

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

(51) Int. Cl. A61K 39/15 (2006.01)

2020.02.20

(21) Номер заявки

201400914

(22) Дата подачи заявки

2013.02.14

РОТАВИРУСНАЯ СУБЪЕДИНИЧНАЯ ВАКЦИНА, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

- 61/598,624 (31)
- (32) 2012.02.14
- (33)US
- (43) 2014.12.30
- (86) PCT/US2013/026179
- WO 2013/123219 2013.08.22
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец: МЕРИАЛ, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель: Бей Рассел Ф., Симонсон Рэнди Р.,

Сириджиредди Камеш Редди, Хаус Бенджамин Мэтью (US)

(74) Представитель: Саломатина И.С., Фелицына С.Б. (RU)

US-A1-2010047763 US-A1-2004009187 (56)

US-A1-2007276130

EL-ATTAR L. ET AL.: "Comparison of the efficacy of rotavirus VLP vaccines to a live homologous rotavirus vaccine in a pig model of rotavirus disease", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 27, no. 24, 21 May 2009 (2009-05-21), pages 3201-3208, XP026108025, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.03.043 [retrieved on 2009-04-07], page 3201, left-hand column, paragraph 2 - page 3201, left-hand column, paragraph 4, page 3202, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2; table 1, page 3206, left-hand column, paragraph 2 - page 3207, right-hand column, paragraph 1

QIAO XINYUAN ET AL.: "Recombinant porcine rotavirus VP4 and VP4-LTB expressed in Lactobacillus casei induced mucosal and systemic antibody responses in mice", BMC MICROBIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 9, no. 1, 4 December 2009 (2009-12-04), page 249, XP021066343, ISSN: 1471-2180, abstract, page 2, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 3, page 9, left-hand column, paragraph 3,

page 7, left-hand column, paragraph 2

K.O. CHANG ET AL.: VIRUS GENES, vol. 18, no. 3, 1999, pages 229-233, XP55058192, ISSN: 0920-8569, DOI: 10.1023/A:1008068218966,

abstract; figure 1

Изобретение направлено на вакцинную композицию против ротавирусной инфекции, содержащую полипептиды ротавируса NSP4, VP4 и VP6 и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент. Изобретение также направлено на способ получения заявленной вакцинной композиции и способ вакцинации свиньи заявленной вакцинной композицией.

Данная заявка испрашивает приоритет по отношению к предварительной заявке на патент США под серийным номером USNN 61/598624, представленной 14 февраля 2012 г., которая целиком включается в настоящий документ путем отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение в широком смысле относится к субъединичным вакцинам, в частности - к вакцинам, содержащим ротавирусные пептиды, которые сконструированы так, чтобы генетически или по антигенным свойствам быть почти идентичными пептидам, экспрессирующимися вирусами, заражающими чувствительную к ним популяцию животных. Плазмиды, обеспечивающие экспрессию антигенных пептидов или субъединичного белка (белков), поддерживаются в популяции бактериальных клеток с помощью селекционной системы токсин/антидот. Бактериальные клетки производят белок-токсин, которому противодействует белок-антидот, кодируемый плазмидой, несущей нуклеотидные последовательности для антигенных пептидов, так что не трансформированные клетки оказываются нежизнеспособными.

Уровень техники

Ротавирусы - наиболее распространенная причина тяжелой диареи у грудных и маленьких детей (Dennehy PH, 2000). Эти вирусы входят в число возбудителей инфекции, часто называемой желудочным гриппом, хотя к собственно гриппу она не имеет никакого отношения. Ротавирусы - род семейства Reoviridae; их генетический материал -двухцепочечная РНК. Известны пять видов (групп) этих вирусов, обозначаемые A, B, C, D и E (см. классификацию вирусов Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV), 2009) В табл. 1 представлены известные ротавирусные белки. Чаще всего встречается ротавирус A, на долю которого приходится 90% случаев ротавирусной инфекции у людей. Эти вирусы передаются фекально-оральным путем, заражают и повреждают клетки слизистой оболочки тонкого кишечника, вызывая гастроэнтерит. Ротавирусы поражают не только человека, но и животных; они являются патогенным агентом для домашнего скота (Dubovi EJ, 2010).

Так, по данным недавно проведенных исследований, ротавирусы часто (в 65% случаев) обнаруживаются в экскрементах или содержимом кишечника у свиней, страдающих поносом. В большинстве случаев инфекция у животных вызывается каким-то одним вирусом (A, B, C), но случается и смешанная инфекция ротавирусами более чем одной группы (Yoon, KJ, Epidemiology of rotaviruses, ISUVDL submissions, 2010-2011, Iowa State). Почти треть случаев ротавирусной инфекции у животных вызывается вирусами группы C, по меньшей мере. До сих пор профилактика ротавирусной инфекции у свиней сводилась к довольно сомнительной практике скармливания тканей инфицированных поросят здоровым животным. К этому методу вынуждало то, что ротавирусы группы C не удается культивировать in vitro, и, соответственно, нет возможности получать обычного типа вакцины на основе инактивированных/ослабленных цельных вирусных частиц. Таким образом, имеется несомненная и настоятельная необходимость в более безопасных и эффективных средствах предотвращения ротавирусной инфекции.

Таблица 1. Ротавирусные белки

Участок РНК (ген)	Размер (число нуклеотидных пар по ротавирусу группы С	Белок	Мол. масса (кДа)	Расположение	Число копий на вирион	Функция
1	3309	VP1	125	В вершинах кора	<25	РНК-зависимая РНК- полимераза
2	2736	VP2	102	Образует внутреннюю часть кора	120	Активирует вирусную РНК-репликазу
3	2283	VP3	88	В вершинах кора	<25	Гуанилилтрансфераза (фермент, кэпирующий мРНК)
4	2166	VP4	87	Поверхностные шипики	120	Связывание с клеткой, вирулентность
5	1353	NSP1	59	Неструктурный	0	Связывание 5'РНК
6	1350	VP6	45	Внутренний капсид	780	Структурный белок, видоспецифичный антиген
7	1270	NSP3	37	Неструктурный	0	Усиливает активность вирусной мРНК и «выключает» синтез клеточных белков
8	1063	NSP2	35	Неструктурный	0	Нуклеозидтрифосфатаза, участвует в упаковке РНК
9	1037	VP7, VP7	38, 34	Поверхность	780	Структурный белок; нейтрализующий антиген
10	730	NSP4	20	Неструктурный	0	Энтеротоксин
11	613	NSP5 NSP6	22	Неструктурный	0	Модулятор NSP2, связывающий одноцепочечную и двухцепочечную РНК

Альтернативный подход состоял бы в получении вакцин, содержащих иммуногенные субъединичные белки ротавирусов или антигены. На момент подачи настоящей заявки авторам данного изобретения не известно о работах, в которых описывались бы методы получения субъединичных ротавирусных вакцин (аутогенных или иных) для иммунизации свиней против ротавирусов, в частности, против ротавирусов группы С. В перечисленных ниже патентах и патентных заявках отражен достигнутый на сегодня уровень знаний в отношении ротавирусов в плане субъединичных вакцин.

В патенте США № 7790178 (Intervet) описываются трехвалентные вакцины, включающие инактивированный ротавирус собак.

В патентах США № 7311918 и 6589529 (Детская больница шт. Огайо) описываются рекомбинантные гибридные (слитые) ротавирусные белки, включающие фрагмент белка VP6, предназначенные для вакцинации людей. Данные, полученные в исследованиях на мышах, показали, что эти вакцины вызывают иммунный ответ, направленный против гибридного белка VP6.

В патенте США № 6867353 (Exploregen) в основном описывается экспрессия фрагмента кДНК, кодирующая структурный белок ротавируса человека, с использованием трансформированных томатов.

В патенте США № 6716431 (Wyeth, теперь входит в Pfizer) описываются альтернативные формы NSP4 (полиморфизмы однонуклеотидных фрагментов, приводящие к заменам аминокислот), сохраняющие антигенность, но обладающие пониженной цитотоксичностью.

Патенты США № 6673355 и US 6210682 (Медицинский колледж Бэйлора) относятся к использованию NSP4 и его фрагментов (NSP4 114-135, NSP4 120-147, NSP4 112-174 или NSP4 112-150) для предотвращения и/или лечения заболеваний, вызываемых ротавирусами. Также описаны композиции, содержащие энтеротоксин с адъювантом. В патентах США № 5891676 и US 5827696 (Медицинский колледж Бэйлора) описывается экспрессия ротавирусных белков VP2 и VP7 соответственно.

Патент США № 6187319 (Массачусетский университет) в основном относится к способам индуцирования иммунного ответа против первого ротавируса у животных путем введения изолированного полипептида VP6 второго ротавируса, который поражает другой вид, отличный от того, к которому принадлежит вакцинируемое животное.

В патенте США № 5298244 (Саскачеванский университет) описываются сборные вирусные частицы, содержащие VP4, VP6 и VP7.

В патенте США № 20110171316 (Служба здравоохранения США) описываются вирусоподобные частицы рекомбинантного ротавируса человека группы С.

В патенте США № 20100047763 (Goes et al.) описывается плазмидная ДНК, кодирующая ротавирусные белки, предназначенная для использования в диагностических наборах.

В патенте США № 5186933 (Медицинский колледж Бэйлора) описывается экспрессия ротавирусных генов, в частности, кодирующих VP3 и VP7, с использованием бакуловирусной экспрессионной системы

До настоящего документа авторам данного изобретения не были известны эффективные ротавирусные субъединичные вакцины для свиней, полученные путем экспрессии антигенов ротавирусов типа С в клетках Е. coli. Также не было описаний способов для получения безопасных и эффективных вакцин для свиней. Таким образом, цель настоящего документа - предложить такие вакцины.

Литература

Dennehy PH (2000). "Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home". Pediatr. Infect. Dis. J. 19 (10 Suppl): S103–5. doi:10.1097/00006454-200010001-00003. PMID 11052397.

Bernstein DI (March 2009). "Rotavirus overview". The Pediatric Infectious Disease Journal 28 (3 Suppl): \$50-3.

Grimwood K, Lambert SB (February 2009). "Rotavirus vaccines: opportunities and challenges". Human Vaccines 5 (2): 57–69. PMID 18838873.

Bishop R (October 2009). "Discovery of rotavirus: Implications for child health". Journal of Gastroenterology and Hepatology 24 Suppl 3: S81–5.

Rheingans RD, Heylen J, Giaquinto C (2006). "Economics of rotavirus gastroenteritis and vaccination in Europe: what makes sense?". Pediatr. Infect. Dis. J. 25 (1 Suppl): S48–55.

Simpson E, Wittet S, Bonilla J, Gamazina K, Cooley L, Winkler JL (2007). "Use of formative research in developing a knowledge translation approach to rotavirus vaccine introduction in developing countries". BMC Public Health 7: 281.

Edward J Dubovi; Nigel James MacLachlan (2010). Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition. Boston: Academic Press. p. 288. ISBN 0-12-375158-6.

Раскрытие изобретения

Цель данного изобретения состоит в том, чтобы предложить субъединичные вакцины, а также способы лечения и профилактики ротавирусных инфекций.

- В одном аспекте данное изобретение относится к вакцинной композиции против ротавирусной инфекции, содержащей:
 - а) полипептиды ротавируса NSP4, VP4 и VP6 и
 - b) фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.
- В одном из вариантов осуществления указанные ротавирусные полипептиды NSP4, VP4 и VP6 слиты в рекомбинантный тройной полипептид.
- В одном из вариантов осуществления указанный рекомбинантный тройной полипептид представляет собой полипептид NSP4-VP6 ротавируса С.
 - В одном из вариантов осуществления вакцинная композиция дополнительно содержит адъювант.
 - В одном из вариантов осуществления адъювант представляет собой эмульсию типа "масло в воде".
- В одном из вариантов осуществления рекомбинантный тройной полипептид имеет последовательность, SEQ ID NO: 95.
- В одном из вариантов осуществления полипептиды NSP4, VP4 и VP6 включают аминокислотные последовательности, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39 для NSP4, SEQ ID NO: 41, 43, 45, 47, 49 для VP4, SEQ ID NO: 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 для VP6.

В одном из вариантов осуществления вакцинная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один антиген, ассоциированный с патогеном, отличным от ротавируса.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один указанный антиген способен вызывать у свиней иммунный ответ, направленный против Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyo), цирковируса свиней 2 типа (PCV2), вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), вируса свиного гриппа (SIV) или другого патогена, способного заражать свиней.

- В другом аспекте данное изобретение относится к способу получения предложенной вакцинной композиции, который включает следующие этапы:
 - (а) забор биологического образца у животного;
 - (b) определение ротавирусного инфекционного статуса животного;
 - (с) выделение РНК из образца животного, зараженного ротавирусами одного или более типов;
- (d) проведение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипазой и праймерами, комплементарными генам NSP4, VP4 и VP6;
 - (e) встраивание продукта ПЦР, полученного на этапе (d), в подходящий экспрессионный вектор;
- (f) введение вектора, полученного на этапе (e), в экспрессионную систему подходящего организмахозяина;
 - (g) выделение полипептидов ротавируса NSP4, VP4 и VP6 и
 - (h) добавление к ротавирусным полипептидам дополнительных вакцинных компонентов.
- В одном из вариантов осуществления дополнительные компоненты выбирают из адъювантов, ветеринарно приемлемых носителей, разбавителей и антигенов, ассоциированных с патогенами, отличными от ротавирусов.
 - В одном из вариантов осуществления дополнительным компонентом является адьювант.
- В одном из вариантов осуществления указанные антигены способны вызывать у свиней иммунный ответ, направленный против Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyo), цирковируса свиней 2 типа (PCV2), вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), вируса свиного гриппа (SIV) или другого патогена, способного заражать свиней.
- В другом аспекте данное изобретение относится к способу вакцинации свиньи, который включает по меньшей мере однократное введение предложенной вакцинной композиции.
- В одном из вариантов осуществления свинья является свиноматкой, которой осталось от около 3 до около 6 недель до опороса.
- В одном из вариантов осуществления среди поросят, рождающихся у указанной свиноматки, понижены смертность и/или заболеваемость по сравнению с поросятами невакцинированных свиноматок.

Краткое описание фигур

Из остального описания, включающего ссылки на прилагаемые фигуры, явствует полное практическое раскрытие данного изобретения, в том числе наилучшего образа действия для рядового специалиста в данной области техники.

- Фиг. 1 изображает рестрикционную карту вектора pStaby1.2 (предоставленную поставщиком).
- Фиг. 2 изображает удаление гена устойчивости к ампициллину из вектора pStaby1.2.
- Фиг. 3 изображает встраивание гена глутатион-S-трансферазы (GST) в вектор pNPL1 с образованием вектора pNPL2.
- Фиг. 4 представляет карту фланкирующих участков и сайтов встраивания ротавирусных генов в вектор pNPL2.
 - Фиг. 5 представляет схему выделения донорной ДНК.

Фиг. 6 представляет схему выделения ротавирусных генов-кандидатов для аутогенной вакцины из клинических образцов.

Фиг. 7 представляет схему встраивания донорной ДНК pNPL2 с образованием pNPL2-Rota.

Фиг. 8 представляет результаты электрофореза в полиакриламидном геле, подтверждающие экспрессию и размеры ротавирусных белков VP4, VP6 и NSP4.

Фиг. 9А представляет выравнивание нуклеотидных последовательностей и последовательностей пептидов для изолятов NSP4 (в таблице указана идентичность в процентах).

Фиг. 9В представляет выравнивание нуклеотидных последовательностей и последовательностей пептидов для изолятов VP4 (в таблице указана идентичность в процентах).

Фиг. 9С представляет выравнивание нуклеотидных последовательностей и последовательностей пептидов для изолятов VP6 (в таблице указана идентичность в процентах).

Фиг. 10 - диаграмма, демонстрирующая результаты общего серологического исследования эффективности вакцины.

Фиг. 11 - диаграммы, демонстрирующие результаты специфичного по VP4, VP6, и NSP4 серологического исследования методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Фиг. 12 представляет результаты анализа методом электрофореза в полиакриламидном геле, подтверждающие экспрессию тройного слитого белка Rota C NSP4-VP4-VP6. L - "линейка"; 1 - до индукции (OD=0.6); 2 - не индуцированные культуры (OD=1.5); 3 - индуцированные культуры (OD=1.5).

Фиг. 13 представляет результаты анализа методом вестерн-блоттинга (слева) и электрофореза в полиакриламидном геле (справа), подтверждающие экспрессию слитого белка. L - "линейка"; 1-BSA 1,5 мкг; 2 - слитый белок, разведение 1:20; 3 - слитый белок, разведение 1:40; 4 - GST 0,5 мкг.

Осуществление изобретения

Данное изобретение охватывает субъединицы ротавирусов (которые в настоящем документе определяются как, например, ротавирусные полипептиды, белки антигены, эпитопы или иммуногенные агенты), вызывающие у животных иммуногенную реакцию, в частности, субъединицы ротавирусов, вызывающие, индуцирующие или стимулирующие такую реакцию у свиней.

Особый интерес представляют такие субъединицы ротавирусов, как VP4, VP6 и NSP4, в частности, кодируемые нуклеотидными последовательностями, имеющимися у свиней, зараженных ротавирусом группы С. Считается, что предшественники любого из этих антигенов можно использовать при реализации данного изобретения.

В одном из воплощений данного изобретения предлагается способ амплификации ротавирусных нуклеотидных последовательностей, источником которых являются зараженные ротавирусом свиньи, и применение хорошо известных молекулярных методов для включения указанных амплифицированных последовательностей в экспрессионные векторы. В одном конкретном воплощении данного изобретения амплификация осуществляется путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, комплементарных высоко консервативным участкам ротавирусных генов, так что эти гены, принадлежащие различным штаммам ротавирусов, можно амплифицировать, используя те же праймеры. В одном из воплощений данного изобретения эти праймеры комплементарны ротавирусным нуклеотидным последовательностям, кодирующим белки VP4, VP6 и/или NSP4, и имеют последовательность, представленную SEQ ID № 8-13).

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы получения экспрессионных векторов, которые содержатся в прокариотическом организме-хозяине и делают возможной экспрессию гена антидота, обеспечивающего жизнеспособность бактериальных клеток, в которых экспрессируются белковые токсины. В одном из воплощений данного изобретения указанный антидот является белком ccdA, а токсин - белком ccdB.

В другом аспекте данного изобретения новые ротавирусные нуклеотидные последовательности включаются в экспрессионные векторы, чтобы производить субъединицы ротавирусов для использования в составе субъединичных вакцин.

В одном из воплощений данного изобретения предлагаемые субъединичные вакцины содержат также адъювант. В одном из конкретных воплощений данного изобретения адъювант представляет собой систему "масло-в-воде". В некоторых воплощениях данного изобретения адъювантом служат продукты под названиями TRIGEN, ULTRAGEN, PrimaVant, TS6, LR4 или их сочетания. В одном из воплощений данного изобретения предлагаемые вакцины также содержат соль алюминия в количестве, достаточном, чтобы служить адъювантом. В субъединичные вакцины по данному изобретению также можно добавлять другие вещества, способные служить адъювантом, в том числе (не ограничиваясь перечисленным здесь) сапонин и гидроксид алюминия. Эти дополнительные адъюванты могут улучшить стабильность вакцины в процессе хранения или ее эффективность, или и то и другое.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы обеспечения защитного иммунитета у поросят против ротавирусов, включающие введение предлагаемых субъединичных вакцин свиноматкам и подсвинкам до опороса.

Таблица 1. Перечень праймеров, используемых для конструирования векторов по данному изобретению

SEQ ID	#	Описание
NO: ID		
NO: ID#		
2	650	GST прямой NdeI
3	651	GST обратный BamHI
4	644	Ген AMP ^R , делеция, прямой
5	645	Ген АМР ^R , делеция, обратный
6	660	Верификация продукта ПЦР, прямой
7	661	Верификация продукта ПЦР, обратный
8	652	NSP4 прямой с сайтом BamHI
9	653	NSP4, обратный с сайтом HindIII
10	654	VP4, прямой с сайтом BamHI
11	655	VP4, обратный с сайтом HindIII
12	656	VP6, прямой с сайтом BamHI
13	657	VP6, обратный с сайтом HindIII
73	760	KSN760 - обратный VP4
74	761	KSN761 - прямой VP4
75	762	KSN762 - обратный VP4
76	763	KSN763 - прямой VP4
77	772	Праймер 1 для введения His Tag в pNPL1
78	773	Праймер 2 для введения His Tag в pNPL1
79	774	Rota C NSP4 прямой для pNPL3
80	775	Rota C NSP4 ОБРАТНЫЙ для pNPL3 или pNPL1
81	776	Rota C VP4 ПРЯМОЙ для pNPL3
82	777	Rota C VP4 ОБРАТНЫЙ для pNPL3 или pNPL1
83	778	Rota C VP6 ПРЯМОЙ для pNPL3
84	779	Rota C VP6 ОБРАТНЫЙ для pNPL3 или pNPL1
85	780	Rota C NSP4 ПРЯМОЙ для pNPL1
86	781	Rota C VP4 ПРЯМОЙ для pNPL1
87	782	Rota C VP6 ПРЯМОЙ для pNPL1
88	783	Rota C VP7 ПРЯМОЙ для pNPL3
89	784	Rota C VP7 ОБРАТНЫЙ для pNPL3 или pNPL1

Антигенные полипептиды или белки по данному изобретению способны защищать от ротавирусов. Это значит, что они могут стимулировать у животного иммунный ответ. Под антигеном или иммуногеном понимается вещество, вызывающее специфический иммунный ответ у животного-хозяина. Антиген может представлять собой цельный организм - убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть этого организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; участок или фрагмент ДНК, способный вызывать иммунный ответ после представления в животном-хозяине; полипептид, эпитоп, гаптен или любое их сочетание. Или же иммуноген/антиген может представлять собой токсин либо антитоксин.

В настоящем документе термины "белок", "пептид", "полипептид" и "фрагмент полипептида/полипептидный фрагмент" употребляются взаимозаменяемо и относятся к полимерной молекулы, состоящей из мономеров - аминокислот, любой длины. Такой полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот; в нем могут быть вставки иных нежели аминокислоты химических группировок. Эти термины также включают полимеры из аминокислот, модифицированные естественным образом или путем стороннего вмешательства: например, путем образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любых других манипуляций или модификаций, например, конъюгирования с мечеными или биологически активными компонентами.

В настоящем документе термин "иммуногенный/антигенный полипептид" включает полипептиды, иммунологически активные в том смысле, что, попав в организм животного-хозяина, они способны вызывать гуморальный и/или клеточный иммунный ответ, направленный против данного белка. Предпочтительно фрагмент белка берется такой, чтобы он обладал в основном такой же иммунологической активностью, что и цельный белок. Таким образом, белковый фрагмент по данному изобретению содержит эпитоп или антигенную детерминанту, или состоит в основном из эпитопа или антигенной детерминанты, или состоит по меньшей мере из одного эпитопа или одной антигенной детерминанты. Термин "иммуногенный белок" или "иммуногенный полипептид" в настоящем документе включает полную аминокислотную последовательность данного белка, его аналогов или иммуногенных фрагментов. Под иммуногенным фрагментом понимается фрагмент белка, включающий один или более эпитопов, и таким образом вызывающий иммунологическую реакцию, описанную выше. Такие фрагменты можно идентифицировать, применяя любое число методов картирования эпитопов, хорошо известных в данной области техники; см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66 (Glenn E. Mor-

гіѕ, Еd., 1996). Например, в случае линейных эпитопов можно параллельно синтезировать множество пептидов на твердой подложке, соответствующих участкам белковой молекулы, и с находящимися на подложке пептидами проводить реакцию с антителами. Такие методы известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 4708871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. В случае конформационных эпитопов идентификация достигается путем определения пространственной конформации аминокислот, например с помощью рентгеновской кристаллографии и двумерной ЯМРспектроскопии; см., например, Epitope Mapping Protocols (см. выше). Методы, особенно подходящие для белков Т. рагуа, исчерпывающе описаны в заявке на патент США № 2004/022605, которая целиком включается в настоящий документ путем отсылки.

В настоящем описании данное изобретение включает активные фрагменты и варианты антигенных полипептидов. Таким образом, термин "иммуногенный/антигенный полипептид" также охватывает делеции, вставки и замены в последовательности, если с такими изменениями данный полипептид иммунологически функционирует, то есть вызывает иммунологическую реакцию, описанную выше. Термин "консервативная вариация" означает замену аминокислотного остатка другим, биологически сходным, или замену нуклеотида в нуклеотидной последовательности, не приводящую к замене аминокислотного остатка или приводящую к замене на биологически сходный аминокислотный остаток. В этой связи особенно предпочтительные замены, имеющие место в природе, консервативны, то есть на место заменяемой аминокислоты встает член того же семейства аминокислот. Аминокислоты обычно разделяют на четыре семейства: (1) кислые - аспарагиновая кислота (аспартат) и глутаминовая кислота (глутамат); (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин. триптофан; (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда объединяют в группу ароматических аминокислот. Консервативные вариации включают замену одного гидрофобного аминокислотного остатка, например изолейцина, валина, лейцина или метионина, на другой гидрофобный остаток; или замену одного полярного аминокислотного остатка на другой полярный остаток, например замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты - на аспарагиновую кислоту или глутамина - на аспарагин и т.п.; Консервативной заменой будет и такая, когда аминокислота заменяется на структурно родственную, что не влияет существенно на биологическую активность. Таким образом, белки, имеющие такую же в основном аминокислотную последовательность, как и эталонная молекула, но только с незначительными заменами аминокислот, не влияющими существенно на иммуногенность белка, охватываются понятием "эталонный полипептид". В эту категорию включаются все полипептиды, порожденные указанными модификациями. Термин "консервативная вариация" также включает использование замещенных аминокислот вместо исходных незамещенных - при условии, что антитела, образовавшиеся в ответ на такой замещенный полипептид, также реагируют с незамещенным полипептидом.

Термин "эпитоп" относится к участку антигена или гаптена, на который отвечают специфичные В-и/или Т-клетки. Этот термин используется как синоним (взаимозаменяемо) термину "антигенная детерминанта" или "участок антигенной детерминанты". Антитела, узнающие один и тот же эпитоп, можно идентифицировать простым иммунологическим методом, демонстрирующим способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью.

Иммунологическая реакция на композицию или вакцину - это развитие в организме-хозяине клеточного и/или гуморального (опосредованного антителами) иммунного ответа, направленного на данную композицию или вакцину. Обычно понятие "иммунологическая реакция" включает (но не ограничивается перечисленным здесь) один или более из следующих феноменов: образование антител, В-клеток, хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных специфично на антиген или антигены, содержащиеся в данной композиции или вакцине. Предпочтительно в организме-хозяине возникает терапевтическая иди протективная иммунологическая реакция, так что усиливается сопротивляемость новой инфекции и/или снижается степень тяжести клинических проявлений заболевания. Такая защита демонстрируется ослаблением или отсутствием симптомов и/или клинических признаков заболевания, обычно имеющих место у зараженного организма-хозяина, более быстрым выздоровлением и/или пониженной концентрацией вируса в зараженном организме-хозяине.

Термин "животное" в настоящем документе подразумевает млекопитающих, птиц и проч. Термины "животное" или "хозяин" в настоящем документе включают млекопитающих, в том числе человека. Животное может быть выбрано из группы, состоящей из представителей семейства лошадиных (например, лошади), собачьих (например, собаки, волка, лисицы, койота, шакала), кошачьих (например, льва, тигра и других "больших кошек", в том числе гепарда и рыси, домашней кошки, дикой кошки), полорогих (например, овцы и крупного рогатого скота), нежвачных парнокопытных (например, свиньи), птиц (например, курицы, утки, гуся, индейки, куропатки и перепела, фазана, попугаев, вьюрков, ястребиных, страусов, включая казуара и эму), приматов (например, полуобезьян, включая долгопятов, низших приматов, человекообразных обезьян, включая гиббонов), хорьков, тюленей и рыб. Термин "животное" включает также понятие особи (индивида) на всех стадиях развития, включая периоды новорожденности и внутриутробного развития.

Если особо не оговорено иного, все технические и научные термины в настоящем документе упот-

ребляются в тех же значениях, которые общеприняты у рядовых специалистов в области техники, к которой относится данное описание. Артикли (неопределенные а/an и определенный the) при существительном в единственном числе включают значение множественного числа, если только из контекста не следует значение исключительно единственного числа. Союз "или" подразумевает также соединительное значение ("и"), если только из контекста не следует значение исключительно альтернативы.

В настоящем описании и, в особенности, в формуле изобретения и/или пунктах выражения "содержать" и его производные ("содержащий" и проч.) имеют значение, придаваемое им согласно патентному законодательству США; например, значение "включать" ("включающий", "включенный" и проч.); выражение "состоять в основном из" и его производные ("состоящий в основном из") имеют значение, придаваемое им согласно патентному законодательству США; например, они означают, что подразумеваются не только буквально названные элементы, но исключают элементы, ранее фигурировавшие в данной области техники или влияющие на основные или новые отличительные признаки данного изобретения.

Композиции

Данное изобретение относится к ротавирусным вакцинам или композициям, содержащим ротавирусный полипептид, антиген, эпитоп или иммуногенный агент, и фармацевтически (для людей или для животных) приемлемый носитель или иной эксципиент. Ротавирусный полипептид, белок, антиген, эпитоп или иммуногенный агент может быть любым ротавирусным полипептидом, белком, антигеном, эпитопом или иммуногенным агентом, например (не ограничиваясь перечисленным здесь), белком, пептидом или их фрагментом, который вызывает или стимулирует реакцию со стороны организма животного.

Данное изобретение относится к ротавирусным вакцинам или композициям, содержащим ротавирусный полипептид VP1, VP2, VP3, VP4, NSP1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4, NSP5 или NSP6 и фармацевтически (для людей или для животных) приемлемый носитель или иной эксципиент. В одном из воплощений данного изобретения предлагаемый экспрессионный вектор может также содержать полинуклеотид, кодирующий полипептид VP4, VP6 или NSP4 или их комбинацию. В одном из конкретных воплощений данного изобретения полинуклеотид в составе вектора содержит последовательность, представленную SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 или 71 или их сочетаниями.

В другом воплощении данного изобретения фармацевтически (для людей или для животных) приемлемый носитель или иной эксципиент может представлять собой эмульсию типа "вода в масле". В еще одном воплощении данного изобретения эта эмульсия типа "вода в масле" может быть тройной эмульсией вода/масло/вода (W/0/W).

В одном из воплощений данного изобретения ротавирусный полипептид или антиген, или его фрагмент, или его вариант содержит какой-либо ротавирусный полипептид или его фрагмент, или его вариант. В одном из вариантов этого воплощения данного изобретения указанный ротавирусный полипептид или его фрагмент, или его вариант является рекомбинантным полипептидом - продуктом ротавирусного гена. В другом варианте этого воплощения указанный ротавирусный ген по меньшей мере на 70% идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 или 71 или их сочетаниями. В другом варианте этого воплощения указанный ротавирусный ген по меньшей мере на 80% идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 или 71, причем указанный полипептид или его фрагмент, или его вариант играет ту же функциональную роль (то есть указанный полипептид является ротавирусным полипептидом VP4, VP6 или NSP4, принадлежащим ротавирусу другого штамма группы C).

