrich, Огайо, США). Они сшиты с аллилсахарозой или с аллилпентаэритритом. Среди них можно упомянуть Carborol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является использование Carborol 971P.

“Разбавители” могут включать воду, солевой раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т. п. Изотонические агенты могут включать, помимо прочих, хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают, помимо прочих, альбумин и соли щелочных металлов с этилендиаминтетрауксусной кислотой.

“Консервант” в контексте данного описания касается агента антимикробиологического действия, такого, как, например, гентамицин, мертиолат и т. п. В частности, добавление консерванта является наиболее предпочтительным для приготовления многодозовой композиции. Агенты антимикробиологического действия добавляют в концентрациях, эффективных для предотвращения микробиологического загрязнения исследуемой композиции или для подавления любого микробиологического роста в пределах исследуемой композиции.

Дальнейшая очистка рекомбинантного белка может достигаться с применением процедур хроматографии, предпочтительно двухэтапной процедуры хроматографии. Если рекомбинантный белок собирают в вирусоподобные частицы (VLP), один этап, предпочтительно первый этап, предпочтительно представляет собой эксклюзионную (гель-фильтрационную) хроматографию, которая может осуществляться, например, с использованием матрицы Sephacryl S300. В лабораторном масштабе предпочтение отдается применению колонок HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR. Однако могут применяться

и другие матрицы для эксклюзионной хроматографии, известные специалистам в данной области, обеспечивающие возможность отделения VLP рекомбинантного белка от фильтрата или супернатанта культуры. Подходящие матрицы описываются, например, в публикации E.L.V. Harris and S. Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL Press Oxford 1995). Гель-фильтрационную хроматографию выполняют, например, путем загрузки колонки необработанной композицией, включающей рекомбинантный белок, со скоростью потока 1,0 мл/мин и элюирования колонки с 1,5-кратным объемом колонки буфера, включающего 20 мМ Tris, pH 6,5, 5 мМ DTT. Однако рекомбинантный белок также может быть очищен с применением аффинной хроматографии, например, путем выборочного связывания со специфичным к иммобилизованному рекомбинантному белку антителом или с применением любого другого способа, известного специалистам в данной области.

Для достижения более высокой степени очистки осуществляют второй этап хроматографии, который отличается от первого. Например, если первый этап очистки / хроматографии представляет собой эксклюзионную (гель-фильтрационную) хроматографию, то второй должен отличаться от него и представлять собой, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию и т. п. В предпочтительном варианте если первый этап очистки рекомбинантного белка представляет собой эксклюзионную (гель-фильтрационную) хроматографию, то второй этап может представлять собой ионообменную хроматографию, предпочтительно анионообменную хроматографию (AIEH). Предпочтительной матрицей для анионообменной хроматографии является для очистки рекомбинантного белка является Q-сефароза. В малом масштабе, приблизительно 50 мл, наибольшее предпочтение отдают применению 5 мл колонок HiTrap Q Sepharose HP.

Данная заявка не только обеспечивает способы получения содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композиции, но и касается содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции, получаемой с применением способа, как описывается и заявляется авторами.

В еще одном аспекте вируцидная активность содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композиции, получаемой предлагаемыми авторами

способами, снижается по меньшей мере на 10 % по сравнению с содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композицией, к которой не был применен вышеупомянутый способ получения. Более предпочтительно вируцидная активность содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композиции снижается по меньшей мере на 50 % по сравнению с содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композицией, к которой не был применен вышеупомянутый способ получения. Еще более предпочтительно вируцидная активность содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композиции снижается по меньшей мере на 70 % по сравнению с содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композицией, к которой не был применен вышеупомянутый способ получения. Еще более предпочтительно вируцидная активность содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композиции снижается по меньшей мере на 90 % по сравнению с содержащей рекомбинантный белок иммуногенной композицией, к которой не был применен вышеупомянутый способ получения.

С точки зрения настоящего изобретения термин “вируцидная активность” означает, что жидкость, текучая среда, раствор, композиция и т. п. в определенной степени инактивирует или убивает живые вирусы или живые бактерии при смешивании вышеупомянутой жидкости, текучей среды, раствора, композиции и т. п. с такими живыми вирусами или живыми бактериями. Таким образом, снижение вируцидной активности жидкости, текучей среды, раствора, композиции и т. п. по меньшей мере на 10 % означает, что коэффициент выживаемости живых вирусов или живых бактерий на 90 % выше в жидкости, текучей среде, растворе, композиции и т. п., к которой был применен любой из описанных авторами способов получения, по сравнению с жидкостью, текучей средой, раствором, композицией и т. п., к которой не был применен ни один из способов получения.

Иммуногенная композиция рекомбинантного белка, получаемая описываемым авторами способом, вызывает потерю менее чем $1 \log$ TCID₅₀ живого вируса или менее чем $1 \log$ CFU на мл живой бактерии, при смешивании живого вируса или живой бактерии с иммуногенной композицией рекомбинантного белка и инкубации в течение 2 или более часов, предпочтительно в течение более 4 часов, еще более предпочтительно – в течение более 12 часов, еще более предпочтительно – в течение более 24 часов,

еще более предпочтительно – в течение более 2 дней, еще более предпочтительно – в течение более 4 дней, еще более предпочтительно – в течение более 7 дней, еще более предпочтительно – в течение более 2 недель, еще более предпочтительно – в течение более 4 недель, еще более предпочтительно – в течение более 2 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 3 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 4 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 6 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 9 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 12 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 18 месяцев, наиболее предпочтительно – в течение более 2 лет. Более предпочтительно иммуногенная композиция рекомбинантного белка, полученная описываемым авторами способом, вызывает потерю менее чем 0,9 log TCID₅₀ на мл живого вируса или менее чем 0,9 log CFU на мл живой бактерии при смешивании и инкубации живого вируса или живой бактерии с иммуногенной композицией рекомбинантного белка в течение 2 или более часов, предпочтительно в течение более 4 часов, еще более предпочтительно – в течение более 12 часов, еще более предпочтительно – в течение более 24 часов, еще более предпочтительно – в течение более 2 дней, еще более предпочтительно – в течение более 4 дней, еще более предпочтительно – в течение более 7 дней, еще более предпочтительно – в течение более 2 недель, еще более предпочтительно – в течение более 4 недель, еще более предпочтительно – в течение более 2 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 3 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 4 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 6 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 9 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 12 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 18 месяцев, наиболее предпочтительно – в течение более 2 лет. В еще более предпочтительном варианте иммуногенная композиция рекомбинантного белка, полученная описываемым авторами способом, вызывает потерю менее чем 0,7 log TCID₅₀ на мл живого вируса или менее чем 0,7 log CFU на мл живой бактерии при смешивании и инкубации живого вируса или живой бактерии с иммуногенной композицией рекомбинантного белка в течение 2 или более часов, предпочтительно в течение более 4 часов, еще более предпочтительно – в течение более 12 часов, еще более предпочтительно – в течение более 24 часов,

еще более предпочтительно – в течение более 2 дней, еще более предпочтительно – в течение более 4 дней, еще более предпочтительно – в течение более 7 дней, еще более предпочтительно – в течение более 2 недель, еще более предпочтительно – в течение более 4 недель, еще более предпочтительно – в течение более 2 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 3 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 4 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 6 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 9 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 12 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 18 месяцев, наиболее предпочтительно – в течение более 2 лет. В еще более предпочтительном варианте иммуногенная композиция рекомбинантного белка, полученная путем выполнения этапов описываемого авторами способа вызывает потерю менее чем $0,5 \log \text{TCID}_{50}$ на мл живого вируса или менее чем $0,5 \log \text{CFU}$ на мл живой бактерии при смешивании и инкубации живого вируса или живой бактерии с иммуногенной композицией рекомбинантного белка в течение 2 или более часов, предпочтительно в течение более 4 часов, еще более предпочтительно – в течение более 12 часов, еще более предпочтительно – в течение более 24 часов, еще более предпочтительно – в течение более 2 дней, еще более предпочтительно – в течение более 4 дней, еще более предпочтительно – в течение более 7 дней, еще более предпочтительно – в течение более 2 недель, еще более предпочтительно – в течение более 4 недель, еще более предпочтительно – в течение более 2 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 3 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 4 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 6 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 9 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 12 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 18 месяцев, наиболее предпочтительно – в течение более 2 лет. В еще более предпочтительном варианте иммуногенная композиция рекомбинантного белка, полученная описываемым авторами способом, вызывает потерю менее чем $0,3 \log \text{TCID}_{50}$ на мл живого вируса или менее чем $0,3 \log \text{CFU}$ на мл живой бактерии при смешивании и инкубации живого вируса или живой бактерии с иммуногенной композицией рекомбинантного белка в течение 2 или более часов, предпочтительно в течение более 4 часов, еще более предпочтительно – в течение более 12 часов, еще более предпочтительно – в

течение более 24 часов, еще более предпочтительно – в течение более 2 дней, еще более предпочтительно – в течение более 4 дней, еще более предпочтительно – в течение более 7 дней, еще более предпочтительно – в течение более 2 недель, еще более предпочтительно – в течение более 4 недель, еще более предпочтительно – в течение более 2 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 3 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 4 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 6 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 9 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 12 месяцев, еще более предпочтительно – в течение более 18 месяцев, наиболее предпочтительно – в течение более 2 лет. Показатель TCID₅₀ на мл оценивают с применением стандартного *in vitro* анализа с титрованием, позволяющего оценивать количество живого вируса. Показатель CFU на мл также определяют с применением стандартного *in vitro* анализа с титрованием, позволяющего оценивать количество живой бактерии. Термин “на мл” предпочтительно относится к количеству на 1 мл текучей среды. Такой очищенный рекомбинантный белок не только демонстрирует сниженную вируцидную активность, как определяется авторами, но и демонстрирует повышенную иммуногенность по сравнению с неочищенным рекомбинантным белком, как определяется авторами, причем предпочтительно такой рекомбинантный белок повышает клеточный и/или антителоопосредованный иммунный ответ по меньшей мере на 10 %, предпочтительно по меньшей мере на 20 %, более предпочтительно – по меньшей мере на 30 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 40 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 50 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 75 %, наиболее предпочтительно – по меньшей мере на 100 % по сравнению с клеточным и/или антителоопосредованным иммунным ответом, вызываемым контрольной иммуногенной композицией, включающей неочищенный рекомбинантный белок.

Иммуногенные композиции, включающие очищенный рекомбинантный белок, предпочтительно получаемые с применением описанных авторами способов, характеризуются повышенной иммуногенностью по сравнению с иммуногенной композицией, не включающей такой очищенный рекомбинантный белок.

Кроме того, термины “повышенная иммуногенность” или “улучшенная иммуногенность” в контексте данного описания означают, что иммунный ответ, вызываемый иммуногенной композицией, включающей исследуемый антиген, является повышенным по сравнению с контрольной иммуногенной композицией, включающей другой антиген или антиген другой степени чистоты, является ли этот иммунный ответ клеточноопосредованным или антителоопосредованным иммунным ответом. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, термины “повышенная иммуногенность” или “улучшенная иммуногенность” означают, что антителоопосредованный иммунный ответ, вызываемый иммуногенной композицией, включающей исследуемый антиген, повышается по сравнению с контрольной иммуногенной композицией, включающей другой антиген или антиген другой степени чистоты. В этом отношении антителоопосредованный иммунный ответ означает, что выработка антител, которые специфичны к исследуемому антигену, повышается по сравнению с выработкой антитела, вызываемой контрольной иммуногенной композицией, включающей другой антиген или антиген другой степени чистоты.

Термин “повышенный” означает, что клеточный и/или антителоопосредованный иммунный ответ повышается по меньшей мере на 10 %, предпочтительно по меньшей мере на 20 %, более предпочтительно – по меньшей мере на 30 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 40 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 50 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 75 %, наиболее предпочтительно – по меньшей мере на 100 % по сравнению с клеточным и/или антителоопосредованным иммунным ответом, вызываемым контрольной иммуногенной композицией, включающей рекомбинантный белок или рекомбинантный белок другой степени чистоты.

Специалистам в данной области хорошо известны способы измерения клеточного и/или антителоопосредованного иммунного ответа. В частности, специалистам в данной области известно, что можно сравнивать клеточноопосредованный иммунный ответ исследуемой иммуногенной композиции с клеточноопосредованным иммунным ответом контрольной композиции или антителоопосредованный иммунный ответ исследуемой иммуногенной композиции с ответом контрольной композиции, но нельзя сравнивать клеточноопосредованный иммунный ответ исследуемой

иммуногенной композиции с антителоопосредованным иммунным ответом контрольной композиции, или наоборот. Более того, клеточноопосредованный иммунный ответ может быть измерен, например, путем измерения активации цитотоксических Т-клеток исследуемой иммуногенной композицией /
5 антигеном. Антителоопосредованный иммунный ответ может быть измерен, например, путем измерения количества специфичных к антигену антител, выработанных вследствие введения животному иммуногенной композиции, включающей такой антиген. Клеточный и/или антителоопосредованный иммунный ответ может быть измерен, например, с использованием мышинной
10 модели. В соответствии с настоящим изобретением, мышиную модель используют в качестве контрольного способа.

Термин “иммуногенная композиция” означает, помимо прочего, композицию материала, включающего по меньшей мере один антиген, который вызывает клеточный и/или антителоопосредованный иммунный ответ у хозяина
15 против исследуемого антигена. Как правило, “иммунный ответ” включает, помимо прочего, один или несколько из следующих эффектов: выработки или активации антител, В-клеток, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток и/или гамма-дельта-Т-клеток, специфично направленных на антиген или антигены, которые включены в исследуемую
20 композицию или вакцину. Предпочтительно хозяин должен демонстрировать терапевтический или защитный иммунный ответ, например, повышение резистентности к новой инфекции и/или снижение клинической тяжести заболевания. В таком случае иммуногенная композиция является “вакциной”. Такая защита должна демонстрироваться через снижение или отсутствие
25 симптомов, обычно проявляемых инфицированным хозяином, более быстрое выздоровление и/или сниженный вирусный титр у инфицированного хозяина.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция также включает аттенюированный живой вирус, предпочтительно
30 аттенюированный вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) или аттенюированную живую бактерию.

“Живой” вирус или бактерия с точки зрения настоящего изобретения означает вирус или бактерию, способные к репликации в организме хозяина. Предпочтительным живым вирусом и предпочтительной живой бактерией в

соответствии с настоящим изобретением являются вирус PRRS и бактерия *Mycoplasma hyopneumonia*, соответственно. Однако термин "живой вирус" или "живая бактерия" не ограничиваются PRRS и *Mycoplasma hyopneumoniae*, соответственно.

5 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции, как описывается и заявляется авторами, в которой аттенюированный живой вирус является вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

10 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция вызывает защитный иммунный ответ против патогена, предпочтительно патогена, включающего рекомбинантный белок, как описывается и заявляется авторами, после введения одной дозы иммуногенной композиции.

15 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции, как описывается и заявляется авторами, причем иммуногенная композиция вызывает защитный иммунный ответ против вируса PRRS после введения одной дозы иммуногенной композиции.

20 Иммуногенная композиция рекомбинантного белка, получаемая в соответствии с вышеописанным способом, или рекомбинантный белок, применяемый на этапе I) вышеописанного способа, может комбинироваться с по меньшей мере одним дополнительным антигеном, предпочтительно вирусным или бактериальным антигеном, еще более предпочтительно – вирусным или бактериальным антигеном из по меньшей мере одного другого вызывающего
25 заболевание организма у свиней. Дополнительным антигеном может быть любой из раскрываемых в международной патентной заявке WO2007/094893 (содержание и идеи которой включены в данное описание путем ссылки). В общих чертах, дополнительными антигенами могут быть антигены любых других вызывающих заболевание организмов у свиней. Предпочтительно
30 “другие вызывающие заболевание организмы” у свиней выбраны из группы, к которой относятся: *Actinobacillus pleuropneumonia* (1); аденовирус (2); альфавирус, такой, как вирусы восточного лошадиного энцефаломиелита (3); *Bordetella bronchiseptica* (4); *Brachyspira* spp. (5), предпочтительно *B. hyodysenteriae* (6); *B. piosicoli* (7), *Brucella suis*, предпочтительно биовары 1, 2 и

3 (8); вирус классической чумы свиней (9); *Clostridium* spp. (10), предпочтительно *Cl. difficile* (11), *Cl. perfringens* типов А, В и С (12), *Cl. novyi* (13), *Cl. septicum* (14), *Cl. tetani* (15); коронавирус (16), предпочтительно респираторный коронавирус свиней (17); *Eperythrozoonosis suis* (18);
5 *Erysipelothrix rhusiopathiae* (19) *Escherichia coli* (20); *Haemophilus parasuis*, предпочтительно подтипов 1, 7 и 14 (21) вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита (22); вирус японского энцефалита (23); *Lawsonia intracellularis* (24) *Leptospira* spp. (25), предпочтительно *Leptospira australis* (26); *Leptospira canicola* (27); *Leptospira grippotyphosa* (28); *Leptospira icterohaemorrhagicae* (29);
10 и *Leptospira interrogans* (30); *Leptospira pomona* (31); *Leptospira tarassovi* (32); *Mycobacterium* spp. (33) предпочтительно *M. avium* (34), *M. intracellulare* (35) и *M. bovis* (36); *Mycoplasma hyopneumoniae* (37); *Pasteurella multocida* (38); свиной цитомегаловирус (39); свиной парвовирус (40); вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (41); вирус псевдобешенства (42); ротавирус (43);
15 *Salmonella* spp. (44), предпочтительно *S. thyphimurium* (45) и *S. choleraesuis* (46); *Staph. hyicus* (47); *Staphylococcus* spp. (48) предпочтительно *Streptococcus* spp. (49), предпочтительно *Strep. suis* (50); вирус свиного герпеса (51); вирус свиного гриппа (52); свиной поксвирус (53); свиной поксвирус (54); вирус везикулярного стоматита (55); Вирус везикулярной экзантемы свиней (56); *Leptospira Hardjo* (57); и/или *Mycoplasma hyosynoviae* (58).

В другом аспекте настоящее изобретение касается комплекта, включающего контейнер, содержащий иммуногенную композицию, как описывается и заявляется авторами.

25 В другом аспекте настоящее изобретение касается комплекта, как описывается и заявляется авторами, который также включает по меньшей мере один дополнительный контейнер, содержащий по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, к которой относятся аттенюированный живой вирус, предпочтительно аттенюированный вирус PRRS, и аттенюированная живая бактерия.

30 В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции, как описывается и заявляется авторами, для применения в качестве медикамента, предпочтительно в качестве вакцины.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенной композиции, как описывается и заявляется авторами, и/или комплекта, как

описывается и заявляется авторами, для применения согласно способу снижения одного или нескольких клинических симптомов инфекции патогена у животного по сравнению с животным, не получавшим вышеупомянутой иммуногенной композиции.

5 Термин “снижение частоты случаев или тяжести клинических признаков” означает, что частота случаев или тяжесть любого из таких признаков снижается у животных, которым вводили вакцину, по сравнению с “контрольной группой” животных, когда обе группы получали инфекцию или провокацию патогена, от которого происходит иммунологически активный компонент(ы) в вакцине, и
10 контрольной группе не вводили вакцину или иммуногенную композицию. В этом контексте термин “уменьшение” или “снижение” означает снижение по меньшей мере на 10 %, предпочтительно на 25 %, еще более предпочтительно – на 50 %, наиболее предпочтительно – более чем на 100 %, в вакцинированной группе по сравнению с невакцинированной контрольной группой.

15 В контексте данного описания “клинические симптомы” или “клинические признаки” означают признаки инфицирования патогенами, которые прямо наблюдаются у живого животного, такие, как симптомы. Типичные примеры зависят от выбранного патогена, но к ним относятся такие явления, как выделения из носа, выраженная вялость, кашель, повышенная температура,
20 увеличение или потеря веса, обезвоживание, диарея, опухание, хромота и т. п.

В контексте данного описания “защитный иммунный ответ” означает снижение частоты случаев или снижение тяжести клинических, патологических или гистопатологических признаков или симптомов инфицирования исследуемым патогеном, до полного исключения таких признаков или
25 симптомов.

Термин “патологические признаки” касается признаков инфекции, которые наблюдаются на микроскопическом или молекулярном уровне через биохимическое испытание или невооруженным глазом после вскрытия.

Термин “гистопатологические признаки” касается признаков изменений
30 тканей в результате инфекции.

Термины “клинические симптомы” или “клинические признаки” определяются выше.

Авторами описываются следующие пункты:

1. Способ получения иммуногенная композиция, включающей рекомбинантный белок, причем способ включает этапы в следующем порядке:

(I) обеспечение / получение смеси, включающей

- первую жидкость,

5 - рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, и

- вектор, включающий нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок;

10 (II) добавление второй жидкости к смеси с этапа (I), причем вторая жидкость отличается от первой жидкости;

(III) промывание и, необязательно, окончательное концентрирование рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков в смеси путем дополнительного добавления второй жидкости к смеси, полученной в результате выполнения

15 этапа (II), и удаления части первой и/или второй жидкости из такой комбинированной смеси;

(IV) инактивацию вектора путем добавления инактивирующего агента к смеси, полученной в результате выполнения этапа (III);

(V) нейтрализацию инактивирующего агента путем добавления

20 нейтрализующего агента к смеси, полученной в результате выполнения этапа (IV).

2. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что смеси с этапа (I) получают с применением процедуры, включающей этапы

(а) инфицирования восприимчивых клеток в культуре вектором,

25 включающим нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, причем вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков,

30 экспрессируются вышеупомянутым вектором,

(б) последующего извлечения рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, из клеточной культуры, причем клеточный дебрис предпочтительно отделяют от рекомбинантного белка и/или четвертичных

структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков через этап отделения, предпочтительно включающий микрофльтрацию через по меньшей мере один фильтр, предпочтительно два фильтра, причем по меньшей мере один фильтр предпочтительно имеет размер пор, больший, чем рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, в частности, имеет размер пор от приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 4 мкм.

3. Способ по пункту 2, отличающийся тем, что клеточную культуру на этапе (а) поддерживают при 27 ± 2 °С, предпочтительно при экспрессии рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, вышеупомянутым вектором, и/или извлечение на этапе (б) происходит через 6 - 8 дней, предпочтительно 8 дней после инокуляции клеток вектором.

4. Способ по пунктам 2 или 3, отличающийся тем, что этап отделения включает или состоит из:

- микрофльтрации через по меньшей мере один фильтр, имеющий размер пор приблизительно 2 мкм до приблизительно 4 мкм, и/или
- микрофльтрации через по меньшей мере один фильтр, имеющий размер пор приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 0,8 мкм.

5. Способ по любому из пунктов с 1 по 4, отличающийся тем, что вышеупомянутая первая жидкость включает часть среды для культивирования клеток или состоит из среды для культивирования клеток, и средой для культивирования клеток предпочтительно является среда для культивирования клеток насекомых.

6. Способ по любому из пунктов с 1 по 5, отличающийся тем, что вышеупомянутый рекомбинантный белок выбирают из группы, к которой относятся:

- белок PPV VP2 предпочтительно включающий или состоящий из последовательности, которая имеет по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по

меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 %, или 100 % идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NOS 5 – 16.

5 7. Способ по любому из пунктов с 1 по 6, отличающийся тем, что вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, являются вирусоподобными частицами, или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, являются гомотримерами.

10 8. Способ по любому из пунктов с 1 по 7, отличающийся тем, что вектор является рекомбинантным вирусом, предпочтительно бакуловирусом, и/или нуклеиновокислотная последовательность является последовательностью ДНК.

15 9. Способ по любому из пунктов с 1 по 8, отличающийся тем, что вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, является рекомбинантным бакуловирусом, причем вышеупомянутый бакуловирус включает последовательность ДНК, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых
20 рекомбинантных белков.

