(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090628 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.16

(22) Дата подачи заявки
2018.09.20

(51) Int. Cl. ***A61K 39/155*** (2006.01)
A61K 39/175 (2006.01)
C07K 14/115 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ PARAMYXOVIRIDAE

(31) **17192791.6**
(32) **2017.09.23**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2018/075542**
(87) **WO 2019/057859 2019.03.28**

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

(72) Изобретатель:
Николин Велько, Бентер Алисса, Галлай Андреас (DE)

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

(57) Настоящее изобретение относится к области (векторых) вакцин и, в частности, к улучшенному расположению нуклеотидных последовательностей для экспрессии вируса Paramyxoviridae, содержащего представляющий интерес экзогенный ген. Кроме того, настоящее изобретение относится к экспрессионным кассетам и векторам, которые пригодны для экспрессии представляющих интерес генов, в частности, кодирующих антиген последовательностей. Вирусные векторы в соответствии с настоящим изобретением пригодны для создания иммуногенной композиции или вакцины.

202090628 A1

202090628 A1

СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ PARAMYXOVIRIDAE

Предпосылки создания изобретения

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области (векторных) вакцин и, в частности, к улучшенному расположению нуклеотидных последовательностей для экспрессии представляющего интерес экзогенного гена посредством вируса *Paramyxoviridae*, содержащего указанный экзогенный ген. Кроме того, настоящее изобретение относится к соответствующим экспрессионным кассетам и векторам, которые пригодны для экспрессии соответствующих генов, в особенности, кодирующих антиген последовательностей. Вирусные векторы в соответствии с настоящим изобретением пригодны для получения иммуногенной композиции или вакцины.

Предпосылки создания изобретения и описание предыдущего уровня техники

Парамиксовирусы семейства *Paramyxoviridae* представляют собой вирусы, содержащие одноцепочечную РНК отрицательного смысла, которые ответственны за многие распространенные заболевания животных и человека. Примерами парамиксовирусов являются вирус ньюкаслской болезни, заражающий домашнюю птицу и другие виды птиц, или вирус кори, вызывающий заболевание у людей. Эти вирусы в настоящее время включают в себя 49 видов, которые подразделяют на 7 родов, среди них род *Morbillivirus* с семью видами.

Чума собак (CD) представляет собой высоко инфекционную, лихорадочную болезнь собак и других. Уровень смертности высок и колеблется от 30 до 80 процентов. Собаки, пережившие CD, часто имеют необратимое повреждение центральной нервной системы. Установленной этиологией CD является заражение членом семейства *Paramyxoviridae*, рода *Morbillivirus*, известного как вирус CD (CDV). В целом, парамиксовирусы представляют собой оболочечные вирусы, содержащие геном одноцепочечной РНК в 18-20 т.п.н. отрицательной полярности. Геном кодирует от 5 до 7 структурных белков, включая слитый (F) гликопротеин и

или гликопротеин гемагглютинин-нейраминидаза (HN) или гемагглютинин (H). Мембранный гликопротеин гемагглютинин (H) отвечает за прикрепление вируса к клетке-хозяину, а слитый гликопротеин (F) вызывает слияние мембраны между вирусом и зараженной клеткой или между инфицированными и соседними неинфицированными клетками.

Концы генома членов *Paramyxoviridae* состоят из экстрагенных областей, называемых 3′-лидер и 5′-трейлер: 3′-лидерная область содержит промотор генома, а трейлер кодирует 3′-конец антигенома, который является полноразмерным промежуточным продуктом репликации положительного смысла, который содержит антигеномный промотор. Каждый ген начинается с консервативной последовательности начала гена (GS) и заканчивается консервативной последовательностью конца гена (GE). Транскрипция начинается в 3′-лидерной области и протекает последовательно с помощью механизма старт-стоп, посредством которого отдельные гены транскрибируются в индивидуальные, отдельные мРНК. Гены разделены некодирующими межгенными последовательностями (IGS), которые являются консервативными по длине и последовательности среди различных генных соединений для некоторых родов (*Respirovirus, Morbillivirus* и *Henipavirus*) и неконсервативными по последовательности или длине для других (*Rubulavirus, Avulavirus, Pneumovirus* и *Metapneumovirus*).

Для CDV, обнаружены гликопротеины как F, так и H, присутствующие в вирусной оболочке и на поверхности инфицированных клеток. Исходя из результатов анализов с другими членами *Morbillivirus*, гликопротеины F и H CDV представляются важными и являются основными для заражения CDV и его иммунобиологии. Для защиты и лечения собак были разработаны рекомбинантные вакцины против CDV на основе поксвируса (US 5,756,102). В заявке на патент США USSN 09/587,964 раскрыты вакцины на основе ДНК-плазмиды, экспрессирующие антигены CDV.

Wang и соавт. (Vaccine 30: 5067–5072 (2012)) создали рекомбинантный вакцинный штамм CDV, экспрессирующий гликопротеин вируса бешенства с использованием обратной генетики.

Тем не менее, недостаток, наблюдаемый на практике, заключается в том, что такой штамм вируса, предположительно опосредованный гомологичной рекомбинацией между дублированной последовательностью (последовательностями) некодирующей области, со временем может потерять вставленный ген.

Таким образом, существует острая потребность в системе экспрессии, которая позволяет стабильно вставлять чужеродный ген в геном вируса *Paramyxoviridiae*.

Кроме того, вирус чумы собак и парвовирус собак (CPV) являются двумя основными патогенами собачьих и других плотоядных животных с глобальным распространением. Эпидемиология этих двух вирусов в популяциях плотоядных и их успешный контроль в значительной степени зависят от активной иммунизации восприимчивых организмов-хозяев. Схемы вакцинации чаще всего включают использование поливалентных вакцин, содержащих в числе других компоненты ослабленного живого собачьего парвовируса и чумы собак. Однако успешная иммунизация зависит от возрастной категории, предыдущего иммунного статуса и наличия иммунитета, полученного по материнской линии. Существует острая необходимость в поиске улучшенных вакцин, защищающих от основных патогенов собачьих, таких как вирус чумы собак и парвовирус собак.

Краткое изложение сущности изобретения

Решения вышеуказанной технической задачи (задач) достигают посредством описания и вариантов осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения.

Таким образом, изобретение в его различных аспектах осуществляют в соответствии с формулой изобретения.

В основе изобретения лежит неожиданное открытие того, что вставка экспрессионной кассеты, содержащей чужеродный ген, фланкированный на 5′-конце 5′-некодирующей областью гена нуклеопротеина (N) вируса CDV, между геном фосфопротеина (P) и геном матричного белка (M) генома вируса CDV (см. Фиг. 1), создает вирусный вектор, позволяющий приспосабливать, поддерживать и экспрессировать чужеродный ген даже в течение длительных периодов времени. Это позволяет генерировать генетически стабильные трансгенные векторы на основе *Paramyxoviridae,* такие как векторы на основе CDV.

Таким образом, в первом аспекте изобретения обеспечивают экспрессионную кассету для вставки между двумя смежными жизненно важными генами (1; 2) вируса *Paramyxoviridae* так, что первый ген (1) расположен в 3′-направлении, а второй ген (2) расположен в 5′-направлении экспрессионной кассеты, при этом указанная экспрессионная кассета содержит:

- первую нуклеотидную последовательность, где указанная первая нуклеотидная последовательность представляет собой интересующую нуклеотидную последовательность и

- вторую нуклеотидную последовательность, фланкирующую 5′-конец первой нуклеотидной последовательности, где указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1).

Экспрессионная кассета в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой молекулу РНК. Предпочтительно, указанная экспрессионная кассета является выделенной экспрессионной кассетой.

Кроме этого, экспрессионная кассета в соответствии с изобретением предпочтительно содержит:

- третью нуклеотидную последовательность, фланкирующую 3′-конец первой нуклеотидной последовательности, где указанная третья нуклеотидная последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующей области гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2).

В конкретном аспекте, в настоящем изобретении используют вакцинный штамм Lederle CDV (задепонирован в ATCC под номером доступа VR-128) в качестве основы (генотип, представленный GenBank Accession DQ903854.1, AY288311 или AY286480) или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% их идентичную последовательность, такую как от вируса, полученного посредством их дополнительных пассирований (например, вирус собачьей чумы, авирулентный Lederle, № по каталогу NR-3845, Biodefense

and Emerging Infections Research Resources Repository, P.O. Box 4137, Manassas, VA 20108-4137, США).

Плазмидная карта на Фиг. 2 в качестве примера показывает конструкцию ДНК для генерирования вектора в соответствии с изобретением.

Вектор в соответствии с изобретением, в частности, пригоден для вакцинации млекопитающих, в особенности свиней.

Кроме того, настоящее изобретение относится к вектору для двойной иммунизации против CDV и другого вируса, особенно CDV и другого собачьего вируса, такого как CPV. Этот вектор двойной иммунизации экспрессирует антигены CDV из основы вектора и другие собачьи антигены, такие как VP2 CPV, которые вставлены в виде трансгена.

Таким образом, изобретение также относится к вектору вируса чумы собак (CDV), содержащему соответствующую гетерологичную последовательность РНК, которая предпочтительно расположена между геном P и геном M CDV, и где указанная представляющая интерес гетерологичная последовательность РНК кодирует белок VP2 парвовируса собак (CPV).

Кроме того, в настоящем изобретении предложены векторы для индукции иммунного ответа против вируса свиного гриппа или вируса эпидемической диареи свиней у свиней. Таким образом, в контексте настоящего изобретения также предусмотрены вирусные векторы *Paramyxoviridae*, содержащие экспрессионную кассету с гетерологичной последовательностью РНК, которая кодирует подтип H3 гемагглютинина вируса свиного гриппа или шиповидный белок вируса эпидемической диареи свиней.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам млекопитающих, содержащим такие векторы и способы получения векторных вакцин с использованием таких клеток-хозяев, а также к иммуногенным композициям и вакцинам, содержащим вектор CDV в соответствии с настоящим изобретением.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении решают проблемы, присущие предшествующему уровню техники, и обеспечивают явное продвижение в уровне техники.

В настоящем изобретении с помощью данных *in vitro* представлено исследование рекомбинантов CDV, созданных в соответствии с представленным в настоящей заявке решением (то есть векторами CDV), кодирующих белки VP2 из генотипов CPV или 2b, или 2c. Вирусы продемонстрировали хорошую кинетику роста при производстве в клетках Vero, достигая пиковых титров через 6 дней после заражения в роллерных флаконах. Рекомбинанты продемонстрировали сильные характеристики экспрессии трансгенов (VP2), что определено иммунофлуоресценцией и вестерн-блоттингом, который квалифицирует их в качестве кандидатов двойных вакцин против CDV-CPV. Кроме того, такие вирусы были проверены на генетическую стабильность для 20 пассирований клеток на клетках Vero. Оба вируса оставались полностью генетически стабильными, что указывает на их восприимчивость к биологической обработке вакциной.

Помимо этого, в настоящем изобретении представлены результаты *in vivo,* что вектор CDV в соответствии с изобретением реплицируется в организме-хозяине свиньи, нацеливаясь на лимфатические клетки. При отборе проб и тестировании различных органов вирус был обнаружен в лимфатических узлах, селезенке или миндалинах вакцинированных животных. Важно, что индикаторные животные оставались серонегативными до конца исследования, что указывает на то, что рекомбинантные вирусы CDV не были переданы от животного к животному после вакцинации.

Что касается эффективности, то все животные, вакцинированные посредством CDV-VP2, были сероконвертированными против собачьего парвовируса 2 (по данным теста нейтрализации вируса CPV). Особое увеличение титров нейтрализующих антител было обнаружено после 2-й вакцинации (см. Фиг. 6). Уровни нейтрализующих антител через 21 день после второй иммунизации достигли уровней от 1:40 до 1:400, что согласно литературным источникам, представляет диапазон защитного титра у реального хозяина (собачьи) (Glover и соавт. 2012, Taguchi и соавт. 2011).

Кроме того, использование вектора CDV в соответствии с изобретением, кодирующего гемагглютинин подтипа H3 (H3) вируса свиного гриппа, приводит к развитию активного иммунитета у поросят, позитивных по H3N2-материнскому

антителу (H3N2-MDA-позитивные), несмотря на наличие такого пассивно присутствующего материнского иммунитета.

Кроме того, вектор CDV в соответствии с изобретением, кодирующий шиповидный белок вируса эпидемической диареи свиней (PEDV) вводили интраназально свиноматкам, что затем, благодаря приему антител молозива, приводило к пассивной иммунизации поросят, подтверждаемой снижением заболеваемости или тяжести клинических признаков, смертности и выделения вируса после стимуляции посредством PEDV.

Как правило, настоящее изобретение обеспечивает экспрессионную кассету, которую в дальнейшем также называют «экспрессионная кассета в соответствии с настоящим изобретением» для вставки между двумя смежными жизненно необходимыми генами (1; 2) вируса *Paramyxoviridae*, так что первый ген (1) расположен в 3′-направлении, а второй ген (2) расположен в 5′-направлении экспрессионной кассеты, где указанная экспрессионная кассета содержит:

- первую нуклеотидную последовательность, где указанная первая нуклеотидная последовательность представляет собой интересующую нуклеотидную последовательность и

- вторую нуклеотидную последовательность, фланкирующую 5′-конец первой нуклеотидной последовательности, где указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1), и

- третью нуклеотидную последовательность, фланкирующую 3′-конец первой нуклеотидной последовательности, где указанная третья нуклеотидная последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующую область гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2).

Предпочтительно указанная третья нуклеотидная последовательность состоит из:

- 3′-некодирующей области гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2), и

- последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, кодирует консенсусную последовательность для инициации или усиления трансляции, и причем указанная консенсусная последовательность для инициации или усиления трансляции необязательно представляет собой последовательность Козак.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом экспрессионная кассета в соответствии с настоящим изобретением состоит из:

- указанной от первой до третьей нуклеотидной последовательности и

- дополнительной нуклеотидной последовательности, фланкирующей 5′-конец второй нуклеотидной последовательности или фланкирующей 3′-конец указанной третьей нуклеотидной последовательности, причем указанная дополнительная нуклеотидная последовательность представляет собой межгенную последовательность вируса *Paramyxoviridae*.

Указанные два смежных гена (1; 2) вируса *Paramyxoviridae* предпочтительно выбирают из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, и/или

указанные жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae* представляют собой:

- ген N, P, M, F, H и L вируса *Paramyxoviridae* или
- ген N, P, M, F, HN и L вируса *Paramyxoviridae*, или
- ген N, P, M, F, G и L вируса *Paramyxoviridae*.

Согласно одному примерному варианту осуществления изобретение обеспечивает экспрессионную кассету для вставки между геном P и геном M вируса *Paramyxoviridae*, при этом

- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1), представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae,* за исключением гена P

вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген N, M, F, H и L вируса *Paramyxoviridae*, и

- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2) представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, за исключением гена M вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген H, P, F, L и N вируса *Paramyxoviridae*.

