



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.19

(21) Номер заявки
201401352

(22) Дата подачи заявки
2013.05.29

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

(54) ИММУНОГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ (ВАКЦИНА) ПРОТИВ ВИРУСА ШМАЛЛЕНБЕРГА (SBV), СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И СПОСОБ ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ SBV

(31) 12170631.1; 13157875.9

(32) 2012.06.01; 2013.03.05

(33) EP

(43) 2015.05.29

(86) PCT/US2013/043146

(87) WO 2013/181270 2013.12.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

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

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

(56) BERND HOFFMANN ET AL.: "Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011", EMERGING INFECTIOUS DISEASES, vol. 18, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 469-472, XP055054135, ISSN: 1080-6040, DOI: 10.3201/eid1803.111905 cited in the application page 469, left-hand column, paragraph 2 - page 471, left-hand column, paragraph 3 & DATABASE EMBL [Online] 16 January 2012 (2012-01-16), "Schmallenberg virus genes for nucleocapsid protein and non-structural protein, segment S, genomic RNA, isolate BH80/11-4", retrieved from EBI accession no. EM_STD:HE649914 Database accession no. HE649914 sequence
IKEGAMI T. ET AL.: "Rift Valley fever vaccines", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 27, 5 November 2009 (2009-11-05), pages D69-D72, XP026694008,

ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.07.046 [retrieved on 2009-10-28] page D69, left-hand column, paragraph 1 - page D70, right-hand column, paragraph 3

MUTIEN-MARIE GARIGLIANY ET AL.: "Schmallenberg virus: A new Shamonda/Sathuperi-like virus on the rise in Europe", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 95, no. 2, 25 May 2012 (2012-05-25), pages 82-87, XP028426110, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2012.05.014 [retrieved on 2012-06-05] the whole document

TOHRU YANASE ET AL.: "Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus", ARCHIVES OF VIROLOGY; OFFICIAL JOURNAL OF THE VIROLOGY DIVISION OF THE INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES, SPRINGER-VERLAG, VI, vol. 157, no. 8, 16 May 2012 (2012-05-16), pages 1611-1616, XP035091855, ISSN: 1432-8798, DOI: 10.1007/S00705-012-1341-8 page 1611, right-hand column, paragraph 2 - page 1616, left-hand column, paragraph 1; table 2

KERSTIN WERNIKE ET AL.: "Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines", VACCINE, 1 May 2013 (2013-05-01), XP55070055, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.062 the whole document

KERSTIN WERNIKE ET AL.: "Schmallenberg virus challenge models in cattle: infectious serum or culture-grown virus?", VETERINARY RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 43, no. 1, 11 December 2012 (2012-12-11), page 84, XP021134454, ISSN: 1297-9716, DOI: 10.1186/1297-9716-43-84 the whole document

ELLIOTT RICHARD M. ET AL.: "Establishment of a reverse genetics system for Schmallenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe.", THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY APR 2013, vol. 94, no. Pt 4, April 2013 (2013-04), pages 851-859, XP002700255, ISSN: 1465-2099 abstract page 852, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 852, right-hand column, paragraph 4 - page 853, right-hand column, paragraph 2 page 857, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3

(57) Изобретение относится к области вакцин и лекарственных средств для профилактики и лечения инфекционных вирусных заболеваний у жвачных животных. Предложены иммуногенная композиция, содержащая инактивированный вирус Шмалленберга (SBV), и вакцина, содержащая данную композицию, которые предназначены для предупреждения или лечения виремии, передачи вируса и пороков развития у новорожденных жвачных животных, таких как крупный рогатый

скот, овцы и козы, индуцированных SBV. Кроме того, предложены способ получения заявленной иммуногенной композиции и основанные на введении данной композиции способы индукции иммунного ответа у животного против SBV, лечения или предупреждения у него инфекции SBV, виремии и пороков развития, обусловленных SBV, а также предупреждения или снижения передачи SBV в стаде животных.

034543 B1

034543 B1

Предпосылки создания изобретения

Область техники, к которой относится изобретения

Настоящее изобретение относится к области вакцин и лекарственных средств для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Оно относится, прежде всего, к инактивированным вирусам, которые можно применять в качестве вакцины или лекарственного средства для предупреждения или лечения вiremии, переноса инфекции и клинических симптомов, вызываемых вирусом Шмалленберга, прежде всего у новорожденных жвачных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы и козы.

Информация о существующем уровне техники

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

Ортобуньявирусы имеют сегментированный РНК-геном с минус-цепью и в основном передаются насекомыми-переносчиками, такими как мелкие двукрылые насекомые и комары. Три сегмента (S, M и L) генома ортобуньявируса позволяют осуществлять генетическую перегруппировку, которая происходит в естественных условиях и приводит к появлению вирусов с новыми биологическими свойствами (3). Наиболее крупный сегмент L кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу. М-сегменты кодируют вирусные поверхностные гликопротеины G_n и G_c, которые ответственны за слияние с клетками, присоединение вируса и индукцию нейтрализующих антител. Малый S-сегмент кодирует нуклеокапсид N, который также участвует в фиксации комплемента (4). Родственную связь между ортобуньявирусами часто выявляют только путем серологического анализа перекрестной реактивности (5). В эпоху ДНК-секвенирования была проведена дополнительная оценка филогенетических характеристик путем сравнения частичных геномных последовательностей (полноразмерной последовательности N и частичной последовательности G_c гена) (6). Однако доступная и опубликованная информация о геномной последовательности полноразмерных геномов является скудной. Вследствие этого глубокие филогенетические анализы являются затруднительными. Таким образом, подробная и надежная таксономическая классификация SBV не могла быть выполнена. Предварительные исследования продемонстрировали наличие сходства последовательностей M- и L-сегментов с частичными последовательностями вируса АКАВ и Аино (AINOV). Ген N является наиболее близкородственным вирусом Shamonda (SHAV) (1).

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

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

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

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

Описание изобретения

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

Одним из объектов изобретения является иммуногенная композиция, содержащая вирус Шмалленберга (SBV), инактивированный с помощью азиридинового соединения. Причем в ней указанный SBV содержит:

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

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

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

(г) их комбинацию.

Кроме того, в иммуногенной композиции указанный SBV может также содержать:

(а) малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 97,8% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8;

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

(в) большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6; или

(г) их комбинацию.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения азиридиновое соединение может представлять собой бинарный этиленимин (БЭИ).

Композиция дополнительно может содержать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Причем указанный по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент выбирается из растворителей, диспергирующих сред, стабилизаторов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых средств, агентов для придания изотоничности и замедляющих адсорбцию средств.

В еще одном предпочтительном варианте иммуногенная композиция дополнительно включает гидроксид алюминия, сапонин или их комбинацию.

Вторым объектом данного изобретения является вакцина, предназначенная для лечения или предупреждения у животных инфекции SBV, вирусемии или пороков развития, обусловленных SBV, а также для предупреждения или снижения передачи SBV в стаде животных, которая содержит указанную иммуногенную композицию и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Третьим объектом данного изобретения является способ получения иммуногенной композиции, включающий стадии, на которых:

(А) клетки млекопитающих заражают SBV; (Б) культивируют зараженные клетки;

(В) собирают вирусные частицы SBV, продуцируемый указанными клетками;

(Г) инактивируют указанные вирусные частицы с помощью азиридинового соединения.

В предпочтительном варианте данного изобретения клетки млекопитающих представляют собой клетки почки обезьяны, либо ВНК-клетки, а в наиболее предпочтительном - клетки почки обезьяны представляют собой Ma104-клетки или Ma104-АК-клетки, а ВНК-клетки представляют собой ВНК-21-клетки.

При этом клетки заражают SBV с величиной MOI, составляющей 0,00001-0,01, а в предпочтительном варианте - с величиной MOI, составляющей 0,0001-0,001.

Как правило, клетки культивируют в среде, содержащей примерно 1-10% FCS, в предпочтительном варианте в среде, содержащей примерно 2-6% FCS. Их культивируют при температуре 25-38°C.

В одном из вариантов осуществления изобретения клетки млекопитающих заражают SBV, который содержит:

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

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

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

(г) их комбинацию. В другом варианте их заражают SBV, который содержит:

(а) малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 97,8% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8;

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

(в) большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6; или

(г) их комбинацию.

Последним объектом данного изобретения является способ индукции иммунного ответа у животного против SBV, лечения или предупреждения у него инфекции SBV, виремии или пороков развития, обусловленных SBV, а также предупреждения или снижения передачи SBV в стаде животных, согласно которому указанному животному вводят казанную иммуногенную композицию.

В предпочтительном варианте осуществления этого способа иммуногенную композицию вводят в виде одной дозы или в виде двух доз.

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

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

В контексте настоящего описания "снижение клинических признаков, ассоциированных с заражением SBV" означает (но, не ограничиваясь только ими) снижение количества зараженных индивидуумов в группе, снижение или уменьшение до нуля количества индивидуумов, у которых проявляются клинические признаки инфекции, или снижение серьезности любых клинических признаков, имеющих у индивидуумов, по сравнению с инфекцией дикого типа. Например, это может относиться к любому снижению патогенной нагрузки, выделения патогена, снижению передачи патогена или снижению любых клинических признаков, симптоматических для заражения SBV, прежде всего, передачи SBV от матери к плоду, или пороков развития, индуцируемых SBV у плода жвачного животного или новорожденного жвачного животного. Предпочтительно указанные клинические признаки у индивидуумов, которым вводят композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, снижают по меньшей мере на 10% по сравнению с индивидуумами, которым не вводили композицию и которые могут подвергаться заражению. Более предпочтительно, клинические признаки у индивидуумов, которым вводят композицию, снижают по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%.

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

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

Понятие "животное" в контексте настоящего описания относится, прежде всего, к млекопитающему или насекомому.