25 10. Способ по любому из пунктов с 1 по 9, отличающийся тем, что на этапе (III) вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, промывают, используя по меньшей мере 2х, предпочтительно от 2х до 3х, второй жидкости, и необязательно доводят до конечной концентрации, по сравнению с первоначальным объемом вышеупомянутого рекомбинантного белка и/или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков в смеси с этапа (I).

30 11. Способ по любому из пунктов с 1 по 10, отличающийся тем, что на этапе (III) такой(ие) этап(ы) промывания, т. е., процесс диафильтрации, выполняют при температуре ниже 37 °С, более предпочтительно при температуре ниже 30 °С, еще более предпочтительно – при температуре ниже 20

°С, еще более предпочтительно – при температуре ниже 10 °С, например, при температуре от 4 °С и 29 °С, например, 27 °С или 4 °С.

12. Способ по любому из пунктов с 1 по 11, отличающийся тем, что на этапе (III) часть первой и/или второй жидкости удаляют из смеси путем
5 фильтрации, причем предпочтительно применяют фильтр или полый фильтр, включающий полупроницаемую мембрану, имеющую средний размер пор, меньший, чем вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, и/или препятствующий прохождению большинства,
10 предпочтительно практически всех белков размером от 20 кДа до 500 кДа, сквозь полупроницаемую мембрану.

13. Способ по любому из пунктов с 1 по 12, отличающийся тем, что вторая жидкость представляет собой буферный раствор, предпочтительно промывочный фосфатно-буферный солевой раствор (WPBS).

14. Способ по любому из пунктов с 1 по 13, отличающийся тем, что
15 объем второй жидкости, добавляемой на этапе (II), приблизительно равен объему первой и/или второй жидкости, удаляемой на этапе (III), т. е., этап концентрирования не выполняется и/или не требуется.

15. Способ по любому из пунктов с 1 по 14, отличающийся тем, что
20 инактивирующий агент представляет собой соединение азиридина, предпочтительно бинарный этиленамин (BEI), и/или инактивирующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к вектору.

16. Способ по любому из пунктов с 1 по 15, отличающийся тем, что
25 нейтрализующий агент представляет собой тиосульфат натрия, и/или нейтрализующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к инактивирующему агенту.

17. Способ по любому из пунктов с 1 по 16, отличающийся тем, что
30 вышеупомянутый способ также включает этап смешивания смеси, оставшейся после этапа (V), с дополнительным компонентом, выбранным из группы, к которой относятся фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, разбавители, инертные наполнители, и их комбинации.

18. Способ по любому из пп. с 1 по 17, отличающийся тем, что вируцидная активность смеси, полученной в результате выполнения вышеупомянутого способа, снижается по меньшей мере на 10 % по сравнению

со смесью, к которой не был применен вышеупомянутый способ, и/или иммуногенная композиция, полученная вышеупомянутым способом, вызывает потерю менее чем $1 \log$ TCID₅₀ на мл живого вируса, когда живой вирус смешивают с иммуногенной композицией в течение двух или более часов.

5 19. Способ по пункту 18, отличающийся тем, что живой вирус является вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

10 20. Способ по любому из пп. с 1 по 19, отличающийся тем, что способ также включает этап (VI) сбора рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков,, оставшихся после этапа (V), и в частности, также включающего этап очистки собранного материала, включающего рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, с применением хроматографической процедуры, предпочтительно эксклюзионной хроматографии.

15 21. Способ по любому из пп. с 1 по 20, отличающийся тем, что способ также включает этап комбинирования собранного (очищенного) рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, с по меньшей мере одним дополнительным антигеном.

20 22. Способ по пункту 21, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный антиген является вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

 23. Иммуногенная композиция, получаемая способом по любому из пп. с 1 по 22.

25 24. Иммуногенная композиция по пункту 23, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция также включает аттенюированный живой вирус, предпочтительно аттенюированный вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), или аттенюированную живую бактерию.

30 25. Иммуногенная композиция по пункту 23 или 24, отличающаяся тем, что аттенюированный живой вирус является вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

 26. Иммуногенная композиция по любому из пунктов с 23 по 25, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция вызывает защитный иммунный ответ против патогена, предпочтительно патогена, включающего

рекомбинантный белок по пункту 6, после введения одной дозы иммуногенной композиции.

27. Иммуногенная композиция по любому из пунктов с 23 по 26, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция вызывает защитный
5 иммунный ответ против вируса PRRS после введения одной дозы иммуногенной композиции.

28. Комплект, включающий контейнер, содержащий иммуногенную композицию по любому из пунктов с 23 по 27.

29. Комплект по пункту 28 который также включает по меньшей мере
10 один дополнительный контейнер, содержащий по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, к которой относятся аттенюированный живой вирус, предпочтительно аттенюированный вирус PRRS, и аттенюированная живая бактерия.

30. Иммуногенная композиция по любому из пунктов с 23 по 29 для
15 применения в качестве медикамента, предпочтительно в качестве вакцины.

31. Иммуногенная композиция по любому из пунктов с 23 по 29 и/или
комплект по любому из пунктов 28 или 29, для применения согласно способу
снижения одного или нескольких клинических симптомов инфекции патогена у
животного по сравнению с животным, не получавшим вышеупомянутой
20 иммуногенной композиции.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры представлены ниже для пояснения конкретных
вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти примеры являются лишь
пояснительными, их не следует рассматривать в качестве ограничивающих
25 объем или принципы, лежащие в основе настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1:

Получение свиного парвовируса (PPV) 27a VP2 – апстрим-процессинг

PPV 27a VP2 получают в инфицированных бакуловирусом клетках SF+ и
инактивируют BEI в процессе, напоминающем процесс для PCV2 ORF2
30 (документ WO 2006/072065; Примеры с 1 по 3). Однако для PPV 27a VP2
используют другой бакуловирусный остов, обозначаемый как “DiamondBac”
(Sigma Aldrich, D6192) (вместо более старого остова VaculoGold, используемого
для PCV2 ORF2).

Нуклеотидную последовательность свиного парвовируса (PPV) 27a VP2 получают от Genbank под номером доступа AY684871.1. Кодировый участок PPV 27a VP2 был подвергнут обратной трансляции и кодон-оптимизирован для *Drosophila* с применением программного обеспечения SciTools[®] Web Tools от Integrated DNA Technologies. Кодон-оптимизированный ген PPV 27a VP2 подвергали дальнейшей модификации для вставки двух сайтов рестрикционных ферментов ClaI в кодирующий участок VP2, вместе с добавлением сайтов рестрикционных ферментов BamHI и NotI на 5'- и 3'-концах, соответственно. Сайты ClaI вставляют таким образом, чтобы не прерывался кодирующий участок VP2. Вставка сайтов ClaI включает три главных аминокислотных изменения в прогнозируемой аминокислотной последовательности 27a VP2. Аминокислотные изменения, возникающие в результате вставок ClaI, происходят в позициях 25 (глицин \Rightarrow изолейцин), 36 (аланин \Rightarrow серин) и 37 (глицин \Rightarrow изолейцин). Кодон-оптимизированный ген PPV 27a-ClaI VP2 химически синтезировали и затем клонировали в стандартную клонированную плазмиду, pUC57, в Integrated DNA Technologies (PPV27a-ClaI 38320377). Ген PPV 27a-ClaI затем вырезали из предоставленной Integrated DNA Technologies плазмиды pUC57 путем расщепления рестрикционными ферментами BamHI и NotI и ген PPV 27a-ClaI субклонировали в соответствующие сайты фермента бакуловирального вектора переноса pVL1393 (BD Pharmingen, 21486P). Плазмиду pVL1393, содержащую Ген PPV 27a-ClaI амплифицировали в DH5 α *E. coli* (Invitrogen[™] MAX Efficiency[™]), а затем извлекали и очищали с применением комплекта серийного производства для очистки плазмид (комплект QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Очищенную плазмиду pVL1393, содержащую Ген PPV 27a-ClaI и линейризованный остов бакуловируса DiamondBac[®] котрансфицировали в клетки насекомых Sf9, используя реагент для трансфекции Escort[™] (Sigma Aldrich, E9770) для образования рекомбинантного бакуловируса. Выполняли предельное разведение для получения запаса очищенного рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген PPV 27a-ClaI VP2, под контролем полиэдринового промотора. Систему бакуловирального вектора экспрессии (BEVS) применяют для того, чтобы суспензионная культура клеток насекомых (SF+) могла производить рекомбинантный антиген, состоящий из белка PPV 27a VP2. Для этого продукта инфицированные клетки SF+ культивируют в

периодическом режиме в течение приблизительно семи дней, а затем обрабатывают для удаления клеточного дебриса и компонентов среды.

ПРИМЕР 2:

Получение свиного парвовируса (PPV) 27a VP2 – даунстрим-процессинг

5 Даунстрим-процессинг состоит из двух последовательных этапов. Удаление клеточного дебриса выполняют в процессе, называемом “осветлением”, а удаления компонентов среды достигают с использованием двух объемов промывочного фосфатно-буферного солевого раствора (WPBS), и этот процесс называется “диафильтрацией”.

10 Бакуловирусный вектор PPV 27a VP2 производят в биореакторах. Среду в биореактор добавляют предварительно стерилизованной или подвергнутой стерильной фильтрации. Среду добавляют с клетками SF+, взятыми из культур для размножения. Клетки одновременно инокулируют (сочетанная инфекция) после внесения с посевом бакуловируса PPV 27a VP2. В течение всего периода
15 размножения вируса температуру поддерживают при 27 ± 2 °C и отслеживают уровень pH. Растворенный кислород (DO) регулируют путем барботажа очищенным сжатым воздухом и кислородом (O₂). Окно сбора появляется через 6 - 8 дней после инфицирования вирусом и по достижении критерия сбора ≤ 20 % жизнеспособности клеток. При сборе жидкости с антигеном PPV 27a VP2
20 освещают с применением двух наборов фильтров: фильтра предварительной очистки с размером пор 2,0 - 4,0 мкм и фильтра конечной очистки с размером пор 0,1 - 0,8 мкм. Фильтрованные собранные жидкости собирают в резервуар.

Очищенные жидкости с антигеном PPV 27a VP2 затем “диафильтруют”, используя \geq два объема (2x-2.5X) WPBS [с применением половолоконного
25 фильтра с отсечкой по номинальной молекулярной массе (NMWC 300000-500000 килодальтон (кДа))] при температуре от 4 °C до 29 °C. После диафильтрации температуру антигена PPV 27a VP2 повышают до 37 ± 2 °C для инактивации путем добавления бинарного этиленамина (BEI) до конечной концентрации 5 мМ. Антиген инкубируют при 37 ± 2 °C и смешивают в течение 72 - 96 часов.
30 Остаточный BEI нейтрализуют молярным избытком раствора тиосульфата натрия в течение по меньшей мере 30 минут. Жидкости с антигеном PPV 27a VP2 переносят в пакеты для хранения при 4 ± 3 °C до смешивания вакцины.

Данные, представленные ниже в Таблицах 1A и 1B, показывают, что вакцина PPV 27a VP2 является невиروцидной для вакцины ReproCyc[®] PRRS EU и

вакцины Ingelvac[®] PRRS MLV, соответственно, при смешивании в течение периода до 8 часов (одного рабочего дня).

Таблица 1А: Две (2) серии ReproCyc PRRS EU[®], номера партий 3910003А (10 доз) и 3910004А (50 доз), хранили при 5 °С ± 3 °С в упаковочных материалах до использования для исследования. Две (2) серии PPV 27а VP2, номера партий 7600016А (10 доз) и 7600018В (50 доз), использовали в качестве разбавителя для Ingelvac ReproCyc[®] PRRS EU партии 3910003А (10 доз) и 3910004А (50 доз), соответственно. Эти две партии хранили при 5 °С ± 3 °С в упаковочных материалах до использования для исследования. Вакцину ReproCyc[®] PRRS EU, после восстановления влагосодержания (либо в содержащем Carborol разбавителе в группе 1, либо жидкая вакцина против PPV 27а VP2 в группе 2), хранили при комнатной температуре (15 - 25 °С) в течение максимального периода 8 часов и испытывали на титр в начале отсчета времени, через два, четыре и 8 часов. Результаты титрования вируса в Группе 1 (Log10 TCID50/2 мл дозу), представленные ниже в Таблице 1А для Т0, Т2, Т4 и Т8, продемонстрировали устойчивость вируса до 8 ч. Результаты титрования вируса в Группе 2 (Log10 TCID50/2 мл дозу) на ассоциированном продукте для Т0, Т2, Т4 и Т8, продемонстрировали, что вакцина PPV 27а VP2 не обладает вируцидной активностью против ReproCyc[®] PRRS EU до 8 ч.

Таблица 1А

| Группа | Действующее вещество | Серийный номер | Цель | Испытание (ч) | | | |
|--------|------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
| | | | | Log10 TCID50/2 мл дозу | | | |
| | | | | 0 | 2 | 4 | 8 |
| 1 | ReproCyc [®] PRRS EU + разбавитель Carborol | 3910003А + 8080019А | Контроль ReproCyc [®] PRRS EU | 5,8 | 5,9 | 5,9 | 5,9 |
| | | 3910004А + 8080019А | | 6,0 | 6,0 | 5,9 | 6,0 |
| 2 | PPV 27а VP2 + ReproCyc [®] PRRS EU | 3910003А + 7600016А | Определение стабильности после вскрытия упаковки для заявленного ассоциированного применения | 5,8 | 5,9 | 5,8 | 5,8 |
| | | 3910004А + 7600018В | | 6,0 | 6,1 | 6,0 | 5,9 |

Таблица 1В: Две (2) серии Ingelvac PRRS MLV, номера партий 2451189А (10 доз) и 2451188А (50 доз), хранили при 5 °С ± 3 °С в упаковочных материалах до использования для исследования. Две (2) серии PPV 27а VP2, номера партий

7600016A (10dose) и 7600018B (50dose), использовали в качестве разбавителя для Ingelvac[®] PRRS MLV, партии 2451189A (10 доз) и 2451188A (50 доз), соответственно. Эти две партии хранили при 5 °С ± 3 °С в упаковочных материалах до использования для исследования. Вакцину Ingelvac[®] PRRS MLV, после восстановления влагосодержания (либо в содержащем Carborol разбавителе в группе 1, либо жидкая вакцина против PPV 27a VP2 в группе 2), хранили при комнатной температуре (15 - 25 °С) в течение максимального периода 8 часов и испытывали на титр (TCID₅₀ на 2 мл дозу) в начале отсчета времени, через два, четыре и 8 часов. Результаты титрования вируса в Группе 1 (Log₁₀ TCID₅₀/2 мл дозу), представленные ниже в Таблице 1В для T₀, T₂, T₄ и T₈, продемонстрировали устойчивость вируса до 8 ч. Результаты титрования вируса в Группе 2 (Log₁₀ TCID₅₀/2 мл дозу) на ассоциированном продукте для T₀, T₂, T₄ и T₈, продемонстрировали, что вакцина PPV 27a VP2 не обладает вируцидной активностью против Ingelvac[®] PRRS MLV до 8 ч.

15 **Таблица 1В**

| Группа | Действующее вещество | Серийный номер | Цель | Испытание (ч) | | | |
|--------|-------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| | | | | Log ₁₀ TCID ₅₀ /2 мл дозу | | | |
| | | | | 0 | 2 | 4 | 8 |
| 1 | Ingelvac [®] PRRS MLV + разбавитель Carborol | 2451189A + 8080019A | Контроль Ingelvac [®] PRRS MLV | 6,0 | 6,1 | 6,2 | 6,3 |
| | | 2451188A + 8080019A | | 6,3 | 6,3 | 6,3 | 6,4 |
| 2 | PPV 27a VP2 + Ingelvac [®] PRRS MLV | 2451189A + 7600016A | Определение стабильности после вскрытия упаковки для заявленного ассоциированного применения | 6,0 | 6,0 | 6,1 | 6,0 |
| | | 2451188A + 7600018B | | 6,4 | 6,3 | 6,5 | 6,5 |

ПРИМЕР 3:

Эффективность вакцины PRRSV-EU при смешивании вакцины PRRSV-EU с вакциной PPV VP2

20 Тридцать шесть (36) небеременных свинок половозрелого возраста рандомизированно распределяли по трем экспериментальным группам, каждая из которых включала двенадцать свинок. Группа T₀₁ получала контрольный продукт WPBS (промывочный фосфатно-буферный солевой раствор) (**контроль**) в начале отсчета времени и на 21-й день (D₀, D₂₁). Группа T₀₂ получала

ReproCyc® PRRS EU (PRRS, штамм 94881), $3,9 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ на дозу, и вакцину от свиного парвовируса, PPV-27a VP2, 10 мкг на дозу (**смешанная**) в D0 и PPV-27a VP2, 10 мкг на дозу, только в D21. ReproCyc® PRRS EU лиофилизированной таблетки подвергали восстановлению влагосодержания с использованием жидкости PPV-27a VP2. Группа T03 получала ReproCyc® PRRS EU (**отдельно**) в D0. Лечение было разработано таким образом, что свинки получали ReproCyc® PRRS EU в минимальной иммунизирующей дозе и PPV-27a VP2 при максимальной относительной активности. Свинки получали провоцирующие дозы $5,5 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ / 6 мл общей дозы (2 мл внутримышечно и 2 мл в каждую ноздрю) гетерологичный PRRSV EU изолят 190136 через четыре недели после первоначальной вакцинации (D28) и образцы сыворотки собирали в следующие дни: D31, D35, D38, D42 и D49. Виремию PRRSV испытывали путем количественной ПЦР (кПЦР) [Sandra Revilla-Fernández et al., Journal of Virological Methods 126 (2005) 21 - 30]. Провоцирующий вирус европейский вирус PRRS изолят 190136 первоначально получали из ткани легкого новорожденного поросенка с фермы, на которой обнаруживались типичные воспроизводимые признаки PRRSV (выкидыши у свиноматок и ослабленные новорожденные поросята) во время вспышки в Нижней Саксонии, Германия, в апреле 2004 г. Лечащие ветеринары направляли образцы легких в BioScreen (образец прибыл 21 апреля 2004 г.) на диагностическое исследование. Провоцирующий вирус размножали в клетках АК-МА104 и дважды пересевали перед провокацией.

После провокации обе группы ("смешанная" и "отдельная") демонстрировали эффективность против вирулентного PRRSV с показателями площади под кривой (AUC) для количественной вирусной нагрузки с D28 по D49 $24,36 \text{ GE/мл}$ (GE = геномные эквиваленты) для "смешанной" ($p=0,0002$) и $32,54 \text{ GE/мл}$ для "отдельной" ($p=0,0045$) по сравнению с $50,85 \text{ GE/мл}$ в контрольной группе. Эти данные представляют приблизительно 50 % снижение со временем системно циркулирующего вируса у свиней для "смешанной" группы и приблизительно 40 % снижение для группы, получавшей только ReproCyc® PRRS EU (Фигура 1), демонстрируя значительный защитный эффект в "смешанной" и "отдельной" группах. Кроме того, количественный анализ кПЦР среднего PRRSV продемонстрировал значительное снижение вирусной нагрузки PRRSV для "смешанной" группы в D35 ($p<0,0001$) и в D38 ($p=0,0052$) и в

"отдельной" группе в D35 ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой, демонстрируя значительный защитный эффект в "смешанной" и "отдельной" группах. Анализ кПЦР продемонстрировал значительное снижение пропорции позитивных свинок в D35 для "смешанной" ($p = 0,0013$) и "отдельной" ($p = 0,0046$) и в D38 для "смешанной" ($p = 0,0137$) по сравнению с контрольной группой. Хотя она не является статистически значимой, численная тенденция к снижению средней вирусной нагрузки и пропорции кПЦР-позитивных на PRRSV наблюдался в "смешанной" группе в D42 и D49. Подобные тенденции наблюдались для "отдельной" группы с численным снижением средней вирусной нагрузки в D49 и пропорции кПЦР-позитивных в D42 и D49.

Применение вакцины ReproCyc® PRRS EU, отдельно или смешанной с вакциной PPV-27a VP2, оказалось эффективным против вирулентного штамма PRRSV-EU для провокационного заражения, демонстрируя начало иммунитета в течение четырех недель. Из данных, представленных на Фигуре 1 и Фигуре 2, становится очевидным, что смешивание вакцины ReproCyc® PRRS EU с PPV-27a VP2 улучшает эффективность. Результаты демонстрируют отсутствие взаимных помех между PRRSV-компонентом и PPV-компонентом в "смешанной" группе, демонстрируя преимущества возможности ассоциированного применения путем смешивания.

ПРИМЕР 4:

Эффективность вакцины PPV VP2 при смешивании вакцины PRRSV-EU с вакциной PPV VP2

Оценка эффективности комбинированных вакцин: эффективность ассоциированного применения обеих вакцин [ReproCyc® PRRS EU (PRRS, штамм 94881) и PPV-27a VP2] оценивают на экспериментальных инфекциях PPV.

Эффективность против экспериментальной провокации диким штаммом PPV: эффективность комбинированной вакцины против PPV оценивают на основе инфекции PPV у плодов. Вакцина считается эффективной, если ≥ 80 % плодов в каждой экспериментальной группе являются серонегативными на PPV.

Уход за животными: животные перед началом исследования имеют хорошее состояние здоровья и алиментарный статус. Перед включением и процедурой рандомизации проводят медицинское обследование. В течение всего

исследования используют нелекарственный корм. Рацион питания подбирают согласно возрасту, состоянию и виду испытуемого животного в соответствии с утвержденной в центре стандартной рабочей процедурой. Воду обеспечивали *ad libitum* в течение всего исследования.

5 Оценка эффективности ассоциированного применения вакцин PPV и PRRSV после провокации гетерологичным штаммом PPV: в начале отсчета времени (D0) обычных небеременных свинок в возрасте 5 - 6 месяцев рандомизированно на равных условиях распределяют по трем экспериментальным группам. Группа T01 получает 2 мл IM контрольного
10 продукта (разбавитель PBS-Carbopol (Impran FLEX[®]) в начале отсчета времени и на 21-й день (D0, D21). Группа T02 получает 2 мл IM ReproCyc[®] PRRS EU (PRRS, штамм 94881) и вакцину от свиного парвовируса, PPV-27a VP2, в D0 и PPV-27a VP2 только в D21. Для Группы T02 лиофилизированную таблетку ReproCyc[®] PRRS EU подвергают восстановлению влагосодержания раствором
15 вакцины PPV-27a VP2. Группа T03 получает 2 мл IM вакцины свиного парвовируса, PPV-27a VP2, (1 мкг/дозу) в D0 и в D21. Свинок наблюдают ежедневно на общее состояние здоровья. Животным вводят провоцирующую дозу между 39-м и 42-м днями беременности, используя гетерологичный штамм PPV 401/09 (198669), полученный от BioScreen (Мюнстер, Германия), взятый из
20 ткани мумифицированного поросенка 15 июня 2004 р. и отправленный в Лейпцигский университет, Германия (провоцирующий вирус размораживают и разводят в DMEM (1x, Gibco, Ref#11966-025, Lot# 1632505) до заданной дозы 6,0 log₁₀ TCID₅₀/6 мл дозу). Плоды собирают (стандартная процедура) приблизительно на 90-й день беременности и оценивают на наличие PPV при
25 помощи ПЦР (Molitor TW et al., Journal of Virological Methods 1991, 32: 201 - 211) образцов их органов или тканевых жидкостей, а также на их состояние, размер и массу. Лечение разрабатывают таким образом, чтобы свинки получали ReproCyc[®] PRRS EU (PRRS, штамм 94881) и вакцину от свиного парвовируса, PPV-27a VP2, при максимальной иммунизирующей дозе ReproCyc[®] PRRS EU
30 (10^{7.0} TCID₅₀ / 2 мл дозу; среднее геометрическое) и вакцину от свиного парвовируса, PPV-27a VP2, при минимальной относительной активности (1 мкг/ дозу).