Предпочтительно, указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена, выбранного из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, расположенную в 3′-направлении экспрессионной кассеты, за исключением 5′-некодирующей области первого гена (1), и/или

указанная третья нуклеотидная последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующей области жизненно важного гена вируса *Paramyxoviridae,* расположенной в 5′-направлении экспрессионной кассеты, за исключением 3′-некодирующей области второго гена (2).

В соответствии с другим предпочтительным аспектом указанная первая нуклеотидная последовательность экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением функционально связана с последовательностью начала гена (GS), включенной в указанную третью нуклеотидную последовательность и/или с промотором генома вируса *Paramyxoviridae*.

Указанные от первой до третьей нуклеотидные последовательности и указанная другая нуклеотидная последовательность экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением представляют собой предпочтительно последовательности РНК, так что указанная первая нуклеотидная последовательность в таком случае представляет собой первую последовательность РНК, указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой вторую последовательность РНК, указанная третья нуклеотидная последовательность представляет собой третью последовательность РНК, а указанная другая нуклеотидная последовательность представляет собой другую последовательность РНК.

В одном экземпляре экспрессионная кассета в соответствии с настоящим изобретением содержит:

- первую последовательность РНК, где указанная первая последовательность РНК представляет собой соответствующую последовательность РНК, и
- вторую последовательность РНК, фланкирующую 5′-конец первой последовательности РНК, где указанная вторая последовательность РНК представляет собой 5′-некодирующую область гена N вируса *Paramyxoviridae*, и
- третью последовательность РНК, фланкирующую 3′-конец первой последовательности РНК, где указанная третья последовательность РНК состоит из:
- 3′-некодирующей области гена, выбранного из группы, включающей в себя ген гемагглютинина (H) вируса *Paramyxoviridae*, ген фосфопротеина (P) вируса *Paramyxoviridae*, ген слитого белка (F) вируса *Paramyxoviridae*, ген большого белка полимеразы (L) вируса *Paramyxoviridae* и ген нуклеопротеина (N) вируса *Paramyxoviridae* и
- последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, кодирует последовательность Козак и
- необязательно дополнительной последовательности РНК, фланкирующей 5′-конец второй нуклеотидной последовательности или фланкирующей 3′-конец указанной третьей нуклеотидной последовательности, причем указанная дополнительная нуклеотидная последовательность представляет собой межгенную последовательность вируса *Paramyxoviridae*.

В целях иллюстрации схематическое представление расположения последовательностей РНК, как описано в настоящей заявке в связи с примерными конкретными последовательностями, представленными ниже, приведено на Фиг. 3.

Предпочтительно, экспрессионная кассета в соответствии с настоящим изобретением не является встречающейся в природе и/или включена в геном выделенного вирусного вектора *Paramyxoviridae*.

Вирус *Paramyxoviridae*, как указано в настоящей заявке, представляет собой, в частности, вирус рода *Morbillivirus*, и где вирус рода *Morbillivirus* предпочтительно выбран из группы, включающей в себя вирус чумы собак (CDV), кошачий

морбилливирус (FeMV) и вирус чумы мелких жвачных животных (PPRV) и где вирус рода *Morbillivirus* наиболее предпочтительно представляет собой вирус чумы собак (CDV). Например, в случае, когда CDV выбран в качестве вируса *Paramyxoviridae*, тогда вирусный вектор *Paramyxoviridae*, описанный ниже представляет собой, в частности вектор CDV.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение, кроме того, относится к вирусному вектору *Paramyxoviridae*, содержащему экспрессионную кассету в соответствии с настоящим изобретением, и где указанный вирусный вектор *Paramyxoviridae* также обозначен в настоящей заявке как «вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением». Вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением представляет собой предпочтительно выделенный вирусный вектор *Paramyxoviridae*.

В одном предпочтительном аспекте изобретение относится к указанному вирусному вектору *Paramyxoviridae* или к экспрессионной кассете в соответствии с настоящим изобретением, где

- указанная 5′-некодирующая область представляет собой 5′-некодирующую область гена N вируса *Paramyxoviridae*, и/или
- указанная 3′-некодирующая область представляет собой 3′-некодирующую область гена H вируса *Paramyxoviridae*,

и/или причем указанная экспрессионная кассета является вставкой между геном P и геном M вируса *Paramyxoviridae*.

Таким образом, изобретение также относится к вирусному вектору *Paramyxoviridae*, содержащему последовательность РНК, вставленную между двумя смежными жизненно необходимыми генами (1; 2) вируса *Paramyxoviridae*, так что первый ген (1) расположен в 3′-направлении, а второй ген (2) расположен в 5′-направлении указанной вставленной последовательности РНК, и причем указанная вставленная последовательность РНК содержит или состоит из:

- первой последовательности РНК, где указанная первая последовательность РНК представляет собой соответствующую нуклеотидную последовательность, и
- второй последовательности РНК, фланкирующей 5′-конец первой последовательности РНК, где указанная вторая последовательность РНК

представляет собой 5′-некодирующую область гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1) и

- третьей последовательности РНК, фланкирующей 3′-конец первой последовательности РНК, где указанная третья последовательность РНК содержит или состоит из 3′-некодирующей области гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2).

Предпочтительно указанная первая последовательность РНК функционально связана с последовательностью начала гена (GS), включенной в указанную третью нуклеотидную последовательность РНК и/или с промотором генома вируса *Paramyxoviridae*.

В соответствии с конкретным предпочтительным аспектом указанные два смежных гена (1; 2) вируса *Paramyxoviridae* выбраны из группы, состоящей из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*

и/или указанными жизненно необходимыми генами вируса *Paramyxoviridae* являются:

- ген N, P, M, F, H и L вируса *Paramyxoviridae* или
- ген N, P, M, F, HN и L вируса *Paramyxoviridae*, или
- ген N, P, M, F, G и L вируса *Paramyxoviridae*.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом указанная третья последовательность РНК вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением состоит из:

- 3′-некодирующей области гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2), и
- последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, кодирует консенсусную последовательность для инициации или усиления трансляции, и причем указанная

консенсусная последовательность для инициации или усиления трансляции необязательно является последовательностью Козак.

В одном примере, в котором два смежных жизненно необходимых гена (1; 2) вируса *Paramyxoviridae* представляют собой ген P и ген M вируса *Paramyxoviridae*, тогда:

- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1), представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, за исключением гена P вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген N, M, F, H и L вируса *Paramyxoviridae*, и
- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae,* исключая второй ген (2), представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae,* за исключением гена M вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген H, P, F, L и N вируса *Paramyxoviridae*.

В контексте вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно:

- указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена, при этом ген выбран из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae,* расположенную в 3′-направлении экспрессионной кассеты, исключая первый ген (1), что, в частности, означает, что 5′-некодирующая область первого гена (1) соответственно не выбрана, и/или
- указанная третья нуклеотидная последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующей области гена, при этом ген выбран из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae,* расположенной в 5′-направлении экспрессионной кассеты, исключая второй ген (2), что, в частности, означает, что 3′-некодирующая область второго гена (2) соответственно не выбрана.

Кроме того, относительно вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, что:

- указанная 5′-некодирующая область представляет собой 5′-некодирующую область гена N вируса *Paramyxoviridae*, и/или

- указанная 3′-некодирующая область представляет собой 3′-некодирующую область гена H вируса *Paramyxoviridae*.

Предпочтительно, экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, в частности, содержит:

- первую последовательность РНК, где указанная первая последовательность РНК представляет собой соответствующую последовательность РНК, и

- вторую последовательность РНК, фланкирующую 5′-конец первой последовательности РНК, где указанная вторая последовательность РНК представляет собой 5′-некодирующую область гена нуклеопротеина (N) вируса *Paramyxoviridae*, и

- третью последовательность РНК, фланкирующую 3′-конец первой последовательности РНК, где указанная третья последовательность РНК состоит из:

3′-некодирующей области гена H, HN, F, или L вируса *Paramyxoviridae*, и

последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области кодирует последовательность Козак.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, кроме того, содержит:

- четвертую последовательность РНК, фланкирующую 5′-конец второй последовательности РНК, где указанная четвертая последовательность РНК представляет собой межгенную последовательность вируса *Paramyxoviridae*, и/или

- пятую последовательность РНК, фланкирующую 3′-конец четвертой последовательности РНК, где указанная пятая последовательность РНК представляет собой межгенную последовательность вируса *Paramyxoviridae*.

Предпочтительно указанная третья последовательность РНК экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением или вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из 3′-некодирующей области гена H вируса *Paramyxoviridae* и/или указанная экспрессионная кассета предпочтительно вставлена между геном P и геном M вируса *Paramyxoviridae*.

В соответствии с особенно предпочтительным аспектом изобретение также относится к:

(A) экспрессионной кассете в соответствии с настоящим изобретением, содержащей:

- первую последовательность РНК, где указанная первая последовательность РНК представляет собой представляющую интерес гетерологичную или экзогенную последовательность РНК, и

- вторую последовательность РНК, фланкирующую 5′-конец первой последовательности РНК, где указанная вторая последовательность РНК представляет собой 5′-некодирующую область гена N CDV, и

- третью последовательность РНК, фланкирующую 3′-конец первой последовательности РНК, где указанная третья последовательность РНК состоит из:

3′-некодирующей области гена H, HN, F или L вируса *Paramyxoviridae*, и

последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, кодирует последовательность Козак,

и где указанная экспрессионная кассета предпочтительно, кроме того, содержит:

- четвертую последовательность РНК, фланкирующую 5′-конец второй последовательности РНК, где указанная четвертая последовательность РНК представляет собой межгенную последовательность CDV, или

- пятую последовательность РНК, фланкирующую 3′-конец третьей последовательности РНК, где указанная пятая последовательность РНК представляет собой межгенную последовательность CDV,

и, соответственно, изобретение также относится к:

(B) вирусному вектору *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, содержащему экспрессионную кассету (A), причем этот вектор также определен в настоящей заявке как «вектор CDV в соответствии с настоящим изобретением».

Предпочтительно указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением или вирусного

вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением функционально связана с последовательностью начала гена (GS), включенной в указанную третью нуклеотидную последовательность РНК и/или с промотором генома вируса *Paramyxoviridae*.

В контексте экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением или вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, указанный вирус *Paramyxoviridae* предпочтительно представляет собой CDV, а указанная 5′-некодирующая область гена CDV выбрана из группы, состоящей из:

5′-некодирующей области гена N CDV, причем 5′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:1,

5′-некодирующей области гена P CDV, причем 5′-некодирующая область гена P CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:2,

5′-некодирующей области гена M CDV, причем 5′-некодирующая область гена M CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:3,

5′-некодирующей области гена F CDV, причем 5′-некодирующая область гена F CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:4,

5′-некодирующей области гена H CDV, причем 5′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:5, и

5′-некодирующей области гена L CDV, причем 5′-некодирующая область гена L CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК,

которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:6.

В контексте экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением или вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, указанный вирус *Paramyxoviridae* предпочтительно представляет собой CDV, а указанная 3′-некодирующая область гена CDV выбрана из группы, состоящей из:

3′-некодирующей области гена H CDV, причем 3′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:7,

3′-некодирующей области гена N CDV, причем 3′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:8,

3′-некодирующей области гена P CDV, причем 3′-некодирующая область гена P CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:9,

3′-некодирующей области гена M CDV, причем 3′-некодирующая область гена M CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:10,

3′-некодирующей области гена F CDV, причем 3′-некодирующая область гена F CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:11, и

3′-некодирующей области гена L CDV, причем 3′-некодирующая область гена L CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:12.

Предпочтительно, указанная вторая нуклеотидная последовательность или указанная вторая последовательность РНК экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением или вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением представляет собой 5′-некодирующую область гена N CDV, и причем указанная 5′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:1.

Что касается экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением или вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, то предпочтительно:

- указанная 3′-некодирующая область гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2), представляет собой 3′-некодирующую область гена H CDV, и где указанная 3′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:7, и/или

- указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области последовательности, кодирует последовательность Козак длиной от 5 до 8 нуклеотидов, и где последовательность Козак предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:13.

Предпочтительно, указанная межгенная последовательность экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением или вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением представляет собой межгенную последовательность CDV, и где указанная межгенная последовательность CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 66% идентична последовательности SEQ ID NO:14.

Предпочтительно, указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, описанная в настоящей заявке в контексте экспрессионной кассеты в соответствии с настоящим изобретением или вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой необходимую последовательность, кодирующую ген или антиген, и/или указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность предпочтительно является не встречающейся в природе и/или рекомбинантной.

В частности, указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность предпочтительно является рекомбинантной и/или гетерологичной, и/или экзогенной.

Указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность предпочтительно кодирует антиген вызывающего заболевание агента, причем вызывающий заболевание агент предпочтительно представляет собой вызывающий заболевание агент, способный инфицировать домашнее животное, такое как собака или кошка, и/или любое другое домашнее или дикое плотоядное животное, или способный инфицировать животных, выращиваемых в продовольственных целях, таких как свиньи или крупный рогатый скот.

В соответствии с одним предпочтительным аспектом в соответствии с настоящим изобретением, вирус *Paramyxoviridae* представляет собой вирус *Paramyxoviridae*, способный инфицировать животное первого биологического семейства, а представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует антиген вызывающего заболевание агента, способного инфицировать животное указанного первого биологического семейства, и где указанный вызывающий заболевание агент предпочтительно отличается от указанного вируса *Paramyxoviridae*.

Указанное животное упомянутого первого биологического семейства предпочтительно выбирают из группы, включающей в себя животное семейства собачьих, животное семейства кошачьих и животное семейства свиней, и причем указанное животное приведенного первого биологического семейства наиболее предпочтительно является представителем семейства собачьих, кошачьих или свиней, таких как собака, кошка или свинья.

Необязательно, указанный вирус *Paramyxoviridae*, способный инфицировать животное первого биологического семейства, представляет собой CDV и указанный вызывающий заболевание агент, способный инфицировать животное указанного первого биологического семейства представляет собой собачий парвовирус (CPV) или,

необязательно указанный вирус *Paramyxoviridae*, способный инфицировать животное первого биологического семейства, представляет собой вирус Ла-Пьедад-Мичоакан-Мексика (LPMV), а указанный вызывающий заболевание способный агент, способный инфицировать животное указанного первого биологического семейства, представляет собой вирус свиного гриппа (SwIV).

В качестве еще одного предпочтительного варианта указанный вирус *Paramyxoviridae*, способный инфицировать животное первого биологического семейства представляет собой вирус Ла-Пьедад-Мичоакан-Мексика (LPMV), а указанный вызывающий заболевание агент, способный инфицировать животное указанного первого биологического семейства, представляет собой вирус эпидемической диареи свиней (PEDV).