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

Указанное в настоящем описании насекомое предпочтительно выбирают из группы, состоящей из

мелких двукрылых насекомых, прежде всего, относящихся к *Culicoides* spp., жалящих мух и комаров.

В контексте настоящего описания понятие "пороки развития" относится, прежде всего, к пороку развития, выбранному из врожденного порока развития позвоночного столба (кифоз, лордоз, сколиоз, искривление шеи) и/или черепа (макроцефалия, укорочение нижней челюсти), разнообразных пороков развития головного мозга (гидроцефалия, порэнцефалия, гипоплазия мозжечка, гапоплазия ствола головного мозга) и спинного мозга, пороков развития и/или ригидности передних и/или задних конечностей. Более конкретно, понятие "пороки развития" относится к порокам развития у ягнят, козлят и телят.

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

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

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

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

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

Ниже приведены примеры, которые подтверждают возможность осуществления изобретения, но не ограничивающие его.

Пример 1. Подробное описание первого выделения SBV.

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

Процесс получения: общее описание.

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

Описание процесса получения.

1. Получение MSV (исходный вакцинный вирус).

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

2. Получение антигена SBV.

Клетки линии ВНК-21 (рабочая клеточная культура - WCS) хранили в замороженном состоянии в жидком азоте. WCS подвергали оттаиванию и размножали в колбах для клеточных культур ($T-160 \text{ cm}^2$) с использованием среды ЕМЕМ, дополненной обработанной гамма-излучением 10% FCS. Клетки трипсинолизировали с помощью рекомбинантного (не животного происхождения) трипсина. Содержимое одной колбы T160 обрабатывали трипсином и ресуспендировали в 150 мл среды ЕМЕМ, дополненной 2% FCS. Эту клеточную суспензию использовали для засева одного роллер-флакона (495 cm^2). Роллер-флаконы, содержащие клеточную суспензию, помещали в инкубатор при 37°C и вращали со скоростью 0,5 об./мин. Через 12-16 ч после посева клетки высевали с плотностью 5×10^7 на флакон. Заражение осуществляли с величиной MOI, составляющей 0,0001. Клетки непрерывно инкубировали при 37°C и вращали со скоростью 0,5 об./мин в течение 50-56 ч до тех пор, пока специфическое цитопатическое действие (ЦПД) SBV не поражаало примерно 60-70% клеток. В этот момент времени все роллер-флаконы замораживали при -20°C и затем подвергали оттаиванию в водной бане при 37°C , и помещали на хранение при -80°C до использования в следующем процессе.

Титрование вируса осуществляли согласно следующей процедуре.

Необходимые материалы:

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

Процедура.

Обрабатывают трипсином содержащиеся в колбе Т75 клетки с высокой степенью конfluence и осторожно ресуспендируют в 20 мл среды (10% FCS).

Добавляют 100 мл среды (0% FCS) и хорошо перемешивают.

Полученную клеточную суспензию сливают в резервуар для многоканальных пипеток.

С использованием многоканальной пипетки вносят по 100 мкл клеточной суспензии в лунки первых 8 столбцов 96-луночных планшетов.

Помещают планшеты в CO₂-инкубатор при 37°C в атмосферу на 6-12 ч для того, чтобы дать клеткам прикрепиться.

По истечении указанного периода времени подготавливают 48-луночные планшеты и в каждую лунку вносят по 1080 мкл бессывороточной среды.

Лунки первой колонки инокулируют 120 мкл предназначенного для титрования материала.

Сначала перемешивают содержимое в лунках первой колонки, которые инокулировали материалом, с использованием 8-канальной пипетки Эппендорф с программой Р/М (четыре раза осуществляют пипетирование 120 мкл и смешение 620 мкл).

Удаляют наконечники.

Из лунок первой колонки забирают пипеткой (с новыми наконечниками) по 120 мкл, вносят в лунки второй колонки и перемешивают.

Удаляют наконечники.

Повторяют указанный процесс, пока не заполнят последнюю колонку.

С использованием матричной пипетки аспирируют 800 мкл из первого ряда 48-луночного планшета (который содержит серийный разведения одного образца).

При присоединении наконечников их необходимо зажимать плотно, но не слишком сильно, иначе функция матрицы не будет выполняться.

Распределяют по 100 мкл в 8 рядов 96-луночного планшета.

Инкубируют при 37°C в течение 3-4 дней.

Считывают результаты с использованием инвертированного микроскопа. 3. Препараты вакцины

3.1. Процедура инактивации.

Процесс инактивации конечного антигена длился в общей сложности 72 ч, применяемая концентрация БЭИ составляла 15 мМ. Конечный антиген инактивировали путем добавления 0,1 М БЭИ в соотношении 100 мл на 1 л предназначенного для инактивации антигена (конечная концентрация 10 мМ). После добавления БЭИ смесь гомогенизировали в течение по меньшей мере 15 мин и проверяли значение рН. После осуществления процесса гомогенизации смесь сливали в стерильный контейнер, который выдерживали при перемешивании при 37±1°C в течение 24 ч. Через 24 ч осуществляли вторую инактивацию конечного антигена путем добавления 0,1М БЭИ в соотношении 50 мл на 1 л подлежащего инактивации антигена (конечная концентрация 5 мМ). После второго добавления БЭИ процесс повторяли в тех же самых условиях, которые описаны выше для первого добавления, но смесь выдерживали при перемешивании в течение 48 ч.

3.2. Нейтрализация оставшегося БЭИ.

После завершения процесса инактивации добавляли 1 М раствор тиосульфата натрия в соотношении 5 мл на 1 литр инактивированного антигена (конечная концентрация 5 мМ) для нейтрализации БЭИ. После гомогенизации смеси проверяли значение рН. При необходимости осуществляли регулирование рН с помощью соляной кислоты, доводя его значение до 7,2±0,2.

3.3 Адьюванты.

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

4. Эксперимент по проверке концепции на крупном рогатом скоте.

Эксперимент осуществляли с использованием восемнадцати (18) голов крупного рогатого скота

возрастом 7 месяцев. Животных разделяли на четыре группы по четыре животных в каждой группе, а оставшиеся два животных служили в качестве контролей контакта. Все животные при начале эксперимента были серонегативными по SBV. Первую группу (четыре животных) вакцинировали, применяя вакцину в дозе, соответствующей TCID₅₀/мл 10⁶ SBV, вторую - TCID₅₀/мл 10⁵ SBV, третью - TCID₅₀/мл 10⁴ SBV и, наконец, четвертую группу не вакцинировали, так же как и оставшихся двух животных, служивших в качестве контролей контакта. В каждой группе 4 животных вакцинировали путем подкожного введения (2 мл) и спустя 3 недели осуществляли ревакцинацию. Всех животных, на которых проводили опыт, за исключением животных, служивших в качестве контролей контакта, подвергали контрольному заражению через две недели после ревакцинации (доза контрольного заражения, соответствующая TCID₅₀ 10⁷ живого вируса/животное). У всех невакцинированных животных развивалась вирусемия после контрольного заражения SBV, начиная со дня 3 (dpi, дни после заражения), и она продолжалась в течение 2-3 дней. У вакцинированных животных по сравнению с невакцинированными животными уровень вирусемии был существенно ниже, и он не сопровождался клиническими симптомами после контрольного заражения SBV.

Пример 2.

1. Введение.

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

Материалы и методы.

Вакцины.

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

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

Вакцины-кандидаты содержали антиген в следующих концентрациях: TCID₅₀/мл (средняя цитопатогенная доза, инфицирующая 50% животных, на мл) 6,1 log₁₀ (МА-НТ) или TCID₅₀/мл 5,7 log₁₀ (ВНКСТ-НТ, ВНК13-НТ, МА-ЛТ) или TCID₅₀/мл 4,7 log₁₀ (ВНК13-ЛТ). В качестве адьювантов применяли сапонин и гидроксид алюминия (0,125 мкг сапонина на 1 мл и 6,65 мг гидроксида алюминия на 1 мл для всех препаратов вакцин-кандидатов). Все препараты тестировали в отношении отсутствия бактериального загрязнения и применяли в двух повторностях для осуществления успешной инактивации путем двух пересевов с использованием клеток линии ВНК-21. Значения pH для каждого прототипа вакцины доводили до 6,8-7,2 при 20°C. Вакцины хранили при 4°C до применения.

Таблица 1. Вакцины и группы животных

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

Животные.

Двадцать пять не инфицированных SBV овец европейской домашней породы (возрастом 7-9 месяцев) распределяли на 5 групп по 5 животных в каждой, которые одновременно иммунизировали путем подкожного введения одного из прототипов вакцины (см. табл. 1). Другие 5 овец служили в качестве невакцинированных контролей. Самцов и самок животных распределяли по группам поровну.

Кроме того, 22 негативных по антителам к SBV самок коров голштино-фризской породы распределяли на четыре группы по четыре (группа H) или шесть (группы G, I и K) животных в каждой. Животных в группах G, H и I иммунизировали путем подкожного введения вакцин ВНКСТ-НТ, МА-НТ и МАЛТ

соответственно. Коровы в группе К служили в качестве невакцинированных контролей. В день первой вакцинации возраст животных составлял от 8 до 12 месяцев.

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

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

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

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

Результаты.

Клинические обследования и посмертные обследования.

После осуществления первой вакцинации с использованием прототипов вакцины не было выявлено побочных действий; ни у одного животного не было обнаружено лихорадки или другого клинического признака. После второй вакцинации у одной коровы, иммунизированной вакциной МА-НТ (группа Н) в течение 2 дней имело место небольшое опухание в области инъекции.

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

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

Гуморальный иммунный ответ.