Исследование было действительным согласно Монографии Европейской фармакопеи 8.0 04/2013:0965, поскольку вакцина обеспечивала защиту 95,7 %

(группа T03) и 94,3 % (группа T02), тогда как в группе T01 (контроль) было 91,4 % позитивных плодов (см. Таблицу 2).

Таким образом, вакцинация вакциной против PPV, отдельно или в смеси с ReproСус® PRRS EU, является безопасной при выполнении вакцинации за три
5 недели до спаривания.

Таблица 2 – Процент позитивных плодов на группу

| Группа | Кол-во свинок | Кол-во плодов | Кол-во позитивных плодов | % PPV-полож. плодов по группам ¹ |
|--------|---------------|---------------|--------------------------|---------------------------------------------|
| T01 | 19 | 269 | 246 | 91,4 |
| T02 | 14 | 176 | 10 | 5,7 |
| T03 | 19 | 231 | 10 | 4,3 |

¹ Количество PPV-позитивных плодов / количество плодов на группу.

ПРИМЕР 5:

10 ПРИГОТОВЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ PPV

Антиген PPV VP2 выбирают для экспрессии в инфицированных бакуловиром клетках насекомых на основе немецкого изолята PPV 27a. Нуклеотидную последовательность свиного парвовируса (PPV) 27a VP2 получают от Genbank под номером доступа AY684871.1. Кодированный участок
15 PPV 27a VP2 является подвергнутым обратной трансляции и кодон-оптимизированным для Drosophila (SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 3). Кодон-оптимизированный ген PPV 27a VP2 химически синтезирован в Integrated DNA Technologies. Ген PPV 27a затем субклонировать в бакуловирусный вектор переноса pVL1393 и совместно трансфицируют с линейризованным остовом
20 бакуловируса DiamondVac® в клетки насекомых Sf9 для генерации рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген PPV 27a VP2, под контролем полиэдринового промотора.

При экспрессии в клетках насекомых Sf9 PPV VP2 самоорганизуется в безоболочечный VLP (данные не показаны).

25 Антиген PPV VP2 дополняется карбомером в качестве адьюванта (Carbopol).

ПРИМЕР 6:РАННЯЯ СТАДИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ PPV

Во всех исследованиях на животных животные имеют хорошее состояние здоровья и алиментарный статус перед началом исследования. Перед процедурой рандомизации проводят медицинское обследование. Нелекарственный корм используют на протяжении всего исследования. Рацион питания подбирают согласно возрасту, состоянию и виду испытуемого животного в соответствии с утвержденной для центра стандартной рабочей процедурой. Воду обеспечивали ad libitum в течение всего исследования.

Цель этого исследования провокационной вакцинации состоит в обеспечении доказательства эффективности концепции определения дозы для предслучной субъединичной вакцины против свиного парвовируса (PPV) (см. Пример 5). Свинок вакцинируют и осеменяют перед провокацией изолятом живого вирулентного PPV (PPV 002346-5; североамериканский штамм) приблизительно после 40 дней беременности (dG). Плоды оценивают на наличие инфекции PPV приблизительно после 90 dG.

План исследования описывается в Таблице 3.

Таблица 3: План исследования

| Лечение | | Вакцинация | Осеменение | Оценка беременности | Провокация | Вскрытие |
|---------|------------------------------------------------------------|---------------------------|------------|---------------------|----------------------------------------------------|------------------|
| T1 | Негативный контроль | 2 мл на D0 прав. шея IM & | D34 – D42 | D71 | 6 мл на D80 (~40dG) PPV 002346-5 прав. шея IM и IN | D129/130 (~90dG) |
| T2 | PPV 10 мкг | | | | | |
| T3 | Позитивный контроль (цельноклеточный инактивированный PPV) | 2 мл на D21 лев. шея IM | | | | |
| NTX | Нет | Не применяется | | | Не применяется | D79 (39dG) |

NTX = Контроль без лечения / провокации; IN = интраназальное; IM = внутримышечное; dG = дней беременности.

Используют шестьдесят семь свинок из стада, ранее испытанного на отсутствие PPV, с отсутствующей историей заболеваний репродуктивной системы или вакцинации против PPV. Свинок рандомизированно распределяют по 6 экспериментальным группам (Т) n=9, объединенных в 3 загона, получающих вакцинацию на D0 и стимуляцию на D21: T1 NC (негативный

контроль, получающий воду для инъекций), **T2** PPV 10 мкг, **T3** РС (позитивный контроль; цельный, инактивированный свиной парвовирус (PPV), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* и *L. Pomona*; серийного производства; применяются в соответствии с инструкцией производителя). Включают трех не получавших 5 лечения контрольных (**NTX**) свинок, по одной на загон. После вакцинации свинок синхронизируют (путем введения Matrix®; altrenogest, Intervet Schering-Plough Animal Health; согласно маркировке в течение 14 последовательных дней, с D18 по D31), а затем спаривали между D35 и D42. Пятьдесят четыре из 67 10 свинок забеременели. На D80 (приблизительно 40dG), NTX-свинок подвергают вскрытию, а остальных свинок инокулируют 6 мл штамма PPV PPV002346-5 (североамериканский штамм) в количестве $4,25 \log_{10}TCID_{50}$ на дозу (2 мл внутримышечно и 2 мл в каждую ноздрю интраназально). У свинок еженедельно брали кровь, за исключением периодов синхронизации и спаривания (D35 – 15 D70). Серологическое исследование выполняют на образцах сыворотки, взятых на D0, D7, D14, D21, D28 и D73; серологическое исследование и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (как описывается в публикации Jozwik et al. 2009; Journal of General Virology, 90, 2437-2441) на вирусе выполняют на образцах сыворотки, взятых на D80, D87, D94, D101, D108, D115, D122 и D128. Свинок 20 подвергают вскрытию на D129 или D130 (приблизительно 90dG). При вскрытии каждый репродуктивный тракт извлекают и записывают позицию плода в матке, состояние плода, его размер и вес. Собирают образцы торакальной промывки и легких каждого плода. Образцы торакальной промывки собирают в асептических условиях с каждого плода. В общих чертах, 3 мл стерильного PBS путем 25 инъекции вводят в грудную полость при помощи стерильной иглы и шприца. Жидкость отсасывают назад в шприц и вводят в соответствующую стерильную SST (пробирку для отделения сыворотки) подходящего размера. Образцы торакальной промывки испытывают на наличие PPV при помощи ПЦР и на наличие антитела PPV при помощи ингибирования гемагглютинации (HI). 30 Легочную ткань хранят в замороженном виде.

Виремия свинок (PPV)

Все свинки являются негативными на вирусе PPV перед провокацией на D0, D73 (данные не показаны) и D80 (Таблица 4). Все негативные контрольные

животные являются вирусемическими на D87, и 4/7 являются вирусемическими на D94.

Поствакцинационные свинки Т3 сероконвертируются после бустерной вакцинации. Т2 обнаруживает серологический ответ на первоначальную вакцинацию и остается серопозитивным после бустерной вакцинации. Контрольные свинки Т1 остаются серологически негативными в отношении PPV до провокации. После провокации все негативные контрольные свинки являются вирусемическими на D87 (через семь дней после провокации). Одна свинка Т3 является вирусемической на D87. Все остальные свинки не являются вирусемическими в эти моменты времени (см. Таблицу 4).

Свинки NTX оставались серологически негативными, и их плоды были негативными на PPV согласно ПЦР на образцах торакальной промывки.

Таблица 4: Распределение частоты PPV-позитивных свинок (ПЦР), получивших провокационную дозу PPV после 40 дней беременности (dG) на D80.

| Лечение / описание | | День исследования (dG = дней беременности) | | | | | | | |
|--------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | D80 | D87 | D94 | D101 | D108 | D115 | D122 | D128 |
| | | dG40 | dG 47 | dG 54 | dG 61 | dG 68 | dG 75 | dG 82 | dG 89 |
| T1 | Негативный контроль | 0/7 | 7/7 | 4/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 |
| T2 | 10 мкг PPV | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 |
| T3 | Позитивный контроль (цельноклеточный инактивированный PPV) | 0/9 | 1/9 | 0/9 | 0/9 | 0/9 | 0/8 | 0/8 | 0/8 |
| NTX | Нет | 0/3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

NA = не применяется.

Результаты плодов

Все плоды NTX считаются нормальными согласно вскрытию на D80 (Таблица 5). При окончательном вскрытии на D129 и D130 22,5 % плодов Т1 (негативный контроль) являются нормальными, и при этом 98,39 % плодов в Т3 и 97,62 % плодов в Т2 являются нормальными. Средний размер и вес плодов Т1 (негативный контроль) составляет 11,5 см и 168,8 г, соответственно, тогда как средний размер и вес плодов в Т2 составляет 17,5 см и 590,1 г, соответственно.

Все плоды Т4 (NTX) являются негативными на PPV согласно ПЦР на образцах торакальной промывки (см. Таблицу 3). Инфекция PPV подтверждается в 67/80 негативных контрольных плодов Т1 (83,75 %). Шестьдесят два из 67 негативных контрольных плодов, подтвержденных как инфицированные PPV,

являются мумиями. В отличие от них, инфекция PPV подтверждается лишь у 0,79 % плодов T2.

На основе определяющих параметров эффективности, как указывается в Европейской фармакопее (монография 01/2008:0965), все вакцины (включая 5 Позитивный контроль (цельноклеточный инактивированный PPV)) отвечают критериям защиты от инфекции (>80 % плодов, негативных на PPV).

Таблица 5: Детали помета: количество, размер, вес и состояние плодов и лабораторное подтверждение инфекции PPV (ПЦР на образцах торакальной промывки).

| Лечение | T1 | T2 | T3 | T4 |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------|------------------------------------------------------------------|------------|
| Описание | NC | PPV 10 мкг | Позитивный контроль (цельноклеточный инактивированный PPV) | NTX * |
| # свинок | 5 | 8 | 9 | 3 |
| Общ. # плодов | 80 | 126 | 124 | 44 |
| Средн. размер помета | 16,0 | 15,8 | 13,8 | 14,7 |
| Состояние плода: | | | | |
| Мумии | 62 | 3 | 2 | 0 |
| Нормальное | 18 | 123 | 122 | 44 |
| % нормальных | 22,50 | 97,62 | 98,39 | 100,0 |
| Средний размер (см) | 11,5 | 17,5 | 17,8 | 6,0 |
| Средний вес (г) | 168,8 | 590,1 | 580,3 | 11,9 |
| Лабораторное подтверждение инфекции PPV: | | | | |
| # PPV+ плоды | 67 | 1 | 3 | 0 |
| % положительных | 83,7 5 | 0,79 | 2,42 | 0,0 |
| % защищенных | 16,2 5 | 99,21 | 97,58 | |
| *Вскрытие плодов NTX после 50 дней беременности NC = Негативный контроль | | | | |

10

Заключение: Вакцина против PPV в соответствии с настоящим изобретением продемонстрировала защиту плодов после провокации вирулентным гетерологичным PPV. Результаты исследования показывают, что вакцина безопасна при введении в предслучный период и эффективна для 15 существенного снижения вирусемии и трансплацентарной инфекции плодов. Кроме того, было продемонстрировано, что вакцина защищает от гетерологичного североамериканского штамма PPV для провокационного

заражения. Кроме того, было продемонстрировано, что субъединичный белок PPV VP2 является столь же эффективным, как и цельный убитый вирус.

ПРИМЕР 7:

5 УСТАНОВЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ИММУНИЗИРУЮЩЕЙ ДОЗЫ
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ PPV – ЗАЩИТА ОТ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО
СЕВЕРОАМЕРИКАНСКОГО ШТАММА PPV

10 Цель этого исследования провокационной вакцинации состоит в установлении минимальной иммунизирующей дозы (MID) для вакцины против свиного парвовируса (PPV). Свинкам вводят провоцирующую дозу изолята живого вирулентного PPV серотипа 1 (PPV 002346-5) приблизительно после 40 дней беременности (dG). Вакцина считается эффективной, если $\geq 80\%$ плодов в вакцинированной группе являются негативными на PPV после провокации. К подтверждающим параметрам относятся размер, вес и состояние плода, статус

15 вiremии свинок после провокации и серологический статус свинок. Свинок (с отсутствующей историей заболеваний репродуктивной системы или вакцинации от PPV) рандомизированно распределяют по экспериментальным группам: T01 = негативный контроль (соответствующее продукту плацебо (PMP)) и T02 = 1,0 мкг PPV/2 мл дозу). Свинок без лечения / провокации (NTX) рандомизированно распределяют по загонам в качестве

20 контрольных животных для общего состояния здоровья.

Свинки получают 2 мл соответствующего лекарственного препарата внутримышечно на D0 и D21. После вакцинации свинок спаривают между D37 и D50, а затем оценивают состояние беременности на D74. На D81 беременным свинкам вводят провоцирующую дозу $6,77 \log_{10} \text{TCID}_{50}/6$ мл PPV серотипа 1

25 внутримышечно и интраназально. У свинок еженедельно берут кровь, за исключением периодов синхронизации и спаривания (D36 - D73). Анализы ингибирования гемагглютинации (HI) выполняют на образцах сыворотки, взятых на D7, D14, D21, D28 и D35; HI и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (см. Пример 6) на вiremию выполняют на образцах сыворотки, взятых на D-3, D74, D80, D88, D95, D102 и D127. Свинок подвергают вскрытию на D128 и D129

30 (приблизительно 90 dG). При вскрытии репродуктивный тракт каждой свиноматки извлекают и записывают позицию плода в матке, состояние плода, его размер и вес. Образцы торакальной промывки (см. Пример 6) собирают с каждого плода и испытывают на наличие PPV при помощи ПЦР.

Виремия свинок (PPV)

Вакцины считаются безопасными, поскольку у животных не обнаруживается отклонений температуры тела через 24 часа или 48 часов после вакцинации, аномальных местных реакций, обусловленных действием вакцины, и клинических признаков, связанных с вакцинацией (данные не показаны).

Все свинки являются негативными на виремию PPV перед вакцинацией, перед провокацией на D74 и на D80. Таким образом, после вакцинации клинические признаки, связанные с введением вакцины, не наблюдаются. На D88 все десять свинок T01 являются виремическими, и все вакцинированные свинки являются негативными. Все остальные образцы крови, взятые на D95, D102 и D127, являются негативными на виремию PPV для всех экспериментальных групп (Таблица 6).

Таблица 6: Распределение частоты PPV-позитивных свинок (ПЦР), получивших провокационную дозу PPV после ~40 дней беременности (dG) на D81.

| Лечение / описание | | День исследования / дни беременности (dG) | | | | | |
|--------------------|---------------------|-------------------------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | | D74 | D80 | D88 | D95 | D102 | D127 |
| | | dG 32 | dG 38 | dG 46 | dG 53 | dG 60 | dG 85 |
| T01 | Негативный контроль | 0/12 | 0/12 | 10/10* | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| T02 | PPV (1,0 мкг/дозу) | 0/12 | 0/12 | 0/12 | 0/12 | 0/12 | 0/12 |

* у 2 свинок было диагностировано отсутствие беременности, и, таким образом, они были исключены из группы

Результаты плодов

При окончательном вскрытии на D128 и D129, 38 % из плодов T01 (негативный контроль) пребывают в нормальном состоянии, тогда как в вакцинированной группе в нормальном состоянии пребывают 95 % плодов. Средний размер и вес плодов T01 (негативный контроль) составляют 14,4 см и 245,9 г, соответственно, тогда как средний размер и вес плодов у вакцинированных свинок составляет 19,3 см и 550 г, соответственно (Таблица 7). Таким образом, вакцинированная группа отвечает критериям защиты от инфекции PPV, поскольку согласно определяющему параметру для эффективности против PPV, установленному в Ph. Eur. 01/2008:0965, составляет >80 % плодов в экспериментальной группе должны быть негативными на PPV.

Инфекция РРV подтверждается у 113/146 негативных контрольных плодов (Т01) (77 %). Однако инфекция РРV в вакцинированной группе (Т02) составляет всего 10 %.

5 Таблица 7: Детали помета: количество, размер, вес и состояние плодов и лабораторное подтверждение инфекции РРV (ПЦР на образцах торакальной промывки).

| Лечение | Т01 | Т02 |
|------------------------------------------|---------------------|-------------------|
| Описание | Негативный контроль | РРV 1 мкг |
| # свинок | 10 | 11 |
| Общее кол-во плодов | 146 | 148 |
| Средн. размер помета | 14,6 | 13,5 |
| Состояние плода: | | |
| # некротич. (%) | 9 (6 %) | 0 (0 %) |
| # мумий (%) | 82 (56 %) | 8 (5 %) |
| # нормальных (%) | 55 (38 %) | 140 (95 %) |
| Средний размер (см) | 14,4 | 19,3 |
| Средний вес (г) | 245,9 | 550,0 |
| Лабораторное подтверждение инфекции РРV: | | |
| # плодов с полож. торак. пром. (%) | 113 (77 %) | 15 (10 %) |
| % защищенных | | 90 % |
| # = количество, % = процент | | |

10 **Заключение:** Субъединичная вакцина против РРV VP2 в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует защиту плодов после провокации вирулентным гетерологичным РРV. Результаты этого исследования обнаруживают, что вакцина является безопасной и эффективной для предотвращения виремии у свинок и инфекция РРV у плодов при применении всего 1 мкг субъединичной вакцины РРV VP2. Кроме того, продемонстрировано, что вакцина защищает от гетерологичного североамериканского штамма для
15 провокационного заражения.

ПРИМЕР 8:

УСТАНОВЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ИММУНИЗИРУЮЩЕЙ ДОЗЫ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РРV – ЗАЩИТА ОТ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ЕВРОПЕЙСКОГО ШТАММА РРV

20 Цель этого исследования состоит в оценке начала иммунитета, обеспечиваемого вакциной от свиного парвовируса (РРV VP2, далее называемой вакциной против РРV). Кроме того, безопасность и эффективность оценивают с

применением плана рандомизированного, слепого исследования с негативным контролем, включающего вакцинацию и провокацию.

5 Свинок рандомизированно разбивают на три группы. В группах 1 и 2 свинок вакцинируют дважды, с трехнедельным интервалом (на D0 и D21). Вторую дозу вводят за три недели до спаривания. Все лекарственные препараты вводят внутримышечным (IM) путем в объеме 2 мл. Группа 2 получает вакцину против PPV, тогда как группа 1 является плацебо-группой, получающей стерильный разбавитель в качестве контрольного продукта, и группа 3 служит в качестве строгого контроля, без какого бы то ни было лечения.

10 Свинок синхронизируют по эструсу и через три недели после второй вакцинации искусственно осеменяют. Забеременевшие животные на D84 между 39-м и 42-м днями беременности получают провоцирующую дозу вирулентного, гетерологичного штамма PPV.

15 На D132-135, приблизительно после 90-го дня беременности, свинок умерщвляют, подвергают вскрытию и исследуют плоды.

Таблица 8: План исследования

| Группа | 1-е лечение D0 (2 мл в правую сторону шеи IM) | 2-е лечение D21 (2 мл в левую сторону шеи IM) | Провокация D84 6,0 Log ₁₀ TCID ₅₀ /6 мл) доза (~40dG) 2 мл прав. шея IM и 2 мл в каждую ноздрю интраназально | Вскрытие |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1 (Негативный контроль) | Контрольный продукт | Контрольный продукт | Евр. штамм PPV 401/09 (198669) | D132 - D135 |
| 2 | PPV (1 мкг/дозу) | PPV (1 мкг/дозу) | Евр. штамм PPV 401/09 (198669) | D132 - D135 |
| 3 (Строгий контроль) | - | - | Без провокации | D83 |

Оценка виремии PPV у свинок до и после провокации при помощи

ПЦР:

20 Все животные являются негативными на PPV согласно ПЦР на D-6 и D-1 перед вакцинацией, что соответствует критериям включения. После вакцинации все животные в группах строгого контроля и контрольного продукта являются негативными на антиген PPV до провокации, и, таким образом, инфекция PPV до провокации может быть исключена.

Виремию исследуют на 7 (D90), 14 (D97) и 21 (D104) дни после провокации и в день вскрытия. После провокации у вакцинированных животных виремия не обнаруживалась, виремия имеет место только у невакцинированных контрольных животных.

5 На D90, (через 7 дней после провокации) уже 95 % невакцинированных контрольных животных являются позитивными на PPV. На D97 60 % этих животных все еще имели позитивный результат, тогда как на D104 все испытанные животные оказались негативными на PPV. В отличие от них, в вакцинированной группе все животные, испытанные на D90, D97 или D104, являются негативными на PPV.

10 Таблица 9: Количество животных с виремией после провокации

| | 7 дней после провокации (D90) | 14 дней после провокации (D97) | 21 день после провокации (D104) |
|----------|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| Контроль | 19/20 (95 %) | 12/20 (60 %) | 0/20 |
| PPV | 0/20 | 0/20 | 0/20 |

Результаты плодов

15 Процент инфицированных PPV плодов составлял 91,4 % в контрольной группе, но лишь 4,3 % в группе PPV (см. Таблицу 10).

Таблица 10: Процент позитивных плодов на группу и размер помета

| Группа | Кол-во свинок | Кол-во плодов | Кол-во полож. плодов | % PPV-полож. (ПЦР) плодов по группам ¹ | Средний размер помета | Мин. % полож. плодов на выводок | Макс. % полож. плодов на выводок |
|----------|---------------|---------------|----------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Контроль | 19 | 269 | 246 | 91,4 | 14,2 | 57 | 100 |
| PPV | 19 | 231 | 10 | 4,3 | 12,2 | 0 | 20 |

¹Количество PPV-позитивных плодов / Количество плодов на группу. N
Общее количество

20 Оценка состояния плодов

Все плоды оценивали на их состояние и разделяли на три категории: нормальные, мумифицированные и аутолизированные.

25 Большинство мумифицированных и аутолизированных плодов обнаруживается в контрольной группе. Лишь 39,8 % плодов в этой группе пребывают в нормальном состоянии, тогда как в вакцинированных группах 97,4 % (PPV-группа) плодов имеют нормальное состояние (см. Таблицу 11).

Таблица 11: Состояние плода

| Группа | Состояние плода | | | |
|----------|--------------------|--------------------------|------------------------|---------------|
| | [% нормальных] | [% аутолизированных] | % мумифицированных] | [N (общ.)] |
| Контроль | 39,8 % | 12,3 % | 48,0 % | 269 |
| PPV | 97,4 % | 0,9 % | 1,7 % | 231 |

Заключение: Вакцина против PPV в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует защиту плодов после провокации вирулентным гетерологичным PPV, что свидетельствует о том, что вакцина является безопасной и эффективной для профилактики виремии и инфицирования плода PPV при применении всего 1 мкг вакцины. Кроме того, продемонстрировано, что вакцина также защищает от гетерологичного европейского штамма для провокационного заражения PPV. Таким образом, вакцина обладает широким спектром защиты, поскольку вакцина защищает от гетерологичных североамериканских, а также гетерологичных европейских штаммов для провокационного заражения.

Все композиции и способы, которые раскрываются и заявляются авторами, могут быть получены и выполнены без лишних экспериментов в свете представленного описания. Хотя композиции и способы согласно настоящему изобретению были описаны на примерах предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области станет понятна возможность внесения изменений в композиции и способы и этапы или последовательность этапов описанного авторами способа без отклонения от идеи, сущности и объема изобретения. Более конкретно, станет очевидно, что некоторые агенты, которые являются химически и физиологически родственными, могут замещать описанные авторами агенты при достижении таких же или подобных результатов. Все подобные замещения и модификации, являющиеся очевидными для специалистов в данной области, считаются охватываемыми сущностью, объемом и идеей изобретения, которые определяются представленной ниже формулой изобретения.

ПРИМЕР 9:

Подтверждение концепции свиного парвовируса (PPV) / Определение дозы вакцины субъединичной комбинированной вакцины против PPV с *Erysipelothrix rhusiopathiae* и/или вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома у свинок случного возраста

5 Цель этого исследования провокационной вакцинации состоит в обеспечении данных по ассоциированному применению Ingelvac® PRRSV MLV с экспериментальной субъединичной комбинированной вакциной против свиного парвовируса (PPV) с бактерином *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Ery) и в
10 определении дозы в подтверждение концепции эффективности для комбинированной вакцины против PPV с бактерином Ery у свинок 5-6-месячного возраста.