В соответствии с особенно предпочтительным аспектом, указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует антиген от собачьего парвовируса (CPV), кошачьего парвовируса (FPV) или вируса свиного гриппа (SwIV).

В качестве другого предпочтительного варианта указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность предпочтительно кодирует антиген вируса эпидемической диареи свиней (PEDV).

Указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность предпочтительно кодирует:

- капсидный белок *Protoparvovirus*, и причем указанный капсидный белок *Protoparvovirus* предпочтительно выбран из группы, включающей в себя капсидный белок *Carnivore protoparvovirus 1* (CPV или FPV), капсидный белок *Primate protoparvovirus 1,* капсидный белок *Rodent protoparvovirus 1*, капсидный белок *Rodent protoparvovirus 2,* капсидный белок *Ungulate parvovirus 1 (PPV)*, или

- белок оболочки вируса гриппа, где указанный белок оболочки необязательно представляет собой гемагглютинин и/или где указанный вирус гриппа необязательно выбран из группы, состоящей из вируса гриппа A, вируса гриппа B и вируса гриппа C, и при этом вирус гриппа A предпочтительно выбран из группы вирусов гриппа H3N2, H3N1, H1N1, H1N2, H2N1, H2N3 и H911.

В качестве другого предпочтительного варианта, указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует шиповидный (S) белок коронавируса, и причем указанный S белок коронавируса предпочтительно выбран из группы, состоящей из S белка *Alpaca coronavirus*, S белка *Alphacoronavirus 1*, S белка *Human coronavirus 229E*, S белка *Human Coronavirus NL63*, S белка *вируса эпидемической диареи свиней* (PEDV), S белка *Human coronavirus OC43*, S белка *Human coronavirus HKU1*, S белка *мышиного коронавируса*, S белка *коронавируса, связанного с тяжёлым острым респираторным синдромом*, S белка *коронавируса ближневосточного респираторного синдрома* (MERS-CoV) и S белка *вируса птичьего инфекционного бронхита* (IBV).

В частности, указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует:

- белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и причем указанный белок CPV VP2 предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35; или
- гемагглютинин подтипа H3 (H3), в частности H3 вируса свиного гриппа, и где указанный H3 предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:36.

В качестве другого предпочтительного варианта, указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует шиповидный (S) белок вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), и где указанный S белок PEDV предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности,

которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45.

Более предпочтительно, указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует:

- белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и где указанная последовательность, кодирующая белок VP2 CPV, в частности, состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:15; или
- гемагглютинин подтипа H3 (H3), предпочтительно H3 вируса свиного гриппа, и где указанная последовательность, кодирующая H3, предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:16.

В качестве другого предпочтительного варианта, указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует шиповидный (S) белок вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), и где указанная последовательность, кодирующая S белок PEDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:37 или SEQ ID NO:38.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом в соответствии с изобретением указанная экспрессионная кассета состоит из или указанный вирусный вектор *Paramyxoviridae* содержит:

- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:18, или
- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20.

В качестве другого предпочтительного варианта указанная экспрессионная кассета состоит из или указанный вирусный вектор *Paramyxoviridae* содержит полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:40.

Предпочтительно, вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением содержит:

- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:21; или

- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:22.

В качестве другого предпочтительного варианта вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:41.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, кроме того, содержит:

- шестую последовательность РНК, фланкирующую 5′-конец четвертой последовательности РНК, где указанная шестая последовательность РНК состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:23, и/или

- седьмую последовательность РНК, фланкирующую 3′-конец пятой последовательности РНК, где указанная седьмая последовательность РНК состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:24.

Кроме того, в изобретении предложен вирусный вектор чумы собак, также называемый в настоящей заявке «вектором для двойной иммунизации против CDV-CPV», причем указанный вектор содержит представляющую интерес гетерологичную последовательность РНК, причем указанная представляющая интерес гетерологичная последовательность РНК предпочтительно расположена между геном P и геном M CDV, и где указанная представляющая интерес гетерологичная последовательность РНК кодирует белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и где указанная последовательность, кодирующая белок VP2 CPV необязательно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:15,

и где предпочтительно указанная представляющая интерес гетерологичная последовательность РНК функционально связана с последовательностью начала гена (GS), расположенной в 3′-направлении указанной гетерологичной последовательности РНК, причем указанная последовательность GS наиболее предпочтительно включена в экзогенную 3′-некодирующую область гена H CDV, и/или с промотором генома CDV.

В качестве другого предпочтительного варианта указанная представляющая интерес гетерологичная последовательность РНК кодирует белок VP2 CPV, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35.

В особенности указанная представляющая интерес гетерологичная последовательность РНК в векторе для двойной иммунизации против CDV-CPV функционально связана с:

- экзогенной 3′-некодирующей областью гена H CDV, в частности с последовательностью GS, включенной в неё, причем указанная экзогенная 3′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно фланкирует 3′-конец указанной представляющей интерес гетерологичной последовательности РНК, кодирующей белок VP2 CPV и/или
- промотором генома CDV.

Кроме того, в изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует экспрессионную кассету в соответствии с настоящим изобретением или вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой предпочтительно молекулу ДНК, и где указанная молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты.

Дополнительно настоящее изобретение обеспечивает молекулу ДНК, которая также определена в дальнейшем как «молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением», причем указанная молекула содержит:

(i) последовательность ДНК, кодирующую соответствующий полипептид,

(ii) последовательность ДНК, фланкирующую 3′-конец последовательности (i) и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:25,

(iii) последовательность ДНК, фланкирующая 5′-конец последовательности (i) и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:26, и

(iv) последовательность ДНК, фланкирующая 5′-конец последовательности (iii) и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO:27.

Молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением, кроме того, предпочтительно содержит:

(v) последовательность ДНК, фланкирующую 5′-конец последовательности (ii) и которая по меньшей мере на 66% идентична последовательности SEQ ID NO:28, и/или

(vi) последовательность ДНК, фланкирующую 3′-конец последовательности (iv) и которая по меньшей мере на 66% идентична последовательности SEQ ID NO:28.

Предпочтительно молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением представляет собой выделенную молекулу ДНК.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением, кроме того, содержит:

(vii) последовательность ДНК, фланкирующую 3′-конец последовательности (v) и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:29 и/или

(viii) последовательность ДНК, фланкирующую 5′-конец последовательности (vi) и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:30.

Предпочтительно последовательность (i) представляет собой

- последовательность ДНК, кодирующую белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и где указанная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:31, или

- последовательность ДНК, кодирующая гемагглютинин подтипа H3 (H3), предпочтительно H3 вируса свиного гриппа, и где указанная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:32.

В качестве другого предпочтительного варианта последовательность (i) представляет собой последовательность ДНК, кодирующую S белок PEDV, и где указанная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:42 или SEQ ID NO:43.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением содержит:

- последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:33 или

- последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:34.

В качестве другого предпочтительного варианта молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:44.

Кроме этого, изобретение обеспечивает клетку-хозяина млекопитающего, содержащую:

- экспрессионную кассету в соответствии с настоящим изобретением,
- вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением или вектор для двойной иммунизации против CDV-CPV, описанный в настоящей заявке, или
- молекулу ДНК в соответствии с настоящим изобретением,

и где указанная клетка-хозяин млекопитающего предпочтительно представляет собой выделенную клетку-хозяина млекопитающего.

Настоящее изобретение также обеспечивает:

- экспрессионную кассету в соответствии с настоящим изобретением,
- вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением или
- молекулу ДНК в соответствии с настоящим изобретением

для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины.

Дополнительно в контексте изобретения предложена конструкция ДНК, содержащая молекулу ДНК в соответствии с настоящим изобретением, где указанная конструкция ДНК, в частности, представляет собой вектор ДНК, такой как плазмида. Векторы ДНК или плазмиды, в которые может быть вставлена молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением, будут определены специалисту в данной области техники. Конструкция ДНК, описанная в настоящей заявке, предпочтительно представляет собой выделенную конструкцию ДНК. Используемый в настоящей заявке термин «содержащий молекулу ДНК» в

частности, следует понимать как эквивалентный термину «содержащий последовательность молекулы ДНК».

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает транскрипт РНК конструкции ДНК, описанный в настоящей заявке, причем указанный транскрипт РНК предпочтительно представляет собой выделенный транскрипт РНК.

Настоящее изобретение также обеспечивает клетку, трансфицированную конструкцией ДНК, описанной в настоящей заявке, причем указанная клетка представляет собой предпочтительно выделенную клетку.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клетку, трансфицированную транскриптом РНК, упомянутым в настоящей заявке, причем указанная клетка предпочтительно представляет собой выделенную клетку.

Предпочтительно клетка или клетка-хозяин млекопитающего, соответственно, представляет собой клетку Vero.

Кроме того, в контексте настоящего изобретения предложен способ получения инфекционного вируса *Paramyxoviridae*, содержащего гетерологичный ген, в частности, для получения вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, причем указанный способ включает в себя стадии:

а обеспечение клетки-хозяина, экспрессирующей гетерологичную РНК-полимеразу;

б трансфекция клетки-хозяина конструкцией ДНК, описанной в настоящей заявке, и где молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением, включенная в конструкцию ДНК, транскрибируется гетерологичной РНК-полимеразой, и

в выделение вирусов, продуцируемых клетками.

Поскольку вирус *Paramyxoviridae* имеет геном РНК с отрицательной цепью, в трансфицированных клетках необходимо присутствие РНК-полимеразы, предпочтительно РНК-полимеразы Т7 или РНК-полимеразы, кодируемой вирусом *Paramyxoviridae*. Наиболее предпочтительным является использование РНК-полимеразы Т7. Присутствие РНК-полимеразы в трансфицированных клетках может быть обеспечено, например, путем совместной трансфекции плазмиды, кодирующей и экспрессирующей РНК-полимеразу, или путем проникновения в клетки с помощью белка РНК-полимеразы. В соответствии с изобретением, в этом

отношении особенно предпочтительным является использование трансгенных клеток, продуцирующих РНК-полимеразу, таких как трансфекция конструкции ДНК в клетки ВНК-21, экспрессирующие полимеразу Т7 или в клетки BSR-T7/5. В качестве альтернативы, клетки также могут быть трансфицированы посредством мРНК, которая кодирует РНК-полимеразу, и которая транслируется в РНК-полимеразу при трансфекции в клетки-хозяева.

Кроме того, в соответствии с другим аспектом изобретение обеспечивает применение вирусного вектора *Paramyxoviridae* в соответствии с изобретением или клетки, описанной в настоящей заявке для изготовления иммуногенной композиции или вакцины.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, которая также определена в настоящей заявке как «иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением», при этом указанная иммуногенная композиция содержит:

а. вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, где указанный вектор необязательно представляет собой инфекционный и/или аттенуированный вирус, или где указанный вектор необязательно представляет собой аттенуированный и/или модифицированный живой вирус, и

б. рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, и/или вирусоподобную частицу, содержащую множество рекомбинантных белков, экспрессируемых указанным вектором, и

в. необязательно приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения.

Предпочтительно указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый вектором, представляет собой

- антиген VP2 парвовируса, такой как белок VP2 CPV, или

- белок оболочки вируса гриппа, где указанный белок оболочки необязательно представляет собой гемагглютинин, такой как H3.

В частности, подразумевают, что выражение «экспрессируемый указанным вектором» или «экспрессируемый вектором», соответственно, используемый в настоящей заявке, в частности, эквивалентно выражению «экспрессируемый в клетке, инфицированной вектором» или «экспрессируемый в клетке, инфицированной указанным вектором», соответственно.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом, иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из:

а любого из вышеупомянутых векторов, кодирующих белок VP2 CPV, и где указанный вектор предпочтительно представляет собой вектор CDV, в частности, вектор CDV в соответствии с настоящим изобретением, или вектор для двойной иммунизации против CDV-CPV, как описано в настоящей заявке, и

б полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36, где указанный полипептид предпочтительно представляет собой рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором,

в и необязательно приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, где указанный носитель предпочтительно подходит для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения.

В качестве другого предпочтительного варианта указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, представляет собой S белок коронавируса, и где указанный S белок коронавируса необязательно представляет собой S белок PEDV, в частности, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45.

Изобретение также обеспечивает вакцину или фармацевтическую композицию, которая в дальнейшем также определена как «вакцина или фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением», где указанная вакцина или фармацевтическая композиция содержит:

а любой из векторов, описанных в настоящей заявке в контексте настоящего изобретения, и

б рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, и/или вирусоподобную частицу, содержащую множество рекомбинантных белков, экспрессируемых указанным вектором, и

в приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, где указанный носитель предпочтительно подходит для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения, и

г необязательно указанная вакцина дополнительно содержит вспомогательное средство,

и где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый вектором, предпочтительно представляет собой:

- антиген VP2 парвовируса, такой как белок VP2 CPV, или

- белок оболочки вируса гриппа, где указанный белок оболочки необязательно представляет собой гемагглютинин, такой как H3.

Предпочтительно, вакцина или фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из:

а любого из вышеупомянутых векторов, кодирующих белок VP2 CPV или гемагглютинин вируса гриппа, и где указанный вектор предпочтительно представляет собой вектор CDV, в частности вектор CDV в соответствии с настоящим изобретением, или вектор для двойной иммунизации против CDV-CPV, как описано в настоящей заявке, и

б полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36, где указанный полипептид предпочтительно представляет собой рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, и

в приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения,

г и необязательно вспомогательное средство.

В качестве другого предпочтительного варианта указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, который включен в вакцину или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой S белок коронавируса, и где указанный S белок коронавируса необязательно представляет собой S белок PEDV, в частности содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ получения иммуногенной композиции или вакцины для снижения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с инфекцией или вызванных ими, включающей следующие стадии:

а инфицирование клетки-хозяина млекопитающего любым из векторов, описанных в настоящей заявке в контексте настоящего изобретения,

б культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,

в сбор инфицированных клеточных культур,

г необязательно очистка собранных инфицированных клеточных культур из стадии в)

д необязательно смешивание указанной собранной инфицированной клеточной культуры с фармацевтически приемлемым носителем,

и где иммуногенная композиция или вакцина предпочтительно снижает тяжесть одного или нескольких клинических признаков, связанных или вызванных посредством:

- заражения CDV и CPV, или
- заражения вирусом гриппа, где указанный вирус гриппа необязательно выбран из группы, включающей в себя вирус гриппа A, вирус гриппа B и вирус гриппа C, и где вирус гриппа A предпочтительно выбран из группы вирусов гриппа H3N2, H3N1, H1N1, H1N2, H2N1, H2N3 и H911.