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

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

Через три недели после первой иммунизации вакциной ВНКСТ-НТ, ВНК13-НТ или ВНК13-ЛТ (SBV выращен на ВНК-клетках) все овцы и коровы имели негативный статус по данным ELISA, в то время как у S07, S08, S10 (ВНКСТ-НТ) и S04 (ВНК13-НТ) были выявлены низкие титры антител по данным анализа нейтрализации. После второй вакцинации антитела были выявлены при проведении по меньшей мере одного серологического анализа, в большинстве случаев было обнаружено значительное увеличение нейтрализующий антител. Через три недели после контрольного заражения 8 из 15 овец (S04, S06, S07, S09, S10, S11, S12, S15) и 5 из 6 коров (C01-C05) имели позитивный статус по данным обоих анализов, 7 овец (S01-S03, S05, S08, S13, S14) и оставшаяся корова (C6) имели позитивный статус только по данным теста на нейтрализацию, а S15 - по данным только ELISA.

После одной иммунизации вакцинами МА-НТ или МА-ЛТ (SBV выращенный на МА-104-клетках) все коровы и все овцы за исключением двух имели негативный статус по данным обоих серологических анализов. По данным анализа нейтрализации S22 и S23 имели титры 1:5 и 1:7 соответственно. После второй вакцинации у S19, S24, C08 и C14 антитела не были обнаружены. S16, S21, C07, C09 и C10 имели

позитивный статус по данным обоих серологических анализов, в то время как остальные животные имели позитивный статус по данным только анализа нейтрализации. Через три недели после контрольного заражения все овцы в группе D и 4 из 5 овец в группе E имели позитивный статус по данным анализа нейтрализации, у животного S16 антитела не были обнаружены методом ELISA, а животное S24 имело негативный статус по данным обоих анализов. У всех коров в группе H (высокий титр SBV) оказалось возможным выявить антитела как с помощью ELISA, так и с помощью анализа нейтрализации. Такой же результат был получен для C12 и C13 (группа I, низкий титр SB), C11, C15 и C16 имели позитивный статус только по данным анализа нейтрализации, а у C14 ни один из тестов не выявил присутствие антител.

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

ОТ-ПЦР в реальном времени.

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

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

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

Заключение.

Было создано пять различных препаратов инактивированной вакцины, после чего они были протестированы на коровах и овцах. В экспериментах ни у одного из животных не были выявлены значительные побочные действия, и у всех животных имела место сероконверсия после вакцинации. Кроме того, у большинства, но не у всех, животных после вакцинации возникали поддающиеся обнаружению уровни антител, нейтрализующих SBV. Важно отметить, что РНК-емия после контрольного заражения полностью предупреждалась при применении четырех прототипов вакцины и значительно снижалась при применении пятого прототипа. Эти данные позволяют сделать предположение о том, что защита от вирусной инфекции лишь частично опосредуется нейтрализующими антителами, и что существуют дополнительные еще не изученные механизмы, наиболее вероятно ассоциированные с клеточным иммунитетом, которые вносят существенный вклад в клиренс вируса после контрольного заражения SBV. Двумя главными характеристиками инактивированных вакцин являются: (I) полная инактивация инфекционного вируса, что продемонстрировано путем осуществления пересевов с использованием клеточных культур и установлением отсутствия РНК-емии после первой иммунизации, и (II) индукция защитного иммунитета. Хотя нейтрализующие антитела не были обнаружены у каждого из вакцинированных животных до контрольного заражения, РНК-емия полностью предупреждалась при применении четырех прототипов вакцины и значительно снижалась при применении пятого прототипа. В рассматриваемом опыте обнаружение вирусной РНК в лимфоретикулярной системе применяли в качестве диагностического инструмента, отличного от выявления РНК-емии. В отличие от контролей, все вакцинированные животные имели четко выраженный негативный SBV-РНК-статус в лимфоидной системе (в лимфоидных органах в момент проведения аутопсии), а также мезентериальных лимфатических узлов. У одной невакцинированной контрольной овцы не было выявлено ни РНК-емии, ни положительных результатов ОТ-к ПЦР-анализа образцов ткани, ни сероконверсии после контрольного заражения, причина таких результатов остается невыясненной. Возможными объяснениями могут являться неудачная инъекция или статус (естественный) устойчивости к заражению SBV.

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

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

Наиболее высокие уровни антител во всех группах овец были выявлены при анализе нейтрализации после контрольного заражения невакцинированных овец. Такой же результат был получен после иммунизации несколькими вакцинами против лихорадки долины Рифт и последующего контрольного зараже-

ния (8), однако, в этом случае применяемые вакцины не обеспечивали абсолютный иммунитет, а приводили лишь к снижению вирусемии. В отличие от этого, прототипы вакцины против SBV, охарактеризованные в опыте, проведенном при создании настоящего изобретения, полностью предупреждали РНК-емию у овец, несмотря на низкий уровень нейтрализующих антител.

В исследовании, проведенном при создании настоящего изобретения, титры нейтрализующих антител зависели от продуцирующей клеточной линии и вирусного титра до инактивации. Дозовая зависимость для супернатанта клеточной культуры, используемого для получения вакцины, была описана также для АКAV, она имела место вне зависимости от того, применяли инактивированные или ослабленные живые вакцины (9; 10). Опубликованы данные о том, что для создания вакцины необходимо количество вируса, составляющее по меньшей мере $10^{5,5}$ TCID₅₀/мл. Когда применяли 2 мл вакцины, содержащей вирус, выращенный на МА-104-клетках, с TCID₅₀/мл, составляющей 6,1 log₁₀, то она полностью предупреждала РНК-емию, однако у половины телят, иммунизированных с использованием TCID₅₀/мл, составляющей 5,7 log₁₀, вирусный геном можно было обнаруживать в течение одного дня, можно предположить, что сходная минимальная доза может иметь место и в случае SBV. Однако, в случае вакцин, полученных с использованием ВНК-21-клеток, более низкий вирусный титр (TCID₅₀/мл, составляющая 5,7 log₁₀) полностью предупреждал РНК-емию у обоих видов животных, для овец требовалась величина TCID₅₀/мл, составляющая лишь 4,7 log₁₀.

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

Пример 3.

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

Процедура инактивации.

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

Нейтрализация оставшегося БЭИ.

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

Пример 4.

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

5. Получение MSV (исходный вакцинный вирус).

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

6. Получение антигена SBV.

Ma104-Ak (рабочий банк клеток - WCS) хранили в замороженном состоянии в жидком азоте. WCS подвергали оттаиванию и размножали в колбах для культур ткани (T-160 см²) с использованием среды ЕМЕМ, дополненной обработанной гамма-излучением 10% FCS. Клетки трипсинизировали с использованием рекомбинантного (не животного происхождения) трипсина. Содержимое одной T160-колбы обрабатывали трипсином и ресуспендировали в 150 мл среды ЕМЕМ, содержащей 2% FCS. Эту клеточную суспензию высевали в один роллер-флакон (495 см²). Роллер-флаконы, содержащие клеточную суспензию, помещали в инкубатор при 37°C и вращали со скоростью 0,5 об./мин. Через 12-16 ч после посева клетки высевали с плотностью 5×10^7 на флакон. Заражение осуществляли с величиной MOI, составляющей 0,001. Зараженные клетки непрерывно инкубировали при 37°C и вращали со скоростью 0,5 об./мин в течение 72-96 ч до тех пор, пока специфическое цитопатическое действие (ЦПД) SBV не поразило примерно 60-70% клеток. В этот момент времени все роллер-флаконы замораживали при -20°C , затем под-

вергали оттаиванию в водяной бане при 37°C и помещали на хранение при -80°C до использования в дальнейшем процессе.

В перечне последовательностей:

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 7 соответствует SEQ ID NO: 1, в которой нуклеотид в положении 9 представляет собой "а" вместо "г", и

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

Ссылки

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

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

Перечень последовательностей

- <110> Бёрингер Ингельхайм Ветмедика ГМБХ
- <120> Иммуногенная композиция (вакцина) против вируса Шмалленберга (SBV), способ ее получения и способ индукции иммунного ответа против SBV
- <130> P01-2825
- <160> 8
- <170> PatentInФ version 3.3
- <210> 1
- <211> 839
- <212> ДНК
- <213> вирус Шмалленберга
- <400> 1
- agtagtgagc tccactatta actacagaaa tatgtcaagc caattcattt ttgaagatgt 60
- accacaacgg aatgcagcta catttaaccc ggaggtcggg tatgtggcat ttattggtaa 120
- gtatgggcaa caactcaact tcggtggtgc tagagtcttc ttcctcaacc agaagaaggc 180
- caagatggtc ctacataaga cggcacaacc aagtgtcgat ctacttttg gtggggtaa 240
- atttacagtg gttaataacc attttcccca atatgtctca aatcctgtgc cagacaatgc 300
- cattacactt cacaggatgt caggatatct agcacgttg attgctgata catgcaaggc 360
- tagtgtcctc aaactagctg aagctagtgc tcagattgtc atgccccttg ctgagggtta 420
- gggatgcacc tgggccgatg gttatacaat gtatcttga tttgcacctg gggccgaaat 480
- gttccttgat gcttttgact tctatccact agttattgaa atgcataggg tcctcaagga 540
- caatatggat gtaaatttta tgaaaaaagt cctccgcaa cgctatggaa caatgactgc 600
- tgaagaatgg atgactcaga aaataacaga aataaaagct gcttttaatt ctgttgaca 660
- gcttgccctgg gccaaatctg gattctctcc tgctgctaga accttcttgc agcaattcgg 720
- tatcaacatc taaacctctt catcacagat cttcaatttc cgtgcaatat gtctatgtat 780
- tgcacaccat tatactgcaa ggcttctggt aagatagtta ataagtggag aacactact 839
- <210> 2
- <211> 4373
- <212> ДНК
- <213> вирус Шмалленберга