Шестьдесят семь свинок брали из стада, предварительно обследованного на отсутствие PPV без заболевания PPV в анамнезе или вакцинации. Свинок
15 рандомизированно распределяли по 6 экспериментальным группам n=9, смешанным в 3 загонах, получавших вакцинацию на D0 и стимуляцию на D21: **T1** Негативный контроль, **T2** PPV 10 мкг, **T3** PPV 0,1 мкг + Ery 10 logs, **T4** PPV 1,0 мкг + Ery 10 logs, **T5** PPV 10 мкг + Ery 10 logs, **T6** Позитивный контроль (FarrowSure® GOLD). Включали трех не получавших лечения контрольных
20 (**NTX**) свинок, по одной на загон. Кроме того, десять свинок помещали в отдельном здании, и они получали **T7** PPV 10 мкг + Ery 10 logs для регидратации Ingelvac® PRRSV MLV для оценки эффективности PPV при комбинации с серийно выпускаемой вакциной против свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS). **T7 представляет исследуемую группу для**
25 **этого Примера 9.**

Свинок вакцинировали и спаривали; 54 из 67 свинок забеременели. Приблизительно после 40 дней беременности (dG) свинок NTX подвергали вскрытию, а остальных свинок инокулировали 6 мл штамма PPV PPV002346-5 в количестве 4,25 log₁₀TCID₅₀ на дозу (2 мл внутримышечно и 2 мл в каждую
30 ноздрю интраназально. У свинок еженедельно брали кровь, за исключением периодов синхронизации и спаривания (D35 – D70), и сыворотку испытывали, как описывается в Таблице 12.

Таблица 12: Образцы и лабораторное испытание, свинки

| Образец | День сбора образцов | Тип испытания | Испытание |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------|
| Сыворотка | Предварительный отбор | SIV серология | HI |
| Сыворотка | Все: D0, D73. Только T7: D21, D80, D128 | PRRSV серология | ELISA |
| Сыворотка | D0, D80, D87, D94, D101, D108, D115, D122, D128 | Серология свинок с PPV | HI |
| Сыворотка | D0, D7, D14, D21, D28, D73, D80, D94, D101, D108, D115, D122, D128 | Виремия свинок с PPV | ПЦР |

Свинок подвергали вскрытию в D129 или D130 (~ 90 dG). При вскрытии репродуктивный тракт каждой свинки извлекали и записывали позицию плода в матке, состояние плода, его размер и вес. Собирали образцы торакальной промывки и легких с каждого плода. Образцы торакальной промывки испытывали на наличие PPV при помощи ПЦР и на наличие антитела PPV при помощи ингибирования гемагглютинации (HI). Легочную ткань хранили в замороженном виде.

Свинки T7 демонстрировали серологическую реакцию на вакцинацию и не были виремическими после провокации. При вскрытии 97,37 % (111/114) из плодов T7 были в нормальном состоянии, и только один плод оказался позитивным на PPV. В отличие от них, все свинки T1 были серонегативными во время фазы вакцинации и сероконвертировались и становились виремическими после провокации. При вскрытии только 22,50 % (18/80) плодов T1 были в нормальном состоянии, а 83,75 % (67/80) оказались позитивными на инфекцию PPV, согласно ПЦР жидкости торакальной промывки. Таким образом, комбинированная вакцина (PPV 10 мкг + Ery) с Ingelvac PRRS MLV была эффективной в предотвращении виремии и инфекции PPV плодов на 40dG.

План исследования:

Таблица 13 – План исследования

| Лечение | # | Вакцинация | Осеменение | Оценка беременности | Провокация | Вскрытие |
|---------|---------------------|------------|-------------------------------------|---------------------|------------|----------------------------------------------------------|
| T1 | Негативный контроль | 9 | 2 мл на D0 прав. шея | D34 – D42 | D71 | 6 мл на D80 (~40dG) PPV 002346-5 прав. шея IM и IN |
| T2 | PPV 10 мкг | 9 | 2 мл на D21 (без PRRSV) лев. шея IM | | | |
| T3 | PPV 0,1 мкг + Ery | 9 | | | | |
| T4 | PPV 1,0 мкг + Ery | 9 | | | | |
| T5 | PPV 10 мкг + Ery | 9 | | | | |
| T6 | Farrow® Sure GOLD | 9 | | | | |

| Лечение | | # | Вакцинация | Осеменение | Оценка беременности | Провокация | Вскрытие |
|---------|-----------------------------------------------|----|-------------------|------------|---------------------|-------------------|---------------|
| T7 | PPV 10 мкг + Ery + Ingelvac PRRS MLV | 10 | | | | | |
| NTX | Нет | 3 | Не применяется | | | Не применяется | D79 (39dG) |

= количество; NTX = контроль без лечения / провокации; IN = интраназальное; IM = внутримышечное; dG = дней беременности

Материалы:

5 Контрольный продукт: контрольный продукт, который вводили негативным контрольным (T1) животным, был стерильным разбавителем (партия #240), приготовленным с использованием воды для инъекций (WFI) из очищенной воды в BIVI, St. Joseph MO, США. Контрольный продукт поставлялся в объеме
10 наполнения 100 мл в пластиковых бутылках. 2 мл дозу вводили в правую шейную мышцу в D0 с 2 мл бустерной дозой, которую вводили в левую шейную мышцу в D21.

Вакцина: исследуемой комбинированной вакциной для T7 была экспериментальная субъединичная комбинированная вакцина против PPV с бактерином Ery, используемым для регидратации Ingelvac® PRRS MLV. Сер. #311-171 направляли в количестве 10 мкг/дозу для PPV в комбинации с 10
15 log/дозу убитого бактериона Ery, поставляемого сотрудником лаборатории в пластиковых бутылках, содержавших 20 мл (10 доз). Одну бутылку Сер. #311-171 использовали для регидратации одной бутылки коммерческой серии Ingelvac® PRRS MLV, получаемой от исследователя, Сер. #245-B53. 2 мл дозу
20 вводили в правую шейную мышцу в D0 с 2 мл бустерной дозой, которую вводили в левую шейную мышцу в D21.

Материал для провокации: материал для провокации производился сотрудником лаборатории, BIVI-R&D, Ames IA, перед осуществлением
25 провокации. PPV, штамм 002346-5, направляли в количестве 5 log¹⁰TCID₅₀ на дозу, 6 мл доза (партия #354-021) и держали на льду во время выполнения провокации. Титры провокации определяли путем анализа TCID₅₀ на удерживаемом материале после провокации, который хранили при 4 °C. Конечный титр материала для провокации составлял 3,47 log/мл или 4,25 log/6

мл дозу. В D80 всех свинок инокулировали 2 мл материала для провокации в каждую ноздрю, а также 2 мл внутримышечно в правую шейную мышцу.

Способы:

5 Вскрытие и Оценка плода: в D79 всех свинок NTX умерщвляли путем внутривенной инъекции барбитурата, а в D129 и D130 умерщвляли всех оставшихся свинок. Для каждого вскрытия извлекали репродуктивный тракт и плоды доставали в асептических условиях путем кесарева сечения. Плоды идентифицировали при помощи идентификатора плодов, состоящего из
10 идентификационного номера свинки с последующим указанием буквы (R для “правой трубы” или L для левой трубы) и числа, поскольку плод появляется из разветвления матки. Записывали состояние плода (нормальное или мумия), его размер и вес.

Сбор образцов плодов: во избежание перекрестного загрязнения образцов применяли все соответствующие технологии для стерилизации или очистки
15 рабочих зон и инструмента между манипуляциями с каждым плодом и каждым образцом, как при вскрытии, так и в лаборатории. Образцы маркировали, указывая идентификатор плода, тип образца, день исследования и день сбора. Как можно раньше в день сбора образцы доставляли на льду сотруднику лаборатории. Сотрудник лаборатории или назначенное лицо обрабатывали
20 каждый образец с применением соответствующих технологий во избежание перекрестного загрязнения при аликвотировании каждого образца по пробиркам надлежащего размера и с надлежащей маркировкой. Одну аликвотную часть отправляли в ISU-VDL. Наличие вируса измеряли в каждом образце при помощи ПЦР. Остальные аликвоты хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в BIVI-R&D – Ames.

25 Сбор торакальной промывки: в максимально асептических условиях исследователь собирал торакальную промывку из каждого плода. В общих чертах, 3 мл стерильного PBS путем инъекции вводили в грудную полость при помощи стерильной иглы и шприца. Как можно больше жидкости отсасывали назад в шприц, а затем вводили в SST соответствующего размера.

Статистические способы:

30 **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЕДИНИЦА:** свинка была экспериментальной единицей для T1 - T6. В случае сравнений с T7 помещение было экспериментальной единицей в том смысле, что размещение T7 было отдельным от других экспериментальных групп.

Обоснование числа животных: согласно Европейской фармакопее, требуется по меньшей мере семь вакцинированных свинок и пять контрольных свинок для введения провоцирующих доз (EPH 01/2008:0965). В запасе предусматривалось девять или десять свинок на каждую группу, с учетом свинок, которые могут не забеременеть.

Рандомизация: перед началом исследования статистик получал идентификационные номера свинок и рандомизированно распределял свинок по загонам и экспериментальным группам на полностью случайной основе. Три свинки были рандомизированно включены в группу NTX, десять свинок были рандомизированно включены в группу T7, а остальные свинки были рандомизированно поровну распределены по группам T1, T2, T3, T4, T5 и T6. Свинки T1-6 и свинки NTX были поровну распределены по трем загонам в Сарае 1. Свинки T7 были размещены по одной в загонах в Сарае 2.

Критерии слепого режима: в течение всего исследования от любого персонала, задействованного в сборе данных или выполнении лабораторных анализов, было скрыто распределение свинок по экспериментальным группам T1, T2, T3, T4, T5 и T6. Поскольку свинки T7 и NTX были размещены отдельно, и сыворотку испытывали на антитело PRRSV, слепой режим в отношении этих двух групп не мог быть применен для персонала. Препараты вводились лицом, не участвовавшим в сборе данных.

Управление данными: статистический анализ данных осуществлялся статистиком. Все данные импортировали в SAS версии 9.2 (Cary, USA/North Carolina, SAS Institute Inc.) для обработки и анализа.

Результаты:

В сводке этого исследования представлены только сравнения для негативного контроля (T1) с группой, получавшей PPV 10 мкг + Ery 10 log для регидратации Ingelvac[®] PRRSV MLV (T7), и представлены данные для групп T1, T7 и NTX.

Результаты свинок: в D0 все свинки были серологически негативными на PRRSV согласно ELISA. В D21, D80 и D128 все свинки T7 были серопозитивными на PRRSV. В D73 все свинки T7 были серопозитивными, и свинки во всех других экспериментальных группах были серонегативными.

Среднее геометрическое титров PPV HI для T7 становилось и оставалось серопозитивным после бустерной вакцинации в D21, тогда как среднее

геометрическое титров PPV HI для групп T1 и NTX оставалось серологически негативным (<100) в течение фазы вакцинации. После D80, когда свинки T1 и T7 получали провоцирующие дозы PPV, обе группы были серопозитивными.

5 Все свинки были негативными на вирус PPV перед провокацией в D0, D73 (данные не показаны) и D80 (0). Все негативные контрольные животные были вирусными в D87, и 4/7 были вирусными в D94.

Таблица 14: Распределение частоты PPV-позитивных свинок (ПЦР), получивших провокационную дозу PPV после 40 дней беременности (dG) на D80.

| Лечение / описание | | День исследования (dG =дней беременности) | | | | | | | |
|--------------------|---------------------|-------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | D80 | D87 | D94 | D101 | D108 | D115 | D122 | D128 |
| | | dG40 | dG 47 | dG 54 | dG 61 | dG 68 | dG 75 | dG 82 | dG 89 |
| T1 | Негативный контроль | 0/7 | 7/7 | 4/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 |
| T7 | 10 мкг PPV/Ery/PRRS | 0/9 | 0/9 | 0/9 | 0/9 | 0/9 | 0/9 | 0/9 | 0/9 |
| NTX | Нет | 0/3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

NA = не применяется; Ery = 10 log бактерина *Erysipelothrix rhusiopathiae*; PRRS = Ingelvac® PRRS MLV

10

Результаты плодов: все плоды NTX считались нормальными согласно вскрытию в D80 (0). При окончательном вскрытии на D129 и D130 22,5 % плодов T1 (негативный контроль) были нормальными, тогда как в T7 99,12 % плодов были нормальными. Средний размер и вес плодов T1 (негативный контроль) составлял 11,5 см и 168,8 г, соответственно, тогда как средний размер и вес плодов в T7 составлял 17,8 см и 576,3 г, соответственно.

15

20

Все плоды NTX были PPV-негативными согласно ПЦР на образцах торакальной промывки. Инфекция PPV подтверждалась у 67/80 негативных контрольных плодов T1 (83,75 %). Шестьдесят два из 67 негативных контрольных плодов, у которых была подтверждена инфекция PPV, были мумиями. Все 18 плодов нормального вида были из одного выводка, и только у пяти из этих 18 плодов подтверждалось наличие PPV. Для T7 только одна свинья была инфицирована с уровнем инфекции <1 %.

Таблица 15: Детали помета: количество, размер, вес и состояние плодов и лабораторное подтверждение инфекции PPV (ПЦР на образцах торакальной промывки).

| Лечение | T1 | T7 | NTX* |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------|------------|
| Описание | Негативный контроль | PPV/Ery/PRRS | NTX* |
| Кол-во свинок | 5 | 8 | 3 |
| Общее количество плодов | 80 | 114 | 44 |
| Средний размер помета | 16,0 | 14,3 | 14,7 |
| Состояние плода: | | | |
| Мумии | 62 (77,50 %) | 3 (0,63 %) | 0 (0,0 %) |
| Нормальные | 18 (22,50 %) | 111 (97,37 %) | 44 (100 %) |
| Средний размер | 11,5 см | 17,8 см | 6,0 см |
| Средний вес | 168,8 г | 576,3 г | 11,9 г |
| Лабораторное подтверждение инфекции PPV (результаты ПЦР) | | | |
| ПЦР-позитивные плоды | 67 (83,75 %) | 1 (0,88 %) | 0 (0,0 %) |
| % защищенных | 13 (16,25 %) | 113 (99,12 %) | |
| *Вскрытие плодов NTX после 50 дней беременности PPV/Ery/PRRS = 10 мкг PPV + 10 log бактериона <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , использ. для регидратации Ingelvac® PRRS MLV | | | |

5 ОБСУЖДЕНИЕ / ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свинки NTX остаются серологически негативными, и все их плоды были PPV-негативными согласно ПЦР на образцах торакальной промывки.

Свинки, которым вводили T7 (10 мкг PPV+Ery+PRRSV), проявляли серологическую реакцию на первоначальную вакцинацию и оставались серопозитивными после бустерной вакцинации. Ни одна из свинок T7 не была вирусемической в дни еженедельного забора образцов после провокации. При вскрытии 97,37 % (111/114) плодов T7 были в нормальном состоянии, и только один плод оказался позитивными на инфекцию PPV согласно ПЦР жидкости торакальной промывки. В отличие от них, свинки, которым вводили T1 (Негативный контроль) были серонегативными во время фазы вакцинации и после провокации, все свинки сероконвертировались и становились вирусемическими. Средний размер и средний вес плодов T1 были значительно меньшими, чем в среднем в группе T7. При вскрытии только 22,50 % (18/80) из плодов T1 были в нормальном состоянии, и 83,75 % (67/80) оказались позитивными на инфекцию PPV, согласно ПЦР жидкости торакальной промывки.

Таким образом, комбинированная вакцина (PPV 10 мкг + Ery) с PRRS MLV была эффективной в предотвращении вирусемии и инфекции PPV плодов на 40dG.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 4 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PPV 27a VP2, которая была подвергнута дальнейшей модификации таким образом, чтобы включать два сайта рестриционного фермента ClaI (в аминокислотной позиции 25 находится изолейциновый остаток, в аминокислотной позиции 36 находится сериновый остаток, в аминокислотной позиции 37 находится изолейциновый остаток), чтобы примыкать к кодирующему участку VP2, состоящему из глициновых повторов. Однако сайты ClaI включали таким образом, чтобы не прерывать кодирующий участок VP2.

10 SEQ ID NO: 2 представляет собой белковую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 3 представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PPV 27a VP2 (без сайтов рестриционных ферментов ClaI). SEQ ID NO: 1 представляет собой белковую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 5 – 16

15 представляют другие белковые последовательности PPV VP2 с (SEQ ID NO: 5 - 10) или без (SEQ ID NO: 11 - 16) сайтов ClaI. SEQ ID NO: 17 соответствует последовательности дикого типа PRRSV Lelystad, и SEQ ID NO: 18 соответствует последовательности дикого типа PRRSV VR2332.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ВЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА ГМБХ

<120> ВАКЦИНА ПРОТИВ СВИНОГО ПАРВОВИРУСА И ВИРУСА СВИНОГО РЕПРОДУКТИВНОГО И РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА И СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

<130> 01-3229

<160> 18

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 579

<212> PRT

<213> Свиной парвовирус

<400> 1

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Arg Gly Ala Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
 35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
 50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
 65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
 85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 2

<211> 579

<212> PRT

<213> Свиной парвовирус

<400> 2

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ser Ile Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
 65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
 85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
 435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
 450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
 465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
 485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
 500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
 515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
 530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
 545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
 565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 3

<211> 1760

<212> ДНК

<213> Свиной парвовирус

<400> 3

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ggatccgccca ccatgtccga gaacgtggag cagcacaacc cgataaacgc aggcacagag | 60 |
| ctgtcggcga ctggcaatga gagcggaggc ggagggcggcg gaggaggtgg acgcggcgca | 120 |
| ggcggagtgg gcgtttcgac cggaagcttc aataatcaaa ccgagtttca gtacctgggc | 180 |
| gagggtttg tgcggattac ggctcacgcg tcccgactga tacatctcaa tatgccggag | 240 |
| catgagacct acaagcgtat ccatgtcctg aactcggaat cgggcgtcgc cggtcagatg | 300 |
| gtccaagatg atgctcatac tcagatggtg acaccctgga gcttgataga tgccaacgca | 360 |
| tggggcgtgt ggttcaacc tgcggattgg cagctgataa gcaataacat gacagaaatc | 420 |
| aatttggtta gtttcgagca agagatattt aatgtcgtgc tgaaaacat cacagagagc | 480 |
| gccacgagcc ccccgacgaa gatttacaat aacgacctga cggcgtcctt gatggtcgcc | 540 |
| ttggacacaa ataacacct cccgtacacc cccgcggccc cccgcagcga gaccctgggc | 600 |
| ttttatccct ggctgcccac caagccaacg cagtatcgct actacctgag ttgtacacga | 660 |
| aatttgaatc cgccgacata cactggtcag tcggagcaga tcacggacag cattcaaacg | 720 |
| ggcctgcact ccgatatcat gttttacacg atagagaacg cagtacctat ccacctgctg | 780 |
| cgtacgggag atgagttctc gaccggatc tatcattttg acacaaaacc cttgaaattg | 840 |
| acgcacagtt ggcaaacc aa tcgctcgtg ggcttgcccc caaagttggt gacggaacct | 900 |
| accaccgagg gtgaccaaca cccaggcact ctccccgcag caaataaccg caagggtat | 960 |
| catcaaacga tcaacaatag ctataccgag gctaccgcca ttcggccagc acaggtggga | 1020 |
| tacaacacac cttacatgaa ctttgaatac tccaacggcg gcccgttcct gaccccgata | 1080 |
| gttccgaccg ccgacactca gtacaacgat gacgagccga acggcgccat caggtttacc | 1140 |
| atgggctatc agcacggtca attgacaact tcgtcgcaag aactggaacg ctatacatc | 1200 |
| aacctcaga gtaagtgtgg ccgggcaccc aaacaacagt tcaaccagca atccccactg | 1260 |
| aacctgcaga ataccaaaa tggcacgctg ctgccatccg atcccattgg aggaaagacc | 1320 |
| aacatgcatt tcatgaacac gctgaataca tacggaccac tgaccgcctt gaacaatacc | 1380 |
| gcaccgtct tccctaattg ccagatctgg gataaagagc tggatacggga cctgaagccc | 1440 |
| cgactccag tgactgcgcc ctttgtgtgc aaaaataacc caccgggaca gttgttcgtc | 1500 |
| aaaatagccc ccaacttgac cgacgacttc aatgcagaca gccctcagca gccgcgaatc | 1560 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atcacctatt cgaacttctg gtggaagggc acgctgactt tcacggctaa gatgcgctcg | 1620 |
| agcaatatgt ggaaccfaat ccagcaacat accacaaccg ctgaaaatat tggcaattac | 1680 |
| atccctacga atataggcgg aataaagatg tttccggagt attcccagct cattccacgc | 1740 |
| aagctgtatt aagcggccgc | 1760 |

<210> 4
 <211> 1760
 <212> ДНК
 <213> СВИНОЙ парвовирус

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| <400> 4 | |
| ggatccgcca ccatgtccga gaacgtggag cagcacaacc cgataaacgc aggcacagag | 60 |
| ctgtcggcga ctggcaatga atcgatcggc ggaggcggcg gaggaggtgg acgcggatcg | 120 |
| atcggagtgg gcgtttcgac cggaagcttc aataatcaaa ccgagtttca gtacctgggc | 180 |
| gagggtttgg tgcggattac ggctcacgcg tcccgactga tacatctcaa tatgccggag | 240 |
| catgagacct acaagcgtat ccatgtcctg aactcggaat cgggcgtcgc cggtcagatg | 300 |
| gtccaagatg atgctcatac tcagatggtg acaccctgga gcttgataga tgccaacgca | 360 |
| tggggcgtgt ggttcaacc tgcggattgg cagctgataa gcaataacat gacagaaatc | 420 |
| aatttggtta gtttcgagca agagatattt aatgtcgtgc tgaaaacat cacagagagc | 480 |
| gccacgagcc ccccgacgaa gatttacaat aacgacctga cggcgtcctt gatggtcgcc | 540 |
| ttggacaaa ataacaccct cccgtacacc cccgcggccc cccgcagcga gaccctgggc | 600 |
| ttttatccct ggctgccac caagccaacg cagtatcgct actacctgag ttgtacacga | 660 |
| aatttgaatc cgccgacata cactggtcag tcggagcaga tcacggacag cattcaaacg | 720 |
| ggcctgcact ccgatatcat gttttacacg atagagaacg cagtacctat ccacctgctg | 780 |
| cgtacgggag atgagttctc gaccggatc tatcattttg acacaaaacc cttgaaattg | 840 |
| acgcacagtt ggcaaaccaa tcgctcgcctg ggcttgcccc caaagttggt gacggaaccc | 900 |
| accaccgagg gtgaccaaca cccaggcact ctccccgcag caaataaccg caagggctat | 960 |
| catcaaacga tcaacaatag ctataccgag gctaccgcca ttcggccagc acaggtggga | 1020 |
| tacaacacac cttacatgaa ctttgaatac tccaacggcg gcccgttcct gaccccgata | 1080 |
| gttccgaccg ccgacactca gtacaacgat gacgagccga acggcgccat caggtttacc | 1140 |
| atgggctatc agcacggtca attgacaact tcgtcgcaag aactggaacg ctatacatc | 1200 |
| aaccctcaga gtaagtgtgg ccgggcaccc aaacaacagt tcaaccagca atccccactg | 1260 |
| aacctgcaga ataccaaaa tggcacgctg ctgccatccg atcccattgg aggaaagacc | 1320 |
| aacatgcatt tcatgaacac gctgaataca tacggaccac tgaccgcctt gaacaatacc | 1380 |
| gcaccgtct tcctaatgg ccagatctgg gataaagagc tggatacggga cctgaagccc | 1440 |
| cgactccacg tgactgcgcc ctttgtgtgc aaaaataacc caccgggaca gttgttcgtc | 1500 |

aaaatagccc ccaacttgac cgacgacttc aatgcagaca gccctcagca gccgcgaatc 1560
 atcacctatt cgaacttctg gtggaagggc acgctgactt tcacggctaa gatgcgctcg 1620
 agcaatatgt ggaaccfaat ccagcaacat accacaaccg ctgaaaatat tggcaattac 1680
 atccctacga atataggcgg aataaagatg tttccggagt attcccagct cattccacgc 1740
 aagctgtatt aagcggccgc 1760