В качестве другого предпочтительного варианта указанная иммуногенная композиция или вакцина снижает тяжесть одного или нескольких клинических

признаков, связанных с или вызванных заражением коронавирусом, где указанный коронавирус необязательно выбран из группы, включающей в себя: *Alpaca coronavirus*, *Alphacoronavirus 1*, *Human coronavirus 229E*, *Human Coronavirus NL63*, *вирус эпидемической диареи свиней* (PEDV), *Human coronavirus OC43*, *Human coronavirus HKU1*, *мышиный коронавирус*, *коронавирус, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом* (SARS-CoV), *коронавирус, связанный с ближневосточным респираторным синдромом* (MERS-CoV) и *вирус птичьего инфекционного бронхита* (IBV).

Настоящее изобретение также относится к:

- иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением или
- вакцине или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением

для применения в способе снижения или предотвращения клинических признаков или заболевания, вызванного заражением по меньшей мере одним патогеном у животного или для применения в способе лечения или предотвращения заражения по меньшей мере одним патогеном у животного, предпочтительно указанное животное является домашним животным, таким как собака или кошка, и/или любым другим домашним или диким плотоядным животным, или животным, выращиваемым в продовольственных целях, таким как свинья, и где указанное заражение по меньшей мере одним патогеном предпочтительно представляет собой:

- заражение посредством CDV и/или CPV, где указанное заражение наиболее предпочтительно представляет собой заражение посредством CDV и/или CPV, или
- заражение вирусом свиного гриппа, где вирус свиного гриппа необязательно представляет собой вирус гриппа подтипа H3, и где указанный вирус гриппа подтипа H3 предпочтительно представляет собой вирус свиного гриппа подтипа H3N2 или H3N1.

В качестве другого предпочтительного варианта, указанное заражение по меньшей мере одним патогеном представляет собой заражение посредством PEDV.

В частности, настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции или к вакцине в соответствии с настоящим изобретением или к

фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением для применения в способе

- индуцирования иммунного ответа против CPV и CDV у животного, предпочтительно у собаки, или
- индуцирования иммунного ответа против вируса свиного гриппа у свиньи, где вирус свиного гриппа необязательно представляет собой вирус гриппа подтипа H3, и где указанный вирус гриппа подтипа H3 предпочтительно представляет собой вирус свиного гриппа подтипа H3N2 или H3N1.

В качестве другого предпочтительного варианта, иммуногенная композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением предназначена для использования в способе индукции иммунного ответа против PEDV у свиньи, в частности, предпочтительно у беременной свиноматки.

В одном аспекте иммуногенная композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения в способе снижения или предотвращения клинических признаков или заболеваний, вызванных заражением посредством PEDV у поросёнка, причем поросёнка следует вскармливать молоком свиноматки, которой вводили иммуногенную композицию, и причем указанная свиноматка предпочтительно является свиноматкой, которой была введена иммуногенная композиция в то время, когда указанная свиноматка была беременной, в частности упомянутым поросёнком.

В соответствии с конкретным предпочтительным аспектом настоящего изобретения при таком применении иммуногенную композицию или вакцину в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением следует вводить указанной свиноматке через слизистую оболочку, предпочтительно интраназально.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ иммунизации животного, такого как домашнее животное, например, такого как собака или кошка и/или любого другого домашнего или дикого плотоядного животного, или животного, выращиваемого в продовольственных целях, включая свиней, против

клинического заболевания, вызванного по меньшей мере одним патогеном у указанного животного, причем указанный способ включающий в себя стадию введения животному иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением или вакцины или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, где указанная иммуногенная композиция или вакцина не вызывает клинических признаков заражения, но способна вызывать иммунный ответ, который иммунизирует животное против патогенных форм указанного по меньшей мере одного патогена, и где указанный по меньшей мере один патоген предпочтительно представляет собой CDV или CPV или SwIV или, наиболее предпочтительно, CDV и CPV.

Помимо этого, в настоящем изобретении предложен способ индукции выработки антител, специфичных к PEDV у свиноматки, где указанный способ включает в себя введение указанной свиноматке иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением или вакцины или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, в частности, содержащим вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, кодирующий S белок PEDV, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45.

Кроме того, настоящее изобретение, в частности, обеспечивает способ снижения или предотвращения клинических признаков или заболеваний, вызванных заражением посредством PEDV у поросенка, где указанный способ включает в себя:

- введение свиноматке иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением или вакцины или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, в частности содержащих вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, кодирующий S белок PEDV, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45, и

- вскармливание указанного поросенка указанной свиноматкой.

Предпочтительно, указанная свиноматка представляет собой беременную свиноматку, в частности, указанным поросёнком.

Более предпочтительно, такой способ снижения или предотвращения клинических признаков или заболеваний, вызванных заражением посредством PEDV у поросенка, включает в себя следующие стадии:

- введение иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением или вакцины или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, в частности содержащих вирусный вектор *Paramyxoviridae* в соответствии с настоящим изобретением, кодирующий S белок PEDV, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45, свиноматке, которая беременна указанным поросёнком,
- рождение указанной свиноматкой указанного поросёнка, и
- вскармливание указанного поросенка указанной свиноматкой.

Предпочтительно иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением или вакцину или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением вводят животному внутримышечно или через слизистую оболочку, например, путем интраназального введения.

Наиболее предпочтительно в таком способе снижения или предотвращения клинических признаков или заболеваний, вызванных заражением посредством PEDV у поросенка указанную иммуногенную композицию или указанную вакцину, или фармацевтическую композицию вводят указанной свиноматке через слизистую оболочку, предпочтительно интраназально.

В соответствии с еще одним предпочтительным аспектом в настоящем изобретении также предложен набор для индукции иммунного ответа против по меньшей мере одного патогена у животного или для вакцинации животного, предпочтительно домашнего животного, такого как собака или кошка и/или любого другого домашнего или дикого плотоядного животного, или животного, выращиваемого в продовольственных целях, такого как свиньи или крупный

рогатый скот, против заболевания, связанного с по меньшей мере один патогеном и/или для снижения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с или вызванных по меньшей мере одним патогеном у животного, который содержит:

а) шприц или распылитель, пригодный для введения вакцины указанному животному; и

б) иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением или вакцину или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением, и

в) необязательно листок-вкладыш с инструкцией,

где указанный по меньшей мере один патоген предпочтительно представляет собой CDV или CPV или SwIV или PEDV, и где указанный по меньшей мере один патоген наиболее предпочтительно представляет собой CDV и CPV.

Определения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение во время подачи заявки. Значение и объем терминов должны быть понятными; тем не менее, в случае любой скрытой неоднозначности, приведенные в настоящей заявке определения превосходят любое словарное или внешнее определение. Кроме того, если контекстом не требуется иное, то термины в единственном числе должны включать и множественное число, а термины во множественном числе будут включать единственное число. В настоящей заявке использование слов «или» означает «и/или» если не указано иное. Кроме того, использование выражения «включающий», а также других форм, таких как «включает» и «включенный», не является ограничивающим. Все упомянутые в настоящей заявке патенты и публикации включены в нее посредством ссылки.

Для осуществления на практике настоящего изобретения будут использованы, если не указано иное, традиционные методы вирусологии, молекулярной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантной ДНК, химии белков и иммунологии, которые известны специалистам в данной области. Такие методы подробно

описаны в литературных источниках. См., например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, тома I, II и III, второе издание (1989); DNA Cloning, тома I и II (D. N. Glover изд. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins изд. 1984); Animal Cell Culture (R. K. Freshney изд. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL press, 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Protein purification methods – a practical approach (E.L.V. Harris and S. Angal, изд., IRL Press at Oxford University Press); и Handbook of Experimental Immunology, тома I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell изд., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Перед подробным описанием настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной ДНК, полипептидными последовательностями или параметрами процесса, которые конечно же могут быть изменены. Также следует понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения, и не предназначена для ограничения. Следует отметить, что используемая в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа охватывают множественные ссылки, если содержание явно не указывает на иное. Таким образом, например, ссылка на «антиген» включает смесь двух или нескольких антигенов, ссылка на «наполнитель» охватывает смеси из двух или нескольких наполнителей и т.п.

Определения *Paramyxoviridae*

В частности, подразумевают, что термин «вирус *Paramyxoviridae*», используемый в настоящей заявке, эквивалентен термину «парамиксовирус», который часто используют в контексте вирусов семейства *Paramyxoviridae*.

Термин «5′-некодирующая область гена N вируса *Paramyxoviridae*», используемый в настоящей заявке, в частности, относится к последовательности РНК экспрессируемого гена N предпочтительно инфекционного вируса *Paramyxoviridae*, причем указанная последовательность РНК фланкирует 5′-конец кодирующей последовательности (т.е. 5′-конец триплета РНК, комплементарной стоп-кодону) и содержит последовательность конца гена указанного гена. Таким

образом, более конкретно «последовательность 5′-некодирующей области», как указано в настоящей заявке, представляет собой последовательность РНК, идентичную всей 5′-некодирующей последовательности экспрессируемого гена N предпочтительно инфекционного вируса *Paramyxoviridae*. Еще более конкретно «5′-некодирующая область», как указано в настоящей заявке, представляет собой последовательность РНК, идентичную некодирующей последовательности гена N вируса *Paramyxoviridae*, где указанная некодирующая последовательность фланкирована посредством (а) кодирующей последовательности и (б) межгенной последовательности, соединяя указанный ген N с геном P.

Термин «3′-некодирующая область» конкретного гена (например, гена H) вируса *Paramyxoviridae*, используемый в настоящей заявке, в частности относится к последовательности РНК экспрессируемого конкретного гена (например, гена H) предпочтительно инфекционного вируса *Paramyxoviridae*, причем указанная последовательность РНК фланкирует 3′-конец кодирующей последовательности (т.е. 3′-конец триплета РНК, комплементарного стартовому кодону) и содержит последовательность начала гена указанного гена. Таким образом, более конкретно, «последовательность 3′-некодирующей области», как указано в настоящей заявке, представляет собой последовательность РНК, идентичную всей 3′-некодирующей последовательности экспрессируемого конкретного гена (например, гена H) предпочтительно инфекционного вируса *Paramyxoviridae*. Еще более предпочтительно «3′-некодирующая область», как указано в настоящей заявке, представляет собой последовательность РНК, идентичную некодирующей последовательности конкретного гена (например, гена H) вируса *Paramyxoviridae*, где указанная некодирующая последовательность фланкирована посредством (а) кодирующей последовательности и (б) межгенной последовательности, соединяющей указанный ген со следующим геном в 3′-направлении.

Используемый в настоящей заявке термин «межгенная область», в частности, относится к последовательности РНК, соединяющей 5′-конец гена вируса *Paramyxoviridae* с 3′-началом смежного гена в 5′-направлении вируса *Paramyxoviridae*.

Термин «последовательность начала гена», используемый в настоящей заявке, в частности эквивалентен термину «сигнал запуска гена».

При использовании в настоящей заявке подразумевают, что термин «промотор генома вируса *Paramyxoviridae*» эквивалентен термину «лидерная последовательность генома вируса *Paramyxoviridae*», и что термин «промотор генома CDV» эквивалентен термину «лидерная последовательность генома CDV», соответственно.

Определения молекулярной биологии

Выражение «последовательность, фланкирующая 5′-конец», как описано в настоящей заявке, в частности эквивалентно выражению «последовательность ковалентно связана с 5′-концом» или, соответственно, выражению «последовательность, в которой её 3'-концевой нуклеотид ковалентно связан с 5′-концевым нуклеотидом», и где в особенности понятно, что указанные два концевых нуклеотида ковалентно связаны между фосфатной группой, присоединенной к 5'-атому углерода пентозы и 3'-атому углерода соседней пентозы.

Выражение «последовательность, фланкирующая 3′-конец», как описано в настоящей заявке, в частности, эквивалентно выражению «последовательность ковалентно связана с 3′-концом» или, соответственно, выражению «последовательность, в которой её 5'-концевой нуклеотид ковалентно связан с 3′-концевым нуклеотидом», и где в особенности понятно, что указанные два концевых нуклеотида ковалентно связаны между 3'-атомом углерода пентозы и фосфатной группой, присоединенной к 5'-атому углерода соседней пентозы.

Понятно, что термин «последовательность Козак», используемый в контексте настоящего изобретения, в частности, относится нуклеотидной последовательности, которая кодирует последовательность мРНК, участвующую в распознавании рибосомой сайта начала трансляции. Предпочтительно последовательность РНК, кодирующая последовательность Козак в контексте настоящего изобретения представляет собой последовательность РНК, которая может быть транскрибирована в последовательность молекулы мРНК, фланкирующей в ней 5′-конец стартового кодона (AUG) и играющей роль в инициации процесса трансляции.

Термин «вектор» как известно в данной области техники, относится к полинуклеотидной конструкции, обычно к плазмиде или бактериальной искусственной хромосоме, применяемой для передачи генетического материала в клетку-хозяина. Векторами могут быть, например, бактерии, вирусы, фаги, бактериальные искусственные хромосомы, космиды или плазмиды. Вектор, используемый в настоящей заявке, может состоять из или содержать либо ДНК, либо РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор состоит из ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой инфекционный вирус. Такой вирусный вектор содержит вирусный геном, которым манипулировали таким образом, что он несет чужеродный ген, который не выполняет функцию репликации вирусного вектора ни в культуре клеток, ни у животного-хозяина. В соответствии с конкретными аспектами данного описания вектор может быть использован для различных аспектов, таких как простая передача генетического материала, для трансфекции клеток-хозяев или организмов, для использования в качестве вакцин, например, ДНК-вакцин или с целью экспрессии генов. Экспрессия генов представляет собой термин, описывающий биосинтез белка в клетке, по указанию специфической полинуклеотидной последовательности, называемой геном. В конкретном аспекте вектор может представлять собой «экспрессионный вектор», который является вектором, способным управлять экспрессией белка, кодируемого одним или несколькими генами, переносимыми вектором, когда он присутствует в соответствующей среде.