Приведенное определение охватывает также синтетические антигены, например, полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие производные антигенов, полученные рекомбинантным или синтетическим путем (см., например, Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998). Для целей данного изобретения иммуногенные фрагменты обычно включают по меньшей мере около 3 аминокислотных остатков, по меньшей мере около 5 аминокислотных остатков, по меньшей мере около 10-15 аминокислотных остатков или по меньшей мере около 15-25 или более аминокислотных остатков исходной молекулы. Что касается длины фрагмента, то верхнего предела здесь нет: он может содержать почти всю аминокислотную последовательность данного белка или даже гибридного (слитого) белка, содержащую по меньшей мере один эпитоп данного белка.

Соответственно минимальная структура полинуклеотида, проявляющаяся как эпитоп, содержит нуклеотиды, кодирующие эпитоп, или антигенную детерминанту, ротавирусного полипептида (или состоит из этих нуклеотидов. или в основном состоит из этих нуклеотидов). Полинуклеотид, кодирующий фрагмент ротавирусного полипептида, может содержать минимум 15 нуклеотидов, около 30-45 нуклеотидов, около 45-75 или по меньшей мере 57, 87 или 150 последовательно или непрерывно расположенных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, кодирующей данный полипептид (или состоять из них, или в основном состоять из них). При осуществлении на практике данного изобретения могут применяться такие подходы к определению эпитопов, как, например, создание библиотек перекрывающихся пептидов (Hemmer et al., 1998), пептидное сканирование (метод PEPSCAN) (Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1985; Van der Zee R. et al., 1989; Geysen, 1990; Multipin.RTM. Peptide Synthesis Kits de

Chiron) и использование алгоритмов (De Groot et al., 1999; PCT/US 2004/022605).

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" относятся к РНК или ДНК-линейным или разветвленным, одно- или двухцепочечным, или их гибридам. Эти термины охватывают также гибридные молекулы ДНК/РНК. Ниже приведены примеры (не имеющие ограничительного характера) полинуклеотидов: ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, матричные РНК (мРНК), транспортные РНК (тРНК), рибосомные РНК (рРНК), рибозимы, комплементарные ДНК (кДНК), рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированная ДНК с любой нуклеотидной последовательностью, изолированная РНК с любой нуклеотидной последовательностью, ДНК- или РНКпробы (зонды) и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, например метилированные нуклеотиды; или аналоги нуклеотидов; урацил; сахара и связывающие группировки, отличные от рибозы и дезоксирибозы, например, фторрибозу и тиолаты; и нуклеотидные ответвления. Нуклеотидная последовательность может модифицироваться после полимеризации, например, путем конъюгации с компонентом-меткой. Другие модификации такого рода включают кэпирование, замену одного или более природных нуклеотидов на аналоги, включение средств для присоединения полинуклеотида к белкам, ионам металлов, компонентам-меткам, другим полинуклеотидам или твердой подложке. Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть получены путем химического синтеза или произведены микроорганизмами.

Термин "ген" употребляется в широком смысле для обозначения любого участка полинуклеотида, связанного с той или иной биологической функцией. Так, понятие гена включает интроны и экзоны как геномные последовательности или только кодирующие нуклеотидные последовательности, например, к ДНК и/или регуляторные последовательности, необходимые для их экспрессии. Например, термин "ген" также относится к фрагментам нуклеиновых кислот, обеспечивающим образование мРНК или функциональной РНК, или кодирующим определенный белок, которые включают регуляторные последовательности.

Данное изобретение также охватывает нуклеотидные последовательности, комплементарные полинуклеотидам, кодирующим антиген, эпитоп или иммуногенный агент. Комплементарная последовательность может быть полимером любой длины и может содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и аналоги в любых сочетаниях.

Определение "изолированный" ("выделенный") применительно к биологическому компоненту (например, нуклеиновой кислоте, белку или клеточной органелле) означает, что данный компонент в основном отделен или очищен от других биологических компонентов клеток того организма, в котором данный компонент присутствует от природы, например, от других хромосомных или нехромосомных ДНК или РНК, белков и органелл. Изолированные (выделенные) нуклеиновые кислоты и белки включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными методами очистки такого рода веществ. Определение "изолированный" ("выделенный") также охватывает нуклеиновые кислоты и белки, полученные с помощью методов рекомбинантной ДНК/РНК или путем химического синтеза.

Определение "очищенный" в настоящем документе не подразумевает абсолютной чистоты - это скорее относительная характеристика. Так, например, препарат частично очищенного полипептида - это такой препарат, в котором относительное содержание данного полипептида выше, чем в его естественном окружении. Иными словами, данный полипептид отделен от других клеточных компонентов. Выражение "в основном очищенный" ("практически очищенный") подразумевает, что по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или более клеточного материала или клеточных компонентов удалены. Сходным образом определяется понятие "частично очищенный полипептид". Это выражение подразумевает, что удалены менее 60% клеточного материала или клеточных компонентов. То же относится к полинуклеотидам. Описанные в настоящем документе полипептиды могут быть очищены любыми известными в данной области техники способами.

Также в объем данного изобретения входят гомологи ротавирусных полипептидов. В настоящем документе термин "гомологи" включает ортологи, аналоги и паралоги. Термин "аналог" применительно к двум полипептидам или полинуклеотидам означает, что они выполняют одну и ту же функцию или сходные функции, но в ходе эволюции возникли независимо друг от друга у неродственных организмов. Термин "ортологи" употребляется в отношении полинуклеотидов или полипептидов из разных видов, подразумевая, что два полипептида (полинуклеотида) разделились в результате видообразования и происходят от общего предкового гена. Обычно ортологи кодируют полипептиды с одной и той же функцией или со сходными функциями. Термин "паралоги" употребляется в отношении полипептидов или полинуклеотидов, разделившихся в результате дупликации в геноме. У двух паралогичных полипептидов (полинуклеотидов) обычно разные функции, но эти функции могут быть связаны. Например, аналоги, ортологи и паралоги ротавирусного полипептида дикого типа могут отличаться от ротавирусного полипептида дикого типа в результате посттрансляционной модификации различий в аминокислотной последовательности или того и другого вместе. В частности, гомологи по данному изобретению в основном по меньшей мере на 80-85%, 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичны по последовательности всему полипептиду или полинуклеотиду ротавируса дикого типа (или его части) и выпол-

няют сходные функции.

В другом аспекте данного изобретения предлагается полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности полипептида, представленного SEQ ID 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72. В еще одном аспекте данного изобретения предлагаются фрагменты и варианты ротавирусных полипептидов, о которых говорилось выше (SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72); они могут быть достаточно легко получены специалистом в данной области техники с помощью хорошо известных молекулярно-биологических методов.

Варианты - это гомологичные полипептиды, у которых аминокислотная последовательность по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72.

Варианты включают аллельные варианты. Термин "аллельный вариант" относится к существующим в природной популяции (например, виды или штаммы вируса) полинуклеотидам или полипептидам, в которых имеются полиморфизмы, приводящие к изменениям аминокислотной последовательности белка. В силу существования таких аллельных вариантов обычно имеет место 1-5%-ная изменчивость полинуклеотидов или полипептидов. Аллельные варианты можно идентифицировать путем секвенирования данной нуклеотидной последовательности у ряда различных видов живых организмов, что можно легко осуществить с помощью гибридизационных зондов, чтобы идентифицировать у этих видов один и тот же генный локус. В объем данного изобретения входят любые (и все) такие вариации нуклеотидных последовательностей и следующий из них полиморфизм аминокислотных последовательностей или вариации, являющиеся результатом природных аллельных вариантов, которые не влияют на функциональную активность данного гена.

В настоящем документе термины "производное" или "вариант" относятся к полипептиду (или к кодирующей его нуклеиновой кислоте), в котором имеются одна или более консервативных вариаций аминокислот или иные незначительные модификации - такие, что функционирование соответствующего полипептида практически не изменяется по сравнению с полипептидом дикого типа или (2) антитела против данного полипептида иммунореактивны в отношении полипептида дикого типа. Эти варианты или производные включают полипептиды с незначительными модификациями по сравнению с исходными аминокислотными последовательностями ротавирусных полипептидов, в результате чего пептиды обладают практически такой же активностью, как соответствующие не модифицированные полипептиды. Такие модификации могут создаваться намеренно, например путем направленного (сайт-специфичного) мутагенеза, или же быть спонтанными. Термин "вариант" также включает делеции, вставки и замены в последовательности, не влияющие на функционирование полипептида, а именно на иммунологическую реакцию, как это описано в настоящем документе.

Термин "консервативная вариация" означает замену аминокислотного остатка на другой, биологически сходный аминокислотный остаток или замену нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты, не приводящую к замене аминокислотного остатка в соответствующем полипептиде или приводящую к замене на биологически сходный аминокислотный остаток. В этой связи особенно предпочтительные замены, как правило, консервативны, о чем говорилось выше.

Иммуногенный фрагмент ротавирусного полипептида включает по меньшей мере 8, 10, 13, 14, 15 или 20 расположенных подряд аминокислотных остатков, по меньшей мере 21 аминокислотный остаток, по меньшей мере 23 аминокислотных остатка, по меньшей мере 25 аминокислотных остатков или по меньшей мере 30 аминокислотных остатков ротавирусного полипептида с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72 или их вариантами, или функциональными фрагментами.

В другом аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид, кодирующий ротавирусный полипептид, например полинуклеотид, кодирующий полипептид с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72 или их вариантами, или функциональными фрагментами. В еще одном аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид. кодирующий полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности полипептида, представленной SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72 или консервативным вариантом, аллельным вариантом, гомологом или иммуногенным фрагментом, содержащим по меньшей мере восемь или по меньшей мере десять расположенных подряд аминокислотных остатков одного из этих полипептидов или их сочетаний.

В другом аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47,

49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 или 71, или их вариантами, или функциональными фрагментами. В еще одном аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид. кодирующий полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности полипептида, представленной SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 или 71, или их вариантом

В настоящем описании полинуклеотиды включают нуклеотидные последовательности, вырожденные в смысле генетического кода в результате, например, использования оптимизированных кодонов для определенного организма-хозяина. В настоящем документе определение "оптимизированный" относится к полинуклеотидам, которым методами генетической инженерии придана способность к усиленной экспрессии у данного вида живых организмов. Для получения кодон-оптимизированных полинуклеотидов. кодирующих ротавирусные полипептиды, последовательность ДНК ротавирусного гена может быть модифицирована, чтобы: 1) содержать кодоны, предпочтительные для генов с высоким уровнем экспрессии в экспрессионной системе данных клеток-хозяев (например, бактериальных); 2) иметь содержание A+T или G+C близкое к обычно имеющему место у данных клеток-хозяев; 3) образовывать инициаторную последовательность указанных клеток-хозяев; 4) исключить последовательности, обусловливающие дестабилизацию, деградацию и терминацию PHK, или образовывать вторичную структуру типа "шпилька", усиленная экспрессия ротавирусного белка в экспрессионной системе указанных клеток-хозяев может достигаться с учетом распределения частоты использования кодонов у прокариот.

Степень идентичности двух сравниваемых аминокислотных последовательностей может быть установлена с помощью программы BLAST с матрицей попарных сравнений BLOSUM62 NCBI (Национального центра биотехнологической информации, Бетесда, шт. Мэриленд, США) с использованием стандартных параметров (см., например, алгоритмы BLAST или BLASTX на сервере NCBI, а так же работу Altschul et al.). В настоящем документе алгоритм или BLAST, или BLASTX и матрица BLOSUM62 обозначаются словом "blasts".

Термин "идентичность" применительно к последовательностям относится к числу положений с одинаковыми нуклеотидами или аминокислотами, деленному на число нуклеотидов или аминокислот в наиболее короткой из сравниваемых двух последовательностей. Выравнивание двух последовательностей определяют согласно алгоритму Уилбура-Липмана (Wilbur, Lipman), например, взяв размер окна 20 нуклеотидов, длину слова 4 нуклеотида и штраф за пробел 4. Компьютерный анализ и интерпретацию данных включая выравнивание можно осуществить, используя имеющиеся в продаже программы (например, Intelligenetics^{тм} Suite, Intelligenetics Inc. CA). Когда говорят, что последовательности РНК сходны или имеют степень идентичности последовательностей, или гомологию с последовательностями ДНК, тимидин (Т) в последовательностях ДНК считается эквивалентным урацилу (U) в последовательности РНК входят в объем данного изобретения; их можно вывести их последовательностей ДНК, полагая тимидин (Т) в последовательностях ДНК эквивалентным урацилу (U) в последовательностях РНК.

Идентичность или сходство двух аминокислотных последовательностей или идентичность двух нуклеотидных последовательностей можно определять, используя пакет программ Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Карлсбад, штат Калифорния, США).

В работах перечисленных ниже авторов предлагаются алгоритмы для сравнения и определения относительной идентичности или гомологии последовательностей; для определения процента гомологии или идентичности дополнительно к изложенному выше (или вместо него) можно использовать рекомендации, данные в работах этих авторов:

Needleman SB and Wunsch CD; Smith TF and Waterman MS; Smith TF, Waterman MS and Sadler JR; Feng DF and Dolittle RF; Higgins DG and Sharp PM; Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ; and, Devereux J, Haeberlie P and Smithies O. Опытный специалист в данной области техники может обойтись без ненужного экспериментирования, используя при опредекелении процента гомологии также многие другие программы или работы.

Реакции гибридизации можно проводить в условиях различной степени строгости. Условия, увеличивающие строгость гибридизации, хорошо известны (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", второе издание (Sambrook et al., 1989).

Данное изобретение также охватывает ротавирусные полинуклеотиды, содержащиеся в векторных молекулах или экспрессионных векторах и функционально связанные с промоторными элементами и при необходимости с энхансерами.

Термин "вектор" в настоящем документе относится к рекомбинантным плазмидам (РНК или ДНК) или вирусам, содержащим гетерологичный полинуклеотид, который должен быть доставлен в клеткумишень in vitro либо in vivo. Этот гетерологичный полинуклеотид может включать нуклеотидную последовательность, нужную для профилактики или лечения и при необходимости он может быть представлен экспрессионной кассетой. В контексте данного изобретения вектор не обязательно способен к репликации в конечной клетке-мишени или организме пациента. Термин "вектор" включает клонирующие и ви-

русные векторы.

Термин "рекомбинантный" означает, что данный полинуклеотид является полностью или частично синтетическим и не встречается в природе или связан с другим полинуклеотидом в конструкции, не встречающейся в природе.

Термин "гетерологичный" означает, что данный полинуклеотид происходит из объекта, генетически отличного от того объекта, с которым проводится сравнение. Например, с помощью методов генетической инженерии полинуклеотид может быть включен в плазмиду или вектор, происходящий из другого источника, и тогда он является гетерологичным. Промотор, отделенный от своей природной кодирующей последовательности и функционально связанный с кодирующей последовательностью, отличной от той, природной, является гетерологичным промотором

Полинуклеотиды по данному изобретению могут содержать дополнительные последовательности, например, дополнительные кодирующие последовательности в пределах той же транскрипционной единицы; регуляторные элементы, например, промоторы; участки связывания с рибосомой; нетранслируемые области (5'-UTR, 3'-UTR); терминаторы транскрипции; сайты полиаденилирования; дополнительные транскрипционные единицы, регулируемые тем же или иным промотором; последовательности, обеспечивающие клонирование, экспрессию, гомологичную рекомбинацию и трансформацию клетки-хозяина; а также любые другие подобные элементы, если они желательны для воплощения данного изобретения.

В векторе по данному изобретению предпочтительно имеются элементы, нужные для экспрессии ротавирусного полипептида, антигена, эпитопа или иммуногенного агента. Как минимум вектор содержит кодон инициации трансляции (ATG), стоп-кодон и промотор, а при необходимости также последовательность polyA - в случае некоторых векторов, например, плазмид и ряда вирусных векторов (например, отличных от поксвирусов). Когда полинуклеотид по данному изобретению кодирует фрагмент полипептида, например ротавирусного полипептида, в векторе предпочтительно инициаторный кодон ATG помещается на 5'-конце рамки считывания, а стоп-кодон - на ее 3'-конце. Могут присутствовать и другие элементы для регуляции экспрессии, например, энхансеры, стабилизирующие последовательности, интроны и сигнальные последовательности, нужные для секреции белка-продукта.

Данное изобретение относится также к препаратам, содержащим векторы (например, экспрессионные векторы), например, к терапевтическим композициям. Такие препараты могут включать один или более векторов, например, экспрессионных векторов, например, векторов для экспрессии in vivo, кодирующих и обеспечивающих экспрессию одного или более ротавирусных полипептидов, антигенов, эпитопов или иммуногенных агентов. В одном из воплощений данного изобретения предлагаемый вектор содержит (и обеспечивает экспрессию) полинуклеотид, включающий полинуклеотид, кодирующий и/или обеспечивающий экспрессию ротавирусного гена, эпитопа или иммуногенного агента, в фармацевтически (для людей и животных) приемлемом носителе, эксципиенте или растворителе. Таким образом, по одному из воплощений данного изобретения другой вектор (векторы) в указанном препарате содержит (содержат) полинуклеотид, кодирующий и при соответствующих обстоятельствах экспрессирующих один или более других белков помимо ротавирусного полипептида, антигена, эпитопа или иммуногенного агента - например, гемагглютинин, белок капсида, нейраминидазу, нуклеопротеин, неструктурный белок, энтеротоксин - или их фрагменты; или указанный вектор состоит в основном или целиком из указанных элементов.

В другом воплощении данного изобретения предлагаемый вектор (векторы) в препарате содержит полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий один или более белков или фрагментов ротавирусного полипептида, антигена, эпитопа или иммуногенного агента полинуклеотид; или указанный вектор состоит в основном либо целиком из указанных элементов. В другом воплощении данного изобретения предлагаемый препарат содержит один, два или более векторов, содержащих полинуклеотиды, кодирующие и обеспечивающие экспрессию, предпочтительно in vivo, ротавирусных полипептидов, антигенов, гибридных (слитых) белков или их эпитопов. Данное изобретение также направлено на смеси векторов, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие и экспрессирующие различные ротавирусные полипептиды, антигены, эпитопы, гибридные (слитые) белки или иммуногенные агенты, например, ротавирусные полипептиды, антигены, эпитопы или иммуногенные агенты различных видов живых организмов, включающих (но не ограничивающихся перечисленным здесь) людей, свиней, коров и другой крупный рогатый скот, собак, кошек и птиц.

В еще одном воплощении данного изобретения экспрессионный вектор является плазмидным, в частности, для экспрессии in vivo. В одном из конкретных примеров (не имеющем ограничительного характера) в качестве вектора для внедрения полинуклеотидной последовательности могут использоваться плазмиды pVR1020 или 1012 (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, см., например, патенты США №№ 5846946 и 6451769). Плазмида pVR1020 происходит из плазмиды pVR1012 и содержит человеческую сигнальную последовательность tPA. В одном из воплощений данного изобретения человеческая сигнальная последовательность tPA содержит аминокислоты с М(1) по S(23) в последовательности, зарегистрированной в базе данных Genbank под номером HUMTPA14. В другом конкретном примере (не имеющем ограничительного характера) указанная плазмида, используемая как вектор для внедрения полинуклеотидной последовательности, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирую-

щую сигнальный пептид лошадиного инсулиноподобного фактора роста IGF1 с аминокислотного остатка M(24) до аминокислотного остатка A(48) в последовательности, зарегистрированной в базе данных Genbank под номером U28070. Дополнительная информация о ДНК-плазмидах, которую можно использовать для консультирования или осуществления на практике, имеется, например, в патентах США № 6852705; 6818628; 6586412; 6576243; 6558674; 6464984; 6451770; 6376473 и 6221362.

Термин "плазмида" в настоящем документе охватывает любые транскрипционные единицы ДНК, содержащие полинуклеотид по данному изобретению и элементы, необходимые для его экспрессии in vivo в клетке или клетках нужного организма-хозяина или мишени; в этой связи следует отметить, что сверхскрученные или несверхскрученные кольцевые, а также в линейной форме плазмиды входят в объем данного изобретения.

Каждая плазмида в дополнение к полинуклеотиду, кодирующему ротавирусный полипептид, антиген, эпитоп или иммуногенный агент, при необходимости содержит (или состоит в основном из указанных элементов) слитую с ним последовательность, кодирующую гетерологичный пептид, вариант, аналог или фрагмент, функционально связанную с промотором или регулируемую промотором, или зависимую от промотора. Вообще предпочтительно использовать сильные промоторы, функциональные в эукариотических клетках. Таким сильным промотором может быть (не ограничиваясь перечисленным здесь) промотор предранних генов цитомегаловируса (CMV-IE) человеческого или мышиного происхождения или при необходимости иного происхождения, например, из морских свинок или крыс.

В более общих чертах промотор может быть вирусного либо клеточного происхождения. Сильным вирусным промотором, отличным от CMV-IE, который можно использовать для осуществления данного изобретения, является промотор ранних/поздних генов вируса SV40 или промотор LTR вируса саркомы Рауса. Сильным клеточным промотором, который можно использовать для осуществления данного изобретения, является промотор какого-либо гена цитоскелета, например, промотор гена десмина (Kwissa et al., 2000) или промотор гена актина (Miyazaki et al., 1989).

Что касается сигнала полиаденилирования (polyA) для плазмид и вирусных векторов, отличных от поксвирусных, можно использовать сигнал полиаденилирования гена гормона роста крупного рогатого скота (bGH) (см. патент США № 5122458) или гена β-глобина кролика, или SV40.

Под клеткой-хозяином понимается прокариотическая либо эукариотическая клетка, которая генетически изменена или способна к генетическому изменению путем введения экзогенного полинуклеотида, например, рекомбинантной плазмиды или вектора. Применительно к генетически измененым клеткам данный термин относится как к клеткам, которые были изменены первыми, так и к их потомкам.

Способы применения и изделие

Данное изобретение включает следующие воплощения предлагаемого способа. В одном из воплощений раскрывается способ вакцинации животных, включающий введение животному композиции, содержащей вектор, в составе которого имеется нуклеотидная последовательность, кодирующая ротавирусный полипептид или его фрагмент, или его вариант, и фармацевтически (для людей и животных) приемлемый носитель, эксципиент или растворитель, в одном из вариантов этого воплощения способа по данному изобретению животным является свинья.

В одном из воплощений данного изобретения применяется такой режим вакцинации, когда проводят несколько иммунизации разными вакцинными препаратами ("прайм-буст"); при этом делается по меньшей мере одно первичное введение и по меньшей мере одна повторная иммунизация с использованием по меньшей мере одного общего полипептида, антигена, эпитопа или иммуногенного агента. Обычно иммунологическая композиция или в акцина, используемая для первичного введения отличается от тех, что используются для повторной иммунизации. Однако следует отметить, что и для первичного введения и для повторной иммунизации можно использовать одну и ту же композицию. Такой режим введения вакцины называется "прайм-буст".

Режим прайм-буста включает по меньшей мере одно первичное введение и по меньшей мере одну повторную иммунизацию с использованием по меньшей мере одного общего полипептида и/или его вариантов, или его фрагментов. Вакцина, используемая для первичного введения, может отличаться от тех препаратов, которые используются для последующего усиления иммунного ответа. Первичное введение может происходить в один или более приемов. Повторное введение также может происходить в один или более приемов.

Объем дозы композиций по данному изобретению для видов-мишеней, являющихся млекопитающими, например, объем дозы для свиньи (как молодых особей, так и взрослых) в случае композиции на основе вирусного вектора, например, отличного от поксвирусного, составляет, как правило, от около 0,1 до около 2,0 мл, от около 0,1 до около 1,0 мл и от около 0,5 до около 1,0 мл.

Эффективность вакцин можно оценивать через около 2-4 недели после последней иммунизации, подвергая животных, например, свиней, контакту с вирулентным штаммом ротавируса. При проверке эффективности вакцины для заражения животных используются как гомологичные, так и гетерологичные штаммы. Животное можно заражать путем внутримышечной или подкожной инъекции, путем использования аэрозольной формы, интраназально, интраокулярно, интратрахеально и/или перорально. Инфицирующая доза вируса может составлять около $10^{5-8} \, \text{EID}_{50}$, TCID_{50} или $10^{3-8} \, \text{геномных}$ эквивалентов

(по данным количественной полимеразной цепной реакции) в объеме, зависящем от пути введения. Например, если введение осуществляется воздушно-капельным путем, то суспензия вируса переводится в аэрозольную форму так, чтобы получились капли 1-100 мкм. Если введение осуществляется интраназально, интратрахеально или перорально, то объем инфицирующей дозы вируса составляет около 0,5 мл, 1-2 мл и 5-10 мл соответственно. На протяжении 14 суток после заражения животных ежедневно обследуют на предмет обнаружения клинических признаков, например, обезвоживания, поноса, неоформленного или водянистого стула, смерти и/или потери или отсутствия прироста массы тела, выделения вируса. Кроме того, группы особей можно умерщвлять и проводить патологоанатомическое исследование на предмет обнаружения поражения кишечника и атрофии кишечных ворсинок. У всех подопытных особей после заражения можно также брать мазки из прямой кишки и делать анализ кала с целью выделения или количественного определения, или выявления вируса. Присутствие или отсутствие вирусных антигенов в тканях кишечника или в экскрементах можно устанавливать с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (qRT-PCR). До и после заражения у животных можно брать образцы крови и определять присутствие антител, специфичных к ротавирусам.

Композиции, включающие рекомбинантные антигенные полипептиды по данному изобретению, используемые для иммунизации в режиме прайм-буста, содержатся в фармацевтически или ветеринарно приемлемом носителе, разбавителе или ином вспомогательном веществе. Протоколы по данному изобретению защищают животных от ротавирусов и/или предотвращают прогрессирование заболевания у зараженных особей.

Предлагаемый препарат предпочтительно вводится с интервалом 1-6 недель. Предпочтительная продолжительность интервала между введениями составляет 3-5 недель, оптимально 4 недели. В одном из воплощений данного изобретения предусматривается ежегодное повторение иммунизации. На момент первого введения возраст подопытных животных, например, свиней, может быть по меньшей мере 8 недель.

Специалистам в данной области техники следует учесть, что настоящее описание представляется в качестве примера и данное изобретение им не ограничивается. Базируясь на настоящем описании и на знаниях в данной области техники, опытный специалист может определить число введений, путь введения и дозы, нужные для каждого протокола иммунизации без излишнего экспериментирования.

По данному изобретению предполагается по меньшей мере одно введение животному достаточного количества терапевтической композиции, приготовленной по данному изобретению. Например, это достаточное количество может составлять от около 10 до около 300 мкг белка. В одном из воплощений данного изобретения в достаточном количестве терапевтической композиции присутствует по 100 мкг каждого из трех различных белков ротавируса группы С. Подопытное животное может быть самцом, самкой, беременной самкой и новорожденным. Введение терапевтической композиции возможно различными путями, включая (но не ограничиваясь перечисленным здесь) внутримышечные (ІМ), интрадермальные (ID), интраперитонеальные (IP) или подкожные (SC) инъекции, или же интраназальное либо пероральное введение. Терапевтические композиции по данному изобретению можно также вводить с помощью безыгольного инъектора, например Pulse Needle Free (производство Pulse Needlefree, Ленекса, шт. Канзас, США), Pigiet, Dermojet, Biojector, Avijet (производство Merial, шт. Гавайи, США), Vetjet или Vitajet (производство Віојест, шт. ОЛрегон, США). Для введения плазмидных композиций можно также использовать другой подход -электропорацию (см., например, Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; PCT Application No. WO 99/01158). В другом воплощении данного изобретения предлагаемая терапевтическая композиция вводится в организм животного путем "бомбардировки" частицами золота или с помощью генной пушки. В предпочтительном воплощении данного изобретения подопытным животным является свинья, собака, хорек или тюлень.

Другое воплощение данного изобретения представляет собой набор для практического осуществления способа возбуждения и индуцирования иммунологической или защитной реакции у животных против ротавируса; оно включает ротавирусную субъединичную иммунологическую композицию или вакцину и инструкции для практического осуществления способа доставки указанного препарата в количестве, эффективном для возбуждения иммунного ответа у животного.

Другое воплощение данного изобретения представляет собой набор для практического осуществления способа индуцирования иммунологической или защитной реакции у животных против ротавируса; оно включает композицию или вакцину, содержащую ротавирусный полипептид или антиген по данному изобретению и инструкции для практического осуществления способа доставки указанного препарата в количестве, эффективном для возбуждения иммунного ответа у животного.

В еще одном своем аспекте данное изобретения относится к набору для вакцинации в режиме прайм-буста, описанному выше в настоящем документе. Такой набор может содержать по меньшей мере две емкости: первая содержит вакцину или композицию для первичной вакцинации по данному изобретению, а вторая емкость содержит вакцину или композицию для повторной иммунизации с целью усиления иммунного ответа (бустер-иммунизации). Такой набор предпочтительно содержит дополнительную первую или вторую емкость для дополнительной первичной вакцинации или для дополнительной бустер-иммунизации.

Специалистам в данной области техники хорошо известны фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители или разбавители, или иные вспомогательные вещества. Например, фармацевтически или ветеринарно приемлемым носителем или разбавителем, или эксципиентом может служить физиологический раствор (0,9%-ный раствор хлорида натрия) или фосфатный буферный раствор. Другие фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители или разбавители, или иные вспомогательные вещества, которые и использовать при осуществлении способов по данному изобретению, включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) поли-(L-глутамат) или поливинилпирролидон. Фармацевтически или ветеринарно приемлемым носителем или разбавителем, или эксципиентом может быть любое вещество или комбинация веществ, способствующая введению вектора (или белка, экспрессия которого обеспечивается вектором по данному изобретению in vitro); предпочтительно носитель или разбавитель, или иное вспомогательное вещество может способствовать трансфекции и/или улучшать сохранность вектора (или белка). Дозы и их объемы обсуждаются в настоящем документе в общем описании, из которого вместе с имеющимися знаниями и информацией специалист в данной области техники может их определить без излишнего экспериментирования.

Предпочтительные для плазмид катионные липиды, содержащие соли четвертичного аммония" (но подходят не только эти соединения), имеют следующую формулу:

$$\begin{array}{c} & \text{CH}_3 \\ \mid \ ^+ \\ \text{R}_1 - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{N} - \text{R}_2 - \text{X} \\ \mid & \mid \\ \text{OR}_1 & \text{CH}_3 \end{array}$$

где R_1 представляет насыщенный или ненасыщенный неразветвленный алифатический радикал, содержащий 12-18 атомов углерода, R_2 представляет другой алифатический радикал, содержащий 2-3 атома углерода, X представляет гидроксильную группу или аминогруппу, например N-(2-гидроксиэтил)-N,N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)-1-пропанаммоний (DMRIE). В другом воплощении данного изобретения указанный катионный липид может быть связан с нейтральным липидом, например диолеоилфосфатидил-этаноламином (DOPE).

Из этих катионных липидов предпочтителен DMRIE (см. публикацию WO 96/34109), предпочтительно связанный с нейтральным липидом, предпочтительно DOPE (см. Behr, 1994), с образованием DMRIE-DOPE.