<210> 5
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> СВИНОЙ парвовирус

<400> 5

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Arg Gly Ser Ile Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
 35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
 50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
 65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
 85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Ala
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser

180

185

190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Ile Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Thr
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Asp Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly

435

440

445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Arg Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 6

<211> 579

<212> PRT

<213> Свиной парвовирус

<400> 6

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ser Ile Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 7
<211> 579
<212> PRT
<213> СВИНОЙ парвовирус

<400> 7

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ser Ile Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Phe Ile Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Gly Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Ile Thr Ser Ser Gln Glu Val Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Arg
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Gly Ala Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Ile Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Ile Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Pro Asn Thr Tyr Gly
 435 440 445

Pro Leu Thr Ala Val Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
 450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
 465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 8

<211> 579

<212> PRT

<213> СВИНОЙ парвовирус

<400> 8

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ser Ile Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Ala
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu His Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Ile Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Asp Tyr Gln His Gly His Leu
370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Thr Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Lys Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 9

<211> 579

<212> PRT

<213> СВИНОЙ парвовирус

<400> 9

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Arg Gly Ser Ile Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
 35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
 50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
 65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
 85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Ser Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
 435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
 450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
 465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
 485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
 500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 10

<211> 579

<212> PRT

<213> Свиной парвовирус

<400> 10

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ser Ile Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Thr
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 11

<211> 579

<212> PRT

<213> Свиной парвовирус

<400> 11

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
 35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
 50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
 65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
 85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Ala
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Ile Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Thr
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Asp Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
 435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
 450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
 465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
 485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
 500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
 515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
 530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Arg Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 12

<211> 579

<212> PRT

<213> СВИНОЙ парвовирус

<400> 12

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 13

<211> 579

<212> PRT

<213> Свиной парвовирус

<400> 13

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
 65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
 85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Phe Ile Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Gly Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Ile Thr Ser Ser Gln Glu Val Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Arg
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Gly Ala Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Ile Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Ile Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Pro Asn Thr Tyr Gly
 435 440 445

Pro Leu Thr Ala Val Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
 450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
 465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
 485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
 500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
 515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
 530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
 545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
 565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 14

<211> 579

<212> PRT

<213> СВИНОЙ парвовирус

<400> 14

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Ala
130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
165 170 175

Leu His Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Ile Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr

210

215

220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Asp Tyr Gln His Gly His Leu
370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Thr Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Lys Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 15

<211> 579

<212> PRT

<213> Свиной парвовирус

<400> 15

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile

100

105

110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
 210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu
 245 250 255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu

355

360

365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Ser Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
 435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
 450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
 465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
 485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln
 500 505 510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
 515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
 530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
 545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
 565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 16

<211> 579

<212> PRT

<213> Свиной парвовирус

<400> 16

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Arg Gly Ala Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Phe Asn Asn
35 40 45

Gln Thr Glu Phe Gln Tyr Leu Gly Glu Gly Leu Val Arg Ile Thr Ala
50 55 60

His Ala Ser Arg Leu Ile His Leu Asn Met Pro Glu His Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Ile His Val Leu Asn Ser Glu Ser Gly Val Ala Gly Gln Met
85 90 95

Val Gln Asp Asp Ala His Thr Gln Met Val Thr Pro Trp Ser Leu Ile
100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Ala Asp Trp Gln Leu
115 120 125

Ile Ser Asn Asn Met Thr Glu Ile Asn Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Ile Thr Glu Ser Ala Thr Ser Pro
145 150 155 160

Pro Thr Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
165 170 175

Leu Asp Thr Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Arg Ser
180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Thr Lys Pro Thr Gln Tyr
195 200 205

Arg Tyr Tyr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Leu Asn Pro Pro Thr Tyr Thr
210 215 220

Gly Gln Ser Glu Gln Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Leu His Ser
225 230 235 240

Asp Ile Met Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ala Val Pro Ile His Leu Leu

245

250

255

Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ser Thr Gly Ile Tyr His Phe Asp Thr Lys
 260 265 270

Pro Leu Lys Leu Thr His Ser Trp Gln Thr Asn Arg Ser Leu Gly Leu
 275 280 285

Pro Pro Lys Leu Leu Thr Glu Pro Thr Thr Glu Gly Asp Gln His Pro
 290 295 300

Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asn Thr Arg Lys Gly Tyr His Gln Thr Thr
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Tyr Thr Glu Ala Thr Ala Ile Arg Pro Ala Gln Val Gly
 325 330 335

Tyr Asn Thr Pro Tyr Met Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Gly Pro Phe
 340 345 350

Leu Thr Pro Ile Val Pro Thr Ala Asp Thr Gln Tyr Asn Asp Asp Glu
 355 360 365

Pro Asn Gly Ala Ile Arg Phe Thr Met Gly Tyr Gln His Gly Gln Leu
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Gln Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Phe Asn Pro Gln Ser
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Arg Ala Pro Lys Gln Gln Phe Asn Gln Gln Ser Pro Leu
 405 410 415

Asn Leu Gln Asn Thr Asn Asn Gly Thr Leu Leu Pro Ser Asp Pro Ile
 420 425 430

Gly Gly Lys Thr Asn Met His Phe Met Asn Thr Leu Asn Thr Tyr Gly
 435 440 445

Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Thr Ala Pro Val Phe Pro Asn Gly Gln
 450 455 460

Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val
 465 470 475 480

Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Pro Pro Gly Gln Leu Phe Val
 485 490 495

Lys Ile Ala Pro Asn Leu Thr Asp Asp Phe Asn Ala Asp Ser Pro Gln

500

505

510

Gln Pro Arg Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Phe Trp Trp Lys Gly Thr Leu
515 520 525

Thr Phe Thr Ala Lys Met Arg Ser Ser Asn Met Trp Asn Pro Ile Gln
530 535 540

Gln His Thr Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gly Asn Tyr Ile Pro Thr Asn
545 550 555 560

Ile Gly Gly Ile Lys Met Phe Pro Glu Tyr Ser Gln Leu Ile Pro Arg
565 570 575

Lys Leu Tyr

<210> 17

<211> 15111

<212> ДНК

<213> Вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома

<400> 17

```

atgatgtgta gggattcccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg taccttggag      60
gcgtgggtac agccccgccc cacccttgg ccctgttct agcccaacag gtatccttct      120
ctctcggggc gagtgcgccg cctgctgctc ccttgcagcg ggaaggacct cccgagtatt      180
tccggagagc acctgcttta cgggatctcc accctttaac catgtctggg acgttctccc      240
ggatgcatgtg cccccggct gcccggtat tttggaacgc cggccaagtc ttttgcacac      300
ggatgtctcag tgcgcggtct cttctctctc cagagcttca ggacactgac ctcggtgcag      360
ttggcttgtt ttacaagcct agggacaagc ttcactggaa agtccctatc ggcacccctc      420
agggtggaatg tactccatcc ggggtgctgtt ggctctcagc tgttttccct ttggcgcgta      480
tgacctccgg caatcacaac ttctccaac gacttgtgaa ggttctgat gttttgtacc      540
gtgacgggtg cttggcacct cgacaccttc gtgaactcca agtttacgag cgcggctgca      600
actggtaccg gatcacgggg cccgtgcccg ggatggggtt gtttgcgaac tccatgcacg      660
tatccgacca gccgttccct ggtgccaccc atgtgttgac taactcgcct ttgcctcaac      720
aggcttgtcg gcagccgttc tgtccatttg aggaggetca ttctagcgtg tacaggtgga      780
agaaatttgt ggttttcacg gactcctccc tcaacggctg atctcgcgat atgtggacgc      840
cggaatccga tgattcagcc gccctggagg tactaccgcc tgagttagaa cgtcaggtcg      900
aaatcctcat tcggagtttt cctgctcatc accctgtcga cctggccgac tgggagctca      960
ctgagtcccc tgagaacggt ttttcttca acacgtctca ttcttgcggt caccttgtcc     1020
agaaccccga cgtgtttgat ggcaagtgct ggctctcctg ctttttgggc cagtccggtcg     1080

```

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| aagtgcgctg | ccatgaggaa | catctagctg | acgccttcgg | ttaccaaacc | aagtggggcg | 1140 |
| tgcatggtaa | gtacctcag | cgcaggcttc | aagttcgagg | cattcgtgct | gtagtcgatac | 1200 |
| ctgatgggcc | cattcacggt | gaagcgctgt | cttgccccca | gtcttgatc | aggcacctga | 1260 |
| ctctggatga | tgatgtcacc | ccaggattcg | ttcgcctgac | atcccttcgc | attgtgcccga | 1320 |
| acacagagcc | taccacttcc | cggatctttc | ggtttgagc | gcataagtgg | tatggcgctg | 1380 |
| ccggcaaacg | ggctcgtgct | aagcgtgccc | ctaaaagtga | gaaggattcg | gctcccaccc | 1440 |
| ccaaggttgc | cctgccggtc | cccacctgtg | gaattaccac | ctactctcca | ccgacagacg | 1500 |
| ggctctgtgg | ttggcatgtc | cttgccgcca | taatgaaccg | gatgataaat | ggtgacttca | 1560 |
| cgtcccctct | gactcagtac | aacagaccag | aggatgattg | ggcttctgat | tatgatcttg | 1620 |
| ttcaggcgat | tcaatgtcta | cgactgcctg | ctaccgtggg | tccgaatcgc | gcctgtccta | 1680 |
| acgccaagta | ccttataaaa | cttaacggag | ttcactggga | ggtagagggtg | aggctctggaa | 1740 |
| tggtcctcgc | ctccccttct | cgtgaatgtg | tggttggcgt | ttgctctgaa | ggctgtgtcg | 1800 |
| caccgcctta | tccagcagac | gggctaccta | aacgtgcact | cgaggccttg | gcgtctgctt | 1860 |
| acagactacc | ctccgattgt | gttagctctg | gtattgctga | ctttcttgct | aatccacctc | 1920 |
| ctcaggaatt | ctggaccctc | gacaaaatgt | tgacctcccc | gtcaccagag | cggctccggct | 1980 |
| tctctagttt | gtataaatta | ctattagagg | ttgttccgca | aaaatgcggg | gccacggaag | 2040 |
| gggctttcat | ctatgctggt | gagaggatgt | tgaaggattg | tccgagctcc | aaacaggcca | 2100 |
| tggtccttct | ggcaaaaatt | aaagttccat | cctcaaaggc | cccgtctgtg | tccctggacg | 2160 |
| agtgtttccc | tacggatggt | ttagccgact | tccgagccagc | atctcaggaa | aggccccaaa | 2220 |
| gttccggcgc | tgctgttgct | ctgtgttcac | cggatgcaaa | agagttcgag | gaagcagccc | 2280 |
| cggaagaagt | tcaagagagt | ggccacaagg | ccgtccactc | tgactcctt | gccgagggtc | 2340 |
| ctaacaatga | gcaggtacag | gtggttgccc | gtgagcaact | gaagctcggc | ggttgtgggt | 2400 |
| tggtcagtcg | gaatgctcat | gaaggtgctc | tggtctcagc | tggtctaatt | aacctggtag | 2460 |
| gctgggaatt | gtccccctca | gaccccatga | aagaaaacat | gctcaatagc | cgggaagacg | 2520 |
| aaccactgga | tttgtcccaa | ccagcaccag | cttcacaaac | gacccttggtg | agagagcaaa | 2580 |
| caccgcgaaa | cccaggttct | gatgccgggtg | ccctccccgt | caccgttcga | gaatttgtcc | 2640 |
| cgacggggcc | tatactctgt | catgttgagc | actgcggcac | ggagtcgggc | gacagcagtt | 2700 |
| cgcttttggg | tctatctgat | gcgcaaacc | tggaccagcc | tttaaatcta | tcctggccg | 2760 |
| cttggccagt | gagggccacc | gcgtctgacc | ctggctgggt | ccacggtagg | cgcgagcctg | 2820 |
| tctttgtaaa | gcctcgaat | gctttctctg | atggcgattc | agcccttcag | ttcggggagc | 2880 |
| tttctgaatc | cagctctgtc | atcgagtttg | accggacaaa | agatgctccg | gtggttgacg | 2940 |
| ccctgtcga | cttgacgact | tcgaacgagg | ccctctctgt | agtcgatcct | ttcgaatttg | 3000 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| ccgaactcaa | gcgccccgct | ttctccgcac | aagccttaat | tgaccgaggc | ggtccacttg | 3060 |
| ccgatgtcca | tgcaaaaata | aagaaccggg | tatatgaaca | gtgcctccaa | gcttgtgagc | 3120 |
| ccggtagtcg | tgcaacccca | gccaccaggg | agtggctcga | caaaatgtgg | gataggggtg | 3180 |
| acatgaaaac | ttggcgctgc | acctcgcagt | tccaagctgg | tcgcattctt | gcgtccctca | 3240 |
| aattcctccc | tgacatgatt | caagacacac | cgctcctgt | tcccaggaag | aaccgagcta | 3300 |
| gtgacaatgc | cggcctgaag | caactgggtg | cacagtggga | taggaaattg | agtgtgacct | 3360 |
| ccccccaaa | accggttggg | ccagtgcctg | accagatcgt | ccctccgcct | acggatatcc | 3420 |
| agcaagaaga | tgtaaccccc | tccgatgggc | caccccatgc | gccggatttt | cctagtcgag | 3480 |
| tgagcacggg | cgggagttgg | aaaggcctta | tgctttccgg | caccgcgtct | gcgggggtcta | 3540 |
| tcagccagcg | ccttatgaca | tgggtttttg | aagttttctc | ccacctccca | gcttttatgc | 3600 |
| tcacactttt | ctcgccgctg | ggctctatgg | ctccaggtga | ttggttgttt | gcaggtgtcg | 3660 |
| ttttacttgc | tctcttgctc | tgctgttctt | acccgatact | cggatgcctt | cccttattgg | 3720 |
| gtgtcttttc | tggttctttg | cggcgtgttc | gtctgggtgt | ttttggttct | tggatggctt | 3780 |
| ttgtctgatt | tttattctcg | actccatcca | accagtcgg | ttcttcttgt | gaccacgatt | 3840 |
| cgccggagtg | tcagtctgag | cttttggctc | ttgagcagcg | ccaactttgg | gaacctgtgc | 3900 |
| gcggccttgt | ggtcggcccc | tcaggcctct | tatgtgtcat | tcttggcaag | ttactcgggtg | 3960 |
| ggtcacgtta | tctctggcat | gttctcctac | gtttatgcat | gcttgcagat | ttggcccttt | 4020 |
| ctcttgttta | tgtggtgtcc | caggggcggt | gtcacaagtg | ttggggaaaag | tgtataagga | 4080 |
| cagctcctgc | ggaggtggct | cttaatgtat | ttcctttctc | gcgcgccacc | cgtgtctctc | 4140 |
| ttgtatcctt | gtgtgatcga | ttccaaacgc | caaaaggggt | tgatcctgtg | cacttggcaa | 4200 |
| cgggttggcg | cgggtgctgg | cgtggtgaga | gccccatcca | tcaaccacac | caaaagccca | 4260 |
| tagcttatgc | caatttggat | gaaaagaaaa | tgtctgcccc | aacgggtggtt | gctgtcccat | 4320 |
| acgatcccag | tcaggctatc | aaatgcctga | aagtctctga | ggcgggaggg | gccatcgtgg | 4380 |
| accagcctac | acctgaggtc | gttcgtgtgt | ccgagatccc | cttctcagcc | ccatttttcc | 4440 |
| caaaagtcc | agtcaaccca | gattgcaggg | ttgtggtaga | ttcggacact | tttgtggctg | 4500 |
| cggttcgctg | cggttactcg | acagcacaac | tggttctggg | ccggggcaac | tttgccaagt | 4560 |
| taaatcagac | ccccccagg | aactctatct | ccacaaaaac | gactgggtggg | gcctcttaca | 4620 |
| cccttgctgt | ggctcaagtg | tctgcgtgga | ctcttgttca | tttcatcctc | ggtctttggt | 4680 |
| tcacatcacc | tcaagtgtgt | ggccgaggaa | ccgctgacct | atgggtgttca | aatccttttt | 4740 |
| catatcctac | ctatggcccc | ggagttgtgt | gctcctctcg | actttgtgtg | tctgccgacg | 4800 |
| gggtcacctc | gccattgttc | tcagccgtgg | cacaactctc | cggtagagag | gtggggattt | 4860 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ttatTTTTggt gctcgtctcc ttgactgctt tggcccaccg catggctctt aaggcagaca | 4920 |
| tgtagtggt cttttcggct ttttTgtgctt acgctggcc catgagctcc tggTtaatct | 4980 |
| gcttctttcc tatactcttg aagtgggtta cccttcaccc tcttactatg ctttgggtgc | 5040 |
| actcattctt ggtgTTTTgt ctgccagcag ccggcatcct ctactaggg ataactggcc | 5100 |
| ttctttgggc aattggccgc tttaccagc ttgccggaat tattacacct tatgacatcc | 5160 |
| accagtacac ctctgggcca cgtgggtgcag ctgctgtggc cacagcccca gaaggcactt | 5220 |
| atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tTtaatcttc acccgtctg | 5280 |
| cagttgatc cttctcga aagtgcttca ggactcataa accctgcctt aacaccgtga | 5340 |
| atgttgtagg ctctccctt ggttccggag gggTTTTcac cattgatggc agaagaactg | 5400 |
| tcgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca | 5460 |
| accgcatgca cactttcaag accaatgggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc | 5520 |
| agggcgttgc ccctgtggtc aaggTtgca aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa | 5580 |
| catcaactgg tgcgaaccc ggtatcattg gggaaagggt cgccttctgt tttactaact | 5640 |
| gcgcgattc ggggtcacc gtcattctcag aatctggTga tcttattgga atccacaccg | 5700 |
| gttcaaacia acttggttct ggtcttTgta caaccctga aggggagacc tgcaccatca | 5760 |
| aagaaacia gctctctgac ctttccagac attttgcagg cccaagcgtt cctcttgggg | 5820 |
| acattaaatt gagtccggcc atcatccctg atgtaacatc cattccgagt gacttggcat | 5880 |
| cgctcctagc ctccgtccct gtagtggaa gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg | 5940 |
| tctttttcct tctctggcgc atgatgggcc atgctggac acccattgtt gccgtgggct | 6000 |
| tctttttgct gaatgaaatt cttccagcag ttttggTccg agccgtgttt tcttttgac | 6060 |
| tctttgtgct tgcatgggcc acccctggT ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca | 6120 |
| cggcatctct caaccgcaac aagctttctc tggcgTtcta cgcactcggg ggtgtcgtcg | 6180 |
| gtttggcagc tgaaatcggg acttttTctg gcagattgtc tgaattgtct caagctcttt | 6240 |
| cgacatactg cttcttacct agggTccttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca | 6300 |
| ttggTggact ccataccctc ggtgtgattc tgtggTtatt caaataccgg tgcctccaca | 6360 |
| acatgctggT tggTgatggg agTTTTcaa gcgccttctt cctacggTat tttgcagagg | 6420 |
| gtaatctcag aaaaggTgtt tcacagTcct gtggcatgaa taacgagTcc ctaacggctg | 6480 |
| ctttagcttg caagTgtca caggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca | 6540 |
| agtgctttgt atctgcttca aacatgaaaa atgctgccgg ccagTacatt gaagcagcgt | 6600 |
| atgccaaggc cctgcgcaa gagTtggcct ctctagTtca gattgacaaa atgaaaggag | 6660 |
| ttttgtcaa gctcgaggcc tttgctgaaa cagccacccc gtcccttgac ataggTgacg | 6720 |
| tgattgttct gcttgggcaa catcctcag gatccatcct cgatattaat gtggggactg | 6780 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| aaaggaaaac | tgtgtccgtg | caagagaccc | ggagcctagg | cggctccaaa | ttcagtgttt | 6840 |
| gtactgtcgt | gtccaacaca | cccgtggacg | ccttgaccgg | catcccactc | cagacaccaa | 6900 |
| cccctctttt | tgagaatggt | ccgcgtcatc | gcagcgagga | agacgatctt | aaagtcgaga | 6960 |
| ggatgaagaa | acactgtgta | tccctcggct | tccacaacat | caatggcaaa | gtttactgca | 7020 |
| aaatttggga | caagtctacc | ggtgacacct | tttacacgga | tgattcccgg | tacaccaag | 7080 |
| accatgcttt | tcaggacagg | tcagccgact | acagagacag | ggactatgag | ggtgtgcaaa | 7140 |
| ccacccccca | acagggattt | gatccaaagt | ctgaaacccc | tgttggcact | gttgtgatcg | 7200 |
| gcggtattac | gtataacagg | tatctgatca | aaggtaagga | ggttctggtc | cccaagcctg | 7260 |
| acaactgcct | tgaagctgcc | aagctgtccc | ttgagcaagc | tctcgctggg | atgggcaaaa | 7320 |
| cttgcgacct | tacagctgcc | gaggtggaaa | agctaaagcg | catcattagt | caactccaag | 7380 |
| gtttgaccac | tgaacaggct | ttaaactggt | agccgccagc | ggcttgacct | gctgtggccg | 7440 |
| cggcggccta | gttgtgactg | aaacggcggg | aaaaattata | aaataccaca | gcagaacttt | 7500 |
| caccttaggc | cctttagacc | taaaagtcac | ttccgaggtg | gaggtaaaga | aatcaactga | 7560 |
| gcagggccac | gctgtttgtg | caaacttatg | ttccggtgtc | atcttgatga | gacctcacc | 7620 |
| accgtccctt | gtcgacgttc | ttctgaaacc | cggacttgac | acaatacccg | gcattcaacc | 7680 |
| agggcatggg | gccgggaata | tgggcgtgga | cggttctatt | tgggattttg | aaaccgcacc | 7740 |
| cacaaaggca | gaactcgagt | tatccaagca | aataatccaa | gcatgtgaag | ttaggcgcgg | 7800 |
| ggacgccccg | aacctccaac | tcccttacia | gctctatcct | gttagggggg | atcctgagcg | 7860 |
| gcataaaggc | cgccttatca | ataccagggt | tggagattta | ccttaciaaaa | ctcctcaaga | 7920 |
| caccaagtcc | gcaatccacg | cggcttggtg | cctgcacccc | aacggggccc | ccgtgtctga | 7980 |
| tggtaaattc | acactaggta | ccactcttca | acatggtttc | gagctttatg | tccctactgt | 8040 |
| gccctatagt | gtcatggagt | accttgattc | acgccctgac | acccttttta | tgtgtactaa | 8100 |
| acatggcact | tccaaggctg | ctgcagagga | cctccaaaaa | tacgacctat | ccaccaagg | 8160 |
| atgtgtcctg | cctgggggtc | tacgcctagt | acgcagattc | atctttggcc | atattggtaa | 8220 |
| ggcgcgccca | ttgttctctc | catcaaccta | tcccgccaag | aactctatgg | cagggatcaa | 8280 |
| tggccagagg | ttccaacaaa | aggacgttca | gagcatacct | gaaattgatg | aaatgtgtgc | 8340 |
| ccgcgctgtc | aaggagaatt | ggcaaactgt | gacaccttgc | accctcaaga | aacagtactg | 8400 |
| ttccaagccc | aaaaccagga | ccatcctggg | caccaacaac | tttattgcct | tggctcacag | 8460 |
| atcggcgctc | agtgggtgtc | cccaggcatt | catgaagaag | gcttgggaag | cccccaattgc | 8520 |
| cttggggaaa | aacaaattca | aggagctgca | ttgcaactgtc | gccggcaggt | gtcttgaggg | 8580 |
| cgacttggcc | tctgtgacc | gcagcacccc | cgccattgta | agatggtttg | ttgccaacct | 8640 |
| cctgtatgaa | cttgcaggat | gtgaagagta | cttgcctagc | tatgtgctta | attgctgcca | 8700 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------|
| tgacctcgtg | gcaacacagg | atggtgcctt | cacaaaacgc | ggtggcctgt | cgtccegggga | 8760 |
| ccccgtcacc | agtgtgtcca | acaccgtata | ttcactggta | atztatgccc | agcacatggt | 8820 |
| attgtcggcc | ttgaaaatgg | gtcatgaaat | tggtcttaag | ttcctcgagg | aacagctcaa | 8880 |
| gttcgaggac | ctccttgaaa | ttcagcctat | gttggtatac | tctgatgatc | ttgtcttgta | 8940 |
| cgctgaaaga | cccacatttc | ccaattacca | ctggtgggtc | gagcaccttg | acctgatgct | 9000 |
| gggtttcaga | acggacccaa | agaaaaccgt | cataactgat | aaaccagct | tcctcggctg | 9060 |
| cagaattgag | gcagggcgac | agctagtccc | caatcgcgac | cgcacctctg | ctgctcttgc | 9120 |
| atatcacatg | aaggcgcaga | acgcctcaga | gtattatgcy | tctgctgccg | caatcctgat | 9180 |
| ggattcatgt | gcttgcattg | accatgaccc | tgagtgggat | gaggacctca | tctgcggtat | 9240 |
| tgccccggtg | gccccgccagg | atggttatag | cttcccaggt | ccggcatttt | tcattgtccat | 9300 |
| gtgggagaag | ctgagaagtc | ataatgaagg | gaagaaattc | cgccactgcy | gcatctgcga | 9360 |
| cgccaaagcc | gactatgcgt | ccgcctgtgg | gcttgatttg | tgtttgttcc | attcgcactt | 9420 |
| tcataaacac | tgccctgtca | ctctgagctg | cggtcaccat | gccggttcaa | aggaatgttc | 9480 |
| gcagtgtcag | tcacctgttg | gggctggcag | atccccctct | gatgccctgc | taaaacaaat | 9540 |
| tccatacaaa | cctcctcgta | ctgtcatcat | gaaggtgggt | aataaaacaa | cggccctcga | 9600 |
| tccggggagg | taccagtccc | gtcagaggtc | cgttgcagtc | aagaggggta | ttgcaggcaa | 9660 |
| tgaagttgat | ctttctgatg | gggactacca | agtggcctt | cttttgccga | cttgcaaaga | 9720 |
| cataaacatg | gtgaaggtgg | cttgcaatgt | actactcagc | aagttcatag | tagggccacc | 9780 |
| aggttccgga | aagaccacct | ggctactgag | tcaagtccag | gacgatgatg | tcatttacac | 9840 |
| accacccat | cagactatgt | ttgatatagt | cagtgtcttc | aaagtttgca | ggtattccat | 9900 |
| tccaggagcc | tcaggactcc | ctttcccacc | acctgccagg | tccgggccgt | gggttaggct | 9960 |
| tattgccagc | gggcacgtcc | ctggccgagt | atcatacctc | gatgaggctg | gatattgtaa | 10020 |
| tcattctggac | attcttagac | tgctttccaa | aacaccctt | gtgtgtttgg | gtgaccttca | 10080 |
| gcaacttcac | cctgtcggct | ttgattccta | ctgttatgtg | ttcgatcaga | tgacctcagaa | 10140 |
| gcagctgacc | actatttaca | gatttgccc | taacatctgc | gcagccatcc | agccttgtta | 10200 |
| cagggagaaa | cttgaatcta | aggctaggaa | cactaggggt | gtttttacca | cccggcctgt | 10260 |
| ggcctttggt | caggtgctga | caccatacca | taaagatcgc | atcggtctct | cgataacat | 10320 |
| agattcatcc | cagggggcca | cctttgatat | tgtgacattg | catctaccat | cgccaaagtc | 10380 |
| cctaaataaa | tcccgagcac | ttgtagccat | cactcgggca | agacacgggt | tgttcattta | 10440 |
| tgacctcat | aaccagctcc | aggagttttt | caacttaacc | cctgagcgca | ctgattgtaa | 10500 |
| ccttggttcc | agccgtgggg | atgagctggg | agttctgaat | gcggataatg | cagtcacaac | 10560 |
| tgtagcgaag | gcccttgaga | caggtccatc | tcgatttcga | gtatcagacc | cgaggtgcaa | 10620 |