Векторы и способы создания и/или использования векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут представлять собой такие или аналогичные, описанным в: патентах США № 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, публикациях PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93: 11349-11353, октябрь 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, октябрь 1996; Smith и соавт., Пат. США № 4,745,051 (рекомбинантный бакуловирус); Richardson, C. D. (ред.), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995

Humana Press Inc.); Smith и соавт., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, декабрь, 1983, том 3, № 12, сс. 2156-2165; Pennock и соавт., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector, "Molecular and Cellular Biology март 1984, том 4, № 3, стр. 406; EPA0 370 573; заявка США № 920,197, поданная 16 октября 1986; патентная публикация ЕР № 265785; патент США № 4,769,331 (рекомбинантный вирус герпеса); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, октябрь 1996; Andreansky и соавт., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, октябрь 1996; Robertson и соавт., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, октябрь 1996; Frolov и соавт., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, октябрь 1996; Kitson и соавт., J. Virol. 65, 3068-3075, 1991; патенты США № 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; акцептованная заявка США сер. номера 08/675,556 и 08/675,566 обе поданы 3 июля 1996 (рекомбинантный аденовирус); Grunhaus и соавт., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology (том 3) сс. 237-52, 1993; Ballay и соавт. EMBO Journal, том 4, сс. 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, апрель 1990; Prevec и соавт., J. Gen Virol. 70, 42434; PCT WO 91/11525; Felgner и соавт. (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259: 1745-49, 1993; и McClements и соавт., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, октябрь 1996; и и патенты США № 5,591,639, 5,589,466 и 5,580,859, а также WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang и соавт., Nature, и Furth и соавт., Analytical Biochemistry, relating to DNA expression vectors, в числе других. См. также WO 98/33510; Ju и соавт., Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (експрессионная система лентивируса); Sanford и соавт., Пат. США № 4,945,050; Fischbach и соавт. (Intracel); WO 90/01543; Robinson и соавт., Seminars in Immunology том 9, сс. 271-283 (1997), (вектор ДНК systems); Szoka и соавт., патент США № 4,394,448 (патент США №);

McCormick и соавт., Пат. США № 5,677,178 (применение цитопатических вирусов); и Пат. США № 5,928,913 (векторы для доставки генов), а также другие процитированные в настоящей заявке.

Термин «вирусный вектор» описывает генетически модифицированный вирус, которым управляют с помощью метода рекомбинантной ДНК таким образом, чтобы его введение в клетку-хозяина приводило к специфической биологической активности, например, экспрессии трансгена, переносимого вектором. В конкретном аспекте трансген представляет собой антиген. Вирусный вектор может или не может быть репликационно компетентным в клетке-мишени, ткани или организме. В частности, понимают, что термин «вектор вируса», используемый в настоящей заявке, является эквивалентным термину «вирусный вектор».

Произведение вирусного вектора может быть осуществлено при использовании любых пригодных методов генной инженерии, хорошо известных в данной области техники, включая, но без ограничения, стандартные методики расщепления эндонуклеазами рестрикции, лигирования, трансформации, очистки плазмиды, секвенирования ДНК, трансфекции клеточных культур, например, как описано у Sambrook и соавт. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)) или K. Maramorosch and H. Koprowski (Methods in Virology Volume VIII, Academic Press Inc. Лондон, UK (2014)).

Вирусный вектор может включать последовательности из генома любого известного организма. Последовательности могут быть включены в их нативной форме или могут быть модифицированы любым способом для получения желаемой активности. Например, последовательности могут содержать инсерции, делеции или замены.

Вирусный вектор может включать в себя кодирующие области двух или нескольких соответствующих белков. Например, вирусный вектор может включать в себя кодирующую область соответствующего первого белка и кодирующую область соответствующего второго белка. Соответствующий первый белок и соответствующий второй белок могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах вирусный вектор может включать в себя кодирующую(ие) область(области) соответствующего третьего или четвертого белка.

Представляющие интерес третий и четвертый белок могут быть одинаковыми или разными. Общая длина двух или нескольких соответствующих белков, кодируемых одним вирусным вектором, может изменяться. Например, общая длина двух или нескольких белков может составлять по меньшей мере приблизительно 200 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 250 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 300 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 350 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 400 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 450 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 500 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 550 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 600 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 650 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 700 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 750 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот или более.

Термины «вирусный вектор» и «вирусная конструкция» могут быть использованы как взаимозаменяемые.

Термин «конструкция», используемый в настоящей заявке, относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, такой как плазмида, BAC или рекомбинантный вирус, который был произведен синтетически.

Термин «плазмида» относится к цитоплазматической ДНК, которая реплицируется независимо от бактериальной хромосомы в бактериальной клетке-хозяине. В конкретном аспекте в соответствии с настоящим изобретением термин «плазмида» и/ или «плазмида для переноса» относится к элементу технологии рекомбинантной ДНК, пригодному для конструирования, например, экспрессионной кассеты для вставки в вирусный вектор. В другом конкретном аспекте термин «плазмида» можно использовать для определения плазмиды, пригодной в целях ДНК-вакцинации.

Как используется в данной заявке, термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» являются взаимозаменяемыми и относятся к любой нуклеиновой кислоте.

Используемые в настоящей заявке термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» являются взаимозаменяемыми и относятся к любой нуклеиновой

кислоте. Термин «последовательность нуклеиновой кислоты» следует понимать как эквивалентный термину «нуклеотидная последовательность». Термин «нуклеотидная последовательность» следует понимать как эквивалентный термину «полинуклеотидная последовательность».

Используемый в настоящей заявке термин «нуклеиновая кислота», «последовательность нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная последовательность», «полинуклеотид», «полинуклеотидная последовательность», «последовательность РНК» или «последовательность ДНК» относится к олигонуклеотиду, нуклеотиду или полинуклеотиду и их фрагментам и частям, а также к ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, представлять собой смысловую или антисмысловую цепь. Последовательность может быть некодирующей последовательностью, кодирующей последовательностью или их смесью. Последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены путем использования стандартных методик, хорошо известных специалисту в данной области техники.

Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» также в особенности включают в себя нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличающихся от пяти биологически встречающихся оснований (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил).

Используемый в настоящей заявке термин «промотор» или «последовательность промотора» означает нуклеотидную последовательность, которая позволяет связывать полимеразу РНК и управляет транскрипцией гена. Как правило, промотор расположен в 5'-некодирующей области гена, проксимально к сайту инициации транскрипции гена. Элементы последовательности в промоторах, которые функционируют в инициации транскрипции, часто характеризуются консенсусными нуклеотидными последовательностями. Примеры промоторов включают, но не ограничиваются ими, промоторы из бактерий, дрожжей, растений, вирусов и животных, таких как млекопитающие (включая лошадей, свиней, крупный рогатый скот и людей), птицы или насекомые. Промотор может быть индуцибельным, репрессируемым и/или конститутивным. Индуцибельные

промоторы инициируют повышенные уровни транскрипции ДНК под их контролем в ответ на некоторые изменения условий культивирования, такие как изменение температуры (Ptashne, 2014). Примерами промоторов, хорошо известных специалисту в данной области, являются, например, большой T SV40, предранний ген 1 HCMV и MCMV, альфа-промотор фактора элонгации человека, бакуловирусный промотор полиэдрина.

Термин «комплементарные нуклеотидные последовательности» описывает одну цепь или две спаренные цепи полинуклеотидов, таких как ДНК или РНК. Нуклеотидная последовательность комплементарной цепи отражает нуклеотидную последовательность её парной цепи так, что для каждого аденозина она содержит тимин (или урацил для РНК), для каждого гуанина - цитозин и наоборот. Комплементарная нуклеотидная последовательность, например, для 5'-GCATAC-3' представляет собой 3'-CGTATG-5' или 3'-CGUAUG-5' для РНК.

Используемые в настоящей заявке термины «ген», «соответствующий ген» имеют одинаковое значение и относятся к полинуклеотидной последовательности любой длины, которая кодирует соответствующий продукт. Кроме того, ген может содержать регуляторные последовательности предшествующие (5′-некодирующие или нетранслируемые последовательности) и последующие (3′-некодирующие или нетранслируемые последовательности) кодирующей последовательности. Выбранная последовательность может быть полноразмерной или укороченной, гибридным или меченым геном, и может представлять собой кДНК, геномную ДНК или фрагмент ДНК. Как правило, считается, что геномная ДНК, кодирующая полипептид или РНК, может включать в себя некодирующие области (то есть интроны), которые сплайсированы из зрелой матричной РНК (мРНК) и вследствие этого присутствуют в кДНК, кодирующей тот же полипептид или РНК. Она может представлять собой нативную последовательность, т.е. встречающуюся в природе форму(ы), или может быть мутированной, или содержащей последовательности, имеющие происхождение из различных источников или модифицированной иным образом по желанию. Эти модификации включают в себя оптимизацию кодонов с целью оптимального использования кодонов в выбранной клетке-хозяине или мечения. Кроме того, они могут включать в себя удаления или присоединения

действующих в *цис*-положении сайтов, такие как (криптический) донор сплайсинга, акцепторные сайты и точки ветвления, сигналы полиаденилирования, TATA-боксы, chi-сайты, сайты посадки рибосомы, повторяющиеся последовательности, вторичные структуры (например, структуры «петля-на-стебле»), сайты связывания для факторов транскрипции или другие регуляторные факторы, сайты рестрикционных ферментов и т.д., которые представляют собой лишь некоторые, но не ограничивающие примеры. Выбранная последовательность может кодировать секретируемый, цитоплазматический, ядерный, связанный с мембраной или клеточной поверхности полипептида.

Выражения «жизненно необходимый ген» или «жизненно необходимые гены», соответственно, используемые в настоящей заявке, в частности, предназначены для охвата генов, которые являются обязательными для репликации в клетке-хозяине.

Используемый в настоящей заявке термин «представляющая интерес нуклеотидная последовательность» является более общим термином, чем представляющий интерес ген, поскольку она не обязательно содержит ген, но может содержать элементы или части гена или другую генетическую информацию, например, *ori* (точка начала репликации). Представляющая интерес нуклеотидная последовательность может представлять собой любую последовательность ДНК или РНК, независимо от того, содержит ли она кодирующую последовательность или нет.

Термин «транскрипция» описывает биосинтез мРНК в клетке.

Используемый в настоящей заявке термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции последовательности нуклеиновой кислоты внутри клетки-хозяина. В соответствии с конкретными аспектами настоящего изобретения термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции гетерологичной и/или экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты внутри клетки-хозяина. Уровень экспрессии целевого продукта в клетке-хозяине может быть определен на основе количества соответствующей РНК или мРНК, которая присутствует в клетке, или количества желаемого полипептида, кодируемого выбранной последовательностью. Например, мРНК, транскрибируемая с выбранной последовательности может быть количественно оценена с помощью Нозерн-блот

гибридизации, защиты РНК от рибонуклеазы, гибридизации *in situ* с клеточной РНК или при использовании количественной ОТ-ПЦР (обратная транскрипция с последующей количественной ПЦР). Белки, экспрессированные из выбранной последовательности, могут быть определены количественно различными методами, например, с помощью ELISA, путем Вестерн-блоттинга, с помощью радиоиммуноанализа, путем иммунопреципитации, путем анализа на биологическую активность белка или путем иммуноокрашивания белка с последующим анализом FACS.

Термин «экспрессионная кассета» или «единица транскрипции», или «экспрессионная единица» определяет область внутри вектора, конструкции или полинуклеотидной последовательности, которая содержит один или несколько генов, подлежащих транскрипции, где нуклеотидные последовательности, кодирующие транскрибованный ген(ы), а также полинуклеотидные последовательности, содержащие регуляторные элементы, которые размещены в экспрессионной кассете, функционально связаны друг с другом. Они транскрибируются с промотора, и транскрипция завершается по меньшей мере одним сигналом полиаденилирования. В одном конкретном аспекте они транскрибируются из одного единственного промотора. В результате этого различные гены связаны по меньшей мере транскрипционно. Более одного белка или продукта можно транскрибировать и экспрессировать из каждой транскрипционной единицы (мультицистронная транскрипционная единица). Каждая единица транскрипции будет содержать регуляторные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции любой из выбранных последовательностей, содержащихся в единице. А каждая транскрипционная единица может содержать одинаковые или различные регуляторные элементы. Например, каждая транскрипционная единица может содержать один и тот же терминатор, элемент IRES или интроны могут быть использованы для функционального связывания генов в транскрипционной единице. Вектор или полинуклеотидная последовательность могут содержать более одной транскрипции.

Термин «вирусный титр» представляет собой меру инфекционных единиц на объем вирусного препарата. Вирусный титр является конечной точкой в

биологической процедуре и определяется как разведение, при котором определенная доля тестов, проводимых параллельно, показывает эффект (Reed and Muench, 1938). В частности, инфекционная доза для тканевой культуры пятьдесят на миллилитр (TCID50/мл) дает разведение препарата вируса, при котором инфицируется 50% количества клеточных культур, инокулированных параллельно с этим разведением.

«Элементы регуляции транскрипции» обычно содержат промотор выше экспрессируемой последовательности гена, сайта инициации и терминации транскрипции, и сигнала полиаденилирования.

Термин «сайт инициации транскрипции» относится к нуклеиновой кислоте в конструкции, соответствующей первой нуклеиновой кислоте, включенной в первичный транскрипт, то есть предшественнику мРНК. Сайт инициации транскрипции может перекрываться промоторными последовательностями.

«Сигнал терминации» или «терминатор», или «сигнал полиаденилирования» или «полиА», или «сайт терминации транскрипции» или «элемент терминации транскрипции» представляет собой представляет собой сигнальную последовательность, которая вызывает расщепление в специфическом сайте на 3'-конце эукариотической мРНК и пост-транскрипционное включение последовательности из приблизительно 100 - 200 нуклеотидов аденина (полиА хвост) на расщепленном 3'-конце, и таким образом вызывает терминацию транскрипции полимеразы РНК. Сигнал полиаденилирования содержит последовательность AATAAA приблизительно в 10-30 нуклеотидов выше сайта расщепления и последовательность, расположенную ниже. Известны различные элементы полиаденилирования, такие как tk полиА, поздний и ранний полиА SV40, BGH полиА (описаны в качестве примера в Пат. США № 5,122,458) или полиА гормона роста хомячка (WO2010010107).

«Элементы регуляции трансляции» включают в себя сайт инициации трансляции (AUG), стоп-кодон и сигнал полиА для каждого индивидуального полипептида, подлежащего экспрессии. Внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) может быть включен в некоторые конструкции. Для оптимизации экспрессии может быть целесообразно удалять, добавлять или изменять 5'- и/или 3'-нетранслируемые

области последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии, чтобы устранить любые дополнительные потенциально несоответствующие альтернативные кодоны инициации трансляции или другие последовательности, которые могут мешать или уменьшать экспрессию, как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Консенсусные сайты связывания рибосомы (последовательность Козак) могут быть вставлены непосредственно выше стартового кодона для усиления трансляции и таким образом экспрессии. Увеличенное содержание A/U вокруг этого сайта связывания рибосом дополнительно способствует более эффективному связыванию рибосом.