034543

<400> 2
agtagtgaac taccacaatc aaaatgcttc tcaacattgt cttgatatct aacttagcct 60
gttttagcttt tgcactccca ctttaaggaag gcactagagg gtctaggtgc ttctgaatg 120
gcgaactggt taaaactggt aacacatcaa aggtcgtttc agaatgctgt gtgaaagacg 180
acatatctat cattaatca aatgctgaac attataaatc aggagatcgg ttggctgctg 240
taataaaata ttatcgttta tatcaggtga aggattggca ttcttgcaat ccaatttatg 300
atgaccacgg ttcttttatg atattagata tagataatac tggcacatta atccctaaaa 360
tgcatacatg cagagttgaa tgcgaaatag cactgaataa agatactggc gaagttatat 420
tgaattcata tcgaattaac cactaccgaa tctcgggcac aatgcatgta tcaggttggt 480
ttaaaaacaa aattgagatt cctttggaaa acacatgcga atccattgag gtaacatgtg 540
gattaaaaac acttaatfff catgcatggt tccatacca taagtcatgc acccgctatt 600
ttaaaggatc aatcctgccg gaattgatga tcgaatcatt ttgtacgaat cttgaattaa 660
tactgctagt aactttcata ttagttgggt ctgtcatgat gatgatattg acgaaaacat 720
atatagtata tgtgttcatt cctatatttt atccatttgt gaaattatat gcttatatgt 780
acaacaaata ttttaaattg tgtaaaaatt gcctgttagc agtacatccc tttacaaatt 840
gcccacgac atgcatctgt ggaatgattt acaactaccac tgaatcactc aaattgcatc 900
gcatgtgtaa caattgttct ggctataaag cattgccgaa aacaaggaaa ttgtgtaaaa 960
gtaaaatata caatatagtg ctatgtgtga taacatcact gatatttttc tcatttatca 1020
cacctatata gagtcaatgt atcgatatag aaaaactgcc agacgagtat attacatgta 1080
aaagagagct agctaatac aaaagcttga caattgatga cacatatagc tttatatatt 1140
cctgtacatg cataattgtg ttaatattac ttaaaaaggc agcaaagtat atcttgact 1200
gcaactgcag cttttgtggt atggtacatg aacgacgtgg attgaagata atggacaact 1260
ttacaaacaa gtgcctaagt tgtgtatgcg cagaaaacaa gggcttaaca attcacagag 1320
cctctgagaa atgtctgttc aaatttgaat caagttataa taggaccggg ttgataatct 1380
ttatgcttct gttagtccca acaattgtaa tgacgcaaga aactagtatt aactgcaaaa 1440
acattcaatc aactcagctt acaatagagc acctgagtaa gtgcatggca ttttatcaaa 1500

034543

ataaaacaag ctcaccagtt gtaatcaatg aaataatffc agatgcttca gtagacgaac 1560
aagaattaat aaaagttta aacttgaact gtaatgtcat agataggttt atttccgaat 1620
ctagtgttat tgagactcaa gtttattatg agtatataaa atcacagttg tgccctctcc 1680
aagtgcataa tattttcact atcaattcag caagtaacat acaatggaaa gcactggccc 1740
gaagtttcac cttaggagtg tgcaatacga atcctcataa acatatatgt agatgcttgg 1800
agtctatgca aatgtgcaca tcaaccaaga cagaccacgc tagggaaatg tcaatatatt 1860
atgatggtea tccagatcgc tttgagcatg acatgaaaat aatattgaat ataatgagat 1920
atatagtccc tggattaggt cgagtcctgc ttgatcaaat caaacaaaca aaagactacc 1980
aagctttacg ccacatacaa ggtaagcttt ctccataatc gcagtcaaat ttacaactta 2040
aaggatttct ggaatttgtt gattttatcc ttggtgcaaa cgtgacaata gaaaaaaccc 2100
ctcaaacatt aactacatta tctttgataa aaggagccca cagaaacttg gatcaaaaag 2160
atccaggtcc aacaccaata ctggtatgca aatcaccaca aaaagtggta tgctactcac 2220
cacgtggtgt cacacacca ggagattata tatcatgcaa atctaagatg tataagtggc 2280
catctttagg ggtatacaaa cataatagag accagcaaca agcctgcagc agtgacacac 2340
attgcctaga gatgtttgaa ccagcagaaa gaacaataac taaaaaata tgcaaagtaa 2400
gtgatatgac ttattcagaa tcgcatata gtactggaat accatcatgc aacgtgaaga 2460
gatttgatc atgtaatgta aggggtcacc aatggcaaat tgcagaatgc tcaaatggct 2520
tattttacta tgtttcagct aaagcccatt cgaaaactaa cgatataaca ctgtactgtt 2580
tatcagcaaa ttgctggac ttgcgttatg cattcagatc cagtagttgt tcagatatag 2640
tatgggatac aagttatcga aataaattaa cacctaaatc tattaatcat ccagatatgt 2700
aaaactacat agcagcgctt cagtcagata ttgcaaatga ttaactatg cactacttta 2760
aaccattaaa aaaccttcca gcaataatc ctcaatacaa acaatgaca ttgaatgggg 2820
acaaggtatc aaatggtatt agaaatagtt atatcgagtc gcacatccct gcaattaatg 2880
gtttatcagc agggattaat attgccatgc caaatggaga aagcctcttt tccattatta 2940
tctatgtcag aagagtaata aataaagcat cgtatcgatt tctatatgaa acaggacca 3000
caattggaat aaatgccaag cacgaagagg tatgtaccgg gaagtgccca agcccaatac 3060

034543

cacatcaaga tggttgggtc acattctcaa aggaaagatc aagtaattgg ggctgtgaag 3120
aatgggggttg cttggcaata aatgatgggtt gtttatatgg gtcattgtcaa gacataataa 3180
ggcctgaata taagatatac aagaagtcta gtattgaaca aaaggatggtt gaagtttgta 3240
taaccatggc ccatgaatca ttctgcagta ccggtgatgt tctccaacct ttaattagcg 3300
acaggataca attagatatac caaacgattc aaatggactc tatgccaaat ataattgcag 3360
tcaagaatgg gaaagtttat gttggagata tcaatgactt aggttcgaca gcaaagaaat 3420
gtggctcagt ccaattatat tctgaaggga tcattggatc gggaaaccca aaatttgatt 3480
atgtttgcca tgcattcaat cgtaaagatg tcatccttcg aagatgcttt gataactcat 3540
atcagtcttg tcttctcttg gaacaagata atacattaac tattgcttct accagtcata 3600
tggaagtgca taaaaaagt tcaagcgtgg gtacaatcaa ttataaaatt atggttagggg 3660
attttgacta caatgcatat tcaacacaag caacagtcac aatagatgag atcaggtgtg 3720
gtggttgta tggctgccct gaaggaatgg ctgcgccact caaattgagt accaatacca 3780
tcgggagttg ttcaataaaa agtaactgcg atacatacat taaaataata gcagtcgatc 3840
cgatgcagag cgagtattcc attaagttaa actgccact agcaacagag acagtttcag 3900
taagtgtgtg ctcagcttct gcttacacaa aaccttcaat atctaaaaat caaccaaaaa 3960
ttgtttgaa ttccttagat gaaacatctt acatcgagca acatgataaa aagtgttcta 4020
catggctttg cagagtttat aaagaaggga ttagcgtaat atttcagcct ctatttgga 4080
acctatcttt ctattggaga ctgacaatat atataataat ctctttgatt atgctaattc 4140
tgtttctata catattaata ccaactgtgca aacggctaaa aggtttattg gaatacaatg 4200
agagaatata ccaaatggaa aataaattta agtgataagc cttataacaa tgagcaatta 4260
taaatgaata aataaaaaa ataaaagata aacaaataac aacatatata tgtggttaca 4320
catatatatg taattattca gctgagaagt ttttcatgtg gtagaacact act 4373

<210> 3

<211> 6882

<212> ДНК

<213> вирус Шмалленберга

<400> 3

agtagtgac ccctaattac aatcactatg gagacatata agattaacat ttttagagat 60

aggatcaacc agtgtcgaag tgctgaagaa gccaaagaca ttggttgctga tcttctcatg 120
 gctagacatg actactttgg tagagaggta tgttattacc tggatatcga attccggcag 180
 gatgttccag cttacgacat acttcttgaa tttctgccag ctggcactgc tttcaacatt 240
 cgcaattgta caccagacaa ttttatcatt cacaatggca agctttatat cattgactat 300
 aaagtatcaa ctgatcatgc atatgggtcaa aaaacttatg aaaagtacac ccagatcttt 360
 ggagacgcat tgtcagaatt gccgtttgat tttgaagttg tgatcatccg tgctgaccct 420
 ctgcgagata ctatccatgt taattcaaat caattcttgg aaatatttgg gccgctcaac 480
 ataaaccttg attttacttg gttctttaat ttgcgatccc tgatatatga gaaatataag 540
 gatgacgaca gattcctaga aattgtgaat caaggtgaat ttacgatgac tggaccctgg 600
 attgatgagg ataccccgga gctctattca caccctgtct ttttggaatt ctatgattct 660
 ttagatgaga tggctaaact gacattccat gagtctatga catttgatgc aactcgcggt 720
 gagaaatgga atcaaaatct acaaaagggt ataaatagat atggcaatga ttataacatt 780
 tttgtgaaag aggccgctgc aggaatcttt agatgtgaag ggaactaccc aaaaccaaatt 840
 catgatgaaa tcacaatcgg ttggaatcaa atggttcaaa gagtgagtac tgagagaaac 900
 ctgactcaag atgtcagcaa gcaaaaacca tctattcatt tcatatgggg tcaacctgac 960
 gaaacatcaa atgcgacaac accaaaacta atcaagattg caaaagcact ccaaaatatt 1020
 tctggcgagt ctacatatat aagcgcattc agagcattgg gtatgcttat ggacttttct 1080
 gagaacacag ctttatatga agcacacact agcaactaa aaagtatggc aagacagaca 1140
 tcgaaaagaa ttgatactaa actggaacca atcaaaatag gcacggcgac aatttattgg 1200
 gaacagcagt ttaaactgga tactgaaata atgaatacaa aagacaaatc acatttgcta 1260
 aaagatthtc ttggcatagg gggtcacgtg caatthtcaa aaaagaccat tgacgatttg 1320
 gatactgaca aacctactat attagatthc aacaaaaagg aagtcattga tthttgcaaa 1380
 ttccagtatg aaaatgtaaa gaaaatacta tccggagata ataacttaga gcgtatagga 1440
 tgttatttag aagaatatgg tgcaaatatt gcatcatggt caaaggatac atgggatcag 1500
 attaaccaga tagggaagtc aaattactgg gcttgtatta aagatthttc agtcttgatg 1560
 aaaaatatgt tggcagthtc tcaatataat aggcacaata cthttcgtgt agtgtgttgt 1620