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------|
| gtctctctta | gccgcttggt | cggccagtct | ggaagggagc | tgtatgccac | taccgcaagt | 10680 |
| ggcacataac | ctgggggtttt | acttttcccc | ggacagtcca | acatttgcac | ctctgccaaa | 10740 |
| agagttggcg | ccacattggc | cagtggttac | ccaccagaat | aatcgggctg | ggcctgatcg | 10800 |
| acttgctcgt | agtatgcgcc | caattgatgc | ccgctacagc | aagccaatgg | tcggtgcagg | 10860 |
| gtatgtggtc | gggccgtcca | cctttcttgg | tactcctggt | gtggtgtcat | actatctcac | 10920 |
| actatacatc | aggggtgagc | cccaggcctt | gccagaaaca | ctcgtttcaa | cagggcgtat | 10980 |
| agccacagat | tgtcgggagt | atctcgacgc | ggctgaggaa | gagggcagca | aagaactccc | 11040 |
| ccacgcattc | attggcgatg | tcaaaggtac | cacggttggg | gggtgtcatc | acattacatc | 11100 |
| aaaataccta | cctaggtccc | tgcctaagga | ctctgttgcc | gtagttggag | taagttcgcc | 11160 |
| cggcagggct | gctaaagccg | tgtgcaactc | caccgatgtg | tacctccccg | aactccggcc | 11220 |
| atatctgcaa | cctgagacgg | catcaaaatg | ctggaaactc | aaattagact | tcagggacgt | 11280 |
| ccgactaatg | gtctggaaag | gagccaccgc | ctatttccag | ttggaagggc | ttacatggtc | 11340 |
| ggcgctgccc | gactatgcca | ggttttattca | gctgcccacg | gatgccggtg | tatacattga | 11400 |
| tccgtgtata | ggaccggcaa | cagccaaccg | taaggtcgtg | cgaaccacag | actggcgggc | 11460 |
| cgacctggca | gtgacaccgt | atgattacgg | tgcccagaac | attttgacaa | cagcctggtt | 11520 |
| cgaggacctc | gggccgcagt | ggaagatfff | ggggttgcag | ccctttaggg | gagcatttgg | 11580 |
| ctttgaaaac | actgaggatt | gggcaatcct | tgcacgccgt | atgaatgacg | gcaaggacta | 11640 |
| cactgactat | aactggaact | gtgttcgaga | acgcccacac | gccatctacg | ggcgtgctcg | 11700 |
| tgaccatacg | tatcattttg | cccctggcac | agaattgcag | gtagagctag | gtaaaccocg | 11760 |
| gctgccgcct | gggcaagtgc | cgtgaattcg | gggtgatgca | atggggtcac | tgtggagtaa | 11820 |
| aatcagccag | ctgttcgtgg | acgccttcac | tgagttcctt | gttagtgtgg | ttgatattgc | 11880 |
| cattttcctt | gccatactgt | ttgggttcac | cgtcgcagga | tggttactgg | tctttcttct | 11940 |
| cagagtgggt | tgctccgcgc | ttctccgttc | gcgctctgcc | attcactctc | ccgaactatc | 12000 |
| gaaggtccta | tgaaggcttg | ttgcccaact | gcagaccgga | tgtcccacaa | tttgcagtca | 12060 |
| agcaccatt | gggtatgttt | tggcacatgc | gagtttccca | cttgattgat | gagatgggtct | 12120 |
| ctcgtcgcac | ttaccagacc | atggaacatt | caggtcaagc | ggcctggaag | caggtgggtg | 12180 |
| gtgaggccac | tctcacgaag | ctgtcagggc | tcgatatagt | tactcatttc | caacacctgg | 12240 |
| ccgcagtgga | ggcggattct | tgccgctttc | tcagctcacg | actcgtgatg | ctaaaaaatc | 12300 |
| ttgccgttgg | caatgtgagc | ctacagtaca | acaccacggt | ggaccgcggt | gagctcatct | 12360 |
| tccccacgcc | aggtacgagg | ccaagttga | ccgatttcag | acaatggctc | atcagtggtc | 12420 |
| acgcttccat | tttttctctc | gtggcttcat | ctgttacctt | gttcatagtg | ctttggcttc | 12480 |

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| gaattccagc | tctacgctat | gtttttgggt | tccattggcc | cacggcaaca | catcattcga | 12540 |
| gctgaccatc | aactacacca | tatgcatgcc | ctgttctacc | agtcaagcgg | ctcgccaaag | 12600 |
| gctcgagccc | ggtcgtaaca | tgtggtgcaa | aatagggcat | gacaggtgtg | aggagcgtga | 12660 |
| ccatgatgag | ttgttaatgt | ccatcccgtc | cgggtacgac | aacctcaaac | ttgagggtta | 12720 |
| ttatgcttgg | ctggcttttt | tgtccttttc | ctacgcggcc | caattccatc | cggagttggt | 12780 |
| cgggataggg | aatgtgtcgc | gcgctcttct | ggacaagcga | caccagttca | tttgtgccga | 12840 |
| gcatgatgga | cacaattcaa | ccgtatctac | cggacacaac | atctccgcat | tatatgcggc | 12900 |
| atattaccac | caccaaatag | acgggggcaa | ttggttccat | ttggaatggc | tgcggccact | 12960 |
| cttttcttcc | tggctgggtc | tcaacatata | atggtttctg | aggcgttcgc | ctgtaagccc | 13020 |
| tgtttctcga | cgcattctatc | agatattgag | accaacacga | ccgcggctgc | cggtttcatg | 13080 |
| gtccttcagg | acatcaattg | tttccgacct | cacggggctc | cagcagcgc | agagaaaatt | 13140 |
| tccttcggaa | agtcgtccca | atgtcgtgaa | gccgtcggta | ctccccagta | catcacgata | 13200 |
| acggctaacg | tgaccgacga | atcatacttg | tacaacgcgg | acctgctgat | gctttctgcg | 13260 |
| tgcttttct | acgcctcaga | aatgagcgg | aaaggcttca | aagtcatctt | tgggaatgtc | 13320 |
| tctggcgttg | tttctgcttg | tgtcaatttc | acagattatg | tggcccatgt | gacccaacat | 13380 |
| accagcagc | atcatctggt | aattgatcac | attcggttgc | tgcatttctc | gacaccatct | 13440 |
| gcaatgaggt | gggctacaac | cattgcttgt | ttgttcgcca | ttctcttggc | aatatgagat | 13500 |
| gttctcacia | attggggcgt | ttcttgactc | cgcactcttg | cttctggtgg | ctttttttgc | 13560 |
| tgtgtaccgg | cttgtcctgg | tcctttgccc | atggcaacgg | cgacagctcg | acataccaat | 13620 |
| acatatataa | cttgacgata | tgcgagctga | atgggaccga | ctggttgtcc | agccattttg | 13680 |
| gttgggcagt | cgagaccttt | gtgctttacc | cggttgccac | tcatacctc | tactggggtt | 13740 |
| ttctcacia | aagccatttt | tttgacgcgc | tcggctctcg | cgctgtatcc | actgcaggat | 13800 |
| ttgttgccgg | gcggtagcga | ctctgcagcg | tctacggcgc | ttgtgcttcc | gcagcgttcg | 13860 |
| tatgttttgt | catccgtgct | gctaaaaatt | gcatggcctg | ccgctatgcc | cgtaccgggt | 13920 |
| ttaccaactt | cattgtggac | gaccggggga | gagttcatcg | atggaagtct | ccaatagtgg | 13980 |
| tagaaaaatt | gggcaaagcc | gaagtcgatg | gcaacctcgt | caccatcaaa | catgtcgtcc | 14040 |
| tcgaaggggt | taaagctcaa | cccttgacga | ggacttcggc | tgagcaatgg | gaggcctaga | 14100 |
| cgatttttgc | aacgatccta | tcgccgcaca | aaagctcgtg | ctagccttta | gcatcacata | 14160 |
| cacacctata | atgatatacg | cccttaaggt | gtcacgcggc | cgactcctgg | ggctggtgca | 14220 |
| catcctaata | tttctgaact | gttcctttac | attcggatac | atgacatatg | tgcattttca | 14280 |
| atccaccaac | cgtgtcgcac | ttaccctggg | ggctggtgtc | gcccttctgt | gggggtgtta | 14340 |
| cagcttcaca | gagtcatgga | agtttatcac | ttccagatgc | agattgtggt | gccttggccc | 14400 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------|
| gcgatacatt | ctggcccctg | cccatcacgt | agaaagtgct | gcaggtctcc | attcaatctc | 14460 |
| agcgtctggg | aaccgagcat | acgctgtgag | aaagcccgga | ctaacatcag | tgaacggcac | 14520 |
| tctagtagca | ggacttcgga | gcctcgtgct | gggcggaaaa | cgagctgtta | aacgaggagt | 14580 |
| ggttaacctc | gtcaagtatg | gccggtaaaa | accagagcca | gaagaaaaag | aaaagtacag | 14640 |
| ctccgatggg | gaatggccag | ccagtcaatc | aactgtgcca | gttgctgggt | gcaatgataa | 14700 |
| agtcccagcg | ccagcaacct | aggggaggac | aggccaaaaa | gaaaaagcct | gagaagccac | 14760 |
| atccccct | ggctgctgaa | gatgacatcc | ggcaccacct | caccagact | gaacgctccc | 14820 |
| tctgcttgca | atcgatccag | acggctttca | atcaaggcgc | aggaactgcg | tcgctttcat | 14880 |
| ccagcgggaa | ggtcagtttt | caggttgagt | ttatgctgcc | ggttgctcat | acagtgcgcc | 14940 |
| tgattcgcgt | gacttctaca | tccgccagtc | aggggtgcaag | ttaatttgac | agtcagggtga | 15000 |
| atggccgcga | ttggcgtgtg | gcctctgagt | cacctattca | attagggcga | tcacatgggg | 15060 |
| gtcatactta | atcaggcagg | aaccatgtga | ccgaaattaa | aaaaaaaaaa | a | 15111 |