По определению каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, вставленный в клетку-хозяина и соответствующий белок или РНК, которые кодируются таким образом, обозначаются как «экзогенная», «экзогенная последовательность», «экзогенный ген», «экзогенная кодирующая последовательность», по отношению к клетке-хозяину, когда они происходят от другого (вирусного) вида. Используемый в настоящей заявке в отношении последовательности или гена, которые представляют интерес, таких как антиген, термин «экзогенный» означает, что указанная последовательность или представляющий интерес ген, в частности, указанный антиген, экспрессируется вне контекста его природного вида. Соответственно, VP2 антиген CPV является одним примером (см. Пример 2) экзогенного антигена в отношении вирусного вектора *Paramyxoviridae*. Используемый в настоящей заявке термин «экзогенная РНК» или «последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты», в частности, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая была введена в геном вируса *Paramyxoviridae* из внешнего источника, такого как из рекомбинантной последовательности. Примеры такого внешнего источника охватывают последовательности вируса *Paramyxoviridae*, а также последовательности, не происходящие от вируса *Paramyxoviridae*. Более конкретно, введение последовательности экзогенной нуклеиновой кислоты приводит к тому, что геном или ген, соответственно, имеют не встречающуюся в природе часть. Таким образом, используемый в настоящей заявке термин «экзогенная РНК», в частности, относится к нуклеотидной последовательности, которая не обнаруживается в

природе в геноме вируса *Paramyxoviridae*. Такая не встречающаяся в природе часть или не обнаруживаемая в природе последовательность, соответственно, также может быть результатом инсерции одной встречающейся в природе нуклеотидной последовательности в другую встречающуюся в природе нуклеотидную последовательность.

По определению, каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, вставленный в клетку-хозяина, и соответствующий белок или РНК, которые кодируются таким образом, обозначают как «гетерологичный», «гетерологичная последовательность», «гетерологичный ген», «гетерологичная кодирующая последовательность», «трансген» или «гетерологичный белок» по отношению к клетке-хозяину. Это применяется даже в том случае, если подлежащая введению последовательность или подлежащий введению ген идентичен эндогенной последовательности или эндогенному гену клетки-хозяина. Например, 5′-некодирующая область гена N вируса *Paramyxoviridae*, введенного в вирусный вектор *Paramyxoviridae* на другом сайте или в модифицированной форме, чем в вирусе дикого типа *Paramyxoviridae* по определению является гетерологичной последовательностью. Используемый в настоящей заявке в отношении последовательности или представляющего интерес гена, такого как антиген, термин «гетерологичный» означает, что указанная последовательность или представляющий интерес ген, в частности, указанный антиген, экспрессируется вне контекста своего природного подвида.

Термин «не встречающийся в природе» означает любую последовательность или представляющий интерес ген, такой как антиген, который не встречается природе в данном контексте, такую как гибридная последовательность или последовательность или представляющий интерес ген, такой как антиген из другого вида, или последовательность или представляющий интерес ген, такой как антиген, который не является продуктом природы вследствие искусственной мутации, инсерции, делеции и т.п.

В описании настоящего изобретения термин «рекомбинантный» используют поочередно с терминами «не встречающийся в природе», «гетерологичный» и «экзогенный». Таким образом, «рекомбинантный» белок представляет собой белок,

экспрессируемый или из гетерологичной, или экзогенной полинуклеотидной последовательности. Термин «рекомбинантный», используемый в отношении вируса, означает вирус, получаемый путем искусственных манипуляций с вирусным геномом. Вирус, содержащий гетерологичную или экзогенную последовательность, такую как последовательность, кодирующую экзогенный антиген, является рекомбинантным вирусом. Термин рекомбинантный вирус и термин не встречающийся в природе вирус используют как взаимозаменяемые.

Таким образом, термин «гетерологичный вектор» означает вектор, который содержит гетерологичную или экзогенную полинуклеотидную последовательность. Термин «рекомбинантный вектор» означает вектор, содержащий гетерологичную или рекомбинантную полинуклеотидную последовательность.

Используемый в настоящей заявке, термин «функционально связанный» используют для описания связи между регуляторными элементами и геном или его кодирующей областью. Обычно, экспрессия гена находится под контролем одного или нескольких регуляторных элементов, например, без ограничения, конститутивных или индуцибельных промоторов, тканеспецифичных регуляторных элементов и энхансеров. Указание на то, что ген или кодирующая область «функционально связаны», или «оперативно связаны» или «функционально связаны» с регуляторными элементами означает, что ген или кодирующая область контролируются находятся под влиянием регуляторного элемента. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности.

В частности, в контексте настоящего изобретения следует понимать, что термин «быть [...] идентичной последовательности» эквивалентен термину «имея [...] идентичность последовательности с последовательностью».

Используя в настоящей заявке, в частности, подразумевают, что термин «быть по меньшей мере на X% идентичной последовательности SEQ ID NO:Y» эквивалентен термину «быть по меньшей мере X% идентичной последовательности SEQ ID NO:Y по длине SEQ ID NO:Y» или термину «быть по меньшей мере на X% идентичной последовательности SEQ ID NO:Y по всей длине SEQ ID NO:Y”,

соответственно. В этом контексте «X» представляет собой любое число от 66 до 100, в частности любое целое число, выбранное от 66 до 100, так что «X% идентичности последовательности» представляет собой любую из процентных идентичностей последовательности, упомянутых в настоящей заявке. Соответственно, «Y» в данном контексте представляет собой любое целое число, выбранное от 1 до 45, так что «SEQ ID NO:Y» представляет собой любую из SEQ ID NO, упомянутых в настоящей заявке.

Кроме того, следует понимать, что термин «быть по меньшей мере на 99% идентичными», как описано в настоящей заявке, также (в одном крайнем диапазоне) включает и относится к термину «быть на 100% идентичным» или «быть идентичным последовательности», соответственно.

Термин «идентичность последовательности» как он известен в уровне техники относится к взаимосвязи между двумя или несколькими полипептидными последовательностями или двумя или несколькими полинуклеотидными последовательностями, а именно референтной последовательностью и заданной последовательностью, которую необходимо сравнить с эталонной последовательностью. Идентичность последовательности определяют путем сравнения заданной последовательности с эталонной последовательностью после того, как последовательности были оптимально выровнены, чтобы обеспечить наивысшую степень сходства последовательностей, которую определяют совпадением между цепями таких последовательностей. При таком выравнивании идентичность последовательности устанавливается на основе положений, например, последовательности являются «идентичными» в конкретном положении, если в этом положении, нуклеотидные или аминокислотные остатки являются идентичными. Затем общее число таких идентичностей положений делят на общее количество нуклеотидов или остатков в эталонной последовательности, чтобы получить % идентичности последовательности. Идентичность последовательности может быть легко рассчитана известными способами, включая, но не ограничиваясь, описанными в Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of

Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательности предназначены для обеспечения наибольшего соответствия между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей кодируются в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичность последовательности между заданными последовательностями. Примеры таких программ включают, но не ограничиваются такими, как пакет программ GCG (Devereux, J., и соавт., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN and FASTA (Altschul, S. F. и соавт., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990). Программа BLASTX общедоступна из NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. и соавт., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. и соавт., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности при использовании веса пробела по умолчанию для получения самого высокого уровня идентичности последовательности между заданной и эталонной последовательностями. В качестве примера, под полинуклеотидом с нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, даже более предпочтительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% «идентичности последовательности» с эталонной нуклеотидной последовательностью, предполагается, что нуклеотидная последовательность заданного полинуклеотида идентична эталонной последовательности, за исключением того, что последовательность заданного полинуклеотида может содержать вплоть 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде с нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, еще более предпочтительно 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, 99,9% идентичности относительно эталонной нуклеотидной последовательности, вплоть до 15%, предпочтительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, еще более предпочтительно 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,1% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими нуклеотидами, или количество нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, еще более предпочтительно 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,1% от общего количества нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть вставлен в эталонную последовательность. Эти мутации эталонной последовательности могут присутствовать в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или где-нибудь между этими концевыми положениями, распределяясь или отдельно среди нуклеотидов в эталонной последовательности, или в одной или нескольких смежных группах в эталонной последовательности. Аналогично, под полипептидом с заданной аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, еще более предпочтительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью, предполагают, что данная аминокислотная последовательность полипептида идентична эталонной последовательности, за исключением того, что заданная последовательность полипептида может содержать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7, 6, еще более предпочтительно вплоть до 5, 4, 3, 2, 1 аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот эталонной аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения заданной полипептидной последовательности, которая имеет по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, еще более предпочтительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью, вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, 9%, 8%, 7%, еще более предпочтительно вплоть до 5%, 4%, 3%, 2%, 1% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другой аминокислотой, или число аминокислот вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, 9%, 8%, 7%, еще более предпочтительно вплоть до 5%, 4%, 3%, 2%, 1% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной

последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить в амино- или карбоксиконцевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, перемежаясь либо индивидуально среди остатков в эталонной последовательности, либо в одной или нескольких смежных группах в эталонной последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Тем не менее, консервативные замены не включены в качестве совпадения при определении идентичности последовательности.

Термины «идентичность последовательности» или «процент идентичности» используют в настоящей заявке как взаимозаменяемые. Для осуществления настоящего изобретения в данном случае определено, что для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в последовательность первой аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают остатки аминокислот или нуклеотидов в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой или нуклеотидным остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е., % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений (т.е. перекрывающиеся положения) x 100). Предпочтительно, две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей может быть проведено по всей длине двух последовательностей, которые подвергают сравнению, или на фрагментах двух последовательностей. Как правило, сравнение будет проведено по всей длине двух

сравниваемых последовательностей. Однако идентичность последовательности может быть выполнена по области, например, двадцати, пятидесяти, ста или более смежных аминокислотных остатков.

Специалисту в данной области техники известно, что доступно несколько различных компьютерных программ для определения идентичности между двумя последовательностями. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. В предпочтительном варианте осуществления процент идентичности между двумя аминокислотными или последовательностями нуклеиновых кислот определяют, используя алгоритм Нидлмана - Вунша (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения Accelrys GCG (доступно на http://www.accelrys.com/products/gcg/), с использованием либо матрицы Blosum 62 или матрицы PAM250, и штрафа за открытие пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, а также штрафа за продолжение пробела 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Специалисту в данной области будет понятно, что все эти разные параметры будут давать немного разные результаты, но общая процентная идентичность двух последовательностей существенно не изменяется при использовании разных алгоритмов.

Кроме того, последовательности белков или последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы в качестве «запрашиваемой последовательности» для осуществления поиска по доступным базам данных, например, для идентификации других членов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с использованием программ BLASTN и BLASTP (версия 2.0) от Altschul и соавт. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски белков BLAST можно осуществлять с помощью программы BLASTP, счет = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков в соответствии с изобретением. Для получения выравниваний с пробелами с целью сравнения, Gapped BLAST можно использовать как описано у Altschul и соавт. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST, можно применять параметры по умолчанию соответствующих

программ (например, BLASTP и BLASTN). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

Определения вакцины

Термин «иммуногенная или иммунологическая композиция» относится к композиции вещества, которая содержит по меньшей мере один антиген или его иммуногенную часть, которая вызывает иммунологический ответ у хозяина клеточного или опосредованного антителами иммунного ответа на композицию.

Используемый в настоящей заявке термин «антиген» легко поддается пониманию в данной области техники и включает вещества, которые являются иммуногенными, т.е. иммуногенами, а также вещества, которые индуцируют иммунологическую невосприимчивость или анергию, то есть отсутствие реакций защитных механизмов организма на чужеродные вещества. Используемый в настоящей заявке термин «антиген» предназначен для обозначения полноразмерных белков, а также их пептидных фрагментов, которые содержат или включают в себя эпитоп.

Термин «животное, выращиваемым в продовольственных целях» охватывает животных, которых используют для употребления в пищу человеком, таких как свиньи, крупный рогатый скот, домашняя птица, рыба и тому подобное, предпочтительно животное, выращиваемое в продовольственных целях представляет собой свинью и крупный рогатый скот, наиболее предпочтительно свинью.

Используемое в настоящей заявке понятие «иммуногенная композиция» может относиться к полипептиду или белку, таким как, например, поверхностный белок вируса, вызывающего иммунологический ответ, как описано в настоящей заявке. Термин «иммуногенный фрагмент» или «имуногенная часть» относится к фрагменту или к укороченной и/или замещенной форме белка или полипептида, который включает один или более эпитопов и, таким образом, вызывает иммунный ответ, описанный в настоящей заявке. В общем, такие укороченные и/или замещенные формы или фрагменты будут содержать по меньшей мере шесть смежных аминокислот из полноразмерного белка. Такие фрагменты могут быть

идентифицированы, с использованием любого количества методов картирования эпитопов, хорошо известных в данной области. См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены путем одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых носителях, пептидов, которые соответствуют участкам молекулы белка, и взаимодействия пептидов с антителами, в то время как пептиды все еще прикреплены к носителям. Такие методики известны и описаны в уровне техники, см., например, патент США № 4,708,871; Geysen и соавт. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; и Geysen и соавт. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. Подобным образом, конформационные эпитопы легко идентифицируются путем определения пространственной конформации аминокислот, такой как, например, рентгеновская кристаллография и двумерный ядерный магнитный резонанс. См. Epitope Mapping Protocols, как приведено выше. Синтетические антигены также включены в это определение, например, полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие рекомбинантные или синтетически полученные антигены. См., например, Bergmann и соавт. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann и соавт. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; и Gardner и соавт., (1998) 12-я Всемирная конференция по вопросам СПИДа, Женева, Швейцария 28 июня-3 июля 1998. (Решения и содержание которых все включены посредством ссылки в настоящую заявку.)

Термин «вакцина», используемый в настоящей заявке относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один иммунологически активный компонент, который индуцирует иммунологический ответ у животного и возможно, но не обязательно один или несколько дополнительных компонентов, которые усиливают иммунологическую активность активного компонента. Вакцина может дополнительно содержать другие компоненты, обычные для фармацевтических композиций. В порядке различия иммунологически активный компонент вакцины может включать в себя полные вирусные частицы либо в их первоначальном виде, либо в виде аттенуированных частиц в так называемой модифицированной живой вакцине (MLV) или частиц,

инактивированных с помощью соответствующих методов в так называемой убитой вакцине (KV). В другой форме иммунологически активный компонент вакцины может содержать соответствующие элементы организмов (субъединичные вакцины), где эти элементы получают либо путем разрушения частицы, либо выращивания культур, содержащих такие частицы и необязательно последующих стадий очистки, обеспечивающих желаемую структуру (структуры), или с помощью синтетических способов, включая соответствующую манипуляцию с использованием приемлемой системы, основанной, например, на бактериях, насекомых, млекопитающих или других видах, плюс необязательно последующие процедуры выделения и очистки, или индукцией синтетических процессов у животного, нуждающегося в вакцине, путем прямого включения генетического материала с использованием пригодных фармацевтических композиций (полинуклеотидная вакцинация). Вакцина может содержать один или одновременно более одного из описанных выше элементов. Как используют в конкретных аспектах в соответствии с настоящим изобретением термин «вакцина» относится к живой вакцине или живому вирусу, которую также называют рекомбинантной вакциной. В другом конкретном аспекте в соответствии с настоящим изобретением термин «вакцина» относится к инактивированному или убитому вирусу, включая вирусоподобные частицы (VLPs). Таким образом, вакцина может быть субъединичной вакциной или убитой вакциной (KV), или инактивированной вакциной.