034543

gcaaacaata atctgtttgg gtttgaatg ccttcttctg atattaaagc aaagcgatcc 1680
acacttgttt acttcttagc tgtgttgcac tctactcctc agaatgtgat gcaccacggt 1740
gcattgcatg cgacatttaa aactggttca aaatacctta gtatctctaa aggaatgcgt 1800
ttagataaag aacgatgtca acgcatagtt agttcaccgg gactttttat gttgactaca 1860
ttgatgtttg caggagacaa tccgacactc aatttgactg atgtcatgaa ttttacattc 1920
cacacttccc tgtctataac caaagctatg ctgtcattga cagaaccatc aagatatatg 1980
ataatgaatt cattagccat atccagtcac gttagagatt atatagcaga aaaatttggc 2040
ccttatacaa agaccagctt ctctgtagta atggcaaact tgattaaaag gggatgttat 2100
atggcatata atcaaagaga taaagtagac atgaggaata tctgcctaac agattatgaa 2160
ataactcaaa aaggtgtgag agataacaga gacctatcat caatctggtt tgaaggctat 2220
gtatcactaa aagaatatat taaccaaata tatctacat tttacttcaa ttcaaaaggt 2280
ttgcatgaaa agcatcatgt tatgatagat ctggctaaga caatctttaga tatagaaagg 2340
gaccagagat taaatatccc aggaatatgg tctacaacac ctagaaaaca aactgcaaat 2400
ttaaatataa ctatctatgc agttgcaaaa aatctaataa tggacactgc tagacataat 2460
tatattagat cacggataga aaacacaaac aacttaata gatcgatatg cactatttct 2520
acattcacca gctctaaatc atgtattaaa gtaggcgact ttgagaaaga aaaaagctca 2580
gcaacaaaaa aggctgcaga ttgcatgtca aaagagataa agaagtatac aattgcaaac 2640
ccagaatttg ttgatgaaga gtactaaat gcaactataa gacattcacg ctatgaagac 2700
ttaaaaaaag caatcccgaa ttatattgac attatgtcaa ctaaagtatt tgattctctg 2760
taccagaaaa taaaaggaa ggagatagat gataaaccca ctgtgtatca tatactctct 2820
gctatgaaga atcacacaga ttttaagttt acattcttta acaaaggcca aaaaacagca 2880
aaggataggg aaatattcgt aggcgaattt gaggcaaaaa tgtgcttgta tttagtggag 2940
aggatatcta aagaacgctg taagttgaat ccagatgaga tgattagtga accaggcgat 3000
tctaaattga aaaaattaga agagcttgca gagtctgaaa tacgattcac agcagcaact 3060
atgaaacaga tcaaagaacg ctatthagca gaaatgggag aagcaagcca tatgatcgca 3120
tataaacacc attctgttaa gattgaaatc aatgcagaca tgtcaaatg gagtgcccaa 3180

034543

gatgttttat tcaaatatth ctggttgtht gcattagatc ccgcacttta tctgcaagaa 3240
aaagaaagga tattgtactt cctatgcaat tatatgcaaa aaaagctaath tctgcctgat 3300
gaaatgctct gtagcatcct tgaccaacgt atcaaacatg aggatgatath aatathatgaa 3360
atgaccaatg gcttatcgca aaattgggtc aatathaaac ggaactggct gcaggggaa 3420
ctcaattaca caagtagcta cctacattca tgttctatga atgtttataa ggatattcta 3480
aagagagcag ccactttact agaaggggaa gttttagtha attctatggt tcattctgat 3540
gacaatcaca cttcaatagt gatgatccaa gataaattag atgatgatath tgttathgaa 3600
ttttctgcaa aactatthga aaaaathatg ctaactthtg gaaatcaagc aathatgaa 3660
aagacathata taacaaatth cataaaggag ttcgtthcac tththaaath ttatggtgag 3720
ccatthtctg thtatggctg cttatthttg acatctgthg gcgattgthc tthtcttgga 3780
ccathatgagg atgtgcccag taggtthtct gcaacgcaga cagcaathaa gcathgagca 3840
cctccathac thgcatggac tgctathgca thaaactcagth ggataacaca tagcacath 3900
aacathgcttc caggtcaath caathatcct actthcatctt thacctagthca thgathatth 3960
gagctgccta tagaaththg thgctthaaath aathcagaath thacctath agctathagca 4020
ggthtggaa gagathaatct aagthathth gthtaggtth caaaaagaath gthccctata 4080
catctthgcc thgaaaccaath ccagcatcaath thtgagaath thacathacath ggathataagth 4140
aaactgacac aaththgath ththcagacth aagctththaa gathacathgac gthtagactca 4200
actaththcat ctgathgathg aathgggcgaa actathgaaa thgathctagth gthctctctg 4260
acaccaagaa aaththactac thgaaagthctg thathctagath thgathcata thgctgathth 4320
caaaaaacaa thacaagacca acagaaath gaagaathth thgaaathth thathgccaac 4380
cctcaactath thgthtaaaaa aggtgagact ththgaaagath ththgathgthc thgaththctc 4440
agathacaacath gthgthaaath thaaagaathca ththctaththc aaaaaccgac thcagctctc 4500
athagaacaa gththththgca aathaaacca athgathagact athacaagth thcathgathg 4560
thgththgth thacaagathg ccaathata aathgathgca caththath thgcaagaag 4620
actthththg aacathathca gcaathaaaa athgathgthg aaaaaththac actthgathg 4680
gagathataa agacgathata thgctthctgth athaathgaacg accctathath agthgctthg 4740

034543

gcaaacaact tgttaatttc aatacagggg gtggagatgc aacgattggg tatgacatgc 4800
tgttatatgc cggagattaa gagccttaaa gtaatttatc atagtcctgc tctcgtatta 4860
cgtgcttatg taacagataa ctatgagcaa aaagggatgg agccagatga aatgcggaga 4920
gatatatatc atttagaaga atttatagag aagacaaaat tgaggacaaa tatgcaaggg 4980
agaattgcaa ataatgaaat taagttaatg aagcgagatt tgaaatttga agtgcaggaa 5040
ttgactaaat tctatcagat ctgttatgaa tatgtgaaat caacagaaca caaaattaaa 5100
atattcatcc ttccaaaaaa ggcttacact cccattgatt tctgctcatt agtaacaggt 5160
aatctgatat cagacaacaa atggatgggt gttcactatt taaaacaaat aactgtccca 5220
gcaaagaagg cacaaatagc cacatctata gatctggaaa tacaaatagc ctacgaatgt 5280
ttcaggctaa ttgcacattt tgctgatatg ttcctaaatg atgactccaa aaaagcttat 5340
attaatgcaa ttattaacac atatacatac aaggatgttc aagtatccag tctctacaag 5400
aaaatcaaaa attcgagact acgttcaaaa attataccat tattatatca cctgggcat 5460
ttgcaacaaa tagacgttga cagatttgat gcagaaaaag cagaagagca gatcacatgg 5520
aataactggc aaacatctcg agaatttact actgggtccaa ttgatctatc aatcaaaggt 5580
tatggacggg caataaggat cgtaggtgag gacaacaagc ttacagctgc agaaatgcaa 5640
ttgtcaagag tgagaagtga tatagtatca aggcattggac aggcctttatt gaacaaacct 5700
catgggctaa aattagagaa aatggaacca gtgactgatc taaatcctaa attatggat 5760
attgcatacc aattgcgtga gaaaaagcgg taccactatg gggctcttag tacatcttat 5820
atagaagagc ataactcaag gatagaagca tctcggatac gtaagactaa taaatggata 5880
ccagtttgcc ctattgctat atcaaaacaa tcatctgatg gaaagcctag tcttgcaaaa 5940
atccctatgt taaatattgg ggagattaaa tttacaaaac tacagattgc agtagatgat 6000
catgcaatga ttaggaaagc cccatttagt aagatgggtg tctttgatgg ccacccata 6060
cagagcgggtg gcattgacat tggaaagctt atgaagaacc aaaatattct caatttgagg 6120
ttagataata tacagagtat aacattatta gatttgtgcc gcatattttc atgccgaggg 6180
tctaaagtgg atcaagatgc atttgaattc ttatctgatg aacctttgga tgaagatgtt 6240
attgatgaat tagatagctc acctgcatta gtggatctt acacaaagaa atcaacccaa 6300