При наличии DOPE молярное отношение DMRIE:DOPE предпочтительно составляет от (около 95: около 5) до (около 5: около 95), более предпочтительно (около 1: около 1), например 1:1.

В другом воплощении данного изобретения фармацевтически или ветеринарно приемлемым носителем или разбавителем, или эксципиентом может служить эмульсия типа "вода в масле". Примеры подходящих эмульсий типа "вода в масле" включают вакцинные эмульсии на масляной основе, стабильные и жидкие при 4°С, которые содержат 6-50% (объем/объем) водной фазы, содержащей антиген (предпочтительно 12-25% (объем/объем)); и 50-94% (объем/объем) масляной фазы, содержащей полностью или частично не метаболизируемое масло (например, минеральное масло - скажем, вазелиновое) и/или метаболизируемое масло (например, растительное масло или жирные кислоты, эфиры многоатомных спиртов или этилового спирта); 0,2-20% (частей на объем) поверхностно-активного агента, предпочтительно 3-8% (частей на объем), причем последний полностью или частично представляет собой смесь либо эфиры полиглицерина (указанные эфиры полиглицерина предпочтительно являются полиглицерол-(поли)рицинолеатами), либо этоксилированное касторовое масло, либо гидрогенизированное полноксиэтиленом касторовое масло. Примеры поверхностно-активных веществ, которые можно использовать в эмульсии типа "вода в масле" включают этоксилированные эфиры ангидросорбита (например, полиоксиэтилен(20)-сорбитан-моноолеат, или TWEEN 80® производства AppliChem, Inc., Чешир, штат Коннектикут, США) и эфиры ангидросорбита (например, сорбитан-моноолеат, или SPAN 80® производства Sigma Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США). В отношении эмульсий типа "вода в масле" см. также патент США № 6919084. В некоторых воплощениях данного изобретения водная фаза, включающая антиген, содержит солевой раствор, включающий один или более забуферивающих агентов. Примером подходящего в этом смысле буферного раствора является фосфатный буфер с хлоридом натрия (РВS). В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения эмульсия типа "вода в масле" может быть тройной эмульсией вода/масло/вода (см. патент США № 6358500). Примеры других подходящих эмульсий описаны в патенте США № 7371395.

Иммунологические композиции и вакцины по данному изобретению могут содержать один или более адъювантов (или состоять в основном из них). Подходящими для практического осуществления данного изобретения адъювантами являются: (1) полимеры акриловой или метакриловой кислоты, малеиновый ангидрид и полимеры с алкенильными группами; (2) иммуностимулирующие последовательности (ISS), например, олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие один или более неметилированных элементов СрG (см. Klinman et al., 1996; WO 98/16247); (3) эмульсии типа "масло в воде", например, эмульсия SPT, описанная на стр. 147 работы "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", М. Powell, М. Newman, Plenum Press 1995, и эмульсия MF59, описанная на стр. 183 той же работы; (4) катионные липи-

ды, содержащие соли четвертичного аммония, например, диметилдиоктадециламмоний (DDA); (5) цитокины; (6) гидроксид алюминия или фосфат алюминия; (7) сапонин или (8) другие адъюванты, обсуждаемые в любой из цитируемых в настоящем документе работ и включаемые в данную заявку путем отсылки, или (9) любые комбинации или смеси указанных агентов.

Эмульсия типа "масло в воде" (3), которая особенно подходит для вирусных векторов, может быть приготовлена на основе легкого вазелинового масла (по Европейской фармакопее); изопреноидного масла, например сквалена; масла, полученного в результате олигомеризации алкенов, например изобутена или децена; эфиров кислот или спиртов с неразветвленной алкильной группой, например растительных масел, этилолеата, пропиленгликоля, ди(каприлат/капрата), глицерол-три(каприлат/капрата) и пропиленгликольолеата, или эфиров разветвленных жирных спиртов или кислот, особенно эфиров изостеариновой кислоты.

Для образования эмульсии масло используется в сочетании с эмульгирующими агентами. Эмульгирующими агентами могут быть неионные поверхностно-активные вещества, например эфиры ангидросорбита (сорбитана), маннита (например, безводный маннитолеат), глицерина, полиглицерина или пропиленгликоля, с одной стороны, и олеиновой, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислот, с другой стороны, причем указанные эфиры при необходимости этоксилированы, или блоксополимеры полиоксипропилена и полиоксиэтилена, например плюроники (например, L121).

Из числа адъювантных полимеров типа (1) предпочтительны полимеры поперечно-сшитой акриловой или метакриловой кислоты, особенно поперечно-сшитые полиалкениловыми эфирами Сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны под названием "карбомеры" (Европейская фармакопея, Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). Специалист в данной области техники может также обратиться к патенту США № 2909462, в котором предлагаются такие акриловые полимеры, поперечно-сшитые полигидроксильным соединением с по меньшей мере тремя гидроксильными группами, предпочтительно, чтобы было не более восьми таких групп, причем атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных групп замещены ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по меньшей мере два атома углерода. Предпочтительны такие радикалы, которые содержат 2-4 атома углерода, например, винилы, аллилы и другие ненасыщенные по этилену группы, ненасыщенные радикалы могут также содержать другие заместители, например, метил. Особенно подходят продукты, имеющиеся в продаже под названием "карбопол" (ВF Goodrich, Огайо, США), в которых поперечные сшивки образованы аллилсахарозой или алилпентаэритритолом. В их числе упомянем карбополы 974Р, 934Р и 97ІР.

Что касается сополимеров малеинового ангидрида и алкенильных производных, то предпочтителен EMA (Monsanto), который является неразветвленным или поперечно-сшитым сополимером этилена и малеинового ангидрида, например, с поперечными сшивками дивинилового эфира. Сошлемся также на работу J. Fields et al., 1960.

Со структурной точки зрения в полимерах акриловой или метакриловой кислот и ЕМА основной единицей является предпочтительно следующая:

$$\begin{array}{c|c}
R_1 & R_2 \\
 & | \\
 & C \\
 &$$

гле

- R₁ и R₂, которые могут быть одинаковыми или же различными, представляют Н или СНЗ

-x = 0 или 1, предпочтительно x = 1 - y = 1 или 2, причем x + y = 2.

В случае EMA x = 0 и y = 2, а в случае карбомеров x = y = 1.

Эти полимеры растворимы в воде или в физиологическом солевом растворе (20 г/л NaCl) и можно довести рН такого раствора до 7,3-7,4, например, с помощью едкого натра (NaOH); в результате получится адъювантный раствор, в который можно включить экспрессионный вектор (векторы). Концентрация полимера в конечной иммунологической или вакцинной композиции может варьировать от около 0,01 до около 1,5% (мас./об.), от около 0,05 до около 1% (мас./об.) и от около 0,1 до около 0,4% (мас./об.).

Цитокин или цитокины (5) в иммунологической или вакцинной композиции могут присутствовать в форме белка или же экспрессироваться в организме-хозяине вместе с иммуногеном или иммуногенами или их эпитопом (эпитопами). Последний вариант предпочтителен: цитокин (цитокины) экспрессируются тем же вектором, что и иммуноген (иммуногены) или эпитоп (эпитопы), либо отдельным вектором.

Данное изобретение включает получение таких комбинированных композиций; например, путем смешивания активных компонентов, предпочтительно вместе с адъювантом, носителем, цитокином и/или разбавителем.

Цитокины, которые можно использовать по данному изобретению, включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF), колониестимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF), интерферон α (IFN α), интерферон β (IFN β), интеррейкин-1 α (IL-1 α), интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-3), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-

8 (IL-8), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-11 (IL-11), интерлейкин-12 (IL-12), фактор некроза опухолей α (TNF α), фактор некроза опухолей β (TNF β) и трансформирующий фактор роста β (TGF β). Ясно, что эти цитокины можно вводить пациенту вместе и/или последовательно с иммунологической или вакцинной композицией по данному изобретению. Так, например, вакцина по данному изобретению может также содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая экспрессируется in vivo с образованием подходящего цитокина, например, цитокина, подходящего для данного организмахозяина, который подлежит вакцинации или в котором должна быть вызвана иммунологическая реакция (например, собачий цитокин в случае препаратов, которые предназначены для введения собакам).

Далее данное изобретение описывается с помощью следующих примеров, не имеющих ограничительного характера.

Примеры

Краткое изложение.

Вирусные вакцины обычно получают из цельных вирусных частиц, выделенных из образцов тканей зараженных животных путем его адаптации и размножения в куриных эмбрионах или in vitro в культуре клеток. Свиные ротавирусы группы С печально известны тем, что их трудно выделить обычными вирусологическими методами и притом в процессе адаптации к куриным эмбрионам или к росту культуры клеток происходит, как правило, нарушение антигенных структур, а в результате не достигается оптимальная продукция вакцины из выделенных цельных вирусных частиц. Поэтому был сконструирован экспрессионный вектор (pNPL2, SEQ ID NO: 15) для того, чтобы обеспечить продукцию вакцины, содержащей рекомбинантные белки VP4, VP6 и/или NSP4 свиного ротавируса группы С. Генетический материал ротавируса был получен с помощью полимеразной цепной реакции из клинического материала, предоставленного ветеринарами. В вектор pNPL2 добавили (способом, описанным в настоящем документе, и изображенным на фиг. 7) ген, кодирующий полипептиды/ субъединицы VP4 (18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40), VP6 (42, 44, 46, 48 или 50) или NSP4 (52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 или 72), в результате чего образовались векторы pNPL2-RotaC, каждый из которых кодировал и обеспечивал экспрессию в бактериальной клетке-хозяине участка NSP4, VP4 или же VP6. Эти векторы размножали в клетках E. coli SE1, в которых конститутивно экспрессируется белковый токсин ccdB, который убивает клетки, не содержащие вектор. Клетки выращивали и инактивировали, затем собирали экспрессировавшиеся рекомбинантные белки ротавируса и объединяли с адъювантом для использования в качестве неживой субъединичной белковой аутогенной вакцины. Вакцинные композиции по данному изобретению вызывали у свиней защитный иммунитет против ротавируса.

Пример 1. Конструирование вектора для аутогенного образования или промышленного производства ротавирусных субъединичных вакцин

Конструирование экспрессионных векторов pNPL1 и 2

Экспрессионный вектор pNPL2 (SEQ ID NO: 15) был получен из вектора pStaby1.2 (SEQ ID NO: 1) (Delphi Genetics, pStaby1.2 руководство пользователя, 2011) путем делеции гена устойчивости к ампициллину и вставки гена глутатион S-трансферазы (GST), чтобы способствовать процессингу "ниже" (в направлении 3') расположенных последовательностей в процессе образования белка-продукта. Этот вектор не содержит и не обеспечивает экспрессию никаких известных признаков вирулентности для млекопитающих, а кроме того в процессе его конструирования были удалены все гены устойчивости к антибиотикам. Вектор pNPL2 размножали в клетках SE1 E. coli,; вместе они составляют систему продукции хозяин/вектор штамма В E. coli (pStaby).

Рестрикционная карта pStaby1.2 представлена на фиг. 1; указано, что данный вектор содержит промотор T7 для обеспечения экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок. Эта плазмида содержит также ген ccdA, который кодирует нестабильный белок-антидот, подавляющий экспрессию стабильного белка ccdB, инактивирующего гиразу, который токсичен для клеток бактерий семейства Enterobacteriaceae. Белок ccdB кодируется геном ccdB, который имеется в хромосоме клеток SE1 E. coli (в плазмиде pStaby1.2 ген ccdB отсутствует). После трансформации благодаря наличию гена ccdA в указанной плазмиде успешно трансформированные клетки жизнеспособны, тогда как в клетках SE1, не несущих плазмиду, образуется токсин, а антидота к нему в них нет, и они, таким образом, не жизнеспособны.

Присутствовавший в векторе pStaby1.2 ген устойчивости к ампициллину не желателен при получении субъединичных ротавирусных вакцин, поэтому он был удален при помощи обратной полимеразной цепной реакции (фиг. 2). В табл. 1 представлен перечень праймеров, использовавшихся во всех описанных в настоящем документе способах. Конечный продукт ПЦР фосфорилировали и сшивали его концы с образованием кольцевой формы pNPL1 (SEQ ID NO: 14). Затем к pNPL1 добавляли последовательность, кодирующую глутатион-S-трансферазу (GST), для увеличения размеров экспрессирующегося белка и для облегчения процессинга в сторону 3¹/инлайн-анализа.

Последовательность GST амплифицировали путем ПЦР, используя pGEX4T.1 (GE Life Sciences) с праймерами #650 (SEQ ID NO: 2) и #651 (SEQ ID NO: 3); затем ампликон (SEQ ID NO: 16) расщепляли и клонировали в векторе NdeI-BamHI-линеаризованный pNPL1, в результате получали pNPL2 (фиг. 2-4). Вектор pNPL2 расщепляли рестриктазами BamHI и HindIII, так что в агарозном геле видно две полосы

(5682 п.н. и 25 п.н.).

Конструирование экспрессионного вектора pNPL3

ПНР проводили с праймерами KSN772 (SEQ ID NO: 77) и KSN773 (SEQ ID NO: 78), используя pNPL1 в качестве матрицы. Продукт ПЦР фосфорилировали и сшивали концы, так что получалась кольцевая форма pNPL3, содержащая гексагистидиновую метку (тэг). Гены NSP4, VP4, VP6 или VP7 можно клонировать в векторе pNPL3, расщепленном рестриктазами BamHI и HindIII, методом In-Fusion (с рекомбиназой), используя продукты ПЦР, образовавшиеся с использованием праймеров, представленных SEQ ID NO: 79-89. Вектор pNPL3 сходен с pNPL2, за тем исключением, что в pNPL3 нет последовательности, кодирующей глутатион-S-трансферазу (GST), вместо которой имеется последовательность, кодирующая гистидиновую метку (тэг), благодаря чему образуются гибридные (слитые) пептиды с гистидиновой меткой (тэгом) на N-конце.

Пример 2. Получение аутогенных ротавирусных субъединичных вакцин

Выделяли ротавирусные РНК, проводя очистку непосредственно клинических образцов, взятых у зараженных свиней, и использовали их для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RTPCR); при этом брали праймеры, специфичные для генов, кодирующих VP4 (праймеры SEQ ID NO: 10, 11), VP6 (праймеры SEQ ID NO: 12, 13) и NSP4 (праймеры SEQ ID NO: 8, 9). Каждая пара праймеров была такой, чтобы связываться с высококонсервативными участками на каждом из концов гена-мишени (фиг. 5), что обеспечивало амплификацию генов ротавирусов группы С из многих разных изолятов вируса. Если эти гены невозможно амплифицировать, используя праймеры, специфичные для генов ротавирусов группы C, представленные SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13, то специалист в данной области техники, применяя известные методы, сумеет подобрать и использовать другие праймеры. Например, можно использовать дегенерированные праймеры, при этом критические положения праймера (например, 3концевой нуклеотид) можно варьировать, чтобы нивелировать отклонения матрицы от консервативных последовательностей. Праймеры с последовательностями, представленными SEQ ID NO: 73, 74, 5 и 76, можно использовать, чтобы амплифицировать и клонировать последовательности VP4 в векторах pNPL1 и/или pNPL2. Последовательности SEQ ID NO: 73 и 74 можно использовать, чтобы амплифицировать последовательность VP4 и клонировать ее векторе TOPO. Затем можно использовать SEQ ID NO: 75 и 76, чтобы включить последовательность VP4 в вектор pNPL2 для последующего получения субъединичной вакцины.

У каждого праймера на 5'-конце имелась последовательность из 15 нуклеотидов, обеспечивающая встраивание в вектор pNPL2 в ходе последующей реакции по методу In-Fusion. Выделение и амплификация генов ротавирусов природного происхождения для получения донорной ДНК, предназначенной для использования в экспрессионной системе показаны на фиг. 4, 5 и 6. Когда в трансформированных клетках SE1 присутствует как ген ccdA (в векторе), так и ген ccdB (в клеточном геноме), клеточная культура жизнеспособна и стабильна и в ней экспрессируется ротавирусный ген. Не трансформированные клетки или клетки, подвергнутые удалению плазмид, нежизнеспособны. Внедрение гена характеризовали и проверяли путем секвенирования. Экспрессию белка проверяли путем электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS PAGE) (фиг. 8); этот метод позволяет определить приблизительную молекулярную массу, а именно 36 кДа (NSP4), 52 кДа (VP4), и 68 кДа (VP6). Такой подход предположительно применим к любому природному ротавирусному штамму, имеющему достаточную степень гомологии с праймерами клонирования в консервативных участках.

Для проведения эксперимента в большем масштабе отдельные колонии или множество одинаковых колоний переносили в среду LB (объем 10-200 000 мл). Когда оптическая плотность при 600 нм достигала 0,4-1,0, прибавляли изопропил-P-D-тиогалактопиранозид (IPTG, Sigma Aldrich, каталожный номер 15502 или эквивалентный продукт) до конечной концентрации 1 мМ. Культуры инкубировали еще 2-6 ч. Клетки можно культивировать в ферментере при следующих условиях:

- а) Температура культуры поддерживается 36° ± 3°C.
- b) Фильтрованный воздух подается под давлением с постоянной скоростью 0,1-300 л/мин.
- с) рН культуры поддерживается 7.4 ± 0.3 .
- d) Когда оптическая плотность при 600 нм достигает 0,4-1,0, прибавляют IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Культуры инкубируют еще 2-6 ч.

Процедура сбора продукта

Путем центрифугирования или фильтрации отделяли отработанную культуральную среду от клеток E. coli, и клетки концентрировали путем фильтрования, используя фильтр с порами 0,1-0,45 мкм. Концентрированные клетки подвергали лизису под действием реагента для экстракции белков B-PER (производство Thermo Scientific, каталожный номер 78248 или эквивалентный продукт), затем перемешивали или встряхивали раствор в течение 0,5-2 ч. Лизированные клетки концентрировали путем центрифугирования при 5000-10000 g в течение 15-30 мин или путем фильтрации, используя фильтр с порами 0,1-0,45 мкм; супернатант/фильтрат отбрасывали. Полученный осадок/концентрат ресуспендировали в буферном растворе для промывания (20 мМ Tris-HCL, 2 мМ EDTA, 0,1% Triton X-100, рН доводят до 7,5-8,5) путем перемешивания или встряхивания в течение 0,1-0,5 ч. Полученную суспензию концентрировали путем

центрифугирования при 5000-10000 g в течение 15-30 мин или путем фильтрации, используя фильтр с порами 0,1-0,45 мкм. Полученный осадок/концентрат ресуспендировали в буферном растворе для промывания (20 мМ Tris-HCL, 2 мМ EDTA, рН доводят до 7,5-8,5) путем перемешивания или встряхивания в течение 0,1-0,5 ч. Полученную суспензию концентрировали путем центрифугирования при 5000-10000 g в течение 15-30 мин или путем фильтрации, используя фильтр с порами 0,1-0,4 мкм. Концентрат суспендировали в растворе (8 М) мочевины (производства Sigma-Aldrich, каталожный номер U6504 или эквивалентный продукт) и перемешивали или встряхивали в течение 0,5-2 ч. Конечную суспензию разбавляли стерильным раствором PBS.

Вакцинные композиции

Собранные ротавирусные субъединицы объединяли с эмульсией TRIGEN ("масло в воде") и консервирующими агентами (гентамицин в концентрации <30,0 мкг/мл и амфотерицин В в концентрации <2,50 мкг/мл или полимиксин В в концентрации <30 мкг/мл). К этой смеси прибавляли а) гель гидроксида алюминия (ALHYDROGEL® "85", производства Brenntag Biosector, каталожный номер EMS 2485-2 или REHYDRAGEL HPA, производства Reheis, каталожный номер 203130070600, REHYDRAGEL LV, производства Reheis, каталожный номер 203120070602 или эквивалентные продукты), что обеспечивало от около 0,1 до около 0,5% Al_2O_3 в конечном продукте. Или же в состав композиции включали адъювант Quil A в соотношении 0,5-2,5% инактивированной жидкости с адъювантом "масло в воде". На долю адъювантов приходится от около 10 до около 50% конечного продукта.

Пример 3. Иммунизация свиней аутогенными ротавирусными субъединичными вакцинами Краткое изложение.

В исследовании эффективности вакцины взяли 48 самок свиней с хронической инфекцией ротавирусом С и сходным числом родов в прошлом. Из них 26 особей получали вместо вакцины плацебо (контроль), а 22 особи получали ротавирусную субъединичную вакцину, содержащую смесь VP4, VP6, NSP4 и эмульсию/дополнительные адъюванты. Состав вакцины был таков, что в каждой дозе вакцины содержалось около 100 мкг каждого из указанных белков (суммарно 300 мкг белка) и 10% Trigen. Вакцину вводили внутримышечно за 6 и 3 недели до опороса. До вакцинации и опороса у животных брали сыворотку крови, также брали сыворотку крови у поросят через 7 суток после опороса.

Результаты.

Среди поросят, родившихся от непривитых самок смертность составляла 21%, а в потомстве привитых свиней - 14% (то есть на 33% меньше). Заболеваемость среди детенышей привитых особей также была значительно ниже, чем непривитых. Кроме того, у поросят вакцинированных самок по сравнению с контрольными был значительно (p<0,05) более высокий титр антител (фиг. 9).

Пример 4. Эффективность новой вакцины на основе ротавирусов группы С в снижении частоты поноса и улучшении состояния у подсосных поросят

Краткое изложение.

Для оценки эффективности новой ротавирусной (ротавирусы группы С) вакцины было отобрано стадо из 3600 свиней с поросятами до отъема от вскармливания молоком. Стадо состояло из самок РІС L03, которые скрещивались с самцами линии 02. Животные получали корм, состав которого соответствовал установленным пищевым потребностям (NRC, 1998) или несколько превышал их. Свиноматок и подсвинок случайным образом распределяли на две группы: контрольную (СОN) и получавшую вакцину (Rota C RS VACC), с учетом даты спаривания и сходства физических показателей. Животные вакцинируемой группы получали 2 мл вакцины внутримышечно за 3 недели; за 3 и 5 недель или же за 3, 5 и 8 недель до опороса. В первые сутки после рождения всех поросят подсаживали к другим свиноматкам (перекрестное вскармливание). Ежедневно начиная с дня опороса и по 5-й день жизни характеризовали случаи поноса у поросят по балловой системе: 0 - отсутствие поноса, 1 - мало случаев, 2 - понос отмечается у 50% детенышей, 3 - понос отмечается более чем у 50% детенышей. Регистрировали число поросят, умерших из-за поноса. Не отмечалось разницы в частоте поноса или в связанной с ним смертности между потомством самок, получавших вакцину за 3 недели до опороса и за 3, 5 и 8 недель до опороса. А между контрольной группой и группой, получавшей вакцину за 3 и 5 недель до опороса, была заметная разница: во втором случае показатели были меньше (0,56 против 0,41; P < 0,05). Кроме того, в потомстве самок, вакцинированных за 3 и 5 недель до опороса, доля детенышей с поносом снижалась от 1-го дня жизни к 5-му. Можно заключить, что новая ротавирусная (ротавирусы группы С) вакцина не влияла на частоту случаев поноса и смерти из-за поноса у детенышей свиноматок, получавших вакцину один или три раза. Однако при вакцинации за 3 и 5 недель до опороса частота поноса у поросят снижалась.

Воздействие.

Свиноматок и подсвинок случайным образом распределяли на четыре группы: контрольную (CON) и три получавших вакцины (Newport) (VACC 1-3), с учетом даты спаривания и сходства физических по-казателей. В состав вакцины входило по 100 мкг каждого из следующих полипептидов: VP4 (SEQ ID NO: 42), VP6 (SEQ ID NO: 52) и NSP4 (SEQ ID NO: 18), происходивших из изолята 1 ротавирусов. Эти белковые субъединицы объединяли с 10% TRIGEN (состоявшего приблизительно из 1,6% полноксиэтиленсорбитан-моноолеата, 10% геля гидроксида алюминия, 38% воды/физиологического раствора, 45% очищенного минерального масла и 5% сорбитан-моноолеата) в объеме 2 мл. В группе VACC 1 животные

получали 2 мл вакцинного препарата внутримышечно за 3 недели до опороса; в группе VACC 2 - 2 мл вакцинного препарата внутримышечно за 5 недель до опороса и еще раз за 3 недели до опороса; в группе VACC 3 - 2 мл вакцинного препарата внутримышечно за 7, 5 и 3 недели до опороса. В первые сутки после рождения всех поросят подсаживали к другим свиноматкам (перекрестное вскармливание).

Сбор данных.

Частоту поноса по балловой системе определяли ежедневно с первого по пятый день жизни. Персоналу, собиравшему данные, изначальное распределение животных по группам не было известно. Регистрировали число поросят, умерших из-за поноса, в день смерти и включали эти данные в оценку смертности/заболеваемости.

Анализ данных.

Показатели смертности/заболеваемости и результаты оценки поноса по балловой системе анализировали с помощью обобщенной линейной модели (GLM). Учитывались также размещение и сходство животных.

Результаты.

В потомстве свиней, получавших две дозы вакцины до опороса, по сравнению с соответствующей контрольной группой смертность и заболеваемость поросят были меньше, хотя и не значительно. В потомстве свиней, получавших одну либо три дозы вакцины, разницы не отмечалось. В случае двукратной вакцинации балловый показатель поноса существенно отличался только в первый день после опороса. Никаких других различий в результатах оценки поноса ни в другие моменты времени, ни между тремя схемами вакцинации не наблюдалось. Интересно, что в этом исследовании эффект вакцины проявлялся при двукратной вакцинации, а при введении одной или трех доз - нет.

Таблица 2. Показатели состояния животных при двукратной вакцинации

	Контроль	Вакцинация	P
Смертность из-за поноса, число	37	23	
особей			
Смертность из-за поноса, %	1,72	1,02	0,19
Негативные последствия, %	0,69	0,92	0,53

Таблица 3. Средняя балловая оценка поноса в разные дни жизни поросят при

двукратной вакцинации

	Контроль Вакцинация Стандартная ошибка		P	
			среднего	
День 1	0,56	0,41	0,06	0,05
День 2	0,87	0,84	0,07	0,77
День 3	1,01	1,00	0,08	0,98
День 4	0,51	0,40	0,10	0,41
День 5	0,29	0,24	0,04	0,37

Таблица 4. Средняя балловая оценка поноса в разные дни жизни поросят при

трехкратной вакцинации

трежеритной викципиции							
	Контроль	Вакцинация	Стандартная ошибка среднего	P			
День 1	0,30	0,32	0,10	0,84			
День 2	0,61	0,40	0,12	0,15			
День 3	0,80	0,76	0,13	0,79			
День 4	0,25	0,15	0,09	0,32			
Лень 5	0.02	0.00	0.02	0.31			

Пример 5. Получение тройной слитой вакцины на основе ротавирусов группы С Краткое изложение.

Как говорилось выше, субъединичную вакцину Rota C получали путем клонирования трех разных генов (NSP4, VP4 и VP6) в трех разных векторах и выращивания трех разных культур Е. coli. Для упрощения процедуры все три гена включали в один плазмидный вектор (тандемно, в одной рамке считывания) что позволяло использовать одну серию культур Е. coli. Эту конструкцию получали путем клонирования генов Rota C (изолят 12-1260-5) в векторе pNPL2 (тэг GST в рамке считывания на N-конце). Три слитых гена (без тэга GST) имели последовательность, представленную SEQ ID NO: 94. Кодируемый ею полипротеин имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 95.

Материалы и методы.

РНК выделяли из клинических образцов, используя набор Qiagen для выделения вирусной РНК согласно инструкции производителя. Концентрацию и чистоту РНК проверяли, определяя поглощение при 260 и 280 нм с помощью спектрофотометра для микрообъемов Nanodrop. РНК считалась достаточно чистой, если отношение поглощения 260/280 составляло по меньшей мере 1,7. а концентрация РНК была по меньшей мере 50 нг/мкл. Ротавирусные гены амплифицировали (праймеры представлены в таблице 5) и продукты ПЦР очищали, используя набор для очистки продуктов ПНР Qiagen. Размеры продуктов ПЦР подтверждали путем гель-электрофореза (NSP4 - 300 п.н., VP4 - 750 п.н., VP6 - 1200 п.н.); концентрацию определяли с помощью Nanodrop.

Таблица 5. Праймеры для тройного слитого Rota C

			, , P
SEQ ID	Обозначение	Ориентация	Последовательность
8	KSN652	NSP4	GGTTCCGCGTGGATCCATCACCTCAAAAACTG
		прямой	
13	KSN657	VP6	GTGCGGCCGCAAGCTTCTACATCACCATTCTCTTC
		обратный	
96	KSN859	NSP4	AAGTGAGGACGCCCTTAGACAAACTTCCGTCTCC
		обратный	
97	KSN860	VP4	AGGGCGTCCTCACTTTATC
		прямой	
98	KSN861	VP4	TGAAAACAGCACGTCTAACACCATCATTCTC
		обратный	
99	KSN862	VP6	GACGTGCTGTTTCAATTGC
77	KSINOOZ	прямой	GACGIGEIGITICAATIGE
		примон	

Клонирование продуктов ПЦР в векторе pNPL2

Все три продукта клонировали в векторе одновременно. Реакцию проводили, как описано ниже, инкубировали 15 мин при температуре 50°С, после чего держали при 4°С. Для трансформации компетентных клеток CYS21 E. coli (Cat # GE-STCB-22) брали около 5 мкл продуктов реакции согласно рекомендациям производителя (Delphi Genetics). Рекомбинантные клетки E. coli, содержащие плазмиду, культивировали в среде LB. Последовательность плазмидной ДНК определяли, используя праймеры, указанные в табл. 5 наряду с праймерами к промотору T7 и терминатору T7 (стандартные свободные праймеры). Последовательности выравнивали, чтобы получилась большая открытая рамка считывания и проверяли точность; открытая рамка считывания содержала все три гена с тэгом GST (GST-NSP4-VP4-VP6; около 2,9 т.п.н.).

Таблица 6. Смесь для реакции лигирования

Объем,
мкл
3
0,5
1
1,5
2
2

Анализ экспрессии полипротеина NSP4-VP4-VP6

Экспрессию белка индуцировали в клетках штамма SE1 E. coli путем добавления IPTG по стандартным протоколам. Культуральную жидкость подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле, чтобы убедиться в экспрессии слитого белка (фиг. 12). Слитый белок присутствовал во фракции, растворимой в мочевине, но не во фракции, растворимой в B-PER (электрофорез в полиакриламидном геле; данные не показаны). Растворимый в мочевине слитый белок разбавляли водой в соотношении 1:20 и 1:40 и разгоняли в полиакриламидном геле для последующего вестерн-блоттинга. В качестве зонда использовали моноклональные антитела против GST (Genscript Cat A00866) в конечной концентрации 0,1 мкг/мл, следуя стандартному протоколу (фиг. 13).

Приведенное в настоящем документе подробное описание предпочтительных воплощений данного изобретения следует принимать к сведению с учетом того, что изложенное выше не ограничивает данное изобретение приведенными в этом описании конкретными деталями, поскольку возможно много очевидных вариантов, не отклоняющихся от сущности и объема изобретения.