Термин «множественность заражения (M.O.I.)» описывает, сколько инфекционных единиц, например, TCID50, вирусного препарата используют на клетку для заражения культивируемых клеток. Например, M.O.I. в 0,01 означает, что на каждые 100 клеток в культуральном сосуде инокулируется одна инфекционная единица.

Термин «ДНК-вакцинация» или «полинуклеотидная вакцинация» означает прямую инокуляцию генетического материала с использованием пригодных фармацевтических композиций.

Из уровня техники известны разные способы физической и химической инактивации. Термин «инактивированный» относится к вирулентному или

невирулентному вирусу, который подвергают облучению (ультрафиолетовыми лучами (УФ), рентгеновским лучами, электронным пучком или гамма-излучением), нагревают или обрабатывают химически для инактивации или уничтожения такого вируса или бактерии, при этом сохраняя его иммуногенность. Соответствующие агенты для инактивации включают в себя бета-пропиолактон, бинарный или бета-, или ацетил-этиленимин, глутеральдегид, озон и формалин (формальдегид).

Для инактивации формалином или формальдегидом, формальдегид, как правило, смешивают с водой и метиловым спиртом для образования формалина. Добавление метилового спирта предотвращает деградацию или перекрестную реакцию в процессе активации. В одном варианте осуществления используют приблизительно 0,1 - 1% 37%-ого раствора формальдегида для инактивации вируса или бактерии. Важно отрегулировать количество формалина, чтобы гарантировать, что материал инактивирован, но не настолько, чтобы возникали побочные эффекты от высокой дозы.

Более конкретно, термин «инактивированный» в контексте вируса означает, что вирус не способен к репликации *in vivo* или *in vitro* и, соответственно, термин «инактивированный» в контексте бактерии означает, что бактерия неспособна к размножению *in vivo* или *in vitro*. Например, термин «инактивированный» может относиться к вирусу, который размножается *in vitro*, а затем инактивируется с использованием химических или физических средств, так что он больше не способен к репликации. В другом примере термин «инактивированный» может относиться к бактерии, которая была размножена, а затем инактивирована с использованием химических или физических средств, что приводит к суспендированию бактерии, фрагментов или компонентов бактерии, к образованию бактерии, которая может быть использована в качестве компонента вакцины.

Например, термин «инактивированный» может относиться к вирусу, который был размножен *in vitro*, а затем подвергался инактивации при использовании химических или физических средств для того, чтобы он больше не был способен к репликации.

Используемые в настоящей заявке термины «инактивированный», «убитый» или "KV" применяют взаимозаменяемо.

Термин «живая вакцина» относится к вакцине, содержащей либо живой организм, либо способный к репликации вирус, либо вирусный вектор.

«Фармацевтическая композиция» в основном состоит из одного или нескольких ингредиентов, способных модифицировать физиологические, например, иммунологические функции организма, в который ее вводят, или организмов, живущих в или на организме. Термин включает в себя, но без ограничения, антибиотики или противопаразитарные средства, а также другие составляющие, которые, как правило, используют для достижения других целей, таких как, но не ограничиваясь ними, особенности обработки, стерильность, стабильность, возможность введения композиции энтеральным путем или парентеральными путями, такими как пероральный, интраназальный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный или другой приемлемый путь введения, толерантность после введения или свойства контролируемого высвобождения. Один неограничивающий пример такой фармацевтической композиции, который приведен исключительно для демонстрационных целей, может быть получен следующим образом: супернатант клеточной культуры инфицированной клеточной культуры смешивают со стабилизатором (например, спермидином и/или бычьим сывороточным альбумином (BSA) и затем смесь лиофилизируют или обезвоживают другими способами. Перед вакцинацией смесь подвергают регидратации в водном (например, физиологическом растворе, забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) или неводных растворах (например, масляной эмульсии, адъюванте на основе алюминия).

Используемое в настоящей заявке выражение «приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель» охватывает любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, адъюванты, стабилизирующие средства, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства, замедляющие адсорбцию средства и т.п. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления и, в частности, тех, которые включают в себя лиофилизированные иммуногенные композиции, стабилизирующие средства для применения в настоящем изобретении включают стабилизаторы для лиофилизации или высушивания замораживанием.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит вспомогательное средство. Используемое в настоящей заявке понятие «вспомогательные средства» может охватывать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа «вода-в-масле», эмульсию типа «масло-в-воде», эмульсию типа «вода-в-масле-в-воде». Эмульсия может быть основана, в частности, на легком жидком парафиновом масле (тип Европейской Фармакопеи); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном после олигомеризации алкенов, в частности, изобутила или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более конкретно растительных маслах, этилолеате, ди-(каприлат/капрат) пропиленгликоля, три-(каприлат/капрат) глицериле или диолеате пропиленгликоля; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложных эфирах изостеариновой кислоты. Для получения эмульсии масло используют в сочетании с эмульгаторами. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбитана, маннита (например, олеат ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилен-полиоксиэтилена, в частности, продукты плюроник, в частности L121. См. Hunter и соавт., The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed.Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, сс. 51-94 (1995) и Todd и соавт., Вакцина 15:564-570 (1997). Примерными вспомогательными веществами являются эмульсия SPT, описанная на стр. 147 в «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под ред. M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на стр. 183 этой же книги.

Дополнительным примером вспомогательного средства является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила. Предпочтительными адъювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой

кислоты, которые сшиты, особенно с простыми полиалкениловыми эфирами сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения являются известны под термином карбомер (Phameurora том 8, № 2 июнь 1996). Специалисты в данной области техники могут обратиться также к патенту США № 2,909,462, в котором описаны такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксилированным соединением, которое имеет по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, где атомы водорода по меньшей мере трех гидроксилов заменены ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы могут сами содержать другие заместители такие, как метил. В особенности пригодны продукты, которые продаются под названием CARBOPOL® (BF Goodrich, Огайо, США. Они являются перекрестно сшитыми с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди них можно упомянуть Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение CARBOPOL® 971P. К сополимерам малеинового ангидрида и алкенильного производного относятся сополимеры EMA (Monsanto), которые являются сополимерами малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде обеспечивает кислый раствор, который будет нейтрализован, предпочтительно до физиологического pH, чтобы получить раствор адъюванта, в который будет включена сама иммуногенная, иммунологическая или вакцинная композиция.

Кроме того, пригодные вспомогательные средства охватывают, но не ограничиваются ними, адъювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блок-сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид A, липидно-аминный адъювант авридин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314 или мурамил-дипептид, или встречающиеся в природе или рекомбинантные цитокины или их аналоги или стимуляторы высвобождения эндогенного цитокина, среди многих других.

Предполагают, что вспомогательное средство можно добавлять в количестве приблизительно от 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, предпочтительно в

количестве приблизительно от 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, более предпочтительно в количестве приблизительно от 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 750 мкг до приблизительно 2.5 мг на дозу, и наиболее предпочтительно в количестве приблизительно от 1 мг на дозу. Альтернативно, вспомогательное средство может находиться в концентрации приблизительно от 0,01 до 50%, предпочтительно в концентрации приблизительно от 2% до 30%, более предпочтительно в концентрации приблизительно от 5% до 25%, еще более предпочтительно в концентрации приблизительно от 7% до 22%, и наиболее предпочтительно в концентрации от 10% до 20% по объему конечного продукта.

Понятие «разбавители» может охватывать воду, солевой раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Изотонические средства могут включать в себя в числе других хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. К стабилизаторам в числе других относят альбумин и щелочные соли этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Понятие «выделенный» означает изменённый «рукой человека» из его естественного состояния, т.е., если это происходит в природе, то он был изменен или удален из своего первоначального окружения или того и другого. Например, полинуклеотид или полипептид, естественно присутствующий в живом организме, не является «выделенным», но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от сосуществующих материалов его естественного состояния является «выделенным», в качестве термина, используемого в настоящей заявке.

Термин «аттенуирование» означает снижение вирулентности патогена. В настоящем изобретении «аттенуирование» является синонимом слову «авирулентный». В настоящем изобретении аттенуированный вирус представляет собой вирус, в котором вирулентность была уменьшена так, что он не вызывает клинических признаков заражения, но способен индуцировать иммунный ответ в целевом животном, а также может означать, что клинические признаки снижены относительно частоты возникновения заболевания или тяжести у животных, зараженных аттенуированным вирусом, в частности вирусный вектор *Paramyxoviridae*, заявляемый в настоящей заявке, по сравнению с «контрольной

группой» животных, зараженных неаттенуированным вирусом или патогеном и не получающих аттенуированный вирус. В этом контексте термин «снижение/сниженный» означает уменьшение по меньшей мере на 10%, предпочтительно на 25%, еще более предпочтительно на 50%, еще более предпочтительно на 60%, еще более предпочтительно на 70%, еще более предпочтительно на 80%, еще более предпочтительно на 90% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с контрольной группой, как определено выше. Таким образом, аттенуированный, авирулентный патоген, такой как, например заявленный аттенуированный вирусный вектор, в частности вирусный вектор *Paramyxoviridae* (предпочтительно вектор CDV), заявляемый в настоящей заявке, пригоден для получения модифицированной живой вакцины (MLV) или модифицированной живой иммуногенной композиции.

В настоящей заявке понятие «эффективная доза» означает, но не ограничиваясь этим, количество антигена вызывает или способно вызывать иммунный ответ, обеспечивающий уменьшение клинических симптомов у животного, которому вводят антиген.

Используемый в настоящей заявке термин «эффективное количество» в контексте композиции означает количество иммуногенной композиции, способной индуцировать иммунный ответ, который снижает заболеваемость или уменьшает тяжесть заражения или частоту возникновения заболевания у животного. В частности, эффективное количество относится к колониеобразующим единицам (КОЕ) на дозу. В качестве альтернативы, в контексте терапии термин «эффективное количество» относится к количеству терапевтического средства, которого достаточно для снижения или улучшения тяжести или продолжительности заболевания или расстройства, или одного или нескольких их симптомов, предотвратить развитие заболевания или расстройства, вызвать регрессию заболевания или расстройства, предотвратить рецидив, развитие, начало или прогрессирование одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или расстройством, или усилить или улучшать профилактику или лечение с помощью другой терапии или терапевтического средства.

Понятие «иммунный ответ» или «иммунологический ответ» означает, но не ограничиваясь этим, развитие клеточного и/или опосредованного антителами иммунного ответа на исследуемую (иммуногенную) композицию или вакцину. Как правило, иммунный или иммунологический ответ включает в себя, но не ограничиваясь этим, один или несколько следующих эффектов: продуцирование или активация антител, В-клеток, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных конкретно на антиген или антигены, включенные в представляющую интерес композицию или вакцину. Предпочтительно, хозяин будет проявлять терапевтический или защитный иммунологический (вторичный) ответ, так что устойчивость к новой инфекции будет повышена и/или уменьшена клиническая тяжесть заболевания. Такая защита будет продемонстрирована либо уменьшением количества симптомов, серьезностью симптомов, или отсутствием одного или нескольких симптомов, связанных с инфекцией патогена, задержкой начала виремии, уменьшением вирусной персистенции, снижением общей вирусной нагрузки и/или снижением экскреции вируса.

Выражение «защита от болезни», «защитный иммунитет», «функциональный иммунитет», «уменьшение клинических симптомов», «индукция/выработка нейтрализующих антител и/или трансформация сыворотки» и подобные фразы означают частичный или полный ответ, направленный против заболевания или состояния, вызываемого путем введения одной или нескольких терапевтических композиций в соответствии с изобретением, или их комбинации, что приводит к сниженным вредным эффектам, чем можно было бы ожидать от неиммунизированного субъекта, который был подвержен заболеванию или инфекции. Таким образом, серьезность вредных эффектов инфекции уменьшается у вакцинированного субъекта. Заражение может быть снижено, замедлено или возможно полностью предотвращено у вакцинированного субъекта. В настоящей заявке, где подразумевают полную профилактику заражения, это конкретно указано. Если полное предотвращение не указано, то термин включает в себя частичное предотвращение.

Термин «нейтрализующее антитело» относится к антителу, которое способно удерживать инфекционный агент, обычно вирус, например, CDV или CPV, от заражения клетки путем нейтрализации или ингибирования ее биологического действия. Нейтрализация может происходить, когда антитела связываются со специфическими вирусными антигенами, блокируя проникновение патогена в клетки-хозяева. В одном примере оно предотвращает связывание вируса с его рецептором (рецепторами) и попадание его генетического материала внутрь клетки.

Термин «антитело» или «иммуноглобулин», используемый в настоящей заявке взаимозаменяемо, включает в себя полные антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (антигенсвязывающую часть) или их одноцепочечных родственников. «Антитело» содержит по меньшей мере одну тяжелую (H) цепь и одну легкую (L) цепь. У встречающихся в природе IgG, например, эти тяжелые и легкие цепи соединены дисульфидными связями, и есть две спаренные тяжелые и легкие цепи, эти две также соединены дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящей заявке как V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящей заявке как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR) или соединяющими (J) областями (JH или JL в тяжелых и легких цепях соответственно). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR, трех FR и домена J, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, J. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей связываются с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) или гуморальные факторы, такие как первый компонент (Clq) классической системы комплемента.

В настоящей заявке выражения «снижение частоты возникновения заболевания и/или тяжести клинических признаков» или «снижение клинических симптомов» означает, но не ограничиваясь этим, снижение числа зараженных субъектов в группе, снижение или исключение числа субъектов, у которых проявляются клинические признаки заражения, или уменьшение тяжести любых клинических проявлений, которые присутствуют у одного или нескольких субъектов, по сравнению с заражением дикого типа. Например, это должно относиться к любому снижению нагрузки патогенов, выделению патогенов, снижению передачи патогенов, или уменьшению любого клинического признака симптоматики малярии. Предпочтительно эти клинические признаки уменьшаются у одного или нескольких субъектов, получающих терапевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере на 10% по сравнению с субъектами, которые не получают композицию и которые заражены. Более предпочтительно клинические признаки уменьшаются у субъектов, получающих композицию в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%.

Понятие «повышенная защита» в настоящей заявке означает, но не ограничиваясь этим, статистически значимое уменьшение одного или нескольких клинических симптомов, которые связаны с заражением инфекционным агентом в вакцинированной группе субъектов по сравнению с невакцинированной контрольной группой субъектов. Понятие «статистически значимое уменьшение клинических симптомов» означает, но не ограничиваясь этим, что частота возникновения по меньшей мере одного клинического симптома в вакцинированной группе субъектов по меньшей мере на 10%, предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, еще более предпочтительно на 50%, и еще более предпочтительно на 70% ниже, чем в невакцинированной контрольной группе после заражения инфекционным агентом.

Понятие «длительная защита» относится к «улучшенной эффективности», которая сохраняется в течение по меньшей мере 3 недель, но более предпочтительно по меньшей мере 3 месяцев, еще более предпочтительно по

меньшей мере 6 месяцев. В случае с домашним скотом наиболее предпочтительно, когда длительная защита будет сохраняться до достижения среднего возраста, в котором животных сбывают на мясо.