034543

tccaatagtt tcaaaaatgt tatagttaga gcattgataa gagaatgtga tatatttgaa 6360
 gatataatgg acataacaga cgatggattc acatctgata gcaatctaga ggtgtagaa 6420
 aacttaacat ggattttaaa tatgctcgca acaaatcagt ggtctacaga actgtagca 6480
 tgcatacaca tgtgtttata tcgcaatgag atggatcata tctatcacia ttttcaagtt 6540
 ccagaaatat ttgtcgacaa tccaatctca ttaaattgaa agtgggatga agtaattatg 6600
 ttcttaaaca tactgcgaga cagagattac aaatttgagc catgggtgtc tatactgaat 6660
 cattccttaa ctaaagctat agagtatgct tacaaaaaga tggagagga gaggaagcag 6720
 aatcaacag gcatcaacaa attcttaaag ggtaaaaaa tgggtggcag atcaaatgtt 6780
 gatttccagt agcttgatct taaataatac ataatctttg ccccaaatct gtattatata 6840
 aataattcta aagtagtttc atgtaattag gggcacacta ct 6882

<210> 4

<211> 839

<212> РНК

<213> вирус Шмалленберга

<400> 4

aguaguguuc uccacuuuuu aacuaucuuu acagaagccu ugcaguauaa uggugugcaa 60
 uacauagaca uauugcacgg aaauugaaga ucugugauga agagguuuag auguugauac 120
 cgaauugcug caagaagguu cuagcagcag gagagaaucc agauuuggcc caggcaagcu 180
 guccaacaga auuaaaagca gcuuuuuuuu cuguuuuuuu cugagucauc cauucucag 240
 cagucuuugu uccauagcgu uggcggagga cuuuuuucau aaaaauuaca uccauuuugu 300
 ccuugaggac ccuaugcuuu ucaauaacua guggauagaa gucaaaagca ucaaggaaca 360
 uuucggcccc agguucauuu ccaagauaca uuguauaacc aucggcccag gugcaucccu 420
 uaaccucagc aaggggcaug acaaucugag cacuagcuuc agcuaguuuu aggacacuag 480
 ccuugcaugu aucagcaauc caacgugcua gauauccuga cauccuguga aguguaaugg 540
 cauugucugg cacaggaauu gagacauuuu ggggaaaauug guuauuaacc acuguaaaau 600
 ugacccccacc aaaaguaaga ucgacacuug guugugccgu cuuauuguagg accaucuugg 660
 ccuucucug guugaggaag aagacucuaug caacaccgaa guugaguugu ugcccuaacu 720

034543

uaccaaiaaa ugccacaiaac ccgaccuccg gguuaaaugu agcugcauuc cguuguggua 780
 caucuucaaa aaugaauugg cuugacaiaai uucuguagu uaauguggag ciscacuaci 839

 <210> 5
 <211> 4373
 <212> РНК
 <213> вирус Шмалленберга

 <400> 5
 aguaguguuc uaccasauga aaaacuucuc agcugaauaa uacaaiauai auguguaacc 60
 асаиаиаиаи гуигуиаиии гуиуаисиии uauuguuiii auiuauiuai uuaaauiugc 120
 ucauuguiuai aaggcuaiuc acuaaaaaui auuuiccaui ugguaiuiuc ucicauugua 180
 uiccaaiaaa ccuuuagcc guuugcacag ugguauiuai auguaiugaa acagaauuag 240
 cauaucuaaa gagauiuaia uaiuauiugi cagucuccaa uagaagaua gguugccaaa 300
 uagaggcuga aauiuaucgc uaaucucuuc uuauaaaacu cugcaaagcc auguagaaca 360
 cuuuuauca uguugcucga uguaagaugu ucaucuaag gaaucaaaa cauuuuugg 420
 uugauuuua gaauiugaag guuuugugua agcagaagcu gagcacacac uuacugaaac 480
 ugucucuguu gcuaugggc aguuuaacuu aauggaauac ugcucugca ucggaucgac 540
 ugcuauiuai uaauguaug uaucgcaguu acuuuuuai gaacaacucc cgaugguuu 600
 gguacuaau uugaguggc aagccauucc uucagggcag ccuaaacaac caccacaccu 660
 gaucucaucu auugugacug uugcuugugu ugaauaugca uuguagucaa aaucuccuaa 720
 cauauiuaa uaauiugaug uaccacgcui ugaacuuiii uuaugcacui ccuaugacu 780
 gguagaagca auaguuaug uaiuaucui uuccaagaga agacaagacu gauaugagu 840
 aucaagcau cuucgaagga ugacaucuu acgauugaau gcauggcaaa cauaaiaaa 900
 uuuugggguu cccgaucsa ugaucucuuc agaauuaau uggacugagc cacuuucuu 960
 ugucugcga ccaagucui ugauiucucc aacuaaaacu uucccauucu ugacugcaau 1020
 uaiuuuuggc auagagucca uuugaaucgu uuggauauci aauuguauc ugucgcuaau 1080
 uaaagguugg agaacaiaaa cgguaucgca gaugauuca ugggccaugg uuaacaaac 1140
 uucaacaucc uuuguuca uacuagacu cuuguauauc uuauiucag gccuauiuu 1200
 gucugacau gaccsaiaa aacaaccauc auuuauugcc aagcaacccc auucucaca 1260

034543

gccccaaaua cuugaucuuu ccuuugagaa ugugacccaa ccaucuugau gugguauugg 1320
 gcuugggcac uccccgguac auaccucuuc gugcuuggca uuuauuccaa uugugggucc 1380
 uguuucauau agaaaucgau acgaugcuuu auuuuuacu cuucugacau agauaaauau 1440
 ggaaaagagg cuuucuccau uuggcauggc aaauuuauuc ccugcugaua aaccauuau 1500
 ugcaggggag ugcgacucga uauaacuauu ucuaauacca uuugauaccu ugucuccauu 1560
 caaugucauu guuuuguaau gaggaauuau ugcuggaagg uuuuuuauug guuuuaagua 1620
 gugcauaguu aaaucauuug caauaucuga cugaagcgcu gcuauguagu uuucauuuc 1680
 uggauuuua auagauuuag guguuuuuu auuucgauaa cuuguauccc auacuauuc 1740
 ugaacaacua cuggaucuga augcauaacg caaguccagg cauuugcug auaaacagua 1800
 caguguuaua ucguuaguuu ucgaaugggc uuuaugcugaa acauaguaaa auaagccauu 1860
 ugagcauucu gcauuuugcc auugaugacc ccuuacauua caugauccaa aucucuucac 1920
 guugcaugau gguauuccag uacuauaugg cgauucugaa uaagucauau cacuuacuuu 1980
 gcuauuuuuu guaguauuug uucuuucugc ugguucaaac aucucuaggc aauguguguc 2040
 acugcugcag gcuuguugcu ggucucuauu auguuuguau accccuaaag auggccacuu 2100
 auacaucuaa gauuugcaug auauuaauuc uccuggggugu gugacaccac guggugagua 2160
 gcuaaccacu uuuuguggug auuugcauac caguauuggu guuggaccug gaucuuuuug 2220
 auccaaguuu cugugggcuc cuuuuaucaa agauaaugua guuaauguuu gagggguuuu 2280
 uucuaauugc acguuugcac caaggauaaa aucaacaaau uccagaaauc cuuuuaguug 2340
 uaaaauugac ugcgauuuag gagaaagcuu accuuguaug uggcguaaag cuugguaguc 2400
 uuuuguuugu uugauuugau caagcaagac ucgaccuaau ccagggacua uauaucucau 2460
 uauauucaau auuuuuuua ugucaugcuc aaagcgauuc ggauagaccu cauaauauau 2520
 ugacauuucc cuagcguggu cugucuuggu ugaugugcac auuugcauag acuccaagca 2580
 ucuaauuaa uguuuauagag gauucguauu gcacacuccu aaggugaaac uucgggccag 2640
 ugcuuuccau uguauguuac uugcugaauu gauagugaaa auaucaugca cuuggagagg 2700
 gcacaacugu gauuuuauau acucauaaua aacuugaguc ucaauaacac uagauucgga 2760
 aauaaaccua ucuaugacau uacaguucua guuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuguucguc 2820

uacugaagca ucugaaaaua uuucauugau uacaacuggu gagcuuguuu uauuuugaua	2880
aaaugccaug cacuuacuca ggugcucuau uguaagcuga guugauugaa uguuuuugca	2940
guuaauacua guuucuugcg ucauuacaau uguugggacu aacagaagca uaaagauuau	3000
caacccgguc cuauuauaac uugauucaaa uuugaacaga cauuucucag aggcucugug	3060
aaugguuaag cccuuguuuu cugcgcauac acaacuuaag cacuuguuug uaaaguuguc	3120
cauuauucuuc aauccacguc guucauguac cauaccacaa aagcugcagu ugcaguacaa	3180
gauauacuuu gcugccuuuu uaaguaauu uaacacaau augcauguac aggaauauu	3240
aaagcuauu gugucauca uugucaagcu uuugauuua gcuagcucuc uuuuacaugu	3300
aaauuacucg ucuggcaguu uuucuauauc gauacauuga cucgauuag gugugauaaa	3360
ugagaaaaau aucagugaug uuaucacaca uagcacuua uuggauuuu uacuuuuaca	3420
cauuuuccuu guuuucggca augcuuuua gccagaacaa uuguuacaca ugccaugcaa	3480
uuugagugau ucagugguag uguaaaucuu uccacagaug caugucgaug ggcauuuugu	3540
aaagggaugu acugcuacaa ggcauuuuu acacaauua aaauuuuugu uguacauua	3600
agcauuaau uucacaaaug gauaaaauu aggaaugaac acauuacua uauauguuu	3660
cgucaauauc aucaucauga cagacccaac uaauaugaaa guuacuagca guauuaauuc	3720
aagauucgua caaaaugauu cgaucauca uuccggcagg auugaucuu uaaaaugcg	3780
ggugcaugac uuauggguau ggaaacaugc augaaaaua aguguuuuu auccacaugu	3840
uaccucaaug gauucgcaug uguuuuccaa aggaaucuca auuuuguuuu uaaaccaacc	3900
ugauacaugc auugugcccg agauucgua gugguuaau cgauaugaau ucaauuaac	3960
uucgccagua ucuuuauuca gugcuauuuc gcuuucaacu cugcauguau gcauuuagg	4020
gauuaaugug ccaguauuau cuauaucua uaucauaaag gaaccguggu caucauaau	4080
uggauugcaa gaugccaau ccuucaccug auauaaacga uaauuuuuu uacagcagc	4140
caaccgaucu ccugauuuau aauguucagc auuugauua augauagaua ugucgucuu	4200
cacacagcau ucugaaacga ccuuugaugu guuaacaguu uuaaccaguu cgccaucag	4260
gaagcaccua gaccucucag ugccuuccuu aagugggagu gcaaaagcua aacaggcuaa	4320
guuagauauc aagacaugu ugagaagcau uuugauugug guaguucacu acu	4373