Список последовательностей

<110>	Merial Bey, Russell Sirigireddy, K Hause, Benjami Simonson, Rand	n	последова		•	
<120>	РОТАВИРУСНАЯ С	убъединична:	Я ВАКЦИНА,	способ ее по	олучения и г	ТРИМЕНЕНИЕ
<130>	MER 2012-192					
<160>	99					
<170>	PatentIn versi	on 3.5				
<210> <211> <212> <213>	1 5932 ДНК Искусственная	последовате.	льность			
<220> <223>	pStaby1 полазм	ида				
<400>	1 atgg gacgcgccct	gtagcggcgc	attaagcgcg	acaaatataa	taattacaca	60
	gacc gctacacttg					120
	cgcc acgttcgccg					180
	attt agtgctttac					240
acgtag	tggg ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacgtt	300
ctttaa	tagt ggactcttgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggtctattc	360
ttttga	ttta taagggattt	tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	420
acaaaa	attt aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgttt	acaatttcag	gtggcacttt	480
tcgggg	aaat gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	540
tccgct	catg agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	600
gagtat	tcaa catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	660
ttttgc	tcac ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	720
agtggg	ttac atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	780
agaacg	tttt ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccg	840
tattga	cgcc gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	900
tgagta	ctca ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	960
cagtgc	tgcc ataaccatga	gtgataacac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	1020
aggacc	gaag gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga	1080
tcgttg	ggaa ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	1140
tgcagc	aatg gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	1200
ccggca	acaa ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	1260
ggccct	tccg gctggctggt	ttattgctga	taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	1320

cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	1380
gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	1440
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	1500
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	1560
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	1620
aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	1680
accgctacca	gcggtggttt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	1740
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	1800
ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	1860
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	1920
accggataag	gcgcagcggt	cgggctgaac	ggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttgga	1980
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgccacgct	2040
tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	2100
cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	2160
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcggagcc	tatggaaaaa	2220
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatgtt	2280
ctttcctgcg	ttatcccctg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgagctga	2340
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcgagtca	gtgagcgagg	aagcggaaga	2400
gcgcctgatg	cggtattttc	tccttacgca	tctgtgcggt	atttcacacc	gcatatatgg	2460
tgcactctca	gtacaatctg	ctctgatgcc	gcatagttaa	gccagtatac	actccgctat	2520
cgctacgtga	ctgggtcatg	gctgcgcccc	gacacccgcc	aacacccgct	gacgcgccct	2580
gacgggcttg	tctgctcccg	gcatccgctt	acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	2640
gcatgtgtca	gaggttttca	ccgtcatcac	cgaaacgcgc	gaggcagctg	cggtaaagct	2700
catcagcgtg	gtcgtgaagc	gattcacaga	tgtctgcctg	ttcatccgcg	tccagctcgt	2760
tgagtttctc	cagaagcgtt	aatgtctggc	ttctgataaa	gcgggccatg	ttaagggcgg	2820
ttttttcctg	tttggtcact	gatgcctccg	tgtaaggggg	atttctgttc	atgggggtaa	2880
tgataccgat	gaaacgagag	aggatgctca	cgatacgggt	tactgatgat	gaacatgccc	2940
ggttactgga	acgttgtgag	ggtaaacaac	tggcggtatg	gatgcggcgg	gaccagagaa	3000
aaatcactca	gggtcaatgc	cagcgcttcg	ttaatacaga	tgtaggtgtt	ccacagggta	3060
gccagcagca	tcctgcgatg	cagatccgga	acataatggt	gcagggcgct	gacttccgcg	3120
tttccagact	ttacgaaaca	cggaaaccga	agaccattca	tgttgttgct	caggtcgcag	3180
acgttttgca	gcagcagtcg	cttcacgttc	gctcgcgtat	cggtgattca	ttctgctaac	3240
cagtaaggca	accccgccag	cctagccggg	tcctcaacga	caggagcacg	atcatgcgca	3300
cccgtggggc	cgccatgccg	gcgataatgg	cctgcttctc	gccgaaacgt	ttggtggcgg	3360

		****			20002000	2420
		gcgagggcgt				3420
		cgaaagcggt				3480
		atgataaaga				3540
tgccccgcgc	ccaccggaag	gagctgactg	ggttgaaggc	tctcaagggc	atcggtcgag	3600
atcccggtgc	ctaatgagtg	agctaactta	cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgctt	3660
tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	3720
gcggtttgcg	tattgggcgc	cagggtggtt	tttcttttca	ccagtgagac	gggcaacagc	3780
tgattgccct	tcaccgcctg	gccctgagag	agttgcagca	agcggtccac	gctggtttgc	3840
cccagcaggc	gaaaatcctg	tttgatggtg	gttaacggcg	ggatataaca	tgagctgtct	3900
tcggtatcgt	cgtatcccac	taccgagata	tccgcaccaa	cgcgcagccc	ggactcggta	3960
atggcgcgca	ttgcgcccag	cgccatctga	tcgttggcaa	ccagcatcgc	agtgggaacg	4020
atgccctcat	tcagcatttg	catggtttgt	tgaaaaccgg	acatggcact	ccagtcgcct	4080
tcccgttccg	ctatcggctg	aatttgattg	cgagtgagat	atttatgcca	gccagccaga	4140
cgcagacgcg	ccgagacaga	acttaatggg	cccgctaaca	gcgcgatttg	ctggtgaccc	4200
aatgcgacca	gatgctccac	gcccagtcgc	gtaccgtctt	catgggagaa	aataatactg	4260
ttgatgggtg	tctggtcaga	gacatcaaga	aataacgccg	gaacattagt	gcaggcagct	4320
tccacagcaa	tggcatcctg	gtcatccagc	ggatagttaa	tgatcagccc	actgacgcgt	4380
tgcgcgagaa	gattgtgcac	cgccgcttta	caggcttcga	cgccgcttcg	ttctaccatc	4440
gacaccacca	cgctggcacc	cagttgatcg	gcgcgagatt	taatcgccgc	gacaatttgc	4500
gacggcgcgt	gcagggccag	actggaggtg	gcaacgccaa	tcagcaacga	ctgtttgccc	4560
gccagttgtt	gtgccacgcg	gttgggaatg	taattcagct	ccgccatcgc	cgcttccact	4620
ttttcccgcg	ttttcgcaga	aacgtggctg	gcctggttca	ccacgcggga	aacggtctga	4680
taagagacac	cggcatactc	tgcgacatcg	tataacgtta	ctggtttcac	attcaccacc	4740
ctgaattgac	tctcttccgg	gcgctatcat	gccataccgc	gaaaggtttt	gcgccattcg	4800
atggtgtccg	ggatctcgac	gctctccctt	atgcgactcc	tgcattagga	agcagcccag	4860
tagtaggttg	aggccgttga	gcaccgccgc	cgcaaggaat	ggtgcatgct	caccagtccc	4920
tgttctcgtc	agcaaaagag	ccgttcattt	caataaaccg	ggcgacctca	gccatccctt	4980
cctgattttc	cgctttccag	cgttcggcac	gcagacgacg	ggcttcattc	tgcatggttg	5040
tgcttaccag	accggagata	ttgacatcgt	atgccttgag	caactgatag	ctgtcgctgt	5100
caactgtcac	tgtaatacgc	tgcttcatgc	ctgcccctcc	cttttggtgt	ccaaccggct	5160
cgacgggggc	agcgcaaggc	ggtgcctccg	gcgggccact	caatgcttga	gtatactcac	5220
tagactttgc	ttcgcaaagt	cgtgaccgcc	tacggcggct	gcggcgccct	acgggcttgc	5280
tctccgggct	tcgccctgcg	cggtcgctgc	gctcccttgc	cagcccgtgg	atatgtggac	5340
gatggccgcg	agcggccacc	ggctggctcg	cttcgctcgg	cccgtggaca	acgcatgcaa	5400

ggagatggcg cccaacagtc ccccggccac ggggcctgcc accataccca cgccgaaaca	5460
agcgctcatg agcccgaagt ggcgagcccg atcttcccca tcggtgatgt cggcgatata	5520
ggcgccagca accgcacctg tggcgccggt gatgccggcc acgatgcgtc cggcgtagag	5580
gatcgagatc tcgatcccgc gaaattaata cgactcacta taggggaatt gtgagcggat	5640
aacaattccc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata catatggcta	5700
gcatgactgg tggacagcaa atgggtcgcg gatccgaatt cgagctccgt cgacaagctt	5760
gcggccgcac tcgagcacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga	5820
aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc ccttggggcc	5880
tctaaacggg tcttgagggg ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg at	5932
<210> 2 <211> 29 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<220> <223> GST прямой праймер NdeI	
<400> 2 gtccatatgt cccctatact aggttattg	29
<210> 3 <211> 30 <212> днк <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> GST обратный праймер BamHI	
<400> 3 gtcggatccg gatccacgcg gaaccagatc	30
<210> 4 <211> 28 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<220> <223> Ген AmpR, делеция, прямой праймер	
<400> 4 actcttcctt tttcaatatt attgaagc	28
<210> 5 <211> 28 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<220> <223> Ген Атрр, делеция, обратный праймер	
<400> 5 ctgtcagacc aagtttactc atatatac	28

<210> <211> <212> <213>	6 29 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	Верификация продукта ПЦР, прямой праймер	
<400> ctcgat	6 cccg cgaaattaat acgactcac	29
<210> <211> <212> <213>	7 29 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	Верификация продукта ПЦР, обратный праймер	
<400> cagcca	7 actc agcttccttt cgggctttg	29
<210> <211> <212> <213>	8 32 ⁽ ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	NSP4 прямой праймер с сайтом BamHI	
<400> ggttcc	8 gcgt ggatccatca cctcaaaaac tg	32
<210> <211> <212> <213>	9 37 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	NSP4 обратный праймер с сайтом HindIII	
<400> gtgcgg	9 ccgc aagctttcat agacaaactt ccgtctc	37
<210> <211> <212> <213>	10 35 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	VP4 прямой праймер с сайтом BamHI	
<400> ggttcc	10 gcgt ggatccaggg cgtcctcact ttatc	35
<210> <211> <212> <213>	11 35 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	VP4 обратный праймер с сайтом HindIII	

<400> 11 gtgcggccgc aagcttttat aacaccatca ttctc	35
<210> 12 <211> 35 <212> днк <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> VP6 прямой праймер с сайтом ВатНІ	
<400> 12 ggttccgcgt ggatccgacg tgctgttttc aattg	35
<210> 13 <211> 35 <212> днк <213> искусственная последовательность	
<220> <223> VP6 обратный праймер с сайтом HindIII	
<400> 13 gtgcggccgc aagcttctac atcaccattc tcttc	35
<210> 14 <211> 5071 <212> дНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> pNPL1 полазмида (pStaby1 без гена AmpR)	
<400> 14 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg	60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc	120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg	180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt	300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc	360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtct	600
gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa	660
aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt	720
ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt	780
ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg	840
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca	900
gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt	960

agcaccgcct	acatacctcg	ctctgctaat	cctgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	1020
taagtcgtgt	cttaccgggt	tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgcagcggtc	1080
gggctgaacg	gggggttcgt	gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	1140
gagataccta	cagcgtgagc	tatgagaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	1200
caggtatccg	gtaagcggca	gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	1260
aaacgcctgg	tatctttata	gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	1320
tttgtgatgc	tcgtcagggg	ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	1380
acggttcctg	gccttttgct	ggccttttgc	tcacatgttc	tttcctgcgt	tatcccctga	1440
ttctgtggat	aaccgtatta	ccgcctttga	gtgagctgat	accgctcgcc	gcagccgaac	1500
gaccgagcgc	agcgagtcag	tgagcgagga	agcggaagag	cgcctgatgc	ggtattttct	1560
ccttacgcat	ctgtgcggta	tttcacaccg	catatatggt	gcactctcag	tacaatctgc	1620
tctgatgccg	catagttaag	ccagtataca	ctccgctatc	gctacgtgac	tgggtcatgg	1680
ctgcgccccg	acacccgcca	acacccgctg	acgcgccctg	acgggcttgt	ctgctcccgg	1740
catccgctta	cagacaagct	gtgaccgtct	ccgggagctg	catgtgtcag	aggttttcac	1800
cgtcatcacc	gaaacgcgcg	aggcagctgc	ggtaaagctc	atcagcgtgg	tcgtgaagcg	1860
attcacagat	gtctgcctgt	tcatccgcgt	ccagctcgtt	gagtttctcc	agaagcgtta	1920
atgtctggct	tctgataaag	cgggccatgt	taagggcggt	tttttcctgt	ttggtcactg	1980
atgcctccgt	gtaaggggga	tttctgttca	tgggggtaat	gataccgatg	aaacgagaga	2040
ggatgctcac	gatacgggtt	actgatgatg	aacatgcccg	gttactggaa	cgttgtgagg	2100
gtaaacaact	ggcggtatgg	atgcggcggg	accagagaaa	aatcactcag	ggtcaatgcc	2160
agcgcttcgt	taatacagat	gtaggtgttc	cacagggtag	ccagcagcat	cctgcgatgc	2220
agatccggaa	cataatggtg	cagggcgctg	acttccgcgt	ttccagactt	tacgaaacac	2280
ggaaaccgaa	gaccattcat	gttgttgctc	aggtcgcaga	cgttttgcag	cagcagtcgc	2340
ttcacgttcg	ctcgcgtatc	ggtgattcat	tctgctaacc	agtaaggcaa	ccccgccagc	2400
ctagccgggt	cctcaacgac	aggagcacga	tcatgcgcac	ccgtggggcc	gccatgccgg	2460
cgataatggc	ctgcttctcg	ccgaaacgtt	tggtggcggg	accagtgacg	aaggcttgag	2520
cgagggcgtg	caagattccg	aataccgcaa	gcgacaggcc	gatcatcgtc	gcgctccagc	2580
gaaagcggtc	ctcgccgaaa	atgacccaga	gcgctgccgg	cacctgtcct	acgagttgca	2640
tgataaagaa	gacagtcata	agtgcggcga	cgatagtcat	gccccgcgcc	caccggaagg	2700
agctgactgg	gttgaaggct	ctcaagggca	tcggtcgaga	tcccggtgcc	taatgagtga	2760
gctaacttac	attaattgcg	ttgcgctcac	tgcccgcttt	ccagtcggga	aacctgtcgt	2820
gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	cggggagagg	cggtttgcgt	attgggcgcc	2880
agggtggttt	ttcttttcac	cagtgagacg	ggcaacagct	gattgccctt	caccgcctgg	2940
ccctgagaga	gttgcagcaa	gcggtccacg	ctggtttgcc	ccagcaggcg	aaaatcctgt	3000

ttgatggtgg	ttaacggcgg	gatataacat	gagctgtctt	cggtatcgtc	gtatcccact	3060
accgagatat	ccgcaccaac	gcgcagcccg	gactcggtaa	tggcgcgcat	tgcgcccagc	3120
gccatctgat	cgttggcaac	cagcatcgca	gtgggaacga	tgccctcatt	cagcatttgc	3180
atggtttgtt	gaaaaccgga	catggcactc	cagtcgcctt	cccgttccgc	tatcggctga	3240
atttgattgc	gagtgagata	tttatgccag	ccagccagac	gcagacgcgc	cgagacagaa	3300
cttaatgggc	ccgctaacag	cgcgatttgc	tggtgaccca	atgcgaccag	atgctccacg	3360
cccagtcgcg	taccgtcttc	atgggagaaa	ataatactgt	tgatgggtgt	ctggtcagag	3420
acatcaagaa	ataacgccgg	aacattagtg	caggcagctt	ccacagcaat	ggcatcctgg	3480
tcatccagcg	gatagttaat	gatcagccca	ctgacgcgtt	gcgcgagaag	attgtgcacc	3540
gccgctttac	aggcttcgac	gccgcttcgt	tctaccatcg	acaccaccac	gctggcaccc	3600
agttgatcgg	cgcgagattt	aatcgccgcg	acaatttgcg	acggcgcgtg	cagggccaga	3660
ctggaggtgg	caacgccaat	cagcaacgac	tgtttgcccg	ccagttgttg	tgccacgcgg	3720
ttgggaatgt	aattcagctc	cgccatcgcc	gcttccactt	tttcccgcgt	tttcgcagaa	3780
acgtggctgg	cctggttcac	cacgcgggaa	acggtctgat	aagagacacc	ggcatactct	3840
gcgacatcgt	ataacgttac	tggtttcaca	ttcaccaccc	tgaattgact	ctcttccggg	3900
cgctatcatg	ccataccgcg	aaaggttttg	cgccattcga	tggtgtccgg	gatctcgacg	3960
ctctccctta	tgcgactcct	gcattaggaa	gcagcccagt	agtaggttga	ggccgttgag	4020
caccgccgcc	gcaaggaatg	gtgcatgctc	accagtccct	gttctcgtca	gcaaaagagc	4080
cgttcatttc	aataaaccgg	gcgacctcag	ccatcccttc	ctgattttcc	gctttccagc	4140
gttcggcacg	cagacgacgg	gcttcattct	gcatggttgt	gcttaccaga	ccggagatat	4200
tgacatcgta	tgccttgagc	aactgatagc	tgtcgctgtc	aactgtcact	gtaatacgct	4260
gcttcatgcc	tgcccctccc	ttttggtgtc	caaccggctc	gacgggggca	gcgcaaggcg	4320
gtgcctccgg	cgggccactc	aatgcttgag	tatactcact	agactttgct	tcgcaaagtc	4380
gtgaccgcct	acggcggctg	cggcgcccta	cgggcttgct	ctccgggctt	cgccctgcgc	4440
ggtcgctgcg	ctcccttgcc	agcccgtgga	tatgtggacg	atggccgcga	gcggccaccg	4500
gctggctcgc	ttcgctcggc	ccgtggacaa	cgcatgcaag	gagatggcgc	ccaacagtcc	4560
cccggccacg	gggcctgcca	ccatacccac	gccgaaacaa	gcgctcatga	gcccgaagtg	4620
gcgagcccga	tcttccccat	cggtgatgtc	ggcgatatag	gcgccagcaa	ccgcacctgt	4680
ggcgccggtg	atgccggcca	cgatgcgtcc	ggcgtagagg	atcgagatct	cgatcccgcg	4740
aaattaatac	gactcactat	aggggaattg	tgagcggata	acaattcccc	tctagaaata	4800
attttgttta	actttaagaa	ggagatatac	atatggctag	catgactggt	ggacagcaaa	4860
tgggtcgcgg	atccgaattc	gagctccgtc	gacaagcttg	cggccgcact	cgagcaccac	4920
caccaccacc	actgagatcc	ggctgctaac	aaagcccgaa	aggaagctga	gttggctgct	4980
gccaccgctg	agcaataact	agcataaccc	cttggggcct	ctaaacgggt	cttgaggggt	5040

tttttgctga aaggaggaac tatatccgga t	5071
<pre><210> 15 <211> 5707 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность</pre>	
<220> <223> pNPL2 SEQ ID NO:15	
<pre><400> 15 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg</pre>	60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc	120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg	180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt	300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc	360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttattttc taaatacatt caaatatgta	540
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtct	600
gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa	660
aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt	720
ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt	780
ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg	840
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca	900
gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt	960
agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga	1020
taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc	1080
gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact	1140
gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga	1200
caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg	1260
aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt	1320
tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt	1380
acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatccctga $$	1440
ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac	1500
gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcctgatgc ggtatttct	1560
ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatatggt gcactctcag tacaatctgc	1620
tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg	1680

ctgcgccccg	acacccgcca	acacccgctg	acgcgccctg	acgggcttgt	ctgctcccgg	1740
catccgctta	cagacaagct	gtgaccgtct	ccgggagctg	catgtgtcag	aggttttcac	1800
cgtcatcacc	gaaacgcgcg	aggcagctgc	ggtaaagctc	atcagcgtgg	tcgtgaagcg	1860
attcacagat	gtctgcctgt	tcatccgcgt	ccagctcgtt	gagtttctcc	agaagcgtta	1920
atgtctggct	tctgataaag	cgggccatgt	taagggcggt	tttttcctgt	ttggtcactg	1980
atgcctccgt	gtaaggggga	tttctgttca	tgggggtaat	gataccgatg	aaacgagaga	2040
ggatgctcac	gatacgggtt	actgatgatg	aacatgcccg	gttactggaa	cgttgtgagg	2100
gtaaacaact	ggcggtatgg	atgcggcggg	accagagaaa	aatcactcag	ggtcaatgcc	2160
agcgcttcgt	taatacagat	gtaggtgttc	cacagggtag	ccagcagcat	cctgcgatgc	2220
agatccggaa	cataatggtg	cagggcgctg	acttccgcgt	ttccagactt	tacgaaacac	2280
ggaaaccgaa	gaccattcat	gttgttgctc	aggtcgcaga	cgttttgcag	cagcagtcgc	2340
ttcacgttcg	ctcgcgtatc	ggtgattcat	tctgctaacc	agtaaggcaa	ccccgccagc	2400
ctagccgggt	cctcaacgac	aggagcacga	tcatgcgcac	ccgtggggcc	gccatgccgg	2460
cgataatggc	ctgcttctcg	ccgaaacgtt	tggtggcggg	accagtgacg	aaggcttgag	2520
cgagggcgtg	caagattccg	aataccgcaa	gcgacaggcc	gatcatcgtc	gcgctccagc	2580
gaaagcggtc	ctcgccgaaa	atgacccaga	gcgctgccgg	cacctgtcct	acgagttgca	2640
tgataaagaa	gacagtcata	agtgcggcga	cgatagtcat	gccccgcgcc	caccggaagg	2700
agctgactgg	gttgaaggct	ctcaagggca	tcggtcgaga	tcccggtgcc	taatgagtga	2760
gctaacttac	attaattgcg	ttgcgctcac	tgcccgcttt	ccagtcggga	aacctgtcgt	2820
gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	cggggagagg	cggtttgcgt	attgggcgcc	2880
agggtggttt	ttcttttcac	cagtgagacg	ggcaacagct	gattgccctt	caccgcctgg	2940
ccctgagaga	gttgcagcaa	gcggtccacg	ctggtttgcc	ccagcaggcg	aaaatcctgt	3000
ttgatggtgg	ttaacggcgg	gatataacat	gagctgtctt	cggtatcgtc	gtatcccact	3060
accgagatat	ccgcaccaac	gcgcagcccg	gactcggtaa	tggcgcgcat	tgcgcccagc	3120
gccatctgat	cgttggcaac	cagcatcgca	gtgggaacga	tgccctcatt	cagcatttgc	3180
atggtttgtt	gaaaaccgga	catggcactc	cagtcgcctt	cccgttccgc	tatcggctga	3240
atttgattgc	gagtgagata	tttatgccag	ccagccagac	gcagacgcgc	cgagacagaa	3300
cttaatgggc	ccgctaacag	cgcgatttgc	tggtgaccca	atgcgaccag	atgctccacg	3360
cccagtcgcg	taccgtcttc	atgggagaaa	ataatactgt	tgatgggtgt	ctggtcagag	3420
acatcaagaa	ataacgccgg	aacattagtg	caggcagctt	ccacagcaat	ggcatcctgg	3480
tcatccagcg	gatagttaat	gatcagccca	ctgacgcgtt	gcgcgagaag	attgtgcacc	3540
gccgctttac	aggcttcgac	gccgcttcgt	tctaccatcg	acaccaccac	gctggcaccc	3600
agttgatcgg	cgcgagattt	aatcgccgcg	acaatttgcg	acggcgcgtg	cagggccaga	3660
ctggaggtgg	caacgccaat	cagcaacgac	tgtttgcccg	ccagttgttg	tgccacgcgg	3720

ttgggaatgt	aattcagctc	cgccatcgcc	gcttccactt	tttcccgcgt	tttcgcagaa	3780
acgtggctgg	cctggttcac	cacgcgggaa	acggtctgat	aagagacacc	ggcatactct	3840
gcgacatcgt	ataacgttac	tggtttcaca	ttcaccaccc	tgaattgact	ctcttccggg	3900
cgctatcatg	ccataccgcg	aaaggttttg	cgccattcga	tggtgtccgg	gatctcgacg	3960
ctctccctta	tgcgactcct	gcattaggaa	gcagcccagt	agtaggttga	ggccgttgag	4020
caccgccgcc	gcaaggaatg	gtgcatgctc	accagtccct	gttctcgtca	gcaaaagagc	4080
cgttcatttc	aataaaccgg	gcgacctcag	ccatcccttc	ctgattttcc	gctttccagc	4140
gttcggcacg	cagacgacgg	gcttcattct	gcatggttgt	gcttaccaga	ccggagatat	4200
tgacatcgta	tgccttgagc	aactgatagc	tgtcgctgtc	aactgtcact	gtaatacgct	4260
gcttcatgcc	tgcccctccc	ttttggtgtc	caaccggctc	gacgggggca	gcgcaaggcg	4320
gtgcctccgg	cgggccactc	aatgcttgag	tatactcact	agactttgct	tcgcaaagtc	4380
gtgaccgcct	acggcggctg	cggcgcccta	cgggcttgct	ctccgggctt	cgccctgcgc	4440
ggtcgctgcg	ctcccttgcc	agcccgtgga	tatgtggacg	atggccgcga	gcggccaccg	4500
gctggctcgc	ttcgctcggc	ccgtggacaa	cgcatgcaag	gagatggcgc	ccaacagtcc	4560
cccggccacg	gggcctgcca	ccatacccac	gccgaaacaa	gcgctcatga	gcccgaagtg	4620
gcgagcccga	tcttccccat	cggtgatgtc	ggcgatatag	gcgccagcaa	ccgcacctgt	4680
ggcgccggtg	atgccggcca	cgatgcgtcc	ggcgtagagg	atcgagatct	cgatcccgcg	4740
aaattaatac	gactcactat	aggggaattg	tgagcggata	acaattcccc	tctagaaata	4800
attttgttta	actttaagaa	ggagatatac	atatgtcccc	tatactaggt	tattggaaaa	4860
ttaagggcct	tgtgcaaccc	actcgacttc	ttttggaata	tcttgaagaa	aaatatgaag	4920
agcatttgta	tgagcgcgat	gaaggtgata	aatggcgaaa	caaaaagttt	gaattgggtt	4980
tggagtttcc	caatcttcct	tattatattg	atggtgatgt	taaattaaca	cagtctatgg	5040
ccatcatacg	ttatatagct	gacaagcaca	acatgttggg	tggttgtcca	aaagagcgtg	5100
cagagatttc	aatgcttgaa	ggagcggttt	tggatattag	atacggtgtt	tcgagaattg	5160
catatagtaa	agactttgaa	actctcaaag	ttgattttct	tagcaagcta	cctgaaatgc	5220
tgaaaatgtt	cgaagatcgt	ttatgtcata	aaacatattt	aaatggtgat	catgtaaccc	5280
atcctgactt	catgttgtat	gacgctcttg	atgttgtttt	atacatggac	ccaatgtgcc	5340
tggatgcgtt	cccaaaatta	gtttgttta	aaaaacgtat	tgaagctatc	ccacaaattg	5400
ataagtactt	gaaatccagc	aagtatatag	catggccttt	gcagggctgg	caagccacgt	5460
ttggtggtgg	cgaccatcct	ccaaaatcgg	atctggttcc	gcgtggatcc	gaattcgagc	5520
tccgtcgaca	agcttgcggc	cgcactcgag	caccaccacc	accaccactg	agatccggct	5580
gctaacaaag	cccgaaagga	agctgagttg	gctgctgcca	ccgctgagca	ataactagca	5640
taaccccttg	gggcctctaa	acgggtcttg	aggggtttt	tgctgaaagg	aggaactata	5700
tccggat						5707

```
<210>
<211>
<212>
<213>
       ДНК
       Искусственная последовательность
       GST ампликон, полученный с использованием SEQ ID NOs 2 and 3 (праймеры)
<400>
gtccatatgt cccctatact aggttattgg aaaattaagg gccttgtgca acccactcga
                                                                            60
                                                                           120
cttcttttgg aatatcttga agaaaaatat gaagagcatt tgtatgagcg cgatgaaggt
                                                                           180
gataaatggc gaaacaaaaa gtttgaattg ggtttggagt ttcccaatct tccttattat
attgatggtg atgttaaatt aacacagtct atggccatca tacgttatat agctgacaag
                                                                           240
                                                                           300
cacaacatgt tgggtggttg tccaaaagag cgtgcagaga tttcaatgct tgaaggagcg
gttttggata ttagatacgg tgtttcgaga attgcatata gtaaagactt tgaaactctc
                                                                           360
aaagttgatt ttcttagcaa gctacctgaa atgctgaaaa tgttcgaaga tcgtttatgt
                                                                           420
cataaaacat atttaaatgg tgatcatgta acccatcctg acttcatgtt gtatgacgct
                                                                           480
cttgatgttg ttttatacat ggacccaatg tgcctggatg cgttcccaaa attagtttgt
                                                                           540
tttaaaaaac gtattgaagc tatcccacaa attgataagt acttgaaatc cagcaagtat
                                                                           600
atagcatggc ctttgcaggg ctggcaagcc acgtttggtg gtggcgacca tcctccaaaa
                                                                           660
tcggatctgg ttccgcgtgg atccgac
                                                                           687
<210>
<211>
<212>
       17
297
       искусственная последовательность
<220>
<223> NSP4 изолят 1
<400> 17
atcacctcaa aaactgtgat tggtaaattc aagactgaaa acaatattag tcatcagaat
                                                                            60
gacgacattc ataaagaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgacat gagagttcat
                                                                           120
                                                                           180
gtaactgcac tatttaatag tatacataag gataatatgg agtggagaat gagtgaatcg
                                                                           240
attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa acaaatacgg tcgagaatga agttaagaat
cacgtagatg atgtaaatat atgtggtacg tctggattag agacggaagt ttgtcta
                                                                           297
<210>
<211>
       99
       искусственная последовательность
<220>
<223> NSP4 изолят 1
<400> 18
Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Gly Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asn Ile 1 10 15
```

Ser His Gln Asn Asp Asp Ile His Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys Gln Met Arg Asp Met Arg Val His Val Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile $35 \hspace{1.5cm} 40 \hspace{1.5cm} 45$ His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60Lys Lys Arg Glu Met Lys Thr Asn Thr Val Glu Asn Glu Val Lys Asn 65 70 80 His Val Asp Asp Val Asn Ile Cys Gly Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu 85 90 95 Val Cys Leu <210> 19 <211> 297 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ <220> <223> NSP4 изолят 63 <400> 19 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60 aatgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120 atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180 attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatacaa ccgggaatga agtcaagaat 240 cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297 <210> 20 <211> 99 <212> Белок <213> Искусственная последовательность <220> <223> NSP4 изолят 63 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile 1 10 15 Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys $20 \hspace{1cm} 25 \hspace{1cm} 30$ Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile $35 \hspace{1.5cm} 40 \hspace{1.5cm} 45$