<210> 18

<211> 15182

<212> ДНК

<213> Вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома

<400> 18

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| tttctccacc | cctttaacca | tgtctgggat | acttgatcgg | tgcacgtgta | cccccaatgc | 60 |
| cagggtgttt | atggcggagg | gccaagtcta | ctgcacacga | tgctcagtg | cacggctctct | 120 |
| ccttcccctg | aacctcaag | tttctgagct | cggggtgcta | ggcctattct | acaggcccga | 180 |
| agagccactc | cggtggacgt | tgccacgtgc | attccccact | gttgagtgct | ccccgcocgg | 240 |
| ggcctgctgg | ctctctgcaa | tctttccaat | cgcacgaatg | accagtggaa | acctgaactt | 300 |
| ccaacaaaga | atgatacggg | tcgcagctga | gctttacaga | gccggccagc | tcaccctgc | 360 |
| agtcttgaag | gctctacaag | tttatgaacg | gggttgccgc | tggtacccca | ttgttggaac | 420 |
| tgcccctgga | gtggccgttt | acgccaattc | cctacatgtg | agtgataaac | ctttcccggg | 480 |
| agcaactcac | gtgttgacca | acctgccgct | cccgcagaga | ccaagcctg | aagacttttg | 540 |
| cccctttgag | tgtgctatgg | ctactgtcta | tgacattggg | catgacgccg | tcagtgtatgt | 600 |
| ggccgaaagg | aaaatctcct | gggcccctcg | tggcggggat | gaagtgaaat | ttgaagctgt | 660 |
| ccccggggag | ttgaggttga | ttgcgaaccg | gctccgcacc | tccttcccgc | cccaccacac | 720 |
| agtggacatg | tctaagttcg | ccttcacagc | ccctgggtgt | ggtgtttcta | tgccgggttga | 780 |
| acgccaacac | ggctgccttc | ccgctgacac | tgtccctgaa | ggcaactgct | ggtggagctt | 840 |
| gtttgactcg | cttccactgg | aagttcagaa | caaagaaatt | cgccatgcta | accaatttgg | 900 |
| ctaccagacc | aagcatgggtg | tctctggcaa | gtacctacag | cggaggctgc | aagttaatgg | 960 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| tctccgagca | gtaactgacc | taaacggacc | tatcgtcgta | cagtacttct | ccgttaagga | 1020 |
| gagttggatc | cgccatttga | aactggcggg | agaaccacgc | tactctgggt | ttgaggacct | 1080 |
| cctcagaata | agggttgagc | ctaacacgtc | gccattggct | gacaaggaag | aaaaaatttt | 1140 |
| ccggtttggc | agtcacaagt | ggtacggcgc | tggaaagaga | gcaagaaaag | cacgctcttg | 1200 |
| tgcgactgcc | acagtcgctg | gccgcgcttt | gtccgttcgt | gaaaccgccc | aggccaagga | 1260 |
| gcacgagggt | gccggcgcca | acaaggctga | gcacctcaaa | cactactccc | cgcttgcgga | 1320 |
| agggaattgt | ggttggcatt | gcatttccgc | catcgccaac | cggatggtga | attccaaatt | 1380 |
| tgaaccacc | cttcccga | gagtgagacc | tccagatgac | tgggctactg | acgaggatct | 1440 |
| tgtgaatgcc | atccaaatcc | tcagactccc | tgccgctta | gacaggaacg | gtgcttgtac | 1500 |
| tagcgccaag | tacgtactta | agctggaagg | tgagcattgg | actgtcactg | tggcccctgg | 1560 |
| gatgtcccct | tctttgctcc | ctcttgaatg | tgttcagggc | tgttgtgggc | acaagggcgg | 1620 |
| tcttggttcc | ccagatgcag | tcgaggtctc | cggatttgac | cctgcctgcc | ttgaccggct | 1680 |
| ggctgagggtg | atgcacctgc | ctagcagtgc | tatcccagcc | gctctggccg | aatgtcttgg | 1740 |
| cgattccgat | cgttcggctt | ctccggtcac | caccgtgtgg | actgtttcgc | agttctttgc | 1800 |
| ccgtcacagc | ggaggggaatc | accctgatca | agtgcgctta | gggaaaatta | tcagcctttg | 1860 |
| tcaggtgatt | gaggactgct | gctgttccca | gaacaaaacc | aaccgggtca | ccccggagga | 1920 |
| ggtcgcagca | aagattgacc | tgtacctccg | tggtgcaaca | aatcttgaag | aatgcttggc | 1980 |
| caggcttgag | aaagcgcgcc | cgccacgcgt | aatcgacacc | ttctttgatt | gggatgttgt | 2040 |
| gctccctggg | gttgaggcgg | caaccagac | gatcaagctg | ccccaggtea | accagtgtcg | 2100 |
| tgctctggtc | cctgttgtga | ctcaaaagtc | cttggacgac | aactcggctc | ccctgaccgc | 2160 |
| cttttactg | gctaactact | actaccgtgc | gcaagggtgac | gaagtctgtc | accgtgaaag | 2220 |
| actaaccgcc | gtgctctcca | agttggaaaa | ggttgttcga | gaagaatatg | ggctcatgcc | 2280 |
| aaccgagcct | ggtccacggc | ccacactgcc | acgcgggctc | gacgaactca | aagaccagat | 2340 |
| ggaggaggac | ttgctgaagc | tggctaacgc | ccagacgact | tcggacatga | tggcctgggc | 2400 |
| agtcgagcag | gttgacctaa | aaacttgggt | caagaactac | ccgcggtgga | caccaccacc | 2460 |
| ccctccgcca | aaagttcagc | ctcgaaaaac | gaagcctgtc | aagagcttgc | cggagagaaa | 2520 |
| gctgtcccc | gccccgcgca | ggaaggttgg | gtccgattgt | ggcagcccgg | tttcattagg | 2580 |
| cggcgatgtc | tctaacagtt | gggaagatth | ggctgttagt | agcccccttg | atctcccgac | 2640 |
| cccacctgag | ccggcaacac | cttcaagtga | gctgggtgatt | gtgtcctcac | cgcaatgcat | 2700 |
| cttcaggccg | gcgacaccct | tgagtgagcc | ggctccaatt | cccgcacctc | gcggaactgt | 2760 |
| gtctcgaccg | gtgacaccct | tgagtgagcc | gatccctgtg | cccgcaccgc | ggcgtaagtt | 2820 |
| tcagcaggtg | aaaagattga | gttcggcggc | ggcaatccca | ccgtaccaga | acgagcccct | 2880 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| ggatttgtct | gcttcctcac | agactgaaca | tgaggcctct | ccccagcac | cgccgcagag | 2940 |
| cgggggcggt | ccgggagtag | aggggcatga | agctgaggaa | accctgagtg | aaatctcgga | 3000 |
| catgtcgggt | aacattaaac | ctgcgtccgt | gtcatcaagc | agctccttgt | ccagcgtgag | 3060 |
| aatcacacgc | ccaaaatact | cagctcaagc | catcatcgac | tcgggcgggc | cctgcagtgg | 3120 |
| gcatctccaa | gaggtaaagg | aaacatgcct | tagtgtcatg | cgcgaggcat | gtgatgcgac | 3180 |
| taagcttgat | gaccctgcta | cgcaggaatg | gctttctcgc | atgtgggatc | gggtggacat | 3240 |
| gctgacttgg | cgcaacacgt | ctgtttacca | ggcgatttgc | accttagatg | gcagggttaaa | 3300 |
| gttcctccca | aaaatgatac | tcgagacacc | gccgccttat | ccgtgtgagt | ttgtgatgat | 3360 |
| gcctcacacg | cctgcacctt | ccgtaggtgc | ggagagcgac | cttaccattg | gctcagttgc | 3420 |
| tactgaagat | gttccacgca | tcctcgagaa | aatagaaaat | gtcggcgaga | tggccaacca | 3480 |
| gggacccttg | gccttctccg | aggataaacc | ggtagatgac | caacttgtca | acgacccccg | 3540 |
| gatatcgtcg | cggaggcctg | acgagagcac | atcagctccg | tccgcaggca | caggtggcgc | 3600 |
| cggtctttt | accgatttgc | cgccttcaga | tggcgcggat | acggacgggg | gggggcccgtt | 3660 |
| tcggacggca | aaaagaaaag | ctgaaaggct | ctttgaccaa | ctgagccgtc | aggtttttga | 3720 |
| cctcgtctcc | catctccctg | ttttcttctc | acgccttttc | taccctggcg | gtggttattc | 3780 |
| tccgggtgat | tggggttttg | cagcttttac | tctattgtgc | ctctttttat | gttacagtta | 3840 |
| cccagccttt | ggtattgctc | ccctcttggg | tgtgttttct | gggtcttctc | ggcgcgttcg | 3900 |
| aatggggggt | tttggctgct | ggttggcttt | tgctgttggg | ctgttcaagc | ctgtgtccga | 3960 |
| cccagtcggc | gctgcttgtg | agtttgactc | gccagagtgt | agaaacatcc | ttcattcttt | 4020 |
| tgagcttctc | aaaccttggg | accctgttcg | cagccttggt | gtgggccccg | tcggtctcgg | 4080 |
| tcttgccatt | cttggcaggt | tactgggcgg | ggcacgctgc | atctggcact | ttttgcttag | 4140 |
| gcttggcatt | gttgcagact | gtatcttggc | tggagcttac | gtgctttctc | aaggtaggtg | 4200 |
| taaaaagtgc | tggggatctt | gtataagaac | tgctcctaat | gaggtcgctt | ttaacgtggt | 4260 |
| tcctttcaca | cgtgcgacca | ggtcgtcact | tatcgacctg | tgcgatcggg | tttgtgcgcc | 4320 |
| aaaaggaatg | gacccattt | ttctcgccac | tgggtggcgc | gggtgctggg | ccggccgaag | 4380 |
| cccattgag | caaccctctg | aaaaacccat | cgcgtttgcc | caattggatg | aaaagaagat | 4440 |
| tacggctagg | actgtggtcg | cccagcctta | tgaccccaac | caagccgtaa | agtgcttgcg | 4500 |
| ggtattgcag | gcgggtgggg | cgatggtggc | taaggcggtc | ccaaaagtgg | ttaaggtttc | 4560 |
| cgctgttcca | ttccgagctc | ccttctttcc | cactggagtg | aaagttagcc | ctgattgcag | 4620 |
| ggtcgtgggt | gaccctgaca | ctttcactgc | agctctccgg | tctggctact | ccaccacaaa | 4680 |
| cctcgtcctt | ggtgtagggg | actttgccca | gctaaatgga | ttaaaaatca | ggcaaatttc | 4740 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| caagccttca | gggggaggcc | cacatctcat | ggctgccctg | catgttgcct | gctcgatggc | 4800 |
| tctgcacatg | cttgctggga | tttatgtgac | tgcggtgggt | tcttgccgca | ccggcaccaa | 4860 |
| cgacccgtgg | tgcgctaacc | cgtttgccgt | ccctggctac | ggacctggct | ctctctgtac | 4920 |
| gtccagattg | tgcatttccc | aacacggcct | taccctgccc | ttgtcagcac | ttgtggcggg | 4980 |
| attcggatt | caagaaattg | ccttggtcgt | tttgatTTTT | gtttccatcg | gaggcatggc | 5040 |
| tcataggttg | agctgtaagg | ctgacatgct | gtgtgttttg | cttgcaattg | ccagctatgt | 5100 |
| ttgggtacct | cttacctggg | tgctttgtgt | gtttccttgc | tggttgcgct | gtttttcttt | 5160 |
| gcacccctc | accatcctat | ggttgggtgt | tttcttgatt | tctgtgaata | tgccttcagg | 5220 |
| aatcttggcc | atgggtgtgt | tggtttctct | ttggcttctt | ggtcgttata | ctaatgttgc | 5280 |
| tggccttgtc | acccctacg | acattcatca | ttacaccagt | ggcccccgcg | gtgttgccgc | 5340 |
| cttggctacc | gcaccagatg | ggacctactt | ggccgctgtc | cgccgcgctg | cgttgactgg | 5400 |
| ccgcaccatg | ctgtttacc | cgtcccagct | tgggtctctt | cttgaggggtg | ccttcagaac | 5460 |
| tcgaaagccc | tactgaaca | ccgtcaatgt | gatcgggtcc | tccatgggct | ctggcggggg | 5520 |
| gtttaccatc | gacgggaaag | tcaagtgcgt | aactgccgca | catgtcctta | cgggcaattc | 5580 |
| agctcggggt | tccggggctg | gcttcaatca | aatgcttgac | tttgacgtaa | agggagattt | 5640 |
| cgctatcgct | gattgcccg | attggcaagg | ggctgcccc | aagacccaat | tctgcacgga | 5700 |
| tggatggact | ggccgtgcct | attggctaac | atcctctggc | gtcgaaccgg | gcgtcattgg | 5760 |
| aaaaggattc | gccttctgct | tcaccgcatg | tggcgattcc | gggtccccag | tgatcaccga | 5820 |
| ggccggtgag | cttgtcggcg | ttcacacggg | atcgaataaa | caaggggggg | gcattgttac | 5880 |
| gcgccccca | ggccagtttt | gtaatgtggc | acccatcaag | ctaagcgaat | taagtgaatt | 5940 |
| ctttgctggg | cctaaggctc | cgctcgggtg | tgtgaaggtc | ggcagccaca | taattaaaga | 6000 |
| cataagcgag | gtgccttcag | atctttgtgc | cttgcttgct | gccaacctg | aactggaagg | 6060 |
| aggcctctcc | accgtccaac | ttctttgtgt | gttttttctc | ctgtggagaa | tgatgggaca | 6120 |
| tgcttgagcg | cccttggttg | ctgtgagttt | ctttatTTTT | aatgaggttc | tcctgcccgt | 6180 |
| cctggctccg | agtgttttct | cctttggaat | gtttgtgcta | tcctggctca | cgccatggct | 6240 |
| tgcgcaagtt | ctgatgatca | ggcttctgac | agcagctctt | aacaggaaca | gatggctact | 6300 |
| tgctttttc | agcctcgggt | cagtgaccgg | ttttgtcgca | gatcttgccg | ccactcaggg | 6360 |
| gcatccgttg | caggcagtga | tgaatttgag | cacctatgca | ttcctgcctc | ggatgatggg | 6420 |
| tgtgacctca | ccagtcccag | tgatcacgtg | tgggtgcgtg | cacctacttg | ccatcatttt | 6480 |
| gtacttgttt | aagtaccgtg | gcctgcacca | tatccttggt | ggcgatggag | tgttctctgc | 6540 |
| ggctttcttc | ttgagatact | ttgccgaggg | aaagttgagg | gaaggggtgt | cgcaatcctg | 6600 |
| cggaatgaat | catgagtctc | tgactgggtg | cctcgctatg | agactcaatg | acgaggactt | 6660 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| ggatttcctt | atgaaatgga | ctgattttta | gtgctttggt | tctgcgtcca | acatgaggaa | 6720 |
| tgcagcgggt | caatttatcg | aggctgccta | tgctaaagca | cttagagtag | aactggccca | 6780 |
| gttggtacag | gttgataaag | ttcgaggtac | tttggccaaa | cttgaagctt | ttgctgatac | 6840 |
| cgtggctcct | caactctcgc | ccggtgacat | tgttgtcgct | ctcggccaca | cgctgtttgg | 6900 |
| cagtatcttc | gacctaaagg | ttggtagcac | caagcatacc | ctccaagcca | ttgagaccag | 6960 |
| agtccttgct | gggtccaaaa | tgaccgtggc | gcgcgtcgtc | gacccgacce | ccacgcccc | 7020 |
| accgcaccc | gtgcccattc | ccctcccacc | gaaagttctg | gagaatggcc | ccaacgcttg | 7080 |
| gggggatgag | gaccgtttga | ataagaagaa | gaggcgcagg | atggaagccc | tcggcatcta | 7140 |
| tgttatgggc | gggaaaaagt | accagaaatt | ttgggacaag | aattccgggtg | atgtgtttta | 7200 |
| tgaggaggtc | cataataaca | cagatgagtg | ggagtgcttc | agagttggcg | accctgccga | 7260 |
| ctttgaccct | gagaagggaa | ctctgtgtgg | acatgtcacc | attgaaaata | aggcttacca | 7320 |
| tgtttacacc | tccccatctg | gtaagaagtt | cttggctccc | gtcaaccag | agaatggaag | 7380 |
| agttcaatgg | gaagctgcaa | agctttccgt | ggagcaggcc | ctaggtatga | tgaatgtcga | 7440 |
| cggcgaactg | actgccaag | aactggagaa | actgaaaaga | ataattgaca | aactccaggg | 7500 |
| cctgactaag | gagcagtggt | taaactgcta | gccgccagcg | acttgaccgg | ctgtggctgc | 7560 |
| ggcggcttgg | ttgttactga | aacagcggta | aaaatagtca | aatttcacaa | ccggaccttc | 7620 |
| accctgggac | ctgtgaattt | aaaagtggcc | agtgagggtg | agctaaaaga | cgcggttgag | 7680 |
| cacaaccaac | accggttgc | gagaccgatc | gatggtggag | ttgtgctctt | gcgttccgcg | 7740 |
| gttccttgc | ttatagacgt | cttgatctcc | ggtgctgatg | catctcccaa | gttacttgcc | 7800 |
| catcacgggc | cgggaaacac | tgggatcgat | ggcacgctct | gggattttga | gtccgaagcc | 7860 |
| actaaagagg | aagtcgcact | cagtgcgcaa | ataatacagg | cttgtgacat | taggcgcggc | 7920 |
| gacgctcctg | aaattggtct | cccttacaag | ctgtaccctg | ttaggggtaa | ccctgagcgg | 7980 |
| gtgaaaggag | ttctgcagaa | tacaaggttt | ggagacatac | cttacaaaac | ccccagtgac | 8040 |
| actggaagcc | cagtgcacgc | ggctgcctgc | cttacgccca | acgccactcc | ggtgactgat | 8100 |
| gggcgctccg | tcttggccac | gaccatgccc | cccgggtttg | agttatatgt | accgaccata | 8160 |
| ccagcgtctg | tccttgatta | ccttgactct | aggcctgact | gccctaaaca | gctgacagag | 8220 |
| cacggctgcg | aagatgccgc | actgaaagac | ctctctaaat | atgacttgtc | caccaaggc | 8280 |
| tttgttttac | ctggagttct | tcgccttgtg | cggaaatacc | tgtttgccca | tgtaggtaag | 8340 |
| tgcccacccg | ttcatcggcc | ttctacttac | cctgctaaga | attctatggc | tggaataaat | 8400 |
| gggaacaggt | tccaaccaa | ggacattcag | agcgtccctg | aaatcgacgt | tctgtgcgca | 8460 |
| caggctgtgc | gagaaaactg | gcaaactgtc | acccttgta | ctcttaagaa | acagtattgc | 8520 |
| gggaagaaga | agactaggac | catactcggc | accaataact | tcatcgcact | agccccccga | 8580 |

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| gcagtgttga | gtgggtttac | ccagggcttc | atgaaaaagg | cgtttaactc | gcccacgccc | 8640 |
| ctcggaaaga | acaagtttaa | ggagctacag | actccgggtcc | tgggcaggtg | ccttgaagct | 8700 |
| gatctcgcat | cctgcgatcg | atccacgcct | gcaattgtcc | gctggtttgc | cgccaacctt | 8760 |
| ctttatgaac | ttgcctgtgc | tgaagagcat | ctaccgtcgt | acgtgctgaa | ctgctgccac | 8820 |
| gacttactgg | tcacgcagtc | cggcgcagtg | actaagagag | gtggcctgtc | gtctggcgac | 8880 |
| ccgatcacct | ctgtgtctaa | caccatthtat | agtttgggtga | tctatgcaca | gcatatgggtg | 8940 |
| cttagttact | tcaaaagtgg | tcacccccat | ggccttctgt | tcttacaaga | ccagctaaag | 9000 |
| tttgaggaca | tgctcaaggt | tcaaccctcg | atcgtctatt | cggacgacct | cgtgctgtat | 9060 |
| gccgagtctc | ccaccatgcc | aaactatcac | tggtgggttg | aacatctgaa | tttgatgctg | 9120 |
| gggtttcaga | cggaccctaaa | gaagacagca | ataacagact | cgccatcatt | tctaggctgt | 9180 |
| agaataataa | atgggcgcca | gctagtcccc | aaccgtgaca | ggatcctcgc | ggccctcgcc | 9240 |
| tatcacatga | aggcgagtaa | tgtttctgaa | tactatgcct | cagcggctgc | aatactcatg | 9300 |
| gacagctgtg | cttgtttggg | gtatgatcct | gaatggtttg | aagaacttgt | agttggaata | 9360 |
| gcgagtgctg | cccgcaagga | cggctacagt | tttcccggca | cgccgttctt | catgtccatg | 9420 |
| tgggaaaaac | tcaggtccaa | ttatgagggg | aagaagtcga | gagtggtcgg | gtactgctggg | 9480 |
| gccccggccc | cgtagcctac | tgctgtggc | ctcgacgtct | gcatttacca | caccacttc | 9540 |
| caccagcatt | gtccagtcac | aatctgggtg | ggccatccag | cgggttctgg | ttctttagt | 9600 |
| gagtgcaaat | cccctgtagg | gaaaggcaca | agccctttag | acgaggtgct | ggaacaagtc | 9660 |
| ccgtataagc | ccccacggac | cgttatcatg | catgtggagc | agggctcac | cccccttgat | 9720 |
| ccaggtagat | accaaactcg | ccgcggacta | gtctctgtca | ggcgtggaat | taggggaaat | 9780 |
| gaagttgaac | taccagacgg | tgattatgct | agcaccgcct | tgctccctac | ctgcaaagag | 9840 |
| atcaacatgg | tcgctgtcgc | ttccaatgta | ctgcgcagca | ggttcatcat | cggcccaccc | 9900 |
| ggtgctggga | aaacatactg | gctccttcaa | caggtccagg | atgggtgatgt | tatttacaca | 9960 |
| ccaactcacc | agaccatgct | tgacatgatt | agggctttgg | ggacgtgccg | gttcaacgtc | 10020 |
| ccggcaggca | caacgctgca | attccccgtc | ccctcccgca | ccggtccgtg | ggttcgcatc | 10080 |
| ctagccggcg | gttgggtgtc | tggcaagaat | tccttcctag | atgaagcagc | gtattgcaat | 10140 |
| caccttgatg | ttttgaggct | tcttagtaaa | actaccctca | cctgtctagg | agacttcaag | 10200 |
| caactccacc | cagtgggttt | tgatttctcat | tgctatgttt | ttgacatcat | gcctcaaact | 10260 |
| caactgaaga | ccatctggag | gtttggacag | aatatctgtg | atgccgttca | gccagattac | 10320 |
| agggacaaac | tcatgtccat | ggtcaacaca | accctgtgtga | cctacgtgga | aaaacctgtc | 10380 |
| aggatgggc | aggctcctcac | cccctaccac | agggaccgag | aggacgacgc | catcactatt | 10440 |
| gactccagtc | aaggcgccac | attcgatgtg | gttacattgc | atltgcccac | taaagattca | 10500 |

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------|
| ctcaacaggc | aaagagccct | tgttgccatc | accagggcaa | gacacgctat | ctttgtgtat | 10560 |
| gaccacaca | ggcagctgca | gggcttgttt | gatcttctg | caaaaggcac | acccgtcaac | 10620 |
| ctcgcagtgc | accgcgacgg | gcagctgatc | gtgctggata | gaaataacaa | agaatgcacg | 10680 |
| gtcgctcagg | ctctaggcaa | cggggataaa | tttagggcca | cagataagcg | tgttgtagat | 10740 |
| tctctccgcg | ccatttgtgc | tgatctagaa | gggtcgagct | ctccgctccc | caaggtcgca | 10800 |
| cacaacttgg | gattttattt | ctcacctgat | ttaacacagt | ttgctaaact | cccagtagaa | 10860 |
| cttgcacctc | actggcccgt | ggtgacaacc | cagaacaatg | aaaagtggcc | agatcggctg | 10920 |
| gttgccagcc | ttcgccttat | ccataaatac | agccgcgctg | gcatcgggtg | cggctatatg | 10980 |
| gtgggccctt | cggtgtttct | aggcactcct | ggggtcgtgt | catactatct | cacaaaattt | 11040 |
| gttaagggcg | aggctcaatt | gcttccggag | acggttttca | gcaccggccg | aattgaggta | 11100 |
| gactgccggg | aatatcttga | tgatcggggag | cgagaagttg | ctgcgtccct | cccacacgct | 11160 |
| ttcattggcg | acgtcaaagg | cactaccggt | ggaggatgtc | atcatgtcac | ctccagatac | 11220 |
| ctcccacgcg | tccttcccaa | ggaatcagtt | gcggtagtcg | gggtttcaag | ccccggaaaa | 11280 |
| gccgcgaaag | cattgtgcac | actgacagat | gtgtacctcc | cagatcttga | cgctatctc | 11340 |
| cacccggaga | cccagtccaa | gtgctggaaa | atgatgttgg | acttcaaaga | agttcgacta | 11400 |
| atggtctgga | aagacaaaac | agcctatttc | caacttgaag | gtcgctattt | cacctggtat | 11460 |
| cagcttgcca | gctatgcctc | gtacatccgt | gttcctgtca | actctacggt | gtacttggac | 11520 |
| ccctgcatgg | gccccgccct | ttgcaacagg | agagtcgtcg | ggccacca | ctggggggct | 11580 |
| gacctcgcgg | tcaccctta | tgattacggc | gctaaaatta | tctgtctag | cgcgtagcat | 11640 |
| ggtgaaatgc | ccccggata | caaaattctg | gcgtgcgagg | agttctcggt | ggatgacca | 11700 |
| gttaagtaca | aacatactg | ggggtttgaa | tcggatacag | cgtatctgta | tgagttcacc | 11760 |
| ggaaacggtg | aggactggga | ggattacaat | gatgcgtttc | gtgcgcgcca | ggaagggaaa | 11820 |
| atttataagg | ccactgccac | cagcttgaag | ttttattttc | ccccggggcc | tgtcattgaa | 11880 |
| ccaactttag | gcctgaattg | aatgaaatg | gggtccatgc | aaagcctttt | ttacaaaatt | 11940 |
| ggccaacttt | ttgtggatgc | ttcacggag | ttcttgggtg | ccattggtga | tatcactata | 12000 |
| tttttgcca | ttttgtttgg | cttcaccatc | gccggttggc | tgggtggtctt | ttgcatcaga | 12060 |
| ttggtttgct | ccgcgatact | ccgtacgcgc | tctgccatc | actctgagca | attacagaag | 12120 |
| atcttatgag | gcctttcttt | cccagtgcca | agtgacatt | cccacctggg | gaactaaaca | 12180 |
| tcctttgggg | atgctttggc | accataaggt | gtcaaccctg | attgatgaaa | tgggtgcgcg | 12240 |
| tcgaatgtac | cgcatcatgg | aaaaagcagg | gcaggctgcc | tggaaacagg | tggtgagcga | 12300 |
| ggctacgctg | tctcgcatta | gtagtttggg | tgtggtggct | cattttcagc | atctagccgc | 12360 |

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| cattgaagcc | gagacctgta | aatatattggc | ctcccggctg | cccatgctac | acaacctgcg | 12420 |
| catgacaggt | tcaaatgtaa | ccatagtgta | taatagcact | ttgaatcagg | tgtttgctat | 12480 |
| ttttccaacc | cctggttccc | ggccaaagct | taatgatttt | cagcaatggt | taatagctgt | 12540 |
| acattcctcc | atattttcct | ctgttgcaac | ttcttgctact | ctttttggtg | tgctgtgggt | 12600 |
| gcggttcca | atactacgta | ctgcttttgg | tttccgctgg | ttaggggcaa | tttttctttc | 12660 |
| gaactcacag | tgaattacac | ggtgtgtcca | ccttgccctca | cccggcaagc | agccgcagag | 12720 |
| atctacgaac | ccggttaggtc | tctttggtgc | aggatagggg | atgaccgatg | tgaggaggat | 12780 |
| gatcatgacg | agctagggtt | tatggtaccg | cctggcctct | ccagcgaagg | ccacttgact | 12840 |
| agtgtttacg | cctggttggc | gttcttgctc | ttcagctaca | cggcccagtt | ccatcccag | 12900 |
| atattcggga | tagggaatgt | gagtcgagtt | tatgttgaca | tcaaacaatca | actcatctgc | 12960 |
| gccgaacatg | acgggcagaa | caccaccttg | cctcgtcatg | acaacatttc | agccgtgttt | 13020 |
| cagacctatt | accaacaatca | agtcgacggc | ggcaattggt | ttcacctaga | atggcttcgt | 13080 |
| cccttctttt | cctcgtgggt | ggttttaaat | gtctcttggg | ttctcaggcg | ttcgcctgca | 13140 |
| aaccatgttt | cagttcgagt | cttgagata | ttaagaccaa | caccaccgca | gcggcaagct | 13200 |
| ttgctgtcct | ccaagacatc | agttgcctta | ggcatcgca | ctcggcctct | gaggggatcc | 13260 |
| gcaaaatccc | tcagtgccgt | acggcgatag | ggacaccctg | gtatgttacc | atcacagcca | 13320 |
| atgtgacaga | tgagaattat | ttacattctt | ctgatctcct | catgctttct | tcttgccctt | 13380 |
| tctatgcttc | tgagatgagt | gaaaagggat | ttaagggtgg | atgtggcaat | gtgtcaggca | 13440 |
| tcgtggctgt | gtgtgtcaat | tttaccagct | acgtccaaca | tgtaaggag | tttaccaca | 13500 |
| gctccctggg | ggtcgacat | gtgcggttgc | tccatttcat | gacacctgag | accatgaggt | 13560 |
| gggcaactgt | tttagcctgt | ctttttgcca | ttctgttggc | aatttgaatg | tttaagtatg | 13620 |
| ttggagaaat | gcttgaccgc | gggctgttac | tcgcaattgc | tttctttgtg | gtgtatcgtg | 13680 |
| ccgttctgtt | ttgctgtgct | cgtcaacgcc | agcaacgaca | gcagctccca | tctacagctg | 13740 |
| atttacaact | tgacgctatg | tgagctgaat | ggcacagatt | ggctagctaa | caaatttgat | 13800 |
| tgggcagtgg | agagttttgt | catctttccc | gttttgactc | acattgtctc | ctatgggtgcc | 13860 |
| ctcactacta | gccatttcct | tgacacagtc | gctttagtca | ctgtgtctac | cgccgggttt | 13920 |
| gttacggggc | ggtatgtcct | aagtagcatc | tacgcggtct | gtgccctggc | tgcgttgact | 13980 |
| tgcttcgtca | ttaggtttgc | aaagaattgc | atgtcctggc | gctacgcgtg | taccagatat | 14040 |
| accaactttc | ttctggacac | taagggcaga | ctctatcgtt | ggcggtcgcc | tgatcatcata | 14100 |
| gagaaaaggg | gcaaagttga | ggtcgaaggt | catctgatcg | acctcaaaag | agttgtgctt | 14160 |
| gatggttccg | tggcaacccc | tataaccaga | gtttcagcgg | aacaatgggg | tcgtccttag | 14220 |
| atgacttctg | tcatgatagc | acggctccac | aaaagggtgct | tttggcggtt | tctattacct | 14280 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-------|
| acacgccagt gatgatatat gccctaaagg tgagtcgcgg cgcactgcta gggcttctgc | 14340 |
| accttttgat cttcctgaat tgtgctttca ctttcgggta catgactttc gcgcactttc | 14400 |
| agagtacaaa taaggtcgcg ctcaactatgg gagcagtagt tgcactcctt tgggggggtgt | 14460 |
| actcagccat agaaacctgg aaattcatca cctccagatg ccgtttgtgc ttgctaggcc | 14520 |
| gcaagtacat tctggcccct gccaccacg ttgaaagtgc cgcaggcttt catccgattg | 14580 |
| cggcaaatga taaccagca tttgtcgtcc ggcgtcccgg ctccactacg gtcaacggca | 14640 |
| cattggtgcc cgggttaaaa agcctcgtgt tgggtggcag aaaagctggt aaacagggag | 14700 |
| tggtaaact tgtcaaatat gccaaataac aacggcaagc agcagaatag aaagaagggg | 14760 |
| gatggccagc cagtcaatca gctgtgccag atgctgggta agatcatcgc tcagcaaaac | 14820 |
| cagtccagag gcaagggacc gggaaagaaa aataagaaga aaaaccgga gaagcccat | 14880 |
| tttcctctag cgactgaaga tgatgtcaga catcacttta cccctagtga gcggcaattg | 14940 |
| tgtctgtcgt caatccagac cgcctttaat caaggcgctg ggacttgcac cctgtcagat | 15000 |
| tcagggagga taagttacac tgtggagttt agtttgccta cgcatacatc tgtgcgctg | 15060 |
| attcgcgtca cagcatcacc ctccagatga tgggctggca ttcttgaggc atctcagtgt | 15120 |
| ttgaattgga agaattgtgtg gtgaatggca ctgattgaca ttgtgcctct aagcactata | 15180 |
| tt | 15182 |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация, которая включает

5 (а) по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV), причем по меньшей мере один антиген PPV является любым антигеном, содержащимся в PPV, и

10 (б) по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), причем по меньшей мере один антиген вируса PRRS является любым антигеном, содержащимся в вирусе PRRS.

2. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по п. 1, отличающаяся тем, что PPV выбирают из группы, к которой относятся: живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PPV, 15 убитый / инактивированный вирус PPV, убитый / инактивированный штамм PPV 014, германские полевые изоляты свиного парвовируса PPV-27a и PPV-143a и вирусы вакцины свиного парвовируса PPV-NADL-2 и PPV-IDT (MSV).

3. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или 20 комбинация по любому из пунктов с 1 по 2, отличающаяся тем, что по меньшей мере один антиген PPV представляет собой одну или несколько субъединиц PPV.

4. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или 25 комбинация по п. 3, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна субъединица PPV представляет собой вирусный белок 2 PPV (VP2), причем в предпочтительном варианте PPV VP2 является единственным антигеном PPV.

5. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или 30 комбинация по п. 4, отличающаяся тем, что PPV VP2 имеет

- в аминокислотной позиции 228 глутаминовокислотный остаток или глутаматный остаток, и/или

- в аминокислотной позиции 414 сериновый остаток, и/или

- в аминокислотной позиции 419 глутаминовый остаток, и/или

- в аминокислотной позиции 436 треониновый остаток,
причем нумерация аминокислотных позиций относится к аминокислотной
последовательности дикого типа PPV VP2.

5 6. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по п. 5, отличающаяся тем, что PPV VP2 также имеет

- в аминокислотной позиции 25 изолейциновый остаток, и/или
- в аминокислотной позиции 36 сериновый остаток, и/или
- в аминокислотной позиции 37 изолейциновый остаток.

10

7. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по любому из пунктов с 5 по 6, отличающаяся тем, что нумерация
аминокислотных позиций относится к аминокислотной последовательности,
показанной в SEQ ID NO: 1.

15

8. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по любому из пунктов с 4 по 7, отличающаяся тем, что PPV VP2
включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по
меньшей мере 90 % идентичности последовательности с аминокислотной
20 последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 5 – 16.

20

9. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
комбинация по любому из пунктов с 1 по 8, отличающаяся тем, что вирус PRRS
выбирают из группы, к которой относятся: вирус PRRS генотипа 1, вирус PRRS
25 генотипа 2, вирус PRRS генотипа 1, включающий геном, кодируемый
нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 90 %, по
меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей
мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97
%, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по
30 меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по
меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по
меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 %, или 100 % идентичности с
нуклеиновокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17
(последовательностью Lelystad дикого типа), вирус PRRS генотипа 2,

30

включающий геном, кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 % или 100 % идентичности с нуклеиновокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18 (последовательностью VR2332 дикого типа).

10

10. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по пункту 9, отличающаяся тем, что вирус PRRS выбирают из группы, к которой относятся: живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 1 (например, Porcilis PRRS, Unistrain PRRS, Amervac PRRS), живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 2 (например, Ingelvac® PRRS MLV, Fosterera PRRS), живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS штамм 94881 [(генотип 1), ReproCyc® PRRS EU], убитый / инактивированный вирус PRRS, убитый / инактивированный вирус PRRS, генотип типа 1 (например, Progressis), убитый / инактивированный вирус PRRS, генотип типа 2, штамм вируса Lelystad (CDI-NL-2.91, Institut Pasteur, Париж, Франция, номер депонирования I-1102), субъект(ы) вируса PRRS, или другие штаммы, такие, как депонированные под номерами доступа ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, номером доступа CNCM I-1140, номером доступа CNCM I-1387, номером доступа CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, и VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, или ECACC V93070108, североамериканский вирус PRRS рТ7Р129А (номер доступа ATCC 203488), под номером депонирования ATCC VR-2332, ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, и ATCC VR 2402.

20

30

11. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 10, отличающаяся тем, что по меньшей

мере один антиген PPV представляет собой одну или несколько субъединиц PPV, в которой предпочтительно по меньшей мере один антиген PPV представляет собой вирусный белок 2 PPV (VP2), более предпочтительно – PPV VP2 является единственным антигеном PPV, и по меньшей мере один антиген
5 вируса PRRS представляет собой живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, предпочтительно живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 1 (например, Porcilis PRRS, Unistrain PRRS, Amervac PRRS), более предпочтительно живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, штамм 94881
10 [(генотип 1), ReproCyc® PRRS EU] и живой аттенюированный / модифицированный живой вирус PRRS, генотип типа 2 (например, Ingelvac® PRRS MLV, Foster PRRS).

12. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
15 комбинация по любому из пунктов с 1 по 11, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированную вакцину или комбинацию рецептируют для введения в форме разовой дозы или двумя дозами.

13. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
20 комбинация по любому из пунктов с 1 по 12, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация также включает по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, предпочтительно карбомер.

14. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или
25 комбинация по любому из пунктов с 4 по 13, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация включает от 0,1 мкг до 50 мкг антигена PPV VP2, предпочтительно от 0,5 мкг до 10 мкг антигена PPV VP2, более предпочтительно – от 1,0 мкг до 10 мкг
30 антигена PPV VP2, и/или от 3,9 до 7,0 \log_{10} TCID₅₀ вируса PRRS.

15. Иммуногенная композиция или комбинированная вакцина или комбинация по любому из пунктов с 1 по 14, отличающаяся тем, что по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген

вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) содержатся вместе в одном контейнере или отделены друг от друга пространством, предпочтительно содержатся в двух или более отдельных контейнерах.

5 16. Комплект, включающий иммуногенную композицию или комбинированную вакцину или комбинацию по любому из пунктов с 1 по 15.

10 17. Комплект по п. 16, отличающийся тем, что по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) содержатся
отдельно друг от друга в двух или более отдельных контейнерах, предпочтительно независимо друг от друга в лиофилизированной или замороженной форме, и комплект также включает инструкцию с руководством по смешиванию разделенных пространством по меньшей мере одного антигена
15 PPV и по меньшей мере одного антигена вируса PPRS, причем такая инструкция с руководством предпочтительно содержит указания по комбинированию содержимого контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген PPV, с содержимым контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген вируса PPRS, причем более предпочтительно жидкое содержимое
20 контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген PPV, используют в качестве разбавителя для лиофилизированного содержимого контейнера(ов), содержащего(их) по меньшей мере один антиген вируса PPRS.

25 18. Комплект по любому из пунктов с 16 по 17, отличающийся тем, что комплект также включает указания по лечению и/или профилактике заболеваний у свиней и/или также включает указания по лечению и/или профилактике инфекций вируса PPV и/или вируса PPRS, причем такой комплект предпочтительно также включает указания по ассоциированному применению компонента PPV (предпочтительно в качестве отдельного компонента
30 комплекта) и компонента PRRSV (предпочтительно в качестве отдельного компонента комплекта) иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации, как раскрывается и заявляется в данном описании, и включенные в такой комплект.

19. Применение иммуногенной композиции или комбинированной вакцины или комбинации по любому из пунктов с 1 по 15 или комплекта по любому из пунктов с 16 по 18 для приготовления медикамента, предпочтительно вакцины.

5

20. Применение по п. 19 для приготовления медикамента для лечения и/или профилактики инфекции вируса PPV и/или вируса PRRS, снижения, профилактики или лечения клинических признаков, вызванных инфекцией PPV и/или вирусом PRRS, или для лечения и/или профилактики заболевания, вызванного инфицированием PPV и/или вирусом PRRS, отличающееся тем, что в предпочтительном варианте по меньшей мере один антиген свиного парвовируса (PPV) и по меньшей мере один антиген вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS) вводят субъекту одновременно, предпочтительно по отдельности одновременно в одном или различных местах введения, последовательно (в любом порядке), и/или с регулированием по времени.

10

15

21. Способ получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, причем способ включает этапы в следующем порядке:

20

(I) обеспечение / получение смеси, включающей

- первую жидкость,

- рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, и

- вектор, включающий нуклеиновокислотную последовательность,

25

кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок;

(II) добавление второй жидкости к смеси с этапа (I), причем вторая жидкость отличается от первой жидкости;

(III) промывание и, необязательно, окончательное концентрирование рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков в смеси путем дополнительного добавления второй жидкости к смеси, полученной в результате выполнения этапа (II), и удаления части первой и/или второй жидкости из такой комбинированной смеси;

30

(IV) инактивацию вектора путем добавления инактивирующего агента к смеси, полученной в результате выполнения этапа (III);

5 (V) нейтрализацию инактивирующего агента путем добавления нейтрализующего агента к смеси, полученной в результате выполнения этапа (IV).

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что смеси с этапа (I) получают с применением процедуры, включающей этапы

10 (а) инфицирования восприимчивых клеток в культуре вектором, включающим нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, причем вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, экспрессируются вышеупомянутым вектором,

15 (б) последующего извлечения рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, из клеточной культуры, причем клеточный дебрис предпочтительно отделяют от рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков
20 через этап отделения, предпочтительно включающий микрофльтрацию через по меньшей мере один фильтр, предпочтительно два фильтра, причем по меньшей мере один фильтр предпочтительно имеет размер пор, больший, чем рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества
25 вышеупомянутых рекомбинантных белков, в частности, имеет размер пор от приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 4 мкм.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что клеточную культуру на этапе (а) поддерживают при 27 ± 2 °С, предпочтительно при экспрессии
30 рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, вышеупомянутым вектором, и/или извлечение на этапе (б) происходит через 6 - 8 дней, предпочтительно 8 дней после инокуляции клеток вектором.

24. Способ по пп. 22 или 23, отличающийся тем, что этап отделения включает или состоит из:

- микрофльтрации через по меньшей мере один фильтр, имеющий размер пор приблизительно 2 мкм до приблизительно 4 мкм, и/или
- 5 - микрофльтрации через по меньшей мере один фильтр, имеющий размер пор приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 0,8 мкм.

25. Способ по любому из пунктов с 21 по 24, отличающийся тем, что вышеупомянутая первая жидкость включает часть среды для культивирования клеток или состоит из среды для культивирования клеток, и средой для культивирования клеток предпочтительно является среда для культивирования клеток насекомых.

26. Способ по любому из пунктов с 21 по 25, отличающийся тем, что вышеупомянутый рекомбинантный белок выбирают из группы, к которой относятся:

- белок PPV VP2 предпочтительно включающий или состоящий из последовательности, которая имеет по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по 20 меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 %, по меньшей мере 99,1 %, по меньшей мере 99,2 %, по меньшей мере 99,3 %, по меньшей мере 99,4 %, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,6 %, по меньшей мере 99,7 %, по 25 меньшей мере 99,8 %, по меньшей мере 99,9 %, или 100 % идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NOS 5 – 16.

27. Способ по любому из пунктов с 21 по 26, отличающийся тем, что вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества 30 вышеупомянутых рекомбинантных белков, являются вирусоподобными частицами, или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, являются гомотримерами.

28. Способ по любому из пунктов с 21 по 27, отличающийся тем, что вектор является рекомбинантным вирусом, предпочтительно бакуловирусом,

и/или нуклеиновокислотная последовательность является последовательностью ДНК.

5 29. Способ по любому из пунктов с 21 по 28, отличающийся тем, что вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, является рекомбинантным бакуловирусом, причем вышеупомянутый бакуловирус включает последовательность ДНК, кодирующую вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков.

15 30. Способ по любому из пунктов с 21 по 29, отличающийся тем, что на этапе (III) вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, промывают, используя по меньшей мере 2х, предпочтительно от 2х до 3х, второй жидкости, и необязательно доводят до конечной концентрации, по сравнению с первоначальным объемом вышеупомянутого рекомбинантного белка и/или вышеупомянутые четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков в смеси с этапа (I).

25 31. Способ по любому из пунктов с 21 по 30, отличающийся тем, что на этапе (III) такой(ие) этап(ы) промывания, т. е., процесс диафильтрации, выполняют при температуре ниже 37 °С, более предпочтительно при температуре ниже 30 °С, еще более предпочтительно – при температуре ниже 20 °С, еще более предпочтительно – при температуре ниже 10 °С, например, при температуре от 4 °С и 29 °С, например, 27 °С или 4 °С.

30 32. Способ по любому из пунктов с 21 по 31, отличающийся тем, что на этапе (III) часть первой и/или второй жидкости удаляют из смеси путем фильтрации, причем предпочтительно применяют фильтр или полый фильтр, включающий полупроницаемую мембрану, имеющую средний размер пор, меньший, чем вышеупомянутый рекомбинантный белок и/или вышеупомянутые

четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, и/или препятствующий прохождению большинства, предпочтительно практически всех белков размером от 20 кДа до 500 кДа, сквозь полупроницаемую мембрану.

5

33. Способ по любому из пунктов с 21 по 32, отличающийся тем, что вторая жидкость представляет собой буферный раствор, предпочтительно промывочный фосфатно-буферный солевой раствор (WPBS).

10

34. Способ по любому из пунктов с 21 по 33, отличающийся тем, что объем второй жидкости, добавляемой на этапе (II), приблизительно равен объему первой и/или второй жидкости, удаляемой на этапе (III), т. е., этап концентрирования не выполняется и/или не требуется.

15

35. Способ по любому из пунктов с 21 по 34, отличающийся тем, что инактивирующий агент представляет собой соединение азиридина, предпочтительно бинарный этиленамин (BEI), и/или инактивирующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к вектору.

20

36. Способ по любому из пунктов с 21 по 35, отличающийся тем, что нейтрализующий агент представляет собой тиосульфат натрия, и/или нейтрализующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к инактивирующему агенту.

25

37. Способ по любому из пунктов с 21 по 36, отличающийся тем, что вышеупомянутый способ также включает этап смешивания смеси, оставшейся после этапа (V), с дополнительным компонентом, выбранным из группы, к которой относятся фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, разбавители, инертные наполнители, и их комбинации.

30

38. Способ по любому из пунктов с 21 по 37, отличающийся тем, что вируцидная активность смеси, полученной в результате выполнения вышеупомянутого способа, снижается по меньшей мере на 10 % по сравнению со смесью, к которой не был применен вышеупомянутый способ, и/или

иммуногенная композиция, полученная вышеупомянутым способом, вызывает потерю менее чем $1 \log$ TCID₅₀ на мл живого вируса, когда живой вирус смешивают с иммуногенной композицией в течение двух или более часов.

5 39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что живой вирус является вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

10 40. Способ по любому из пунктов с 21 по 39, отличающийся тем, что способ также включает этап (VI) сбора рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков,, оставшихся после этапа (V), и в частности, также включающего этап очистки собранного материала, включающего рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, состоящие из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, с применением хроматографической
15 процедуры, предпочтительно эксклюзионной хроматографии.

20 41. Способ по любому из пунктов с 21 по 40, отличающийся тем, что способ также включает этап комбинирования собранного (очищенного) рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, состоящих из множества вышеупомянутых рекомбинантных белков, с по меньшей мере одним
25 дополнительным антигеном.

 42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный антиген является вирусом свиного репродуктивного и
25 респираторного синдрома (PRRS).

 43. Иммуногенная композиция, получаемая способом по любому из пунктов с 21 по 42.

30 44. Иммуногенная композиция по п. 43, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция также включает аттенюированный живой вирус, предпочтительно аттенюированный вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), или аттенюированную живую бактерию.

45. Иммуногенная композиция по пп. 43 или 44, отличающаяся тем, что аттенюированный живой вирус является вирусом свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

5 46. Иммуногенная композиция по любому из пунктов с 43 по 45, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция вызывает защитный иммунный ответ против патогена, предпочтительно патогена, включающего рекомбинантный белок по п. 26, после введения одной дозы иммуногенной композиции.

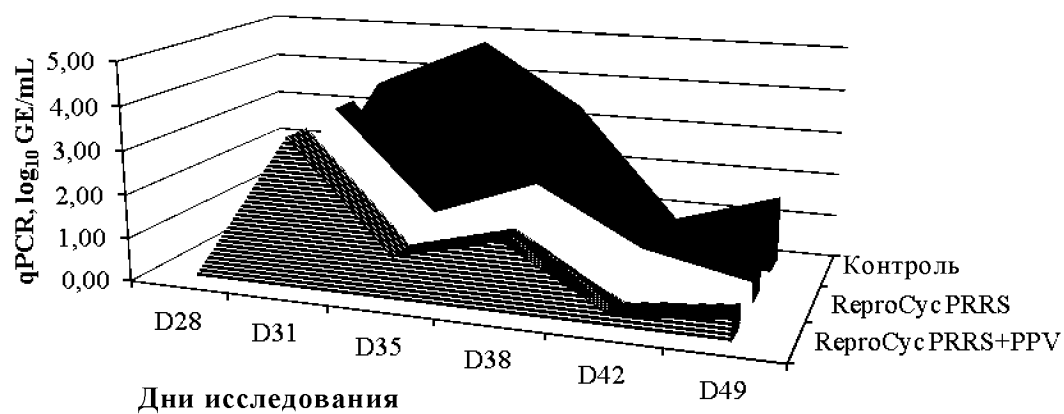
10 47. Иммуногенная композиция по любому из пунктов с 43 по 46, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция вызывает защитный иммунный ответ против вируса PRRS после введения одной дозы иммуногенной композиции.

15 48. Комплект, включающий контейнер, содержащий иммуногенную композицию по любому из пунктов с 43 по 47.

20 49. Комплект по п. 48 который также включает по меньшей мере один дополнительный контейнер, содержащий по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, к которой относятся аттенюированный живой вирус, предпочтительно аттенюированный вирус PRRS, и аттенюированная живая бактерия.

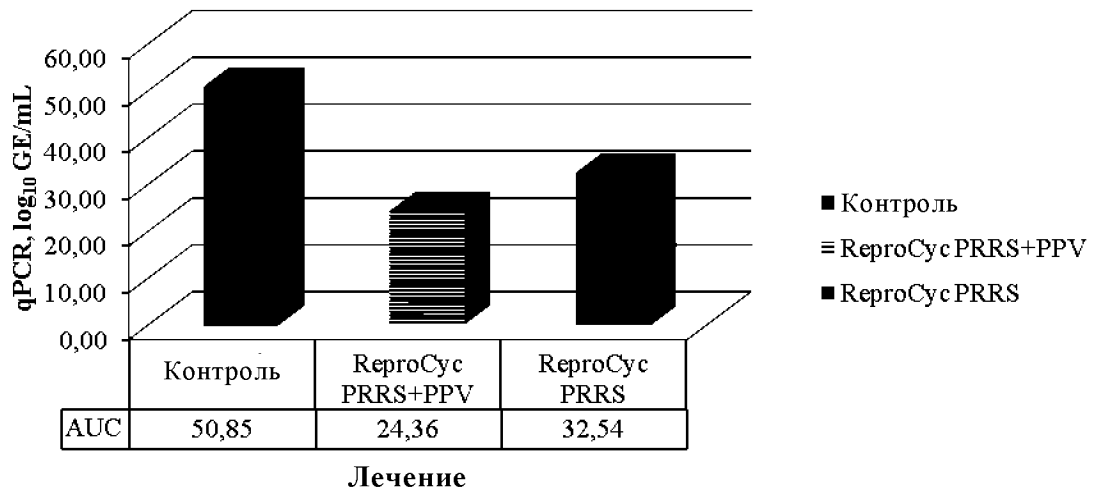
25 50. Иммуногенная композиция по любому из пунктов с 43 по 47 для применения в качестве медикамента, предпочтительно в качестве вакцины.

30 51. Иммуногенная композиция по любому из пунктов с 43 по 47 и/или комплект по любому из пунктов с 48 по 49, для применения согласно способу снижения одного или нескольких клинических симптомов инфекции патогена у животного по сравнению с животным, не получавшим вышеупомянутой иммуногенной композиции.

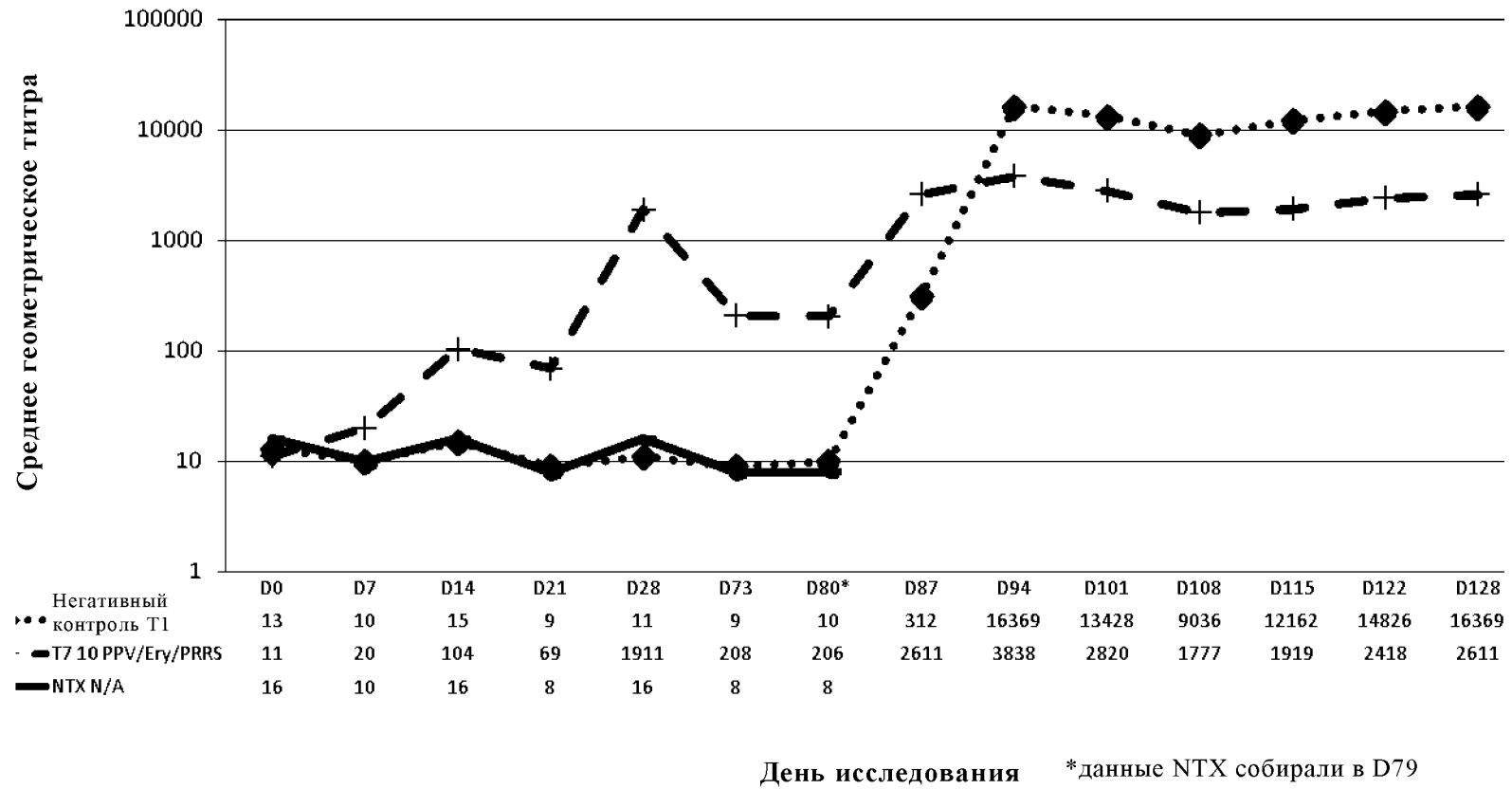


| | D28 | D31 | D35 | D38 | D42 | D49 |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| ReproCyc PRRS+PPV | 0,00 | 3,45 | 1,00 | 1,62 | 0,25 | 0,50 |
| ReproCyc PRRS | 0,00 | 3,61 | 1,36 | 2,25 | 1,00 | 0,50 |
| Контроль | 0,00 | 3,74 | 4,77 | 3,33 | 0,75 | 1,51 |

ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3