<210>	6		
<211>	6882		
<212>	РНК		
<213>	вирус Шмалленберга		
<400>	6		
	агуагуигус	сссиаииас	аугаасиас
		иииагаииа	иииаииааи
		асагаиуигг	60
	ггсаагаиу	аугиаииаиу	иаагаисааг
		сиасиггааа	усааасиуиг
		аусигссасс	120
	саииииииа	сссииаага	аииугиугау
		гссигиугау	иисигсиуцс
		ицсссиуцс	180
	саусиуиуиг	иаагсаиаси	сиаиагсиуу
		агуиааггаа	угаиисагуа
		иагасассса	240
	уiggсисаааи	иугиааисис	игисисгсг
		иаугиуиааг	аасаиаауа
		сиуцауцсса	300
	сиуиасаиуу	ааугагауиг	гауигуцгас
		аааиуууцс	ггаасиугаа
		аауигугауа	360
	гаиаугауцс	аусисауигс	гаиаиаааса
		саугигуауг	саугсиааса
		гууцигуага	420
	ссасигаиуу	гуигсггас	иаиуааааи
		ссaugуиааг	ууууцааса
		сссиагаиу	480
	гсиауцагау	гугаауцсау	сгисигиуау
		гиссаиуауа	иуууцаауа
		иауцаауцс	540
	иуиуауцау	гсисиаасиа	иаасаиуууу
		гааасиауиг	гаууиггуиг
		ауууциуигу	600
	гуаагауацс	ауааугсг	гугагсиауцс
		иааууцауа	ауаасиууу
		сауцсааагг	660
	иуцауцагау	аагаиуаа	аугсаууиг
		ауцсаууа	гасссисггс
		аугааауау	720
	гсггсасааа	иуааиаауиг	иуаиасисиг
		иаиууауцс	аассисаааи
		угагаиуаиу	780
	иуггуиуцс	аиаагсиууцс	сааугиуаау
		гссасгсгс	угауигггг
		ггссауцааа	840
	гааассауцс	иуасиааауиг	гггсиууцс
		аауцауигса	угауцауца
		сигсауцсг	900
	иагуууугуа	ааиуаауцс	сссааиуаиу
		иаацауаггг	аууууугсаа
		гасуаггс	960
	ицсауцагау	гауигууууиг	аиаагсаау
		агггсааас	ггуауцсауу
		иаууагс	1020
	асгуауцсга	гаугсиуца	ицсиагауу
		аугсисууцс	ауааагауиг
		иасиааагас	1080
	сссауагуга	иасгссиууу	иуисасгсаа
		иуггуаугса	аиауацсауа
		ауууагггауу	1140
	иагауцагис	асиггуицса	ууууууцсаа
		ууууагцсса	угаггууууиг
		ицааиааагс	1200
	сигиссауигс	сиугаиасиа	иауцауууцс
		сасисуугас	аауигсаууу
		сигсгсгсг	1260
	аагсиуигуиг	ицсисацса	сгауцс
		иуауагс	иаацсиууга
		иугауагауцс	1320

aauuggacca	guaguaaaau	cucgagaugu	uugccaguua	uuccauguga	ucugcucuuc	1380
ugcuuuuuucu	gcaucaaauuc	ugucaacguc	uaauuguugc	aaaucgccc	ggugauauaa	1440
uaaugguaua	auuuuugaac	guagucucga	auuuuugauu	uucuuguaga	gacuggauac	1500
uugaacaucc	uuguauguau	auguguaau	aaugcauua	auauaagcuu	uuuuggaguc	1560
aucuuuuagg	aacauaucag	caaaaugugc	aaauagccug	aaacauucgu	aggcuauuug	1620
uaauuccaga	ucuaugaug	uggcuauuug	ugccuucuuu	gcugggacag	uuauuuguuu	1680
uaaauguga	acaaccaucc	auuuguugc	ugauaucaga	uuaccguua	cuaaugagca	1740
gaaaucaaug	ggaguguaag	ccuuuuuugg	aaggaugaau	auuuuauuuu	uguguucugu	1800
ugauuucaca	uaucuaaac	agaucugua	gaauuuguc	aauccugca	cuucaaauuu	1860
caauucucgc	uucuuuacu	uaauuucuu	auuugcauu	cucccuugca	uaauuguccu	1920
caauuuuguc	uucucuauaa	auucucuaa	augauauua	ucucucgca	uuucaucugg	1980
cuccaucccu	uuuugcucuu	aguuauucgu	uacauaagca	cguauuacga	gagcaggacu	2040
augauaaaau	acuuuaaggc	ucuuauucuc	cggcauauaa	cagcauguca	uacccaaucg	2100
uugcaucucc	acucccugua	uugaaauuaa	caaguuguuu	gcacaagcaa	cuaauauagg	2160
gucguucauu	auacagaagc	uaauauucgu	cuuuauaucc	ucuacauca	guguauuuuu	2220
uucuauca	auuuuuuuu	gcugauaugu	uucacaaaa	gucuucugc	cauaauaca	2280
uguagcauca	uuuauuuuug	ggucaucuuug	uaucacaaac	aaccuaucau	gaauacuugu	2340
auagucuauc	auugguuuau	uugcaaacaa	uacuuguucu	augaagagcu	gagcuggguu	2400
uugaauagac	aaugauucuu	uaaaauuacg	acuguuguau	cugaacaaua	cagacauaca	2460
gaacucuuca	caagucucac	cuuuuguaac	caauaguuga	ggguuggcua	uaaaauauuc	2520
aaauuuuucu	ucauuuuucu	guuggucuuug	uaauuuuuu	ugauauucag	cauugaauug	2580
caaucuagau	aacgaacuug	caguagugaa	uuuucuuugu	gucagaagag	accuagaucu	2640
cauuucacua	guuucgccc	uuccaucauc	agaugacaua	guugagucua	acgucaugua	2700
ucuuuuuagc	uuuagucuga	aaauaucaca	uugugucagu	uuacuauau	cccauguaug	2760
uaauuucua	uaugaugcu	ggauugguuc	acggcaaaaga	uguauagggg	acauucuuuu	2820
ugauaacua	acuaauaac	uuagauuauc	ugcuuccaaa	ccugcuauag	cuauaguggg	2880

034543

uaaucugaa uuuaaaagc cacacaauc uauaggcagc ucaaaucua caugacuagg 2940
 uaaagauga guaggauc ugaauugacc uggaagcaug uuuaugugc uauguguuau 3000
 ccacugaguu aaugcaauag caguccaugc aagugaugga gguguccau gcuaaaugc 3060
 ugucugcguu gcagacaacc uacuggcaac auccucauau gguccaagaa aagcacaauc 3120
 gccaacagau gucaaaaaua agcgaccua aacagaaaau ggucaccuau aaauuuuaa 3180
 aagugaaacg aacuccuuua ugaaauugu uauuauguc uucuucauau uugcuugauu 3240
 uccaaaaguu agacauuuu uuucaaaag uuuugcagaa aaucuaaa caauauc 3300
 aucuaauuu ucuuggauca ucacuauga agugugauug ucaucagaau gaaccuaga 3360
 auugacuaaa acuucccuu cuaguaaagu ggucgucuc uuuagaauau ccuaauaac 3420
 auucauagaa caugaugua gguagcuacu uguguaauug agauucccu gcagccaguu 3480
 ccguuuuaa uugacccaau uuugcgaua gccauugguc auuucuaua uuauauc 3540
 cucauguuug auacguuggu caaggaugcu acagagcau ucaucaggca gaauuagcuu 3600
 uuuuugcaua uaaugcaua ggaaguaca uauccuuuc uuuucugca gauaaagugc 3660
 gggaucauu gcaacaacc agaaauuuu gaauaaaaca ucuugggcac uccauuuuga 3720
 caugucugca uugauucaa ucuaacaga augugguuu uaugcgauca uauggcuugc 3780
 uucuccauu ucugcaaa uagcuuuu gaucuguuu auaguugcug cugugaucg 3840
 uauuucagac ucugcaagcu cuucuaauu uucaauuu gaucgccug gucacuaau 3900
 caucucauc ggaucaacu uacagcguu uuuagauuc cucuccacua aaacaagca 3960
 cauuuuugcc ucaaaucgc cuacgaauu uuccuaucc uuugcuguu uuuggccuu 4020
 guaaagaau guaaacuaa aaucugugug auucuaa gcagagagua uaugauacac 4080
 aguggguuu ucaucuauc ccuuccuuu uuuuucugg uacagagaau caauucuuu 4140
 aguugacua augucaauu aaucggggu ugcuuuuuu aagucuucau agcgugaau 4200
 ucuuauaguu gcauuagua acucuauc acaaaucuu ggguuugca uuguauacu 4260
 cuuauucuc uuugacaugc aaucugcagc cuuuuuugu gcugagcuu uuucuuuc 4320
 aaagucgcc acuuuaauac augauuuaga gcuggugaau guagaaauag ugcuaucga 4380
 ucuuuuaag uuguuugugu uuucuaucg ugaucuaa uauuauguc uagcagugc 4440