His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60 Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Thr Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn 65 70 80 His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu 85 90 95 Val Cys Leu Искусственная последовательность <220> <223> NSP4 изолят 64 <400> 21 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60 aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120 atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg aatggagaat gagtgaatca 180 240 attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagatt cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297 22 99 Белок Искусственная последовательность <220> <223> NSP4 изолят 64 <400> 22 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile 10 10Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys $20 \hspace{1cm} 30$ Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile $35 \hspace{1.5cm} 40 \hspace{1.5cm} 45$ His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Ile 65 70 75 80His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu

Val Cys Leu

<21 <21 <21 <21	1> 2>	23 297 ДНК ИСКУ	сств	енна	я по	след	оват	ельн	ость						
<220> <223> NSP4 изолят 66															
<400 atc		23 caa	agac [.]	tgtg	at ta	agta	agtt	c aa	gacte	gaaa	atga	acati	tag (ccac	agaac
aac	gata	itca a	ataa	ggaa	ta t	gaaga	aggt	g at	gaaa	caaa	tgcg	gtgaa	aat (gagag	gttcat
atga	acto	cat	tatt	taata	ag ta	ataca	ataa	a ga	taata	atgg	agt	ggaga	aat 🤉	gagt	gaatca
att	cgca	ıgag i	aaaa	gaag	cg to	gaaa [.]	tgaaa	a tca	aaat	gcaa	ccg	gaat	tga a	agtca	agatt
caca	acca	atg	atgt	aaat	gt a	tgtg	atac	g tc	tggat	ttag	agad	ggag	ggt 1	ttgto	cta
<210 <211 <211 <211	1> 2>	24 99 Бело Иску		енная	я пос	следо	овате	ельн	ость						
<220 <22		NSP4	изол	пят (56										
<400)>	24													
Ile 1	Thr	Ser	Lys	Thr 5	∨al	Ile	Ser	Lys	Phe 10	Lys	Thr	Glu	Asn	Asp 15	Ile
Ser	His	Gln	Asn 20	Asn	Asp	Ile	Asn	Lys 25	Glu	Tyr	Glu	Glu	Va1 30	Met	Lys
Gln	Met	Arg 35	Glu	Met	Arg	val	ніs 40	Met	Thr	Ala	Leu	Phe 45	Asn	Ser	Ile
His	Lys 50	Asp	Asn	Met	Glu	Trp 55	Arg	Met	Ser	Glu	ser 60	Ile	Arg	Arg	Glu
Lys 65	Lys	Arg	Glu	Met	Lys 70	Ser	Asn	Ala	Thr	G]у 75	Asn	Glu	val	Lys	Ile 80
ніѕ	Thr	Asn	Asp	Va1 85	Asn	٧a٦	Cys	Asp	Thr 90	Ser	Glу	Leu	Glu	Thr 95	Glu
val	Cys	Leu													
<211 <212	<210> 25 <211> 297 <212> днк <213> Искусственная последовательность														

<220> <223> NSP4 изолят 67											
<400> 25 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac	60										
aacgatatca ataaggaata tgaagaggta atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 12											
atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca	180										
attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat											
cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agatggaggt ttgtcta											
<210> 26 <211> 99 <212> Белок <213> Искусственная последовательность											
<220> <223> NSP4 изолят 67											
<400> 26											
Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile 1 10 15											
Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys 20 25 30											
Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile 35 40 45											
His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60											
Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn 65 70 75 80											
His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Met Glu 85 90 95											
Val Cys Leu											
<210> 27 <211> 297 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ											
<220> <223> NSP4 изолят 68											
<pre><400> 27 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60</pre>											
	120										
atgactocat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180											

atccgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat 240										
cacacgaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297										
<210> 28 <211> 99 <212> Белок <213> Искусственная последовательность										
<220> <223> NSP4 изолят 68										
<400> 28										
Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile 1 10 15										
Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys 20 25 30										
Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile 35 40 45										
His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60										
Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn 65 70 75 80										
His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu 85 90 95										
Val Cys Leu										
<210> 29 <211> 297 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность										
<220> <223> NSP4 изолят 69										
<400> 29 atcacctcga agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60										
aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120										
atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180										
atccgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat 240										
cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297										
<210> 30 <211> 99 <212> Белок <213> Искусственная последовательность										

```
<220>
<223> NSP4 изолят 69
Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile 1 10 15
Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys 20 25 30
Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile 35 \hspace{0.25cm} 40 \hspace{0.25cm} 45
His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60
Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn 65 75 80
His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
85 90 95
Val Cys Leu
<210> 31
<211> 297
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> NSP4 изолят 70
<400> 31 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac
aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat
                                                                                  120
atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca
                                                                                  180
attcgcagag aaaagaaacg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat
                                                                                  240
cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta
                                                                                  297
        Белок
искусственная последовательность
<220>
<223> NSP4 изолят 70
Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
```

Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys 20 25 30Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile $35 \hspace{1.5cm} 40 \hspace{1.5cm} 45$ His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60 Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn 65 70 75 80His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu Val Cys Leu <210> 33 <211> 297 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ <220> <223> NSP4 изолят 71 <400> 33 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60 aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120 180 atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 240 attcgcagag aaaagaaacg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297 34 99 Белок Искусственная последовательность <210> <211> <212> <213> <220> <223> NSP4 изолят 71 АА последовательность <400> 34 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile $35 \hspace{1.5cm} 40 \hspace{1.5cm} 45$ His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60

```
Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn 65 70 75 80
His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu 90 95
Val Cys Leu
<210> 35
<211> 297
<212> ДНК
<213> ИСК
        днк
искусственная последовательность
<220>
<223>
        NSP4 изолят 72
<400> 35
atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac
                                                                                   60
aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat
                                                                                  120
                                                                                  180
atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca
attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagatt
                                                                                  240
cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta
                                                                                  297
<210>
<211>
<212>
<213>
        Белок
Искусственная последовательность
<220>
<223>
       NSP4 изолят 72
<400> 36
Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile 1 10 15
Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile 35 \hspace{1.5cm} 40 \hspace{1.5cm} 45
His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Ile 65 70 75 80
His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu 90 \\ 95
```

Val Cys Leu

<210> 37 <211> 297 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность											
<220> <223> NSP4 изолят 3882											
<400> 37 atcacctcaa aaactgtgat tggtaaattc aagactgaaa acaatattag tcatcagaat											
gacgacattc ataaagaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgacat gagagttcat											
gtaactgcac tatttaatag tatacataag gataatatgg agtggagaat gagtgaatcg											
attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa acaaatacgg tcgagaatga agttaagaat											
cacgtagatg atgtaaatat atgtgatacg tctggattag agacggaagt ttgtcta											
<210> 38 <211> 99 <212> Белок <213> Искусственная последовательность											
<220> <223> NSP4 изолят 3882											
<400> 38											
tle Thr Ser Lys Thr Val Ile Gly Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asn Ile L 5 10 15											
Ser His Gln Asn Asp Asp Ile His Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys 20 25 30											
Gln Met Arg Asp Met Arg Val His Val Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile 35 40 45											
dis Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60											
ys Lys Arg Glu Met Lys Thr Asn Thr Val Glu Asn Glu Val Lys Asn 50 75 80											
dis Val Asp Asp Val Asn Ile Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu 85 90 95											
/al Cys Leu											
3210> 39 3211> 297 3212> ДНК 3213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ											
<220>											

<223> NSP4 изолят 3509										
<400> 39 atcacctcaa aaactgtgat tggtaaattc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac	60									
aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat	120									
atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 18										
attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagatt 2										
cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaagt ttgtcta 29										
<210> 40 <211> 99 <212> Белок <213> Искусственная последовательность										
<223> NSP4 изолят 3509										
<pre><400> 40 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Gly Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile 1</pre>										
Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys 20 25 30										
Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile 35 40 45										
His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu 50 60										
Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Ile 65 70 75 80										
His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu 85 90 95										
Val Cys Leu										
<210> 41 <211> 732 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность										
<220> <223> VP4 изолят 1										
<400> 41 agggcgtcct cactttatca tcaattaatt tctcagaatt attattcaac tgggaatgag	60									
atcttaaaag atttacaaac gactaaaact actgttgact atgtagatgc tgggaattat	120									
acatatgctc aattgccgcc aacgaagtgg ggagctggag ctaccttcga atcagtcttt	180									
agcgcagctg aaataacagg accgcacaca aatagagtta tagagtggaa gaatttacta	240									

aattctgacc agtggttgct gtttccaaaa ccagctgaca cagttaaatt acttaaacat 300 ggacctcaaa catatgatag cactttagcg gcatgtgaat tgtggtatgg gaaggctaat 360 420 actatagtga catcagaaca ctattcatca ttaagtgata atcaggtgaa tgtaaatgcc 480 gattcattag tattattttg gaatgctgga gggacaacat tcgataaaca aatagttaat 540 600 atatacatgg ccaacatgaa taatttcaat agtgataatt tcaattggga agagtggcgt 660 ttcacactac ctcgcagtaa tgcaacaatt aacatataca ctgattatta cctagctagc 720 agtgatccat acaatcagct gaaagaatta caacagtcaa ctattaccac attcgaaatg 732 agaatgatgg tg

Искусственная последовательность

<220> <223> VP4 изолят 1

<400> 42

Arg Ala Ser Ser Leu Tyr His Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser 1 10

Thr Gly Asn Glu Ile Leu Lys Asp Leu Gln Thr Thr Lys Thr Thr Val

Asp Tyr Val Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Tyr Ala Gln Leu Pro Pro Thr 35 40 45

Lys Trp Gly Ala Gly Ala Thr Phe Glu Ser Val Phe Ser Ala Ala Glu 50 60

Ile Thr Gly Pro His Thr Asn Arg Val Ile Glu Trp Lys Asn Leu Leu 65 70 75 80

Asn Ser Asp Gln Trp Leu Leu Phe Pro Lys Pro Ala Asp Thr Val Lys

Leu Leu Lys His Gly Pro Gln Thr Tyr Asp Ser Thr Leu Ala Ala Cys $100 \hspace{1cm} 105 \hspace{1cm} 110$

Glu Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Asn Thr Ile Val Thr Ser Glu His Tyr 115 120 125

Ser Ser Leu Ser Asp Asn Gln Val Asn Val Asn Ala Asp Ser Leu Val

Leu Phe Trp Asn Ala Gly Gly Thr Thr Phe Asp Lys Gln Ile Val Asn

Phe Ala Trp Asp Met Gly Gly Ile Leu Ile Lys Pro Ser Ser Gln Gln 170 175Pro Arg Leu Asp Ile Tyr Met Ala Asn Met Asn Asn Phe Asn Ser Asp $180 \\ 185 \\ 190 \\$ Asn Phe Asn Trp Glu Glu Trp Arg Phe Thr Leu Pro Arg Ser Asn Ala 195 200 205 Thr Ile Asn Ile Tyr Thr Asp Tyr Tyr Leu Ala Ser Ser Asp Pro Tyr 210 215 220Asn Gln Leu Lys Glu Leu Gln Gln Ser Thr Ile Thr Thr Phe Glu Met 225 230 235 240Arg Met Met Val <210> 43 <211> 735 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ <220> <223> VP4 изолят 66 <400> 43 agggcgtcct cactttatca gcaattaatt tcacagaatt attattcaac tggaaatgat 60 attttactgg atcagcaaac aaataacaca actgttgact atatagatat aggaaattat 120 tcgtatacac aattaccgcc gacatcatgg ggagcaggaa tgacttttaa gtctgcattt 180 aatgcagagg aaattacagg acccaataca ggtgatatag atttgaataa tttgacaaat 240 gcgaatgggt ggatattgta tgacaaacca actgatacaa aacgattgtt aaaactagga 300 ccagaaagtt atgacagtgt gtacgcagca ttcgaattat ggtatggtaa agcaaatact 360 gtagtcacat caatatacta ttcatcagtg caaaactctg aaaacactgt aacagtacaa 420 catgactcat tagtgttatt ctttaatgtt ggttatactg gtctaactaa gcaaatagtt 480 aaatttaact ggaatatggg aggcatatta gttagaccga ctgctgatgg tagagtggat 540 600 atttgtatgg ctgacatgaa tgattttaat agtgataatt ttaattggga atcttggaaa 660 cgtagttttc cacgtagcaa cattaacatg tacactgaat attatttagc gaatgttgat 720 ccatataatc aactaaaaat attaaaccaa ctaactgcaa aaaatgtaga aattagaatg 735 atgaaggcaa ttaag

44 245

Искусственная последовательность

<220>

<223> VP4 изолят 66

Arg Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser $1 \hspace{1cm} 10 \hspace{1cm} 15$ Thr Gly Asn Asp Ile Leu Leu Asp Gln Gln Thr Asn Asn Thr Thr Val Asp Tyr Ile Asp Ile Gly Asn Tyr Ser Tyr Thr Gln Leu Pro Pro Thr 35 40 45Ser Trp Gly Ala Gly Met Thr Phe Lys Ser Ala Phe Asn Ala Glu Glu 50 60Ile Thr Gly Pro Asn Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Asn Leu Thr Asn 65 70 80 Ala Asn Gly Trp Ile Leu Tyr Asp Lys Pro Thr Asp Thr Lys Arg Leu $85 \hspace{1.5cm} 90 \hspace{1.5cm} 95$ Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Asn Thr Val Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser 115 125 125Ser Val Gln Asn Ser Glu Asn Thr Val Thr Val Gln His Asp Ser Leu 130 140Val Leu Phe Phe Asn Val Gly Tyr Thr Gly Leu Thr Lys Gln Ile Val 145 150 155 160 Lys Phe Asn Trp Asn Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Thr Ala Asp 165 170 175Gly Arg Val Asp Ile Cys Met Ala Asp Met Asn Asp Phe Asn Ser Asp $180 \hspace{1cm} 185 \hspace{1cm} 190 \hspace{1cm}$ Asn Phe Asn Trp Glu Ser Trp Lys Arg Ser Phe Pro Arg Ser Asn Ile 195 200 205Asn Met Tyr Thr Glu Tyr Tyr Leu Ala Asn Val Asp Pro Tyr Asn Gln 210 215Leu Lys Ile Leu Asn Gln Leu Thr Ala Lys Asn Val Glu Ile Arg Met Met Lys Ala Ile Lys

120

180

240

420

480

540

600

660

720

```
<210> 45
<211> 735
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> VP4 изолят 71
<400> 45 agggcgtcct cactttatca gcaattaatc tcacagaatt attattcaac tggaaatgat
attttactgg atcagcaaac aaataacaca actgttgact atatagatat aggaaattac
tcgtatacac aattaccgcc gacatcatgg ggagcaggaa tgacttttaa gtctgcattt
aatgcagagg aaattacagg acccaatacg ggtgatatag atttgaataa tttgacaaat
gcgaatggat ggatattgta tgacaaacca actgatacaa aacgattgtt aaaactagga
ccagaaagtt atgacagtgt gtacgcagca ttcgaattat ggtatggtaa agcaaatact
gtagtcacat caatatacta ttcatcagtg caaaactctg aaaacactgt aacagtacag
catgactcat tagtgttatt ctttaatgtt ggttatactg gtctaactaa gcaaatagtt
aaatttaatt ggaatatggg aggcatatta gttagaccga ctactgatgg tagagtggat
atttgtatgg ctgacatgaa tgattttagt agtgataatt ttaattggga atcttggaaa
cgtagttttc cacgtagcaa cattaacatg tacactgaat attatttagc gaatgttgat
ccatataatc aactaaaaat attaaaccaa ctaactgcaa aaaatgtaga aattagaatg
atgaaggcaa ttaag
<210>
<211>
<212>
<213>
       245
Белок
Искусственная последовательность
<220>
<223> VP4 изолят 71
<400> 46
Arg Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser 1 \hspace{1cm} 10 \hspace{1cm} 15
Thr Gly Asn Asp Ile Leu Leu Asp Gln Gln Thr Asn Asn Thr Thr Val 20 25 30
Asp Tyr Ile Asp Ile Gly Asn Tyr Ser Tyr Thr Gln Leu Pro Pro Thr 35 \  \  \, 40 \  \  \, 45
Ser Trp Gly Ala Gly Met Thr Phe Lys Ser Ala Phe Asn Ala Glu Glu 50 60
Ile Thr Gly Pro Asn Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Asn Leu Thr Asn 65 70 75 80
Ala Asn Gly Trp Ile Leu Tyr Asp Lys Pro Thr Asp Thr Lys Arg Leu
```

Leu Lys Leu Gly Pro Glu Ser Tyr Asp Ser Val Tyr Ala Ala Phe Glu 100 105 110Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Asn Thr Val Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser 115 120 125Ser Val Gln Asn Ser Glu Asn Thr Val Thr Val Gln His Asp Ser Leu 130 135 140 Val Leu Phe Phe Asn Val Gly Tyr Thr Gly Leu Thr Lys Gln Ile Val 145 150 155 160Lys Phe Asn Trp Asn Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Thr Thr Asp Gly Arg Val Asp Ile Cys Met Ala Asp Met Asn Asp Phe Ser Ser Asp 180 185Asn Phe Asn Trp Glu Ser Trp Lys Arg Ser Phe Pro Arg Ser Asn Ile Asn Met Tyr Thr Glu Tyr Tyr Leu Ala Asn Val Asp Pro Tyr Asn Gln 210 215 220 Leu Lys Ile Leu Asn Gln Leu Thr Ala Lys Asn Val Glu Ile Arg Met 225 230 235 240 Met Lys Ala Ile Lys <210> 47 <211> 735 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность

<220> <223> VP4 изолят 3509

<400> agggcgtcct cactttatca gcaattaatc tcacagaatt attattcaac tggaaatgat 60 attttactgg atcagcaaac aaataacaca actgttgact atatagatat aggaaattat 120 tcgtatacac aattaccgcc gacatcatgg ggagcaggaa tgacttttac gtctgcattt 180 aatgcagagg aaattacagg acccaataca ggtgatatag atttgaataa tttgacaaat 240 gcgaatgggt ggatattgta tgacaaacca actgatacaa aacgattgtt aaaactagga 300 ccagaaagtt atgacagtgt atacgcagca ttcgaattat ggtatggtaa agcaaatact 360 gtagtcacat caatatacta ttcatcagtg caaaactctg aaaacactgt aacagtacag 420 catgactcat tagtgttatt ctttaatgtt ggttatactg gtctaactaa gcaaatagtt 480 aaatttaact ggaatatggg aggcatatta gttagaccga ctactgatgg tagagtggat 540 atttgcatgg ctgacatgaa tgattttaat agtgataatt ttaattggga atcttggaaa cgtagttttc cacgtagcaa cattaacatg tacactgaat attatttagc gaatgttgat ccatataatc aactaaaaat attaaaccaa ctaactgcaa aaaatgtaga aattagaatg 735 atgaaggcaa ttaag

<21 <21 <21 <21	1> 2>	48 245 Бело Иску	к ССТВ:	енна	я по	след	оват	ельн	ость						
<220> <223> VP4 изолят 3509															
<400> 48															
Arg 1	Ala	Ser	Ser	Leu 5	туг	Gln	Gln	Leu	Ile 10	Ser	Gln	Asn	Туr	Tyr 15	Ser
Thr	Gly	Asn	Asp 20	Ile	Leu	Leu	Asp	Gln 25	Gln	Thr	Asn	Asn	Thr 30	Thr	Val
Asp	туг	11e 35	Asp	Ile	Gly	Asn	туг 40	Ser	туr	Thr	Gln	Leu 45	Pro	Pro	Thr
Ser	Trp 50	Gly	Αla	Gly	Met	Thr 55	Phe	Thr	Ser	Ala	Phe 60	Asn	Ala	Glu	Glu
Ile 65	Thr	Gly	Pro	Asn	Thr 70	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu 75	Asn	Asn	Leu	Thr	Asn 80
Ala	Asn	Gly	Тгр	Ile 85	Leu	Tyr	Asp	Lys	Pro 90	Thr	Asp	Thr	Lys	Arg 95	Leu
Leu	Lys	Leu	Gly 100	Pro	Glu	Ser	Tyr	Asp 105	Ser	٧a٦	Tyr	Ala	Ala 110	Phe	Glu
Leu	Trp	Tyr 115	Gly	Lys	Ala	Asn	Thr 120	٧a٦	val	Thr	Ser	Ile 125	Tyr	Tyr	Ser
Ser	Val 130	Gln	Asn	Ser	Glu	Asn 135	Thr	val	Thr	val	Gln 140	нis	Asp	Ser	Leu
Val 145	Leu	Phe	Phe	Asn	Val 150	Gly	Туг	Thr	Glу	Leu 155	Thr	Lys	Gln	Ile	Val 160
Lys	Phe	Asn	Trp	Asn 165	Met	Gly	Gly	Ile	Leu 170	val	Arg	Pro	Thr	Thr 175	Asp
Gly	Arg	۷a٦	Asp 180	Ile	Cys	Met	Аlа	Asp 185	Met	Asn	Asp	Phe	Asn 190	Ser	Asp

```
Asn Phe Asn Trp Glu Ser Trp Lys Arg Ser Phe Pro Arg Ser Asn Ile 195 200 205
Asn Met Tyr Thr Glu Tyr Tyr Leu Ala Asn Val Asp Pro Tyr Asn Gln 210 215 220
Leu Lys Ile Leu Asn Gln Leu Thr Ala Lys Asn Val Glu Ile Arg Met 225 230 240
Met Lys Ala Ile Lys
      49
735
ДНК
Искусственная последовательность
<220>
<223> VP4 изолят 3882
<220>
<221>
<222>
      прочий признак
(59)..(59)
n - a, c, g, или t
<220>
<221> прочий признак
<222> (690)..(690)
<223> n - a, c, g, или t
       прочий признак
(699)..(700)
n - a, c, g, или t
<400> 49
agggcgtcct cactttatca gcaattaatc tcacaaaatt attattcaac tgggaatgnt
                                                                                  60
atattattgg atcagcaaac gaataaaaca actgttgatt atgtagatgt gggaaattat
                                                                                 120
tcatatacac aattaccacc aacatcatgg ggagcaggaa tgacttttaa gtctgcattt
                                                                                 180
aatgcagaag aaatgacggg acctaacaca ggtgatatag atctgagtaa tctcacaact
                                                                                 240
gcgaatggat ggatattata tgagaagccg acaattacca aacggttatt aaaactaggg
                                                                                 300
ccagatgttt acgatagtgt ttatgccgca tttgaactgt ggtatggtaa agcaaataca
                                                                                 360
gtagttacat caatatatta tgcatcagca caaaattctg agaatactgt aacattacag
                                                                                 420
                                                                                 480
tatgactcat tagtactatt tttcaatgtt ggttacactg gtctgactaa gcaaatagtt
agatttaatt gggatatggg aggcatatta gttaggccaa ctgctgatgg tagagtagat
                                                                                 540
atctgtatgg cagacatgaa tgattttagc agcgacaatt ttaattggga gaaatggact
                                                                                 600
cgtagctttc cacgcagtaa tattaatatg tatgctgaat attacttagc aaatgttgac
ccgtatagtc aattaaaagc attaaatcan ctcacaacnn aaaatataga aattagaatg
                                                                                 720
```

atgaagtcaa ttaag

```
50
245
          Белок
Искусственная последовательность
<220>
<223> VP4 изолят 3882
          прочий признак
(20)..(20)
Хаа - любая аминокислота
<220>
<221> прочий признак
<222> (230)..(230)
<223> Хаа - любая аминокислота
<220>
<221> прочий признак
<222> (233)..(234)
<223> Хаа - любая аминокислота
<220>
<221>
<222>
<223>
        прочий признак
(245)..(245)
Хаа - любая аминокислота
<400>
Arg Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser 1 \hspace{1cm} 10 \hspace{1cm} 15
Thr Gly Asn Xaa Ile Leu Leu Asp Gln Gln Thr Asn Lys Thr Thr Val
Asp Tyr Val Asp Val Gly Asn Tyr Ser Tyr Thr Gln Leu Pro Pro Thr 35 40 45
Ser Trp Gly Ala Gly Met Thr Phe Lys Ser Ala Phe Asn Ala Glu Glu 50 60
Met Thr Gly Pro Asn Thr Gly Asp Ile Asp Leu Ser Asn Leu Thr Thr 65 70 75 80
Ala Asn Gly Trp Ile Leu Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Thr Lys Arg Leu 85 \hspace{1cm} 90 \hspace{1cm} 95
Leu Lys Leu Gly Pro Asp Val Tyr Asp Ser Val Tyr Ala Ala Phe Glu 100 \hspace{1cm} 105 \hspace{1cm} 110
Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Asn Thr Val Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ala 115 120 125
Ser Ala Gln Asn Ser Glu Asn Thr Val Thr Leu Gln Tyr Asp Ser Leu
130 135 140
Val Leu Phe Phe Asn Val Gly Tyr Thr Gly Leu Thr Lys Gln Ile Val
```

145 150 Arg Phe Asn Trp Asp Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Thr Ala Asp 165 170 175Gly Arg Val Asp Ile Cys Met Ala Asp Met Asn Asp Phe Ser Ser Asp 180 185 190 Asn Phe Asn Trp Glu Lys Trp Thr Arg Ser Phe Pro Arg Ser Asn Ile $\frac{195}{200}$ Asn Met Tyr Ala Glu Tyr Tyr Leu Ala Asn Val Asp Pro Tyr Ser Gln Leu Lys Ala Leu Asn Xaa Leu Thr Xaa Xaa Asn Ile Glu Ile Arg Met 225 230 240 Met Lys Ser Ile Xaa <210> 51 <211> 1182 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ <220> <223> VP6 изолят 1 gacgtgctgt tttcaattgc gaaaactgta tctgaactca aaaagaaagt tgtagttggt 60 actatttaca ctaatgtaga agatataatt caacaaacca atgaactgat tagaactttg 120 aatggtaata cgtttcatac aggtggtatt ggaacacagc ctcaggaaga gtggaatttt 180 caattaccgc agctaggtac gacactctta aatttagatg acaactatgt tcaagccact 240 agaagtgtta ttgattattt ggcttcattt atagaatcag tatgtgatga tgaaattgtc 300 agagaagcat ctagaaatgg aatgcagcca cagtcgccag cacttataac gctgtcatca 360 tcaaagttta agactatcaa ctttaataac agttcacaat caattaaaaa ttggagtgct 420 480 caatcaagac gtgaaaatcc agtctatgaa tacagaaatc caatgatatt cgaatataga aattcataca ttcttcagcg tgctaatcca caatttggaa tcgtaatggg attgaggtat 540 tatacaactg gtaacacctg tcaagttgca gcttttgatt caacatttgc tgaaaatgct 600 cctaataata ctcaacgttt tatctataat ggaagactta agagaccaac ttctaatgca 660 ttgatgaaaa ttgaggctgg cgctcagaac atcagtattc caacagtttt gcctgatctg 720 gcaaatcaaa caacatggtt atttaatcca gtgcaagtaa tgaatggaac attctctatt 780 gaattttata acaatggaca actagttgat atgattagaa atatgggagt agttactgtt 840

agaacttttg attcttacag aataacaatc gatgtgatta gaccagcagc tatgacacaa

tacgttcaga gaacattccc gcaaggtggt ccttatccat accaagctgc atacatgttg

900

acgctcagtg tattagatgc gacaacggaa tctgtcctat gcgattcaca ctctgtggat
tattcaattg ttgcaaacgt tagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtattcaa
ccagggtttc catgggaaca gacattatcc aactacactg ttgctcagga agataattta
gaaagacttt tactagttgc gtccgtgaag agaatggtga tg

1080 1140 1182

52 394 Белок Искусственная последовательность <220> <223> VP6 изолят 1 <400> 52 Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Glu Leu Lys Lys Lys 1 Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln 20 25 30Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly 35 40 45 Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Glu Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln 50 60Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr 65 70 80Arg Ser Val Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ser Val Cys Asp Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser $100 \ \ \, 105$ Pro Ala Leu Ile Thr Leu Ser Ser Ser Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe 115 120 125 Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Arg Asn Pro Met Ile Phe Glu Tyr Arg 145 150 155 160 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Pro Gln Phe Gly Ile Val Met Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Thr Gly Asn Thr Cys Gln Val Ala Ala Phe $180 \hspace{0.5cm} 190 \hspace{0.5cm}$ Asp Ser Thr Phe Ala Glu Asn Ala Pro Asn Asn Thr Gln Arg Phe Ile

195 200 205

Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Thr Ser Asn Ala Leu Met Lys Ile

Glu Ala Gly Ala Gln Asn Ile Ser Ile Pro Thr Val Leu Pro Asp Leu
225 Ala Ala Gly Ala Gln Asn Ile Ser Ile Pro Thr Val Leu Pro Asp Leu
226 Ala Asn Gln Thr Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Val Met Asn Gly
225 Thr Phe Ser Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Met Ile
275 Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Ser Tyr Arg Ile
280 Arg Thr Phe Asp Ser Tyr Arg Ile
280 Thr Ile Asp Val Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg
295 Thr Leu Ser Val Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Leu Cys Asp Ser
325 His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala
Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Thr
385 Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu
386 Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met
387 VP6 изолят 63
380 VP6 изолят 63
380 Sqatytgettyt teteccattge gaagactyte teagatetta agaagaaagt tgtagttggt

<400> 53
gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt
actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg
aatggcaaca cattccatac tggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaattt
caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact

60

300 agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 360 gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct 420 cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaaatc caatggtgtt tgagtataga aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga acgtaatggg gctgagatat 540 tacacagcca gcaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgct 600 660 cctaatggca ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaatgtg ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca 720 gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtgcagataa tgaatggaac atttactatt 780 gagttttata ataatgggca gttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcaac catgacacag 900 tatgtacaaa gactgtttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020 1080 tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa ccaggatttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140 gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

<210> 54 <211> 394 <212> Белок <213> Искусственная последовательность <220> <223> VP6 изолят 63 <400> 54

Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys Val Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln Gln Asn Gly Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln Glo Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr Gly Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp Res Cys As

Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser

100 105 110

Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe 115 120 125 Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg 145 150 155 160 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met $165 \ \ \, 170 \ \ \, 175$ Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe 180 185 190 Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile 210 220Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro 225 230 230 230 Ala Asn Gln Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly $\frac{255}{250}$ Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile $\frac{275}{280}$ Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Thr Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg $290 \ \ \,$ Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile 305 310 315 320 Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala $\frac{340}{340}$ Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu

370 375 380 Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met 385 ДНК Искусственная последовательность <220> <223> VP6 изолят 64 <400> 55 gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt 60 actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg 120 180 aatggcaaca catttcatac tggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact 240 300 agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 360 gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct 420 cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatggtgtt tgagtataga 480 aattcatata ttcttcagcg tgctaatgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat 540 tacacagcga gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc 600 cctaatggta ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaatgtg 660 ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca 720 780 gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt gagttttata ataatgggca gttagttgat ttaattagaa atatgggagt agttactgtt 840 agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacacag 900 tatgtacaaa gactgtttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020 1080 tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1140 ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182 <210> <211> 56 394 Белок Искусственная последовательность VP6 изолят 64 АА последовательностьs <400>

Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys

Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln 20 25 30Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly $\frac{35}{40}$ Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln 50 60 Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr $65 7075$ Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp $90 \hspace{1.5cm} 95$ Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser 100 105 110Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg 130 140Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg 145 $\,$ 150 $\,$ 155 $\,$ 160 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe $180 \\ \hspace*{1.5cm} 185 \\ \hspace*{1.5cm} 190 \\ \hspace*{1.5cm}$ Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro Ala Asn Gln Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly $245\ \ \, 255\ \ \,$ Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile 260 265 270 Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile

Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile 305 310 315Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser 325 330 335 His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile 355 360 365Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu $370 \hspace{1cm} 375 \hspace{1cm} 380$ Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met 385

<210> 57 <211> 1182 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220> <223> VP6 изолят 65

 $<\!400\!>$ 57 gatgtgctgt tttcaattgc gaagactgtc tcagaactca aaaagaaagt tgtagttggt 60 actatttaca ctaatgtaga agatataatt cagcaaacta atgaattaat tagaactttg aatggcaaca cgtttcatac aggtggtatt ggaacgcagc ctcaaaaaga gtggaatttt 180 240 caattaccac agctaggtac aacactcttg aatttagatg ataactatgt ccaagctact agaagtgtta ttgactattt ggcctcattc atagaagcag tatgtgatga tgagattgtc 300 agagaagcat cgagaaatgg aatgcagcct caatcaccta cacttatagc gctgtcctca 360 420 tcaaaattta aaactattaa ttttaataac agttcacaat ctattaaaaa ctggagtgct caatcaagac gcgaaaatcc agtctacgag tacagaaatc cgatgatatt cgaatataga 480 aattcataca ttcttcagcg cgctaatcca caatttggaa atgtaatggg gttgaggtat 540 tatacaacta gtaacacttg tcaaatcgca gcttttgact caacatttgc tgagaatgct 660 cctaataata ctcaacgttt catctataat ggaagactta agagaccaat ttctaatgtg 720 ctaatgaaaa ttgaggctgg tgctcagaac atcagtagtc caacagtcct acctgatccg acaaatcaaa caacatggct atttaatcca gtacaagtaa tgaatggaac ttttactatt 780 840 gagttttata ataatggaca attagttgat atgattagaa acatgggagt agttactgtt

agaacttttg attcttatag aataacaatt gatatgatca gaccagcagc tatgacacaa 900 tacgttcaga gaacattccc acaaggtggt ccttatccat accaaggtgg atacatgttg 960 acactcagtg tattagatgc tacaacagaa tctgtcctat gcgattcaca ctctgtagac 1020 tattcaattg ttgcaaacat tagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtattcaa 1080 ccaggatttc catgggaaca gacattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140 gaaagacttc tactagttgc gtccgtgaag agaatggtga tg 1182

<211> 58
<211> 394
<212> Белок
<221> Белок

<222> VP6 изолят 65
<400> 58
Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Glu Leu Lys Lys Lys
15 Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln
25 Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly
45 do Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln
50 Gly Ile Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr
65 For Val Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Gys Asp
Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser
100 Arg Ser Val Ile Ala Leu Ser Ser Ser Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe
115 Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Pro Met Ile Phe Glu Tyr Arg
Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Arg Asn Pro Met Ile Phe Glu Tyr Arg
Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Arg Asn Pro Gln Phe Gly Asn Val Met
175 Met
175 Met
176 Cln Phe Gly Asn Val Met
177 Cln Phe Gly Asn Val Met
177 Met
177 Cln Phe Gly Asn Val Phe
178 Cln Phe
179 Cln Phe Gly Asn Val Phe
179 Cln Phe Gly Asn Val Phe
170 Cln Phe
170 Cln Phe Gly Asn Val Phe
171 Cln Phe
171 Cln Phe
172 Cln Phe
173 Cln Phe
174 Cln Phe
175 Cln Phe
1

Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Thr Ser Asn Thr Cys Gln Ile Ala Ala Phe

Asp Ser Thr Phe Ala Glu Asn Ala Pro Asn Asn Thr Gln Arg Phe Ile 195 200 205Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile 210 220 Glu Ala Gly Ala Gln Asn Ile Ser Ser Pro Thr Val Leu Pro Asp Pro Thr Asn Gln Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Val Met Asn Gly 245 250 Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Met Ile $260 \hspace{0.5cm} 265 \hspace{0.5cm} 270 \hspace{0.5cm}$ Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Ser Tyr Arg Ile $275 \hspace{1cm} 280 \hspace{1cm} 285$ Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg 290 295 300 Thr Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Pro Tyr Gln Ala Ala Tyr Met Leu 305 310 315 320 Thr Leu Ser Val Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Leu Cys Asp Ser 325 330 335 His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Ile Arg Arg Asp Ser Ala 340 350 Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Thr $355 \hspace{1cm} 360 \hspace{1cm} 365$ Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu $370 \hspace{1cm} 375 \hspace{1cm} 380$ Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met

<210> 59 <211> 1182 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220> <223> VP6 изолят 66

<400> 59 gatgtgctgt tttcaattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg

180 aatggcaaca catttcatac tggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact 240 agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt 300 agagaggcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 360 gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct 420 cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatggtgtt tgagtataga 480 540 aattcatata ttcttcagcg tgctaatgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat 600 tacacagcga gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc cctaatggta ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaatgtg 660 ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca 720 gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt 780 gagttttata ataatgggca gttagttgat ttaattagaa atatgggagt agttactgtt agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacacag tatgtacaaa gactgtttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020 tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080 ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140 gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

<220> <223> VP6 изолят 66

<400> 60

Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys 1 10 15

Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln 20 25 30

Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly 35 40 45

Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln 50 60

Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr 65 70 75

Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp

Искусственная последовательность

85 90 95

Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg 130 140Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg 145 150 155 160 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met 165 170 175Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe 180 185 Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile 195 200 205 Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile 210 225 Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro 225 230 235 240 Ala Asn Gln Thr Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly 245 250 255 Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile 260 270 Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile 275 280 285 Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg 290 295 300 Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile $305 \hspace{1.5cm} 310 \hspace{1.5cm} 315 \hspace{1.5cm} 320$ Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile

Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu $370 \hspace{1cm} 375 \hspace{1cm} 380$

Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met 385

<210> 61 <211> 1182 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220> <223> VP6 изолят 67

 $<\!400\!>$ 61 gatggcggt tctctattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt 60 actatttata caaatgtaga agatataatc caacaaacta atgaattgat tagaactttg 120 aatggcaaca cattccatac tggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt 180 caactaccgc agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact 240 agaagtatca tcgattattt gacctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt 300 agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 360 gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct 420 cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatggtgtt tgagtataga aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga acgtgatggg gctgagatat 540 tacacagcta gcaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc cctaatggta ctcaacggtt tatttataat gggagactta aaagaccaat ttctaatgtg ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtactc caacaatact acctgatcca gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt 780 gagttttata ataatgggca gttagttgat ttaattagaa atatgggagt agttactgtt agaacattcg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacacag 900 960 tatgtacaaa gactgtttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020 tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080 ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140 gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

62 394 Белок Искусственная последовательность

<220> <223> VP6 изолят 67

Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys 1 10 15 15 $\,$ Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln 20 25 30 Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly $\frac{35}{40}$ Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln 50 60Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr 65 70 75 80 Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Thr Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp $85 \hspace{1.5cm} 90 \hspace{1.5cm} 95$ Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser 100 105 110Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg 130 140 Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg 145 150 155 160 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met $165 \hspace{1.5cm} 170 \hspace{1.5cm} 175$ Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe $180 \ \ \, 185 \ \ \,$ Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile $195 \ 200 \ 205$ Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Thr Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro 225 230 235 Ala Asn Gln Thr Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly 245 250 255 Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile

260 Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile 275 280 Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile $305 \qquad \qquad 310 \qquad \qquad 315 \qquad \qquad 320$ Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser 325 His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile 355 360 365Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu 370 380 Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met 385 <210> 63 <211> 1182 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ <220> <223> VP6 изолят 68 <400> 63 gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg 120 aatggcaaca cattccatac tggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt 180 caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt 300 360 agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagcgct 420 cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaaatc caatggtgtt tgagtataga 480

aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga acgtaatggg gctgagatat

tacacagcca gcaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc cctaatggca ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccgat ttctaatgtg

ttgatgaaaa tcgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca

540 600

660

gcaaatcaga caacatggct gtttaatcca gtgcagataa tgaatggaac atttactatt 780
gagttttata ataatgggca gttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt 840
agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcaac catgacacag 900
tatgtacaaa gactgttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960
actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020
tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtattcaa 1080
ccaggatttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140
gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

<210> 64
<211> 894
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220> <223> VP6 изолят 68
<400> 64
Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys Is
Val Val Val gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln Gln 35
Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly 40
Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln 60
Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr 80
Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp 95
Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser 1105
Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg Arg 130
Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg Glu Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met

Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe $180 \hspace{0.25cm} 185 \hspace{0.25cm} 190$ Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile 195 200 205 Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn val Leu Met Lys Ile 210 225 220 Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro 225 230 235 Ala Asn Gln Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly $245 \\ 250 \\ 250$ Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile $260 \hspace{0.2in} 265$ Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile 275 280 285 Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Thr Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg $290 \ \ \,$ 300 Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile 305 $$310\$ Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser 325 330 335 His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala 340Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile 355 360 365Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu 370 375Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met

<210> 65 <211> 1182 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220> <223> VP6 изолят 69

<400> 65

gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt 120 actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg aatggcaaca cattccatac tggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt 180 240 $caactaccac\ agctaggtac\ aacacttttg\ aatttagatg\ ataactatgt\ tcaagcaact$ agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt 300 agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 420 gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatggtgtt tgagtataga 480 aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga acgtaatggg gctgagatat 540 tacacagcca gcaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc 600 cctaatggca ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaatgtg 660 ttgatgaaaa tcgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca 720 gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtgcagataa tgaatggaac atttactatt 780 gagttttata ataatgggca gttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt 840 agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcaac catgacacag 900 960 tatgtacaaa gactgtttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080 ccaggatttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140 gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

<210> 66 <211> 394 <212> Белок <213> Искусственная последовательность

<220> <223> VP6 изолят 69 АА последовательность

<400> 66

Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys 1

Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln $\frac{25}{25}$

Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly $35 \ \ 40 \ \ 45$

Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln 50 55 60

Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr

5 70 75 80

Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp $90 \hspace{0.5cm} 95$ Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe 115 120 125 Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg 145 $\,$ 150 $\,$ 155 $\,$ 160 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met $165 \hspace{0.25cm} 170 \hspace{0.25cm} 175$ Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe $180 \hspace{1cm} 185 \hspace{1cm} 190$ Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile 210 220 Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro 225 230 235 240 Ala Asn Gln Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly 245 250 Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile $260 \ \ \, 265 \ \ \,$ Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile $275 \hspace{1cm} 280 \hspace{1cm}$ Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Thr Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg $\frac{290}{290}$ Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile 305 $$310\$ Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala

Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile 355 360 365

Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu 370 380

Leu val Ala Ser val Lys Arg Met val Met

<210> 67 <211> 1182 <212> ДНК <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220> <223> VP6 изолят 70

<400> 67 gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt 60 actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg aatggcaaca cattccatac tggtggaatt gggacacaac ctcagaaaga atggaatttt 180 240 caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga tgaaattgtt 300 agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 360 420 gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct 480 cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatggtgtt tgagtataga aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat 540 tatacagcca gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc 600 cctaatggta ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaatgtg 660 ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc taacaatact acctgatcca 720 780 gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtacaaataa tgaatggaac atttactatt 840 gagttttata ataatgggca gttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt agaacatttg atacgtacag aatcacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacacag 900 tatgtacaaa gactgtttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020 tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080 ccaggttttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140 1182 gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg

<213> Искусственная последовательность

<220> <223> VP6 изолят 70

Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys 1 10 15 val val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn val Glu Asp Ile Ile Gln Gln 20 25 30 Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly $35 \ \ 40 \ \ \ 45$ Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp $90 \ \ 95$ Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg 130 140Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg 145 $$ 150 $$ 155 $$ 160 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe $180 \\ \hspace*{1.5cm} 185 \\ \hspace*{1.5cm} 190 \\ \hspace*{1.5cm}$ Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile $195 \\ 200 \\ 205$ Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile 210 215 220 Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Leu Thr Ile Leu Pro Asp Pro Ala Asn Gln Thr Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly

Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile $\frac{260}{265}$ Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile 275 280 Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg 290 295 300Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile 305 310 320 Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser 325 His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile 355 360 365

Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met 385

<210> 69 <211> 1182 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность

<220> <223> VP6 изолят 71

<400> 69 gatgtgctgt tctccattgc gaaaactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattaat tagaactttg 120 aatggcaaca cattccatac tggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt 180 caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact 240 agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 360 gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct 420 cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatggtgtt tgagtataga 480 aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat 540 tacacagcca gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc

cctaatggta ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaatgta ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca 720 gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt 780 840 gagttttata ataatgggca gttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt 900 agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacgcag tatgttcaaa gactgtttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020 1080 tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140 gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

<210> 70 <211> 394 <212> Белок <213> Искусственная последовательность

<220> <223> VP6 изолят 71

<400> 70

Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys 10 10 15

Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln 20 25 30

Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly $\frac{35}{40}$

Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln 50 60

Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr

Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp $85 \hspace{0.5cm} 90 \hspace{0.5cm} 95$

Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser $100 \ \ \, 105 \ \ \, 110$

Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe

Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg

Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg

Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met 165 170 175 Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe 180 185 190 Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile $195 \hspace{1cm} 200 \hspace{1cm} 205$ Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro 225 230 235 240 Ala Asn Gln Thr Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly 245 250 255Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile 260 265 270 Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile 275 280 285Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg 290 295 300 Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile 305 310 315 320Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser 325 330 335His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala 340 345 350 Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile $355 \hspace{1.5cm} 360 \hspace{1.5cm} 365$ Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu $370 \hspace{1.5cm} 375 \hspace{1.5cm} 380$ Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met 385

Искусственная последовательность

```
<220>
<223> VP6 изолят 72
<400> 71
gatgtgctgt tctccattgc gaaaactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt
                                                                          60
actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattaat tagaactttg
                                                                         120
                                                                         180
aatggcaaca cattccatac tggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt
caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact
                                                                         240
agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt
                                                                         300
                                                                         360
agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca
gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct
                                                                         420
cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatggtgtt tgagtataga
                                                                         480
aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat
                                                                         540
tacacagcca gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc
                                                                         600
                                                                         660
cctaatggta ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaatgta
ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca
                                                                         720
gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt
                                                                         780
gagttttata ataatgggca gttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt
agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacgcag
                                                                         900
tatgttcaaa gactgtttcc acagggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata
                                                                         960
                                                                        1020
actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat
tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa
                                                                        1080
ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta
                                                                        1140
gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg
                                                                        1182
       Белок
Искусственная последовательность
<220>
<223> VP6 изолят 72
<400> 72
Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys 10 15
Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln 20 25 30
Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly
```

Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln

50 55 60

Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser 100 105 110Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg 130 140Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg 145 150 155 160 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met 165 170 175 Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile 195 200 205 Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro 225 230 235 240 Ala Asn Gln Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly 245 250 255 Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile 260 265 270 Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile $275 \hspace{0.2in} 280 \hspace{0.2in} 285$ Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg 290 295 300 Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile 305 310315315 Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser

		325			330					335		
His Se	r Val Asp 340		Ile Val	Ala 345	Asn	۷a٦	Arg	Arg	Asp 350	Ser	Ala	
Met Pr	o Ala Gly 355	Thr Val	Phe Gln 360		Gly	Phe	Pro	Trp 365	Glu	Gln	Ile	
Leu Se 37	r Asn Tyr O	Thr Val	Ala Gln 375	Glu	Asp	Asn	Leu 380	Glu	Arg	Leu	Leu	
Leu Va 385	l Ala Ser	val Lys 390	Arg Met	Val	Met							
<210> <211> <212> <213>	73 33 ДНК Искусстве	енная по	следоват	ельно	ость							
<220> <223>	KSN760 -	обратны	й прайме	p VP4	4							
<400> cyttrm	73 tyay yact	tyatyh r	mdttdatt	r dbo	5							33
<210> <211> <212> <213>	74 34 ДНК ИСКУССТВ	енная по	следоват	ельно	ость							
<220> <223>	KSN761 -	прямой і	праймер	VP4								
<400> atggcg	74 tcct cacti	ttatca g	carttrat	y tca	ac							34
<210> <211> <212> <213>	75 52 днк Искусстве	енная по	следоват	ельно	ость							
<220> <223>	KSN762 -	обратныі	й прайме	p VP4	1							
<400> gtgcgg	75 ccgc aagc1	tttac y	ttrmtyay	y act	tyat	yhr	mdtt	:dat1	rd b	с		52
<210> <211> <212> <213>	76 47 ДНК Искусстве	енная пос	следоват	ельно	ость							
<220> <223>	KSN763 -	прямой г	праймер	VP4								

<400> 76 ggttccgcgt ggatccgcgt cctcacttta tcagcarttr atytcac

<210> 77

47

- 77 -

<211> <212> <213>	30 ДНК ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<220> <223>	Праймер 1 для введения His Tag в pNPL1	
<400> atgatg	77 atgc atatgtatat ctccttctta	30
<210> <211> <212> <213>	78 28 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	Праймер 2 для введения His Tag в pNPL1	
<400> catcat	78 catg gatccgaatt cgagctcc	28
<210> <211> <212> <213>	79 32 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	Rota C NSP4 прямой праймер для pNPL3	
<400> tcatca	79 tcat ggatccatca cctcaaaaac tg	32
<210> <211> <212> <213>	80 37 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	Rota C NSP4 обратный праймер для pNPL3 или pNPL1	
<400> gtgcgg	80 ccgc aagctttcat agacaaactt ccgtctc	37
<210> <211> <212> <213>	81 35 ДНК ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<220> <223>	Rota C VP4 прямой праймер для pNPL3	
<400> tcatca	81 tcat ggatccaggg cgtcctcact ttatc	35
<210> <211> <212> <213>	82 35 ДНК ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<220> <223>	Rota C VP4 обратный праймер для pNPL3 или pNPL1	
<400>	82	

gtgcgg	ccgc aagcttttat aacaccatca ttctc	35
<210> <211> <212> <213>	83 35 днк Искусственная последовательность	
<220> <223>	Rota C VP6 прямой праймер для pNPL3	
<400> tcatca	83 tcat ggatccgacg tgctgttttc aattg	35
<210> <211> <212> <213>	84 35 днк искусственная последовательность	
<220> <223>	Rota C VP6 обратный праймер для pNPL3 или pNPL1	
<400> gtgcgg	84 ccgc aagcttctac atcaccattc tcttc	35
<210> <211> <212> <213>	85 32 ДНК Искусственная последовательность	
<220> <223>	Rota C NSP4 прямой праймер для pNPL1	
<400> aatggg	85 tcgc ggatccatca cctcaaaaac tg	32
<210> <211> <212> <213>	86 35 днк Искусственная последовательность	
<220> <223>	Rota C VP4 прямой праймер для pNPL1	
<400> aatggg	86 tcgc ggatccaggg cgtcctcact ttatc	35
<210> <211> <212> <213>	87 35 ДНК ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<220> <223>	Rota C VP6 прямой праймер для pNPL1	
<400> aatggg	87 tcgc ggatccgacg tgctgttttc aattg	35
<210> <211> <212> <213>	88 31 ДНК ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	

```
<220>
<223> Rota C VP7 прямой праймер для pNPL3
<400> 88 tcatcatcat ggatccgttt gtgcaacatt g
                                                                             31
<210> 89
<211> 35
       днк
Искусственная последовательность
<220>
<223> Rota C VP7 обратный праймер для pNPL3 или pNPL1
<400> 89
gtgcggccgc aagcttttac gcgtatctta gcatc
                                                                            35
       ДНК
Искусственная последовательность
<220>
<223> VP7 последовательность: полная ORF
       прочий признак
(781)..(781)
n - a, c, g, или t
<400> 90 atggtttgtg caacattgta cactgtttgc gttatactct gcattctttt tatatacact
                                                                            60
ttactgttta gaaaaatgtt ccacctaatt actgatacat taatcataac tttaataata
                                                                           120
tctaactgta ttggatggac acatggtcaa atgtttattg atgacatgaa ttataatgga
                                                                           180
aacgttgaaa tagtcattaa cgctactgat ccattcaatg tagaatctct atgtatatat
                                                                           240
tttccaaatg ctgttgtagg atcacaagga cctggtcaaa cgaatggcca tttaaatgat
                                                                           300
ggaaattatg ctcaaacaat tgctacctta tttgagacaa aaggattccc aaaaggctca
                                                                           360
gtaacactta aaacatacat taaagcttca gattttatta gttcagtaga gatgacttgt
                                                                           420
tcgtataatg tagttataat acctgatgat ccaaataagt cagaggagat tgaacaaata
                                                                           480
gcagaatgga ttctgaatgt ttggagatgt gatgatatgg atttaactat ttatacttac
                                                                           540
gaacaaacag gaatagataa tttgtgggct gcttttggtg acgattgtga tatatctgtt
                                                                           600
tgtccactag acactacaat gcatggaatt ggatgttcac ctgcaagtac agaaacatat
                                                                           660
gaagtattat caaataacac gcaagtagcg ttaattaatg ttgtagataa tgtaaaacac
                                                                           720
agaattcaaa tgaatactgg tcattgtaag ttaaagaatt gtgtgaaagg cgaagcaaga
                                                                           780
ntaaatactg caatagtaag aatttcaaag tcatcaagct ttgataattc attgtcacca
                                                                           840
ttaaataatg gtcaaactac acgatcattt aaaataaacg ctaagaaatg gtggacaata
                                                                           900
ttttatacaa taattgatta cattaataca attgtacaga caatgactcc tagacatagg
                                                                           960
gccatttacc cagaaggttg gatgctaaga tacgcg
                                                                           996
```

```
<210> 91
<211> 332
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> VP7 последовательность: полная ORF
<220>
<221> прочий признак
<222> (261)..(261)
<223> Хаа - любая аминокислота
Met Val Cys Ala Thr Leu Tyr Thr Val Cys Val Ile Leu Cys Ile Leu 15 10 15
Phe Ile Tyr Thr Leu Leu Phe Arg Lys Met Phe His Leu Ile Thr Asp 20 \hspace{1.5cm} 25 \hspace{1.5cm} 30
Thr Leu Ile Ile Thr Leu Ile Ile Ser Asn Cys Ile Gly Trp Thr His 35 \hspace{1cm} 40 \hspace{1cm} 45
Val Ile Asn Ala Thr Asp Pro Phe Asn Val Glu Ser Leu Cys Ile Tyr
65 70 75 80
Phe Pro Asn Ala Val Val Gly Ser Gln Gly Pro Gly Gln Thr Asn Gly 85 \\ 90 \\ 95
His Leu Asn Asp Gly Asn Tyr Ala Gln Thr Ile Ala Thr Leu Phe Glu
100 105 110
Thr Lys Gly Phe Pro Lys Gly Ser Val Thr Leu Lys Thr Tyr Ile Lys 115 120 125
Ala Ser Asp Phe Ile Ser Ser Val Glu Met Thr Cys Ser Tyr Asn Val
Val Ile Ile Pro Asp Asp Pro Asn Lys Ser Glu Glu Ile Glu Gln Ile 145 \phantom{\bigg|}150\phantom{\bigg|} 150 \phantom{\bigg|}160\phantom{\bigg|}
Ala Glu Trp Ile Leu Asn Val Trp Arg Cys Asp Asp Met Asp Leu Thr
165 170 175
Ile Tyr Thr Tyr Glu Gln Thr Gly Ile Asp Asn Leu Trp Ala Ala Phe 180 \hspace{0.25cm} 190 \hspace{0.25cm}
Gly Asp Asp Cys Asp Ile Ser Val Cys Pro Leu Asp Thr Thr Met His 195 200 205
```

Asn Asn Thr Gln Val Ala Leu Ile Asn Val Val Asp Asn Val Lys His 225 230 235 240 Arg Ile Gln Met Asn Thr Gly His Cys Lys Leu Lys Asn Cys Val Lys 245 250 255 Gly Glu Ala Arg Xaa Asn Thr Ala Ile Val Arg Ile Ser Lys Ser Ser 260 265 270 Ser Phe Asp Asn Ser Leu Ser Pro Leu Asn Asn Gly Gln Thr Thr Arg 275 280 285 Ser Phe Lys Ile Asn Ala Lys Lys Trp Trp Thr Ile Phe Tyr Thr Ile $\frac{290}{290}$ $\frac{295}{300}$ Ile Asp Tyr Ile Asn Thr Ile Val Gln Thr Met Thr Pro Arg His Arg 305 $$310\$ Ala Ile Tyr Pro Glu Gly Trp Met Leu Arg Tyr Ala

<210> 92 <211> 2208 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность

<220> <223> VP4 полная ORF GenBank (M74218)

<400> 92 atggcgtcct cactttatca gcagttaatt tcacaaaatt attattctat tggaaacgaa atattaacag atcaacagac aacagaaact gtagtagatt atgtagatgc tggtaattat 120 acatacgcgc aattaccacc tactaaatgg ggagcacgtg ggacttttaa gtctgcattt 180 aatgtatcaa atataactgg acctcatacg aatacaataa tagaatggag taatttacta 240 aattctaacg gatgggtcat ttatcaaaaa ccggccaata ctacaaaatt atttaaacat 300 360 acatcagtta catcagacta ttattcttca ttacagaata atgaaaaaac tgtgacagct 420 480 acttcagatt cattgatact attttggaat gaaggatcta cagtgttagc taataaaaag gtaaatttta gctgggacat gggtggtatg ttaataaaac ctacgagagg caatagagtg 540 gacatctgca tggcaaacat gaatgatttc aatagtagca tatttaattg ggaagaatgg 600 aaacatgaat ttccacgcag tgatgttaat ataaatgtta atatgtatac agattattat 660 720 cttgcgagtg aagatcctta tactgaactt aaagcactac agcaaccaaa cattacaact tttgagatga aaatgatgaa aataatccgt aatgggtcaa taaacttgaa tgaagtagta 780

```
840
agtaaagact cactatggca ggaggtaaga tatgctaggg atataacgtt agagtgtaag
atagaatcag aagtagtcaa aggtggtgga tgggggttatg actacacgag tgtagctttt
                                                                        900
aaaactgtta atcatacata cacgtatact cgagctggtg aaatagtaaa tgcacatgtt
                                                                        960
                                                                       1020
accattagtt ttaataatat gaaagaacga tcatacgggg gttcattacc gactgatttc
                                                                       1080
aaaataggaa ggtttgatgt aattgatact gatacttata tgtatataga ttattgggac
gattcagaaa ttttcaaaaa tatggtgtat gtgcgtgatt taagtgctaa cattggtggt
                                                                       1140
ttcttttatt atgctgaaat gtcatattat tttcaaattc ctgtaggtgc acatccagga
                                                                       1200
ttacattcat caggagtaag atttgtatat gaaagatgtc ttttatcaca acaattcact
                                                                       1260
gaccaagttg cacttaactc tatgaggttc atatttagag tgacagaatc aaatggttgg
                                                                       1320
                                                                       1380
tttatgacat caggtaatat taatactaga cggatagcat caggaactgg atttgcatat
                                                                       1440
gcagacgggc atacttctca aacagttgga aatattactt tcatatcatt gatcccaagt
aatccaaatt atcagacacc aatagcatca tcaagcacag tcaggatgga tttagaaagg
                                                                       1500
aagataaatg atttacgtaa tgattttaat cagctagcta attcagtcgc attaggtgac
                                                                       1560
attctatctt tggcaacttc accactaact tttgctaatt tgcttgaatc agtgcctgct
                                                                       1620
                                                                       1680
atcgcttcat cagttaaaga tgttgcagct aatgtaatga aaaaatttag aaacactaaa
atgtttaaaa aagctacaaa agctaaatat agtgagttta ttattggaga tttgttggaa
                                                                       1740
gatgtaacga atgttgcacg aaattcaaat ggcatgaatt ttgatgacat tacatccgct
                                                                       1800
gtgatggtat caactactaa taaactacaa cttactgacg tagacacact ctcagagatt
                                                                       1860
gtcgctagat cagctgataa ttttatccct aacagatctt acagaatgat agaagacggt
                                                                       1920
attgtgtatg aagcaacacc aaaacgaact ttctcatacg atcttacaac attgcaacag
                                                                       1980
agggaatttg acatagataa gttcatgcga ttggcatcta aatcaccagt aatatctgca
                                                                       2040
atagtagatt ttgcaacatt aaaggctatg agagaaacat atggtgtagg aacggacgta
                                                                       2100
atatacaaat tagtagcctc agatgctcca acgatattat cattcatcga taacaacaat
                                                                       2160
ccgttgatta aaagtagaat tgaggaacta ttaagacaat gcagatta
                                                                       2208
```

```
<210> 93
<211> 736
<212> Бело
```

<400> 93

Met Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser $1 \hspace{1cm} 15$

Ile Gly Asn Glu Ile Leu Thr Asp Gln Gln Thr Thr Glu Thr Val Val $20 \ \ 25 \ \ 30$

Asp Tyr Val Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Tyr Ala Gln Leu Pro Pro Thr

<213> Искусственная последовательность

<220> <223> VP4 полная ORF GenBank (M74218)

35 40 45

Lys Trp Gly Ala Arg Gly Thr Phe Lys Ser Ala Phe Asn Val Ser Asn 50 55 60Ile Thr Gly Pro His Thr Asn Thr Ile Ile Glu Trp Ser Asn Leu Leu 65 70 75 80Asn Ser Asn Gly Trp Val Ile Tyr Gln Lys Pro Ala Asn Thr Thr Lys Leu Phe Lys His Gly Pro Glu Thr Tyr Asn Ser Asn Leu Ala Ala Phe $100 \hspace{1cm} 105 \hspace{1cm} 110$ Glu Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Gly Thr Ser Val Thr Ser Asp Tyr Tyr 115 120 125 Ser Ser Leu Gln Asn Asn Glu Lys Thr Val Thr Ala Thr Ser Asp Ser 130 135 140 Leu Ile Leu Phe Trp Asn Glu Gly Ser Thr Val Leu Ala Asn Lys Lys 155 150 155 160Val Asn Phe Ser Trp Asp Met Gly Gly Met Leu Ile Lys Pro Thr Arg Gly Asn Arg Val Asp Ile Cys Met Ala Asn Met Asn Asp Phe Asn Ser 180 185 190 Ser Ile Phe Asn Trp Glu Glu Trp Lys His Glu Phe Pro Arg Ser Asp Val Asn Ile Asn Val Asn Met Tyr Thr Asp Tyr Tyr Leu Ala Ser Glu 210 215 220Asp Pro Tyr Thr Glu Leu Lys Ala Leu Gln Gln Pro Asn Ile Thr Thr 225 230 235 240 Phe Glu Met Lys Met Met Lys Ile Ile Arg Asn Gly Ser Ile Asn Leu 250 255 Asn Glu Val Val Ser Lys Asp Ser Leu Trp Gln Glu Val Arg Tyr Ala Arg Asp Ile Thr Leu Glu Cys Lys Ile Glu Ser Glu Val Val Lys Gly 275 280 285 Gly Gly Trp Gly Tyr Asp Tyr Thr Ser Val Ala Phe Lys Thr Val Asn 290 300 His Thr Tyr Thr Tyr Thr Arg Ala Gly Glu Ile Val Asn Ala His Val