034543

cauuuuuaga uuuuuugcaa cugcauagau aguuuuuuu aaauuugcag uuuguuuucu 4500
agguguugua gaccuuuuuc cugggauuuu uaaucucugg uccuuuuua uaucaagau 4560
ugucuuagcc agaucuauc uacaugaug cuuuucaugc aaaccuuuug aaugaagua 4620
aaaugguaga uauuuuuggu uauuuuuuc uuuuagugau acauagccuu caaaccagau 4680
ugaugauagg ucucuguuuu cucucacacc uuuuugaguu auuucuuuuu cuguuaggca 4740
gauuuuccuc augucuuuuu uaucucuuug auuuuugcc auuuuucuc cccuuuuuuu 4800
caaguuuucc auuucuauc agaagcuggu cuuuuuuuu gggccuuuuu uuucugcuuu 4860
auuuucucua acaugacugg auuugcuaa ugaauucuu aucauuuuu uugaugguuc 4920
ugucuuagc agcauagcuu ugguuuuaga cagggaugug uggauuuuu aaucuuagc 4980
aucaguuuuu uugagugucg gauugucucc ugcauuuuu aauguuuuu acuuuuuuu 5040
ucccgguuuu cuuuuuuug guugacuuug uuuuuuuuu aaucuuuuu cuuuuuuuu 5100
acuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu cuuuuuuuu gcuuuuuuu gcuuuuuuu 5160
cugaguuuuu gaauguuuuu cuuuuuuuu guuuuuuuu guuuuuuuu uuuuuuuuu 5220
aucuuuuuuu gcuuuuuuuu cuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5280
aguuuuuuuu cuuuuuuuu guuuuuuuu cuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5340
uuuuuuuuu gcuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5400
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5460
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5520
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5580
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5640
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5700
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5760
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5820
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5880
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 5940
uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 6000

034543

ucuuugaacc auuugauucc aaccgauugu gauuucaca ugauuugguu uuggguaguu 6060
 cccuucacau cuaaagauuc cugcagcggc cucuuucaca aaaauguuau aaucauugcc 6120
 auaucuauuu auaacuuuu guagauuuug auuccauuuc ucaccgcgag uugcaucaa 6180
 ugucauagac ucauggaug ucaguuuagc caucucaucu aaagaaucau agaauuccaa 6240
 aaagacaggg ugugaauaga gcuccggggg auccucauca auccaggguc cagucaucgu 6300
 aaaaucaccu ugauucacaa uuucuaggaa ucugucguca uccuuauuu ucucauuuu 6360
 cagggauccg aaaaauaaga accaaguaaa aucaagguuu auguugagcg gcccauuuu 6420
 uuccaagaau ugauuugaau uaacauggau aguaucucgc agagggucag cacggaugau 6480
 cacaacuuaa aaaucaaacg gcaauucuga caaugcgucu ccaaagaucu ggguguaucu 6540
 uucauaaguu uuuugaccuu augcaugauc aguugauacu uuauagucua ugauuuuaag 6600
 cuugccauug ugaaugauaa aaugucucgg uguacaauug cgaauuguua aagcagugcc 6660
 agcuggcaga aaaucaaga guaugucgua agcuggaaca uccugccgga auucgauauc 6720
 cagguauuaa cauaccucuc uaccaagua gucaugucua gccaugagaa gaucagcaac 6780
 aaugucuuug gcuuucucag cacuucgaca cugguugauc cuaucucuaa aaauuuuuuu 6840
 cuuguauguc uccauguga uuguaauuag ggguacacua cu 6882

<210> 7

<211> 839

<212> ДНК

<213> вирус Шмалленберга

<400> 7

agtagtgaac tccactatta actacagaaa tatgtcaagc caattcattt ttgaagatgt 60
 accacaacgg aatgcagcta catttaaccc ggaggtcggg tatgtggcat ttattggtaa 120
 gtatgggcaa caactcaact tcggtgttgc tagagtcttc ttcctcaacc agaagaaggc 180
 caagatggtc ctacataaga cggcacaacc aagtgtcgat ctacttttg gtgggggtcaa 240
 atttacagtg gttataaacc attttcccca atatgtctca aatcctgtgc cagacaatgc 300
 cattacactt cacaggatgt caggatatct agcacgttgg attgctgata catgcaaggc 360
 tagtgtcctc aaactagctg aagctagtgc tcagattgtc atgcccttg ctgagggttaa 420
 gggatgcacc tgggccgatg gttatacaat gtatcttggg tttgcacctg gggccgaaat 480

gttccttgat gcttttgact tctatccact agttattgaa atgcataggg tcttcaagga 540
 caatatggat gtaaatttta tgaaaaaagt cctccgcca a cgctatggaa caatgactgc 600
 tgaagaatgg atgactcaga aaataacaga aataaaaagct gcttttaatt ctgttggaca 660
 gcttgctcgg gccaaatctg gattctctcc tgctgctaga accttcttgc agcaattcgg 720
 tatcaacatc taaacctctt catcacagat cttcaatttc cgtgcaatat gtctatgtat 780
 tgcacaccat tatactgcaa ggcttctggt aagatagtta ataagtggag aacactact 839

<210> 8
 <211> 839
 <212> РНК
 <213> вирус Шмалленберга

<400> 8
 aguaguguuc uccacuuuuu aacuuuuuuu acagaagccu ugcaguauaa uggugugcaa 60
 uacauagaca uuuugcacgg aaauugaaga ucugugauga agagguuuag auguugauac 120
 cgaauugcug caagaagguu cuagcagcag gagagaaucc agauuuggcc caggcaagcu 180
 guccaacaga auuuuuuuga gcuuuuuuuu cuuuuuuuuu cugagucauc cauuuuucag 240
 cagucuuugu uccauagcgu uggcgagga cuuuuuuuuu aaaaauuuaca uccauuuugu 300
 ccuugaggac ccuauagcgu ucauuuacua guugauagaa gucaaaagca ucaaggaaca 360
 uuucggcccc aggugcaauu ccaagauaca uuguuuuacc aucggccccag gugcauuccu 420
 uaaccucagc aaggggcaug acaaucugag cacuagcuuc agcuaguuuug aggacacuaug 480
 ccuugcaugu aucagcaauc caacugcua gauauccuga cauccuguga aguguaauug 540
 cauuugucug cacaggauiu gagacuuuuu ggggaaaaug guuuuuuacc acuguuuuuu 600
 ugacccccacc aaaauguaga ucgacacuuug guugugccgu cuuauguagg accauuuug 660
 ccuucuuucug guugaggaag aagacucua caacaccgaa guugaguugu ugcacuuacu 720
 uaccuuuuuu ugcacuuuac ccgaccuccg guuuuuuuuu agcuagcuuc cguuguggua 780
 cauuuuuuuu aauuuuuuuu cuugacuuuu uuucuuuuuu aauugugag uccuuuuuu 839

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая вирус Шмалленберга (SBV), инактивированный с помощью азиридинового соединения.

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

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

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

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

(г) их комбинацию.

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

(а) малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 97,8% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8;

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

(в) большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6; или

(г) их комбинацию.

4. Иммуногенная композиция по п.1, в которой азиридиновое соединение представляет собой бинарный этиленмин (БЭИ).

5. Иммуногенная композиция по п.1, дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

6. Иммуногенная композиция по п.5, в которой указанный по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент выбран из растворителей, диспергирующих сред, стабилизаторов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых средств, агентов для придания изотоничности и замедляющих адсорбцию средств.

7. Иммуногенная композиция по пп.1 или 5, дополнительно включающая гидроксид алюминия, сапонин или их комбинацию.

8. Вакцина, предназначенная для лечения или предупреждения у жвачных животных инфекции SBV, вирусии или пороков развития, обусловленных SBV, а также для предупреждения или снижения передачи SBV в стаде жвачных животных, содержащая иммуногенную композицию по пп.1-3 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

9. Способ получения иммуногенной композиции по любому из пп.1-3, включающий стадии, на которых:

(А) клетки млекопитающих заражают SBV;

(Б) культивируют зараженные клетки;

(В) собирают вирусные частицы SBV, продуцируемые указанными клетками; и

(Г) инактивируют указанные вирусные частицы с помощью азиридинового соединения.

10. Способ по п.9, в котором клетки млекопитающих представляют собой клетки почки обезьяны либо ВНК-клетки.

11. Способ по п.10, в котором клетки почки обезьяны представляют собой Ma104-клетки или Ma104-AK-клетки, а ВНК-клетки представляют собой ВНК-21-клетки.

12. Способ по п.9, в котором клетки заражают SBV с величиной MOI, составляющей 0,00001-0,01.

13. Способ по п.12, в котором клетки заражают SBV с величиной MOI, составляющей 0,0001-0,001.

14. Способ по п.9, в котором клетки культивируют в среде, содержащей примерно 1-10% FCS.

15. Способ по п.14, в котором клетки культивируют в среде, содержащей примерно 2-6% FCS.

16. Способ по п.9, в котором клетки культивируют при температуре 25-38°C.

17. Способ по п.9, в котором клетки млекопитающих заражают SBV, который содержит:

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

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

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

(г) их комбинацию.

18. Способ по п.9, в котором клетки млекопитающих заражают SBV, который содержит:

(а) малый (S) сегмент РНК, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 97,8% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8;

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

(в) большой (L) сегмент РНК, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 93% нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6; или

(г) их комбинацию.

19. Способ индукции иммунного ответа у жвачного животного против SBV, лечения или предупреждения у него инфекции SBV, вирусии или пороков развития, обусловленных SBV, а также предупреждения или снижения передачи SBV в стаде жвачных животных, согласно которому указанному жвачному животному вводят иммуногенную композицию по любому из пп.1-7.

20. Способ по п.19, в котором иммуногенную композицию вводят в виде одной дозы или в виде двух доз.