305 310 315 320

Thr Ile Ser Phe Asn Asn Met Lys Glu Arg Ser Tyr Gly Gly Ser Leu Pro Thr Asp Phe Lys Ile Gly Arg Phe Asp Val Ile Asp Thr Asp Thr 340 345 350Val Tyr Val Arg Asp Leu Ser Ala Asn Ile Gly Gly Phe Phe Tyr Tyr 370 380 Ala Glu Met Ser Tyr Tyr Phe Gln Ile Pro Val Gly Ala His Pro Gly 385 390 400 Leu His Ser Ser Gly Val Arg Phe Val Tyr Glu Arg Cys Leu Leu Ser 410 415 Gln Gln Phe Thr Asp Gln Val Ala Leu Asn Ser Met Arg Phe Ile Phe 420 425 430Arg Val Thr Glu Ser Asn Gly Trp Phe Met Thr Ser Gly Asn Ile Asn $435 \hspace{1.5cm} 440 \hspace{1.5cm} 445$ Thr Arg Arg Ile Ala Ser Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Ala Asp Gly His 450 460Thr Ser Gln Thr Val Gly Asn Ile Thr Phe Ile Ser Leu Ile Pro Ser Asn Pro Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Ala Ser Ser Ser Thr Val Arg Met $485 \hspace{1.5cm} 490 \hspace{1.5cm} 495$ Asp Leu Glu Arg Lys Ile Asn Asp Leu Arg Asn Asp Phe Asn Gln Leu 500 505 510Ala Asn Ser Val Ala Leu Gly Asp Ile Leu Ser Leu Ala Thr Ser Pro Leu Thr Phe Ala Asn Leu Leu Glu Ser Val Pro Ala Ile Ala Ser Ser 530 540 Val Lys Asp Val Ala Ala Asn Val Met Lys Lys Phe Arg Asn Thr Lys 545 550 560 Met Phe Lys Lys Ala Thr Lys Ala Lys Tyr Ser Glu Phe Ile Ile Gly Asp Leu Leu Glu Asp Val Thr Asn Val Ala Arg Asn Ser Asn Gly Met

Asn Phe Asp Asp Ile Thr Ser Ala Val Met Val Ser Thr Thr Asn Lys $595 \hspace{0.5cm} 600 \hspace{0.5cm} 605$ Leu Gln Leu Thr Asp Val Asp Thr Leu Ser Glu Ile Val Ala Arg Ser 610 620Ala Asp Asn Phe Ile Pro Asn Arg Ser Tyr Arg Met Ile Glu Asp Gly 625 630 635 640Ile Val Tyr Glu Ala Thr Pro Lys Arg Thr Phe Ser Tyr Asp Leu Thr 645 650 655Thr Leu Gln Gln Arg Glu Phe Asp Ile Asp Lys Phe Met Arg Leu Ala 660 665 670 Ser Lys Ser Pro Val Ile Ser Ala Ile Val Asp Phe Ala Thr Leu Lys 675 680 685Ala Met Arg Glu Thr Tyr Gly Val Gly Thr Asp Val Ile Tyr Lys Leu 690 700 Val Ala Ser Asp Ala Pro Thr Ile Leu Ser Phe Ile Asp Asn Asn Asn 705 710 715 720 Pro Leu Ile Lys Ser Arg Ile Glu Glu Leu Leu Arg Gln Cys Arg Leu 725 730 735

<400> 94

atcacctcaa aaactgtgat tgaaagattt aaaactgaaa acaatactaa tgatcaaagc ggtaatattc atgaagaata tgaagaggta atgaaacaaa tgcgtgagat gaaaattcat 120 180 ttgactgcgc tatttaataa tatacacaaa gataatatgg agtggaggat gagtgaatca attcgcagag aaaagaaacg tgaaatgaaa gcgaatacag ccgagaatgt aattaaaaat 240 gatgtaaata atgttaacat atgtgatacg tcaggactgg agacggaagt ttgtctaagg 300 gcgtcctcac tttatcagca attaatctca caaaattatt attcaactgg taatgaaatt 360 420 ttgttggata gacagactac cagaaccact aaagattacg tagaagctgg aaattataca 480 tatgctcaat taccaccaac ggagtgggga gcagggtcaa cctttgaatc tacattcaaa tcatcaaata taactggtcc acacaataac acagtcattg aatggagtaa tttaatgaat 540 tctgatattt ggttattgta tcaaaaacca ttggatataa ctgcaccaat cagattatta 600

ДНК Искусственная последовательность

<220> <223> Тройной слитый белок Rota C NSP4-VP4-VP6

```
660
aaacatggac cggaaaatca tgctgatgta gcagcttttg aattatggta tggtaaagct
ggtcataccg tgacatcaat atattattca gcaatatcta atcctaataa tactgttacg
                                                                       720
ttaacgtcgg attcattagt tctattttgg aacgaaggtc aaacgatact ggatacaaag
                                                                       780
acagtcaatt ttaattggaa tatgggtggt atattagtta gaccgtcaag aggtacacgt
                                                                       840
gtggacattt gtatgtctga tatggacaat acagatggta ctaattttaa ttggattcaa
                                                                       900
tggaagcatg agttcccccg tagtagtagt aatgctaatg ttagtatgta tgttgaatat
                                                                       960
tatctagcaa gtagtgatcc ataccatgaa ctcaaagagt tgcaaagacc agcagtaaca
                                                                      1020
                                                                      1080
actataaata tgagaatgat ggtgttagac gtgctgtttt caattgcaaa gactgtttca
gatctcaaga agaaagttgt agttggtact atttatacaa atgtagaaga tataattcaa
                                                                      1140
cagactaacg aattgattag aactttaaat ggcaacacat tccatactgg tggaattgga
                                                                      1200
acacaacctc aaaaagaatg gaactttcag ctaccacagc taggtacaac actcttgaat
                                                                      1260
ttggatgata actatgttca agcaactaga agtattattg attacttagc ctcattcata
                                                                      1320
gaagcagtgt gtgatgacga aattgttaga gaagcgtcaa gaaatggaat gcaacctcaa
                                                                      1380
tcccctgcat ttatagcatt atcttcatca aaatttaaga ctattaattt taacaatagt
                                                                      1440
tcgcaatcca ttaaaaattg gagtgctcaa tcaagacgtg agaatccagt ttatgaatac
                                                                      1500
aaaaatccga tggtatttga atatagaaat tcgtacattc ttcagcgtgc taatgcacaa
                                                                      1560
tttgggaacg taatgggact gagatattac acagccagca atgtctgtca gattgcagct
                                                                      1620
tttgattcaa ctcttgctga aaatgctcct aatggcgctc aacggtttat ctataatgga
                                                                      1680
agacttaaga gaccaatttc taatgtgttg atgaaaattg aagcaggcgc tccaaatatt
                                                                      1740
aataatccaa caatactacc tgatccagca aaccaaacta catggttatt taatccagtg
                                                                      1800
cagataatga atggaacgtt cactattgaa ttttacaaca atggacaatt ggtcgatttg
                                                                      1860
attagaaata tgggagtggt tactgttaga acgtttgata catacagaat tacaattgat
                                                                      1920
atgattagac cagcagccat gacacagtat gtacaaagac tgttcccaca aggtggccca
                                                                      1980
tatcaacatc aagctgcata tatgatgaca cttagtatat tagatgctac aacagaatca
                                                                      2040
gttatgtgcg attcacattc agtagactat tcaattgttg caaatgtcag aagagattca
                                                                      2100
gcgatgccag ctggaacagt atttcagcca ggctttccat gggaacagac gttatccaac
                                                                      2160
tacactgttg ctcaggaaga caatttagaa agacttttat tggttgcgtc tgtgaagaga
                                                                      2220
atggtgatg
                                                                      2229
```

<210> 95 <211> 743 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220> <223> Тройной слитый белок Rota C NSP4-VP4-VP6

<400> 95

Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Glu Arg Phe Lys Thr Glu Asn Asn Thr

1 5 10 15

Asn Asp Gln Ser Gly Asn Ile His Glu Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys 20 25 30 Gln Met Arg Glu Met Lys Ile His Leu Thr Ala Leu Phe Asn Asn Ile $35 \hspace{1.5cm} 40 \hspace{1.5cm} 45$ His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu Lys Lys Arg Glu Met Lys Ala Asn Thr Ala Glu Asn Val Ile Lys Asn 65 70 75 80Asp Val Asn Asn Val Asn Ile Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu 85 90 95 Val Cys Leu Arg Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser Thr Gly Asn Glu Ile Leu Leu Asp Arg Gln Thr Thr Arg 115 120 125Thr Thr Lys Asp Tyr Val Glu Ala Gly Asn Tyr Thr Tyr Ala Gln Leu 130 140 Pro Pro Thr Glu Trp Gly Ala Gly Ser Thr Phe Glu Ser Thr Phe Lys 145 150 160 Ser Ser Asn Ile Thr Gly Pro His Asn Asn Thr Val Ile Glu Trp Ser 165 170 175Asn Leu Met Asn Ser Asp Ile Trp Leu Leu Tyr Gln Lys Pro Leu Asp 180 185 190 Ile Thr Ala Pro Ile Arg Leu Leu Lys His Gly Pro Glu Asn His Ala 195 200 205 Asp Val Ala Ala Phe Glu Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Gly His Thr Val 210 215 220 Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser Ala Ile Ser Asn Pro Asn Asn Thr Val Thr 225 230 235 240 Leu Thr Ser Asp Ser Leu Val Leu Phe Trp Asn Glu Gly Gln Thr Ile 245 250 255 Leu Asp Thr Lys Thr Val Asn Phe Asn Trp Asn Met Gly Gly Ile Leu 260 265 270 Val Arg Pro Ser Arg Gly Thr Arg Val Asp Ile Cys Met Ser Asp Met

275 280 285

Asp Asn Thr Asp Gly Thr Asn Phe Asn Trp Ile Gln Trp Lys His Glu 290 300Phe Pro Arg Ser Ser Ser Asn Ala Asn Val Ser Met Tyr Val Glu Tyr 305 \$310\$Tyr Leu Ala Ser Ser Asp Pro Tyr His Glu Leu Lys Glu Leu Gln Arg Pro Ala Val Thr Thr Ile Asn Met Arg Met Met Val Leu Asp Val Leu 340 345Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys Val Val Val 355 360 365 Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln Thr Asn Glu 370 375 Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly Gly Ile Gly 385 390 400 Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln Leu Gly Thr 405 410 415Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr Arg Ser Ile 420 425 430 Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp Asp Glu Ile 435 440 445Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser Pro Ala Phe Ile Ala Leu Ser Ser Ser Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe Asn Asn Ser 465 470 475 480Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Phe Gly Asn Val Met Gly Leu Arg 515 520 525 Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Val Cys Gln Ile Ala Ala Phe Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Ala Gln Arg Phe Ile Tyr Asn Gly

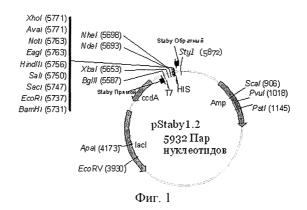
```
Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile Glu Ala Gly 565 570 575
  Ala Pro Asn Ile Asn Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro Ala Asn Gln 580 585 590
  Thr Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly Thr Phe Thr 595 \hspace{1.5cm} 600 \hspace{1.5cm} 605
  Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile Arg Asn Met 610\,
  Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile Thr Ile Asp 625 630 635 640
  Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg Leu Phe Pro 645 650 655
  Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Met Thr Leu Ser 660 \hspace{1.5cm} 665 \hspace{1.5cm} 670
  Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser His Ser Val 675 \\ 680 \\ 685
  Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala Met Pro Ala 690 700
  Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Thr Leu Ser Asn 705 \hspace{0.25cm} 710 \hspace{0.25cm} 720
  Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu Leu Val Ala 725 730 735
  Ser Val Lys Arg Met Val Met
  <210> 96
<211> 34
<212> ДНК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
  <220>
<223> NSP4 прямой праймер
  <400> 96 aagtgaggac gcccttagac aaacttccgt ctcc
 <210> 97
<211> 19
<212> ДНК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<220>
<223> VP4 прямой праймер
<400> 97 agggcgtcct cactttatc
                                                                                                  19
         днк
Искусственная последовательность
<220>
<223> VP4 обратный праймер
<400> 98
tgaaaacagc acgtctaaca ccatcattct c
                                                                                                 31
         99
20
ДНК
Искусственная последовательность
<220>
<223> VP6 прямой праймер
<400> 99
gacgtgctgt tttcaattgc
                                                                                                 20
```

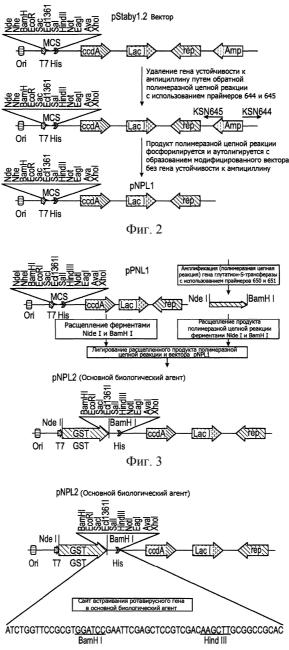
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

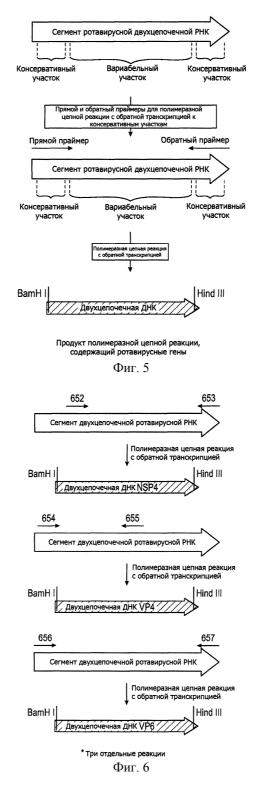
- 1. Вакцинная композиция против ротавирусной инфекции, содержащая:
- а) полипептиды ротавируса NSP4, VP4 и VP6 и
- b) фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.
- 2. Композиция по п.1, в которой указанные ротавирусные полипептиды NSP4, VP4 и VP6 слиты в

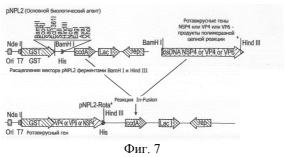
рекомбинантный тройной полипептид.

- 3. Композиция по п.2, в которой указанный рекомбинантный тройной полипептид представляет собой полипептид NSP4-VP4-VP6 ротавируса С.
 - 4. Композиция по любому из пп.1-3, дополнительно содержащая адъювант.
 - 5. Композиция по п.4, в которой адъювант представляет собой эмульсию типа "масло в воде".
- 6. Композиция по любому из пп.2-5, в которой указанный рекомбинантный тройной полипептид имеет последовательность SEQ ID NO: 95.
- 7. Композиция по любому из пп.1-5, в которой полипептиды NSP4, VP4 и VP6 включают амино-кислотные последовательности, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39 для NSP4, SEQ ID NO: 41, 43, 45, 47, 49 для VP4, SEQ ID NO: 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 для VP6.
- 8. Композиция по любому из пп.1-7, дополнительно содержащая по меньшей мере один антиген, ассоциированный с патогеном, отличным от ротавируса.
- 9. Композиция по п.8, в которой по меньшей мере один указанный антиген способен вызывать у свиней иммунный ответ, направленный против Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyo), цирковируса свиней 2 типа (PCV2), вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), вируса свиного гриппа (SIV) или другого патогена, способного заражать свиней.
- 10. Способ получения вакцинной композиции по любому из пп.1-9, включающий следующие этапы:
 - (а) забор биологического образца у животного;
 - (b) определение ротавирусного инфекционного статуса животного;
 - (с) выделение РНК из образца животного, зараженного ротавирусами одного или более типов;
- (d) проведение полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой и праймерами, комплементарными генам NSP4, VP4 и VP6;
 - (e) встраивание продукта ПЦР, полученного на этапе (d), в подходящий экспрессионный вектор;
- (f) введение вектора, полученного на этапе (e), в экспрессионную систему подходящего организмахозяина;
 - (g) выделение полипептидов ротавируса NSP4, VP4 и VP6 и
 - (h) добавление к ротавирусным полипептидам дополнительных вакцинных компонентов,
- 11. Способ по п.10, в котором указанные дополнительные компоненты выбирают из адъювантов, ветеринарно приемлемых носителей, разбавителей и антигенов, ассоциированных с патогенами, отличными от ротавирусов.
 - 12. Способ по п.11, в котором дополнительным компонентом является адьювант.
- 13. Способ по п.11, в котором указанные антигены способны вызывать у свиней иммунный ответ, направленный против Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyo), цирковируса свиней 2 типа (PCV2), вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), вируса свиного гриппа (SIV) или другого патогена, способного заражать свиней.
- 14. Способ вакцинации свиньи, включающий по меньшей мере однократное введение композиции по любому из пп.1-9.
- 15. Способ по п.14, в котором свинья является свиноматкой, которой осталось от около 3 до около 6 недель до опороса.
- 16. Способ по п.15, в котором среди поросят, рождающихся у указанной свиноматки, понижены смертность и/или заболеваемость по сравнению с поросятами невакцинированных свиноматок.







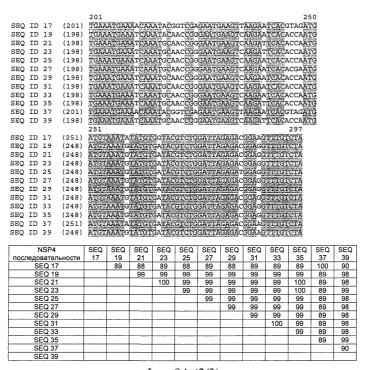




Фиг. 8

		1 50
SEQ ID 17	(1)	ATCACCTCAAAAACTGTGATTGGTAAATTCAAGACTGAAAACAATATTAG
SEO ID 19	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEO ID 21	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEO ID 23	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEQ ID 25	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEO ID 27	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEQ ID 29	(1)	ATCACCTCGAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEQ ID 31	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEQ ID 33	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEQ ID 35	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAATGACATTAG
SEQ ID 37	(1)	ATCACCTCAAAAACTGTGATTGGTAAATTCAAGACTGAAAACAATATTAG
SEQ ID 39	(1)	ATCACCTCAAAAACTGTGATTGGTAAATTCAAGACTGAAAATGACATTAG
		51 100
SEQ ID 17	(51)	TCATCAGAATGACGACATTCATAAAGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 19	(51)	CCACCAGAACAATGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 21	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 23	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 25	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTAATGAAACAAA
SEQ ID 27	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 29	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 31 SEO ID 33	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 33 SEQ ID 35	(51) (51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 35	(51)	TCATCAGAATGACGACATTCATAAAGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
SEQ ID 37	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA
DEQ ID 39	(31)	101
SEO ID 17	(101)	TGCGTGACATGAGAGTTCATGTAACTGCACTATTTAATAGTATACATAAG
SEQ ID 19	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCATACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEQ ID 21	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCATACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEO ID 23	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCATACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEQ ID 25	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEQ ID 27	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCATACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEQ ID 29	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEQ ID 31	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEQ ID 33	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCATACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEQ ID 35	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCATACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
SEQ ID 37	(101)	TGCGTGACATGAGAGTTCATGTAACTGCACTATTTAATAGTATACATAAG
SEQ ID 39	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCATACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA
	/- >	151 200
SEQ ID 17	(151)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCGATTCGCAGAGAAAAGAAGCG
SEQ ID 19	(148)	GATAATATGGAGTGAGAATGAGTGAATCAATTCGCAGAGAAAAGAAGCG
SEQ ID 21 SEO ID 23	(148)	GATAATATGGAATGGAGAATGAGTGAATCAATTCGCAGAGAAAAGAAGCG
SEQ ID 23 SEO ID 25	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGCAGAGAAAAGAAGCG
SEQ ID 25	(148) (148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGCAGAGAAAAGAAGCG GATAATATGGAGTGGAG
SEQ ID 27	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATCGGCAGAGAAAAGAAGCG GATAATATGGAGTGGAG
SEQ ID 29	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATCCGCAGAGAAAAGAAACG GATAATATGGAGTGGAG
SEQ ID 31	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGCAGAGAAAAAGAAACG
SEQ ID 35	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGCAGAGAAAAGAAGCG
SEQ ID 33	(151)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCGATTCGCAGAGAAAAGAAGCG
SEQ ID 37	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGCAGAGAAAAGAAGCG
~ 37	(110)	SOURCE STREET ST

Фиг. 9А (1/3)



Фиг. 9А (2/3)

	1									50)	
SEQ ID 18 (1)	ITSKI	VIGKE	KTENN	ISHQN	IDDIH	EYEEV	MKQMF	DMRVI	VTALE	NSIH	ţ	
SEQ ID 20 (1)	ITSKI	VISKE	KTENE	ISHQN	NDINK	EYEEV	MKQMF	EMRVI	MTALE	NSIH	Ž	
SEQ ID 22 (1)	ITSKI	VISKE	KTENI	ISHQN	NDINE	EYEEV	MKQMF	EMRVI	MTALE	NSIHK	į	
SEQ ID 24 (1)	ITSKI	VISKE	KTENE	ISHQN	INDINK	EYEEV	MKQMF	EMRVI	MTALE	NSIHK	ţ	
SEQ ID 26 (1)	ITSKI	VISKE	KTENE	ISHQN	NDINK	EYEEV	MKQMF	EMRVI	MTALE	NSIHK	į	
SEQ ID 28 (1)	ITSKI	VISKE	KTEND	ISHQÑ	NDINK	EYEEV	MKQMF	EMRVI	MTALE	NSIHK		
SEQ ID 30 (1)	ITSKI	VISKF	KTEND	ISHON	NDINK	EYEEV	MKQMR	EMRVI	MTALE	NSIHK		
SEQ ID 32 (1)	ITSKI	VISKE	KTEND	ISHQN	NDINK	EYEEV	MKQMR	EMRVI	MTALE	NSIHK		
SEQ ID 34 (1)	ITSKI	VISKF	KTEND	ISHQN	NDINK	EYEEV	MKQMR	EMRVE	MTALF	NSIHK		
SEQ ID 36 (1)	ITSKI	VISKE	KTEND	ISHQN	NDINK	EYEEV	MKQMR	EMRVI	MTALF	NSIHK		
SEQ ID 38 (1)	ITSKI	VIGKE	KTENN	ISHON	DDIHK	EYEEV	MKQMR	DMRVI	VTALE	NSTHK		
SEQ ID 40 (1)	ITSKI	VIGKE	KTEND	ISHQN	NDINK	EYEEV	MKQMR	EMRVI	MTALE	NSIHK		
	51									99		
SEQ ID 18 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	TÑTVE	NEVKN	HVDDV	NICGI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 20 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNTTC	NEVKN	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 22 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATO	NEVKI	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 24 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATG	NEVKI	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 26 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATG	NEVKN	HTNDV	NVCDI	SGLEM	EVCL		
SEQ ID 28 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATG	NEVKN	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 30 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATG	NEVKN	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 32 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATG	NEVKN	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 34 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATG	NEVKN	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 36 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATG	NEVKI	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 38 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	TNTVE	NEVKN	HVDDV	NICDI	SGLET	EVCL		
SEQ ID 40 (51)	DNMEW	RMSES	IRREK	KREMK	SNATG	NEVKI	HTNDV	NVCDI	SGLET	EVCL		
	and are made					SS-MALLE-13						
NSP4	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ
последовательности	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
SEQ 18		87	85	85	85	86	86	86	86	85	99	86
SEQ 20			98	98	98	99	99	99	99	98	88	97
SEQ 22				100	98	99	99	99	99	100	86	99
SEQ 24					98	99	99	99	99	100	86	99
SEQ 26						99	99	99	99	98	86	97
SEQ 28							100	100	100	99	87	98
SEQ 30								100	100	99	87	98
SEQ 32	-		-			-	_	l	100	99	87	98
SEQ 34							<u> </u>			99	87	98
SEQ 36		_	-								86	99
SEQ 38	-							-				87

Фиг. 9А (3/3)

```
SEQ ID 41
                                     AGGGCGTCCTCACTTTATCATCAATTAATTTCTCAGAATTATTATTCAAC
                                     AGGCCTCCTCACTTTATCAGCAATTAATTTCACAGAATTATTATTCAAC
AGGCCTCCTCACTTTATCAGCAATTAATCTCACAGAATTATTATTCAAC
AGGCCTCCTCACTTTATCAGCAATTAATCTCACAGAATTATTATTATAAC
AGGCCTCCTCACTTTATCAGCAATTAATCTCACAAAATTATTATTCAAC
 SEQ ID 43
                              (1)
 SEO TD 45
                              (1)
 SEO ID 47
                              (1)
 SEQ ID 49
                             (1)
                                                                                                                                          100
                                     TGGGAATGAGATCTTAAAAGATTTACAAACGACTAAAACTACTGTTGACT
TGGAAATGATATTTTACTGGATCAGCAAACAAATAACACAACTGTTGACT
TGGAAATGATATTTTACTGGATCAGCAAACAAATAACACAACTGTTGACT
TGGAAATGATATTTTACTGGATCAGCAAACAAATAACAACTGTTGACT
TGGAAATGATATTTTACTGGATCAGCAAACAAATAACAACTGTTGACT
 SEO ID 41
                           (51)
 SEO ID 43
                           (51)
 SEO ID 45
                           (51)
 SEQ ID 47
                           (51)
 SEO ID 49
                           (51)
                                      101
                                                                                                                                          150
                                     TOT
ATGTAGATGCTGGGAATTATACATATGCTCAATTGCCGCCAACGAAGTGG
ATATAGATATAGGAAATTATTCGTATAGACAATTACCGCCGACATCATGG
ATATAGATATAGGAAATTACTCGTATAGACAATTACCGCCGACATCATGG
 SEO TD 41
                         (101)
 SEO ID 43
                         (101)
 SEQ ID 45
                         (101)
                                     ATATAGATATAGGAAATTATTCGTATACACAATTACCGCCGACATCATG
 SEQ ID 47
 SEO ID 49
                                     ATGTAGATGTGGGAAATTATTCATATACACAATTACCACCAACATCATGG
                         (101)
                                                                                                                                          200
                                     200
GGAGCTGGAGCTACCTTCGAATCAGTCTTTTAGCGCAGCTGAAATAACAGG
GGAGCAGGAATCACTTTTAAGTCTGCATTTTAATGCAGGAAATTACAGG
GGAGCAGGAATGACTTTTAAGTCTGCATTTAATGCAGAGGAAATTACAGG
GGAGCAGGAATGACTTTTAACGTCTGCATTTAATGCAGAGGAAATTACAGG
 SEO ID 41
                         (151)
 SEQ ID 43
                         (151)
 SEQ ID 45
                         (151)
 SEO ID 47
                         (151)
 SEQ ID 49
                         (151)
                                     GGAGCAGGAATGACTTTTAAGTCTGCATTTAATGCAGAAGAAATGACGGG
                                      201
                                                                                                                                         250
                                    201

ACCGCACAGAAATAGAGTTATAGAGTGGAAGAATTTACTAAATTCTGACC
ACCCAATACAGGT ---GATATAGATTTGAATAATTTTGACAAATGGGAATG
ACCCAATAGGGGT ---GATATAGATTTGAATAATTTTGACAAATGGGAATG
ACCCAATAGAGGT ---GATATAGATTTGAATAATTTTGACAAATGGGAATG
ACCCAATAGAGGT ---GATATAGATTTGAATAATTTTGACAAATGGGAATG
 SEQ ID 41
                         (201)
 SEQ ID 43
                         (201)
 SEQ ID 45
                         (201)
SEC TD 47
                         (201)
SEO ID 49
                         (201)
                                                                                                                                         300
                                     251
                                   AGTGGTTGCTGTTTCCAÄÄACCAGGTGACÄGAGTTAAATTACTTÄÄÄCAT
GGTGGATATTGTATGACÄÄACCAACTGATÄCAAAACGATTGTTÄÄÄÄCTA
GATGGATATTGTATGACÄÄACCAACTGATÄCAAAACGATTGTTÄÄÄÄCTA
GGTGGATATTGTATGACÄÄÄCCAACTGATÄCAAAACGATTGTTÄÄÄÄCTA
GATGGATATTATÄTGAGÄÄGCGACAATTÄCAAAACGGTTATTÄÄÄÄCTA
SEQ ID 41
SEQ ID 43
                         (248)
SEO ID 45
                        (248)
SEQ ID 47
                        (248)
SEQ ID 49
                                     301
                                    350
GGACCTCAAACATATGATAGCACTTTAGCGGGCATGTGAATTGTGGTATGG
GGACCACAAAGTTATGACAGTGTGTACGCAGCATTCGAATTATGGTATGG
CGACCACAAAGTTATGACAGTGTGTACGCAGCATTCGAATTATGGTATGG
GGACCACAAAGTTATGACAGTGTATACGCAGCATTCGAATTATGGTATGG
GGACCACAAAGTTATGACAGTGTATACGCAGCATTCGAATTATGGTATGG
GGGCCAGATGTTTACGATAGTGTTTATGCCGCATTTGAACTGTGTATGG
SEO ID 41
                        (301)
SEO ID 43
                        (298)
SEQ ID 45
                        (298)
SEQ ID 47
                        (298)
SEQ ID 49
                        (298)
                        400
(351) GAAGGGTAATACTATAGTGACATCAGAACACTATTCATCATTAAG----
(348) TAAAGCAAATACTGTAGTCACATCAATATACTATTCATCAGTGCAAAACT
(348) TAAAGCAAATACTGTAGTCACATCAATATACTATTCATCAGTGCAAAACT
(348) TAAAGCAAATACTGTAGTCACATCAATATACTATTCATCAGTGCAAAACT
SEO TD 41
SEQ ID 43
SEQ ID 45
SEQ ID 47
SEO ID 49
                        (348) TAAAGCAAATACAGTAGTTACATCAATATATTATGCATCAGCACAAAATT
                                     401
                                                                                                                                         450
                                     -TGATAATCAGGTGAATGTAAATGCCGATTCATTAGTATTATTTTGGAAT
SEO ID 41
                        (396)
                        (398) CTGAAAACACTGTAACAGTACAACATGACTCATTAGTGTTATTCTTTAAT
(398) CTGAAAACACTGTAACAGTACAGCATGACTCATTAGTGTTATTCTTTAAT
(398) CTGAAAACACTGTAACAGTACAGCATGACTCATTAGTGTTATTCTTTAAT
SEQ ID 43
SEQ ID 45
SEQ ID 47
SEO TD 49
                        (398) CTGAGAATACTGTAACATTACAGTATGACTCATTAGTACTATTTTTCAAT
```

Фиг. 9В (1/3)

				451 500
SEQ	ID	41	(445)	GCTGGAGGGACAACATTCGATAAACAAATAGTTAATTTTGCTTGGGATAT
SEQ	ID	43	(448)	GTTGGTTATACTGGTCTAACTAAGCAAATAGTTAAATTTAACTGGAATAT
SEQ	ID	45	(448)	GTTGGTTATACTGGTCTAACTAAGCAAATAGTTAAATTTAATTGGAATAT
SEQ	ID	47	(448)	GTTGGTTATACTGGTCTAACTAAGCAAATAGTTAAATTTAACTGGAATAT
SEQ	ID	49	(448)	GTTGGTTACACTGGTCTGACTAAGCAAATAGTTAGATTTAATTGGGATAT
				501 550
SEQ	ID	41	(495)	GGGTGGAATTCTGATTAAGCCGTCAAGTCAACAACCTAGATTAGATATAT
SEQ	ID	43	(498)	GGGAGGCATATTAGTTAGACCGACTGCTGATGGTAGAGTGGATATTT
SEQ	ID	45	(498)	GGGAGGCATATTAGTTAGACCGACTACTGATGGTAGAGTGGATATTT
SEQ	ID	47	(498)	GGGAGGCATATTAGTTAGACCGACTACTGATGGTAGAGTGGATATTT
SEQ	ID	49	(498)	GGCAGCCATATTAGTTAGGCCAACTGCTGATGGTAGAGTAGATATCT
				551 600
SEQ	ID		(545)	ACATGGCCAACATGAATAATTTCAATAGTGATAATTTCAATTGGGAAGAG
SEQ	ID	43	(545)	GTATGGCTGACATGAATGATTTTAATAGTGATAATTTTAATTGGGAATCT
SEQ	ID	45	(545)	GTATGGCTGACATGAATGATTTTAGTAGTGATAATTTTAATTGGGAATCT
SEQ	ID	47	(545)	GCATGGCTGACATGAATTTTAATAGTGATAATTTTAATTGGGAATCT
SEQ	ID	49	(545)	GTATGGCAGACATGAATGATTTTAGCAGCGACAATTTTAATTGGGAGAAA
				650
SEQ		41	(595)	TGGCGTTTCACACTACCTCGCAGTAATGCAACAATTAACATATACACTGA
SEQ	ID	43	(595)	TGGAAACGTAGTTTTCCACGTAGCAACATTAACATGTACACTGA
SEQ	ID	45	(595)	TGGAAACGTAGTTTTCCACGTAGCAACATTAACATGTACACTGA
SEQ	ID	47	(595)	TGGAAACGTAGTTTTCCACGTAGCAACATTAACATGTACACTGA
SEQ	ID	49	(595)	TGGACTCGTAGCTTTCCACGCAGTAATATTAATATGTATGCTGA
				651 700
SEQ		41	(645)	TTATTACCTAGETAGCAGTGATCCATACAATCAGCTGAAAGAATTACAAC
SEQ	ID	43	(639)	ATATTATTTAGCGAATGTTGATCCATATAATCAACTAAAAATATTAAACC
SEQ	ID	45	(639)	ATATTATTTAGCGAATGTTGATCCATATAATCAACTAAAAATATTAAACC
~	ID	47	(639)	ATATTATTRAGEGAATGTTGATECATATAATCAACTAAAAAATATTAAACG
SEQ	ID	49	(639)	ATATTACTTAGCAAATGTTGACCCGTATAGTCAATTAAAAGCATTAAATG
				747
SEQ	ID	41	(695)	AGTCAACTATTACCACATTCGAAATGAGAATGATGGTG
SEQ	ID	43	(689)	AACTAACTGCAAAAAATGTAGAAATTAGAATGAAGGCAATTAAG
~	ID	45	(689)	AACTAACTGCAAAAAATGTAGAATTAGAATGAAGGCAATTAAG
SEQ	ID	47	(689)	AACTAACTGCAAAAAATGTAGAAATTAGAATGATGAAGGCAATTAAG
SEQ	ID	49	(689)	ANCTCACAACNNAAAATATAGAAATTAGAATGAAGTCAATTAAG

VP4	SEQ 41	SEQ 43	SEQ 45	SEQ 47	SEQ 49
последовательности					
SEQ 41		69	69	69	67
SEQ 43			99	99	86
SEQ 45				99	86
SEQ 47					86
SEQ 49					

 Φ иг. 9B (2/3)

RASSLYHOLISONYYSTGNEILKDLOTTKTTVDYVDAGNYTYAOLPPTKW SEQ ID 42 (1) RASSLYQOLISQNYYSTGNDILLDQOTNNTTVDYIDIGNYSYTÖLPPTSW RASSLYQOLISQNYYSTGNDILLDQOTNNTTVDYIDIGNYSYTOLPPTSW RASSLYQOLISQNYYSTGNDILLDQOTNNTTVDYIDIGNYSYTOLPPTSW SEQ ID 44 (1) SEO TD 46 (1) SEQ ID 48 (1) SEQ ID 50 RASSLYQQLISQNYYSTGNXILLDQQTNKTTVDYVDVGNYSYTQLPPTSW SEQ ID 42 (51) GAGATFESVFSAAEITGPHTNRVIEWKNILNSDOWLLFPKPADTVKLLKH GAGMTEKSAENÄEEITGENTG-DIDLNNETNANGWILVDKETDTKKLIKL GAGMTEKSAENÄEEITGENTG-DIDLNNETNANGWILVDKETDTKKLIKL GAGMTETSAENÄEEITGENTG-DIDLNNETNANGWILVDKETDTKKLIKL SEO ID 44 (51) SEO ID 46 (51) SEQ ID 48 (51) SEQ ID 50 GAGMTEKSAENAEEMTGPNTG-DIDLSNITTANGWILYEKPTITKRLIKL 101 TOU

GPOTYDSTLAACELWYGKANTIVTSEHYSSLS--DNOVNVNADSLVLFWN
GPESYDSVYAAFELWYGKANTVVTSIYYSSVQNSENTVTVQHDSLVLFFN
GPESYDSVYAAFELWYGKANTVVTSIYYSSVQNSENTVTVQHDSLVLFFN
GPESYDSVYAAFELWYGKANTVVTSIYYSSVQNSENTVTVQHDSLVLFFN SEQ ID 42 (101) SEQ ID 44 (100) SEQ ID 46 (100)SEQ ID 48 (100) SEQ ID 50 GPDVYDSVYAAFELWYGKANTVVTSIYYASAQNSENTVTLQYDSLVLFFN 200 151
AGGTTFDKQIVNFAWDMGGILIKESSQQPRLDIYMANMNNFNSDNFNWEE
VGYTGLTKQIVKFNWNMGGILVRFTADG-RVDICMADMNDFNSDNFNWES
VGYTGLTKQIVKFNWNMGGILVRFTTDG-RVDICMADMNDFNSDNFNWES
VGYTGLTKQIVKFNWNMGGILVRFTTDG-RVDICMADMNDFNSDNFNWES
VGYTGLTKQIVKFNWNMGGILVRFTTDG-RVDICMADMNDFNSDNFNWES
VGYTGLTKQIVRFNWDMGGILVRFTADG-RVDICMADMNDFNSDNFNWES SEQ ID 42 SEQ ID 44 (150) SEQ ID 46 (150) SEQ ID 48 (150) SEQ ID 50 (150) 201 249 WRFTLPRSNATĪNIYTDYYLASSDRYNOLKELOOSTITTFĒMRMMV---WRRSFPRS--NINMYTEYYLANVDPYNOLKILNOLTAKNVĒIRMMKAIK WKRSFPRS--NINMYTEYYLANVDPYNOLKILNOLTAKNVĒIRMMKAIK WKRSFPRS--NINMYTEYYLANVDPYNOLKILNOLTAKNVĒIRMMKAIK WTRSFPRS--NINMYAEYYLANVDPYSOLKALNXLTXXNIĒIRMMKSIX SEQ ID 42 (199) SEQ ID 44 (199) SEO ID 46 (199)SEQ ID 48 (199) SEO ID 50 (199)

VP4	SEQ 42	SEQ 44	SEQ 46	SEQ 48	SEQ 50
последовательности					
SEQ 42		64	64	64	62
SEQ 44			99	99	88
SEQ 46				99	88
SEQ 48					87
SEQ 50					

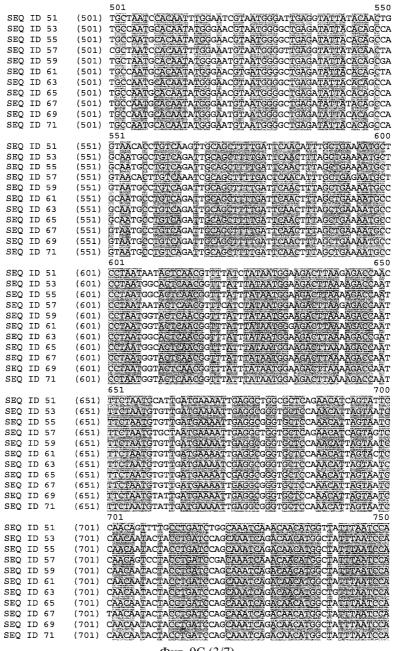
Фиг. 9В (3/3)

```
SEQ ID 51
                                       (1)
                                                 GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
 SEQ ID 53
                                       (1)
                                                GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAGA
GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
CATGTGCTGTTTTCAATTGCGAAGACTGTCTCAGAACTCAAAAAGAAGT
GATGTGCTGTTTCAATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
GATGTGCTGTTCTGATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAAACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
GATGTGCTGTTCTCCATTGCGAAAACTGTCTCAGATCTTAAGAAGAAAGT
 SEQ ID 55
                                       (1)
 SEO ID 57
                                       (1)
 SEO ID 59
                                       (1)
 SEO ID 61
                                       (1)
 SEO ID 63
                                       (1)
 SEO ID 65
                                       (1)
 SEO ID 67
                                       (1)
 SEQ ID 69
                                       (1)
 SEQ ID 71
                                               TGTAGTTGGTACTATTTACACTAATGTAGAAGATATAATTCAACAAAACTA
TGTAGTTGGTACTATTTACACTAATGTAGAAGATATAATTCAACAAAACCA
TGTAGTTGGTACTATTTATACAAATGTAGAAGATATAATTCAACAACTA
TGTAGTTGGTACTATTTATACAAATGTAGAAGATATAATTCAGCAAACTA
TGTAGTTGGTACTATTTATACAAATGTAGAAGATATAATTCAACACACTA
TGTAGTTGGTACTATTTATACAAATGTAGAAGATATAATCCAACAACTA
101
 SEO ID 51
                                    (51)
 SEO ID 53
                                    (51)
 SEO ID 55
                                    (51)
 SEQ ID 57
                                    (51)
 SEQ ID 59
                                    (51)
 SEQ ID 61
                                    (51)
 SEC ID 63
                                    (51)
 SEO ID 65
                                    (51)
 SEO ID 67
                                    (51)
 SEQ ID 69
                                    (51)
                                    (51)
 SEO ID 71
                                              101
 SEQ ID 51
                                  (101)
 SEC TD 53
                                  (101)
 SEO ID 55
                                  (101)
 SEQ ID 57
                                 (101)
 SEQ ID 59
                                 (101)
                                 (101)
 SEQ ID 61
 SEO ID 63
                                 (101)
 SEO ID 65
                                 (101)
 SEO ID 67
                                 (101)
 SEQ ID 69
                                 (101)
 SEQ ID 71
                                 (101)
                                              SEO ID 51
                                 (151)
 SEQ ID 53
                                 (151)
 SEO ID 55
                                 (151)
SEO ID 57
                                 (151)
 SEQ ID 59
                                 (151)
                                 (151)
 SEQ ID 61
 SEQ ID 63
                                 (151)
SEQ ID 65
                                 (151)
SEC ID 67
                                 (151)
SEO ID 69
                                 (151)
                                                GGAACACAACCTCAGAAAGAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTAGGTAC
SEQ ID 71
                                 (151)
                               201
201) GACACTCTTAAATTTAGATGACAACTATGTTCAAGCACTAGAAGTGTTA
(201) AACACTTTTGAATTTAGATGACAACTATGTTCAAGCAACTAGAAGTGTTA
(201) AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAAGTATCA
                                                 201
SEQ ID 51
SEQ ID 53
SEQ ID 55
SEO TD 57
SEO ID 59
SEQ ID 61
SEQ ID 63
SEO ID 65
SEQ ID 67
SEQ ID 69
SEQ ID 71
```

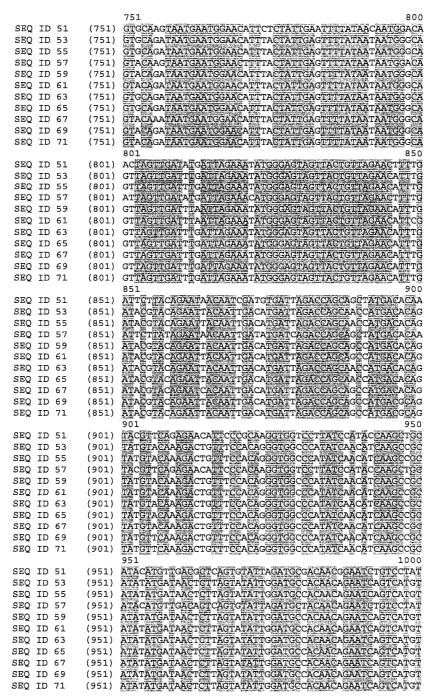
Фиг. 9С (1/7)

				251 300
SEQ	ID	51	(251)	TTGATTATTTGGCTTCATTTATAGAATCAGTATGTGATGATGAAATTGTC
SEQ			(251)	TCGATTATTTGGCCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATTGTT
SEQ		55	(251)	TCGATTATTTGGCCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATTGTT
SEQ	ID	57	(251)	TTGACTATTTGGGCTCATTCATAGAAGCAGTATGTGATGATGAGATTGTC
SEQ	ID	59	(251)	TCGATTATTTGGCCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATTGTT
SEQ	ID	61	(251)	TCGATTATTTGACCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATTGTT
SEQ	ID	63	(251)	TCGATTATTTGGCCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATTGTT
SEQ		65	(251)	TCGATTATTTGGCCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATTGTT
SEQ		67	(251)	TCGATTATTTGGCCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGAAATTGTT
SEQ		69	(251)	TCGATTATTTGGCCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATTGTT
SEQ	ID	71	(251)	TCGATTATTTGGCCTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATTGTT 301 350
SEQ	ID	51	(301)	AGAGAAGCATCTAGAAATGGAATGCAGCCACAGTCGCCAGCACTTATAAC
SEQ		53	(301)	AGAGAAGCGTCAAGAAATGGAATGCAACCTCAATCTCCTGCACTTATAGC
SEQ		55	(301)	AGAGAAGCGTCAAGAAATGGAATGCAACCTCAATCTCCTGCACTTATAGC
SEQ	ID	57	(301)	AGAGAAGCATCGAGAATGGAATGCAGCCTCAATCACCTACACTTATAGC
SEQ	ID	59	(301)	AGAGAGGGGTCAAGAAATGGAATGCAACCTCAATGTCCTGCACTTATAGC
SEQ	ID	61	(301)	AGAGAAĞCGTCAAGAAATGGAATGCAACCTCAATCTCCTGCACTTATAGC
SEQ	ID	63	(301)	AGAGAAGCGTCAAGAAATGGAATGCAACCTCAATCTCCTGCACTTATAGC
SEQ	ID	65	(301)	AGAGAAGCGTCAAGAAATGGAATGCAACCTCAATCTCCTGCACTTATAGC
SEQ	ID	67	(301)	AGAGAAGGGTCAAGAAATGGAATGCAACCTCAATCTCCTGCACTTATAGC
SEQ	ID	69	(301)	AGAGAAGEGTCAAGAAATGGAATGCAACETCAATETEETGEAETTATAGC
SEQ	ID	71	(301)	AGAGAAGCGTCAAGAAATGGAATGCAACGTCAATGTCCTGCACTTATAGC
				351 400
SEQ		51	(351)	GCTGTCATCATCAAAGTTTAAGACTATCAACTTTAATAACAGTTCACAAT
SEQ		53	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT
SEQ		55	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT
SEQ		57	(351)	GCTGTCCTCATCAAAATTTAAAACTATTAATTTTAATAACAGTTCACAAT
SEQ		59	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT
SEQ SEQ		61 63	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT
SEQ		65	(351) (351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT
SEQ		67	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT
SEQ		69	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCAGAAT
SEQ		71	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTCACAAT
			(00-)	401 450
SEQ	ID	51	(401)	CAATTAAAAATTGGAGTGGTCAATCAAGAGGTGAAAATGCAGTCTATGAA
SEQ	ID	53	(401)	CCATTAAGAATTGGAGTGGTCAGTCAAGAEGTGAAAATCCAGTGTATGAA
SEQ	ID	55	(401)	CCATTAAGAATTGGAGTGETCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA
SEQ	ID	57	(401)	CTATTAAAAACTEGAGTECTCAATCAAGACCCGAAAATCCAGTCTACGAG
SEQ	ID	59	(401)	CCATTAAGAATTGGAGTGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA
SEQ	ID	61	(401)	CCATTAAGAATTGGAGTGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA
SEQ	ID	63	(401)	CCATTAAGAATTGGAGCGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA
SEQ	ID	65	(401)	CCATTAAGAATTGGAGTGGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA
SEQ	ID	67	(401)	CCATTAAGAATTGGAGTGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA
	ID	69	(401)	CCATTAAGAATTGGAGTGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA
SEQ	ID	71	(401)	CCATTAAGAATTGGAGTGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA
CEO	TD	F 1	(451)	451 500
	ID	53	(451) (451)	TACAGAAATCCAATGATATTCGAATATAGAAATTCATACATTCTTCAGCG
SEO	ID	55	(451)	TATÄAÄAATCCAATGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG TATÄAÄÄATCCAÄTGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG
SEQ	ID		(451)	TACAGAAATCCGATGATATTCGAATATAGAAATTCATACATTCTTCAGCG
SEQ	ID	59	(451)	TATAAAAATCCAATGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG
SEO	ID	61	(451)	TATAAAAATCCAATGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG
SEQ	ID	63	(451)	TATAAAAATCCAATGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG
SEQ	ID	65	(451)	TATAAAAATCCAATGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG
SEQ	ID		(451)	TATAAAAATCCAATGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG
SEQ	ID	69	(451)	TATAAAAATCCAATGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG
SEQ			(451)	TATAAAAATCCAATGGTGTTTGAGTATAGAAATTCATATATTCTTCAGCG

Фиг. 9С (2/7)



Фиг. 9С (3/7)



Фиг. 9С (4/7)

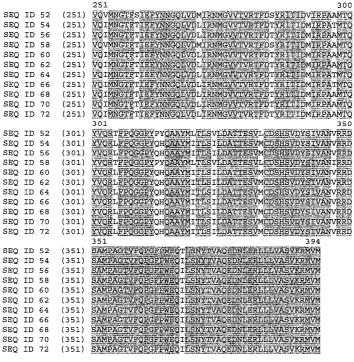
				1001							1050)
SEO	ID	51	(1001)		TCACAC	retere	ATTATT	CAATTGT	TGCAAA	CGTTAG		
	ID	53	(1001)	Serie Prop. British	and well the pain of	Salara Telescott Salar	ATTATT	200000000000000000000000000000000000000	 ZASSALINA ESTRADA 	THE STREET	word their Whiteholder Landson	ć.
-	ID		(1001)	Part Fattiguestic	Setula may be a sind of	Chicago School St.	ATTATT	projectional strain in the second	of the party of the same of the same of	App. Market	Commission of the last	é
~	ID		(1001)				ACTATT					
_	ID		(1001)	107 50000000000	The state of the s	CACC BURNING ST.	ATTATT	AND STREET, ST	THE RESERVE AND ADDRESS OF THE PARTY OF THE	ORGI BUSTACA	ASSESSMENT NAME OF STREET	~
_		61	(1001)				ATTATT					
	ID		(1001)				ATTATT					
~	ID		(1001)				ATTATT					
SEO		67	(1001)	100 00000000000000000000000000000000000	prepare menter in	made to the	ATTATTO	CHOCKE 12:27	BOOK FUNDAMENTAL	70C 35050-00	a determent our day	2
SEO		69	(1001)				ATTATT					
SEO		71	(1001)				ATTATT					
			(1001)	1051	SANGER - L	Maria Maria 12	and mandatable	MARKET CALL	· Colone	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	1100	
SEO	ID	51	(1051)		AATGCC/	GGTGGA	ACAGTA'	PTTCAAC	CAGGGT	TTCCAT		
SEO		53	(1051)				ACAGTA'					
SEQ	ID	55	(1051)				ACAGTA					
SEO			(1051)				ACAGTA					
SEO	ID	59	(1051)	THE RESERVE AND THE PARTY OF TH	AND DESCRIPTION OF THE PERSON	Distriction of the State of the	ACAGTA'	AND THE PARTY OF THE PARTY OF	Care Control Control	STATE SELECTION AND ADDRESS OF THE PARTY AND	NAC AND DECLARATION	:
SEO	ID	61	(1051)	A CONTRACTOR SOLVER	The Real Property lies and the last	And Street and Charles	ACAGTA'	THE PROPERTY AND ADDRESS OF THE PARTY AND ADDR	SCHOOLINGS, SPE	PRODUCTOR STREET, SCHOOL S	California i de la companya de la co	
SEO		63	(1051)				ACAGTA'					
SEO		65	(1051)				ACAGTA:					
SEO			(1051)				ACAGTA'					
SEQ		69	(1051)				ACAGTA'					
SEO	ID	71	(1051)				ACAGTA					
		. –	(/	1101	her a Commission of the	RADESTANTAL		AMERICAN STREET, ST. TO. TO.	SECRETARIO - SE	STATE OF THE PARTY	1150	
SEO	ID	51	(1101)		TATCCA	CTACAC	TGTTGC	CAGGAA	GATAAT	TTAGAA	AGACTTI	
SEO	ID	53	(1101)	CONTRACT MEMORITOR	CO. The Secretary Co., in Side	Andrew A South	TGTTGC	CONTRACTOR DESCRIPTION	Second of the Party of the Part	Control of the second	Marie Committee of the	
SEQ	ID	55	(1101)				TGTTGC					
SEQ			(1101)	Total Processing	AND THE PERSON NAMED IN COLUMN		TGTTGC	CONTRACTOR CON	No leaders and the second	Callet a company of the	Attendance of the Parket	
SEO	ID	59	(1101)				TGTTGC					
SEQ	ID	61	(1101)				TGTTGC					
SEQ		63	(1101)				TGTTGC.					
SEQ			(1101)	POSSE SOMETIME	PROPERTY OF STREET	CONTRACTOR STATE OF THE PARTY OF	TGTTGC	AND ADDRESS OF THE PARTY.	Commence of the Contract of th	NO AMERICAN PROPERTY	SCO. PROPERTY.	
SEO	ID	67	(1101)				TGTTGC					
SEQ	ID	69	(1101)				TGTTGC:					
SEQ	ID	71	(1101)				TGTTGC:					
				1151	II. N. B. LUTZEP B. UKU, APILINI.	OUR CONTRACTOR OF THE PROPERTY	ALLMAN OF MON-ING TOWARD	118		P-100-772 + 180-794 H-100-64-16	CONTRACTOR CONTRACTOR	
SEQ	ID	51	(1151)	TACTA	GTTGCGT	CCGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	Ğ			
SEQ	ID	53	(1151)	TGTTA	GTTGCGT	CTGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	G			
SEQ	ID	55	(1151)	TGTTA	GTTGCGT	CTGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	Ģ			
SEQ	ID	57	(1151)	TACTA	GTTGCGT	CCGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	G			
SEQ	ID	59	(1151)	TGTTA	GTTGCGT	CTGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	G			
SEQ	ID	61	(1151)	TGTTA	GTTGCGT	CTGTGA	AGAGAA	GGTGAT	Ğ			
SEQ	ID	63	(1151)	TGTTA	GTTGCG1	CTGTGA	AGAGAA:	GGTGAT	Ğ			
SEQ	ID	65	(1151)	TGTTA	TTGCGT	CTGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	G			
SEQ	ID	67	(1151)	TGTTA	GTTGCGT	CTGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	Ğ			
SEQ	ID	69	(1151)	TGTTA	TTGCG1	CTGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	Ğ			
SEQ	ID	71	(1151)	TGTTA	STTGCGT	CTGTGA	AGAGAAT	GGTGAT	Ġ			
1			SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEC
- 1			51	53	55	57	59	61	63	65	67	69
İ	SE	Q 51		86	86	92	86	85	85	85	86	86

	SEQ										
	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71
SEQ 51		86	86	92	86	85	85	85	86	86	86
SEQ 53			100	87	99	99	100	100	99	99	99
SEQ 55				87	99	99	100	100	99	99	99
SEQ 57					87	86	86	86	87	87	87
SEQ 59						99	98	99	99	99	99
SEQ 61							98	99	98	98	98
SEQ 63								100	99	99	99
SEQ 65									99	99	99
SEQ 67										99	99
SEQ 69				-							100
SEO 71											

Фиг. 9С (5/7)

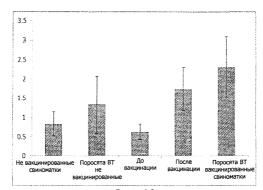
```
DVLFSIAKTVSELKKKVVVGTIYTNVEDIIQQTNELIRTLNGNTFHTGGI
 SEQ ID 52
                                                  (1)
                                                              DVLFSTAKTVSDLKKKVVVGTTYTNVEDITQQTNELTRTLNGNTFHTGGT
 SEQ ID 54
                                                  (1)
                                                (1) DVLFSIAKTVSDLKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
(1) DVLFSIAKTVSDLKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
(1) DVLFSIAKTVSELKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
(1) DVLFSIAKTVSDLKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
(2) DVLFSIAKTVSDLKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
(3) DVLFSIAKTVSDLKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
(4) DVLFSIAKTVSDLKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
(5) DVLFSIAKTVSDLKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
(7) DVLFSIAKTVSDLKKKVVVGTIYTNVEDIIQOTNELIRTLNGNTFHTGGI
  SEO ID 56
 SEQ ID 60
 SEQ ID 62
 SEQ ID 64
 SEO ID 66
 SEO ID 68
 SEO ID 70
 SEO ID 72
                                                            GTOPOKEWNFOLPOLGTTLLNLDDNYVOATRSVIDYLASFIESVCDDEIV
GTOPOKEWNFOLPOLGTTLLNLDDNYVOATRSVIDYLASFIESVCDDEIV
GTOPOKEWNFOLPOLGTTLLNLDDNYVOATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV
                                                               51
 SEQ ID 52
                                              (51)
 SEQ ID 54
                                              (51)
 SEQ ID 56
 SEQ
               ID 58
                                              (51)
 SEQ ID 60
                                             (51)
 SEQ ID 62
                                              (51)
 SEQ ID 64
                                             (51)
 SEO ID 66
                                             (51)
 SEO ID 68
                                             (51)
 SEO ID 70
                                             (51)
 SEQ ID 72
                                             (51)
                                                            101
REASRNGMQPQSPALITLSSSKFKTINFNNSQSIKNWSAQSRRENPVYE
REASRNGMQPQSPALITLSSSKFKTINFNNSQSIKNWSAQSRRENPVYE
REASRNGMQPQSPALIALSSAKFKTINFNNSQSIKNWSAQSRRENPVYE
                                                               101
 SEQ ID 52
                                          (101)
 SEQ ID 54
                                          (101)
 SEQ ID 56
                                          (101)
 SEO ID 58
                                          (101)
 SEO ID 60
                                          (101)
 SEO ID 62
                                          (101)
SEQ ID 64
                                          (101)
SEO ID 66
                                         (101)
SEO ID 68
                                         (101)
SEO ID 70
                                         (101)
SEO ID 72
                                         (101)
                                                               151
                                                              TST
VRNPMIFEYRNSYILQRANPOFĞIÜMĞLRYYTTGNTCOVAAFDSTFÄENA
YKNPMVFEYRNSYILQRANAÖYGNÜMĞLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILQRANAÖYĞNÜMĞLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA
YKNPMIFEYRNSYILQRANPÖFĞNÜMĞLRYYTTSNTCQIAAFDSTFAENA
SEQ ID 52
SEQ ID 54
                                         (151)
SEQ ID 56
                                         (151)
 SEO ID 58
                                          (151)
                                                            YKNPMIFEYRNSYILORANPOFGRYMGLRYYTTSNTCOTAAFDSTFAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
YKNPMVFEYRNSYILORANAOYGNVMGLRYYTASNACOTAAFDSTLAENA
SEQ ID 60
                                          (151)
SEQ ID 62
                                          (151)
SEO ID 64
                                          (151)
SEO ID 66
                                          (151)
SEQ ID 68
                                         (151)
SEO ID 70
                                         (151)
SEO ID 72
                                         (151)
                                                              201
SEQ ID 52
                                                              PNNTORFIYNGRLKRPTSNALMKIEAGAQNISIPTVLPDLANQTTWLFNP
                                         (201)
                                                              PNGTORFIYNGRLKRPISNVLMKIEAGAPNISNPTILPDPANOTTWLFNE
SEQ ID 54
                                        (201)
SEQ ID 56
                                         (201)
                                                              PNGTQRFIYNGRLKRPISNVLMKIEAGAPNISNPTILPDPANQTTWLFNP
                                                             PNNTQRFIYNGRLKRPISNVLMKIEAGAONISSPTVLPDPTNOTTWLFNP
PNGTQRFIYNGRLKRPISNVLMKIEAGAPNISNPTILPDPANOTTWLFNP
SEO ID 58
                                         (201)
SEQ ID 60
                                         (201)
SEQ ID 62
                                         (201)
                                                             PNGTORFIYNGRLKREISNVLMKIEAGAPNISTPTILPDPANOTTWLFNP
                                                            PNGTORFIYNGRLKREISNVLMKIBAGAPNISNPTILPDPANOTIMEFNP
PNGTORFIYNGRLKREISNVLMKIBAGAPNISNPTILPDPANOTIMEFNP
PNGTORFIYNGRLKREISNVLMKIBAGAPNISNLTILPDPANOTIMEFNP
PNGTORFIYNGRLKREISNVLMKIBAGAPNISNLTILPDPANOTIMEFNP
PNGTORFIYNGRLKREISNVLMKIBAGAPNISNPTILPDPANOTIMEFNP
SEO ID 64
                                         (201)
SEO ID 66
                                         (201)
SEO ID 68
                                        (201)
SEO ID 70
                                        (201)
SEO ID 72
                                        (201) PNGTORFLYNGRLKRPISNVLMKIEAGAPNISNPTILPDPANOTTWLFNP
```

Фиг. 9С (6/7)

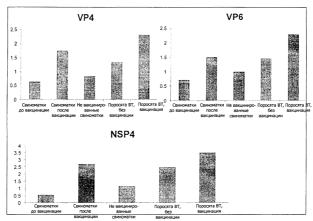


	SEQ										
	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72
SEQ 52		91	91	96	91	91	91	91	91	91	91
SEQ 54			100	93	100	99	100	100	99	100	100
SEQ 56				93	100	99	100	100	100	100	100
SEQ 58					93	93	93	93	93	93	93
SEQ 60						99	100	100	100	100	100
SEQ 62							99	99	99	99	99
SEQ 64								100	99	100	100
SEQ 66									99	100	100
SEQ 68										100	100
SEQ 70											100
SEQ 72											

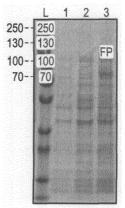
Фиг. 9С (7/7)



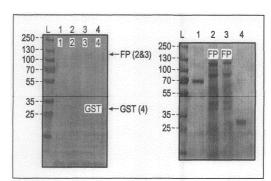
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13