Термин «уменьшение виремии», индуцируемой вирусом, означает, но не ограничиваясь этим, уменьшение количества вируса, попадающего в кровоток животного, где уровень виремии, т.е. количество копий вирусной ДНК или РНК на мл сыворотки крови или количество образующих бляшки колоний на децилитр сыворотки крови, уменьшается в сыворотке крови животных, получающих композицию в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере на 50% по сравнению с животными, не получающими композицию и которые могут заразиться. Более предпочтительно уровень виремии снижается у животных, получающих композицию в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 99,9%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,99%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,999%.

Используемый в настоящей заявке термин «виремия», в частности, следует понимать как состояние, при котором вирусные частицы размножаются и/или циркулируют в кровотоке животного, в частности млекопитающего, птицы или насекомого.

Понятие «безопасность» относится к отсутствию неблагоприятных последствий у вакцинированного животного после вакцинации, включая, но не ограничиваясь: потенциальный возврат вакцины на основе вируса к вирулентности, клинически значимые побочные эффекты, такие как постоянные, системные заболевания или недопустимое воспаление в месте введения вакцины.

Термины «вакцинация» или «прививка» или их варианты, используемый в настоящей заявке означает, но не ограничиваясь этим, процесс, включающий в себя введение иммуногенной композиции в соответствии с изобретением, которая при введении в организм животного вызывает или может вызывать - прямо или косвенно - иммунный ответ у указанного животного.

Понятие «смертность» в контексте настоящего изобретения относится к смерти, вызванной заражением, и включает в себя ситуацию, когда заражение

является настолько тяжелым, что животное подвергают эвтаназии, чтобы предотвратить страдания обеспечить гуманный конец его жизни.

Составы

Субъектом, которому вводят композицию, предпочтительно является животное, включая, но не ограничиваясь этим, крупный рогатый скот, лошадей, овец, свиней, домашнюю птицу (например, кур), коз, кошек, собак, хомяков, мышей и крыс, наиболее предпочтительно, млекопитающее представляет собой свинью.

Составы в соответствии с изобретением содержат эффективное иммунизирующее количество одной или нескольких иммуногенных композиций и физиологически приемлемую лекарственную основу. Вакцины содержат эффективное иммунизирующее количество одной или нескольких иммуногенных композиций и физиологически приемлемую лекарственную основу. Состав должен соответствовать способу введения.

При необходимости, иммуногенная композиция может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих средств или pH буферных средств. Иммуногенная композиция может представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетку, пилюлю, капсулу, состав с замедленным высвобождением или порошок. Состав для перорального введения может включать в себя стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия и т.д. фармацевтической степени чистоты.

Способы лечения

Предпочтительные пути введения включают в себя, но не ограничиваются этим, интраназальный, пероральный, внутрикожный и внутримышечный. Предпочтение отдают введению в питьевой воде, наиболее предпочтительно в однократной дозе. Специалисту в данной области будет понятно, что композиции в соответствии с изобретением можно также вводить одной, двумя или несколькими дозами, а также другими путями введения. Например, такие другие пути включают в себя подкожное, внутрикожное, внутрибрюшинное, внутрикожное введение и в зависимости от необходимой продолжительности и эффективности лечения композиции в соответствии с изобретением можно вводить один или несколько раз, также с перерывами, например, ежедневно в течение нескольких дней, недель или

месяцев и в разных дозировках, таких как приблизительно от 10^3 до 10^8 TCID50 (см. титр вируса выше). В конкретном аспекте в соответствии с настоящим изобретением дозировка составляет приблизительно от 10^3 до 10^8 TCID50, в частности для живого вируса/живой вакцины.

При необходимости, композиции могут быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну или несколько стандартных дозированных форм, содержащих активное вещество. Упаковка может содержать, например, металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Упаковка или дозирующее устройство предпочтительно могут сопровождаться инструкциями для введения, предпочтительно для введения млекопитающему, в частности, свинье. С таким контейнером (контейнерами) может быть связано уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, причем это уведомление отражает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеком.

Обзор последовательностей

Нижеследующие последовательности подробно описаны и раскрыты в настоящей заявке, где последовательности в перечне последовательностей представлены в направлении с 5'-конца до 3'-конца слева направо, и где:

SEQ ID NO:1 (РНК) соответствует 5′-некодирующей области гена N CDV,
SEQ ID NO:2 (РНК) соответствует 5′-некодирующей области гена P CDV,
SEQ ID NO:3 (РНК) соответствует 5′-некодирующей области гена M CDV,
SEQ ID NO:4 (РНК) соответствует 5′-некодирующей области гена F CDV,
SEQ ID NO:5 (РНК) соответствует 5′-некодирующей области гена H CDV,
SEQ ID NO:6 (РНК) соответствует 5′-некодирующей области гена L CDV,
SEQ ID NO:7 (РНК) соответствует 3′-некодирующей области гена H CDV,
SEQ ID NO:8 (РНК) соответствует 3′-некодирующей области гена N CDV,
SEQ ID NO:9 (РНК) соответствует 3′-некодирующей области гена P CDV,
SEQ ID NO:10 (РНК) соответствует 3′-некодирующей области гена M CDV,
SEQ ID NO:11 (РНК) соответствует 3′-некодирующей области гена F CDV,

SEQ ID NO:12 (РНК) соответствует 3′-некодирующей области гена L CDV,
SEQ ID NO:13 (РНК) соответствует последовательности, кодирующей последовательность Козак,
SEQ ID NO:14 (РНК) соответствует межгенной последовательности CDV,
SEQ ID NO:15 (РНК) соответствует последовательности, кодирующей белок VP2 CPV,
SEQ ID NO:16 (РНК) соответствует последовательности, кодирующей гемагглютинин подтипа H3,
SEQ ID NO:17 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 14, 1, 15, 13 и 7,
SEQ ID NO:18 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 1, 15, 13, 7 и 14,
SEQ ID NO:19 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 14, 1, 16, 13 и 7,
SEQ ID NO:20 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 1, 16, 13, 7 и 14,
SEQ ID NO:21 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 14, 1, 15, 13, 7 и 14,
SEQ ID NO:22 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 14, 1, 16, 13, 7 и 14,
SEQ ID NO:23 (РНК) соответствует последовательности, содержащей ген M, F, H и L CDV,
SEQ ID NO:24 (РНК) соответствует последовательности, содержащей ген N и P CDV,
SEQ ID NO:25 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:1,
SEQ ID NO:26 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:13,
SEQ ID NO:27 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:7,
SEQ ID NO:28 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:14,
SEQ ID NO:29 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:23,
SEQ ID NO:30 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:24,
SEQ ID NO:31 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:15,
SEQ ID NO:32 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:16,
SEQ ID NO:33 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:21,
SEQ ID NO:34 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:22,
SEQ ID NO:35 соответствует аминокислотной последовательности CPV VP2,
SEQ ID NO:36 соответствует аминокислотной последовательности гемагглютинина подтипа H3,

SEQ ID NO:37 (РНК) соответствует последовательности, кодирующей S белок PEDV,

SEQ ID NO:38 (РНК) соответствует последовательности, кодирующей S белок PEDV,

SEQ ID NO:39 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 14, 1, 38, 13 и 7,

SEQ ID NO:40 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 1, 38, 13, 7 и 14,

SEQ ID NO:41 (РНК) соответствует комбинации SEQ ID №: 14, 1, 38, 13, 7 и 14,

SEQ ID NO:42 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:37,

SEQ ID NO:43 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:38,

SEQ ID NO:44 соответствует ДНК обратного комплемента SEQ ID NO:41,

SEQ ID NO:45 соответствует аминокислотной последовательности S белка PEDV.

Краткое описание фигур

Нижеследующие фигуры являются частью настоящего описания и приведены для дополнительного пояснения некоторых аспектов настоящего изобретения. Изобретение можно лучше понять с помощью ссылки на одну или несколько из этих фигур в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке.

Фиг. 1. Схематическое изображение организации векторного генома вируса чумы собак (CDV), несущего трансген VP2 собачьего парвовируса.

Фиг. 2. Карта конструкции ДНК (плазмиды) для генерации (спасения) рекомбинантного вектора CDV с расположением последовательностей экзогенной РНК, где соответствующие последовательности плазмидной ДНК названы «ген H начала UTR», «Kozak seq», «CPV-VP2» и «ген N UTR».

Фиг. 3. Схематическое изображение примерного расположения последовательностей РНК, слева направо в направлении от 5'-конца к 3'-концу: (**A.**) основная принципиальная схема, (**B**.) расположение в вирусном векторе *Paramyxoviridae*, (**C.**) расположение в векторе CDV, кодирующем собачий парвовирус (CPV) VP2, и где (**D.**) и (**E.**) иллюстрируют соответствующее расположение последовательностей, как указано с помощью SEQ ID NO перечня последовательностей.

Фиг. 4. Титры вируса ($TCID_{50}$), измеренные в супернатантной фракции. Титры представляют рост вируса в супернатанте, отбираемом каждые 24 часа, начиная с 1 дня после заражения в течение 6 дней после заражения; «SD» = «день исследования».

Фиг. 5. Титры, нейтрализующие CDV в ходе исследования животных, вакцинированных рекомбинантным CDV-VP2. Ось Y указывает максимальные разведения сывороток, которые нейтрализовали вирус в анализе (штамм CDV, полученный из штамма Lederle). Титр нейтрализации (титр VNT [Virus Neutralization Test/Тест на нейтрализацию вируса]) измеряли до 1-й вакцинации в день исследования 0 (SD0), до 2-й вакцинации в день исследования 21 (SD21) и через три недели после второй вакцинации в день исследования 42 (SD42). Отдельные животные указаны в условных обозначениях.

Фиг. 6. Титры нейтрализующих антител собачьего парвовируса в ходе исследования у животных, вакцинированных рекомбинантным CDV-VP2. Ось Y указывает максимальные разведения сывороток, которые нейтрализовали вирус в анализе (CPV). Титр нейтрализации (титр VNT [Тест на нейтрализацию вируса]) измеряли до 1-й вакцинации в день исследования 0 (SD0), до 2-й вакцинации в день исследования 21 (SD21) и через три недели после второй вакцинации в день исследования 42 (SD42). Отдельные животные указаны в условных обозначениях.

Фиг. 7. Уровни антител, определенные с помощью теста ELISA, специфического для гемагглютинина (H3), подтипа H3, у образцов животных, вакцинированных рекомбинантным CDV-H3. Ось Y показывает считывания данных, представленных в значениях ОП разведений образцов 1:500 для двух моментов времени, т.е. образцов, взятых у животных до 1-й вакцинации в день исследования 0 (SD0) и после второй вакцинации в день исследования 45 (SD45).

Фиг. 8. Результаты анализа IFNγ-ELISpot после вакцинации H3N2-MDA-позитивных поросят рекомбинантным CDV-H3. Ось Y указывает количество клеток, продуцирующих IFN-гамма, на миллион PBMC (ось Y) у вакцинированных животных (левый столбец представляет среднее значение для шести животных) и невакцинированных животных (правый столбец представляет среднее значение для трех животных).

Примеры

Нижеследующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области должно быть понятно, что методики, раскрытые в приведенных ниже примерах представляют собой методики, обнаруженные изобретателями для эффективного функционирования при практическом использовании изобретения, и таким образом могут рассматриваться как составляющие предпочтительные способы его практического применения. Тем не менее, специалисту в данной области техники, в свете настоящего описания, должно быть понятно, что в конкретных раскрытых вариантах осуществления могут быть сделаны многие изменения, и все же получить аналогичный или схожий результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

ПРИМЕР 1:

А) Экспрессия CPV-VP2 векторами CDV

В исследовании *in vitro* с использованием остова CDV, полученного из вакцинного штамма Lederle, со вставкой последовательности SEQ ID NO:17 между геном P и геном M (вектор, таким образом, содержащий последовательность SEQ ID NO:21), было возможно показать внутриклеточную экспрессию белка собачьего парвовируса (тип 2b) в ассоциированных с CDV флуоресцентных фокусах. Соответствующие результаты были также достигнуты для соответствующего вектора CDV (то есть отличающегося только последовательностью, кодирующей VP2 CPV), кодирующего белок VP2 собачьего парвовируса типа 2c (CPV-2c). Результаты, полученные для обоих векторов с помощью иммунофлуоресценции, указывают на сильную экспрессию белка VP2 CPV во всех зараженных CDV синцитиях. VP2, в отличие от антигенов CDV, накопленных в ядрах и частично в цитоплазме зараженных клеток, который изменяется в течение развития синцитий и может указывать на то, что CPV-VP2 имеет транзиторный перенос ядра, хотя предполагаемая последовательность ядерной локализации не была обнаружена в ходе обычного поиска в гене VP2, ни опубликована в научных литературных источниках.

B) Генетическая стабильность

Оба вектора CDV из Примера 1 A) оценивали с помощью последовательных пассажей, включающих циклы замораживания-оттаивания в конце каждого пассажа в клеточной линии Vero (т.е. производственной клеточной линии CDV). Для оценки генетической стабильности рекомбинантов было выполнено 20 серийных пассажей на клетках Vero. Секвенирование рекомбинантных клонов выявило полную генетическую стабильность вставленной последовательности –CPV VP2 и фланкирующих областей. Последовательность (включая мутации), кодирующая оба белка (на уровне аминокислот) осталась неизменной. Кроме того, используя иммунофлуоресценцию (ИФ) и вестерн-блоттинг (ВБ), можно было продемонстрировать, что сильная экспрессия VP2 присутствовала в клетках, зараженных рекомбинантами CDV-VP2 во время всех уровней пассажа.

C) Рост *in vitro*

Оба вектора CDV, описанных в Примере 1 A) и B) выращивали в клетках Vero. Пиковые титры обоих рекомбинантов в системе с роллерными флаконами были достигнуты через 144 часа после заражения, и титры резко увеличивались после цикла замораживания/оттаивания, что указывает на клеточную ассоциацию вируса (аналогично родительскому вирусу CDV). При сравнении с классическими родительскими CDV-MLV, генерированные CDV рекомбинантные вакцины-кандидаты имеют очень похожие конечные титры, приемлемые для биологической обработки.

В заключение, оба вектора CDV показали хорошую кинетику роста при производстве в клетках Vero, достигая пиковых титров через 6 дней после заражения в роллерных флаконах. Оба вектора показали сильные характеристики экспрессии трансгенов (VP2), как определено с помощью ИФ и ВБ, квалифицируя их в качестве кандидата на двойную вакцину против CDV-CPV. Кроме того, оба вируса были проверены на генетическую стабильность в течение 20 пассажей на клетках Vero. Оба вируса оставались полностью генетически стабильными, что указывает на их восприимчивость к биологической обработке вакциной.

ПРИМЕР 2:

Исследование эффективности *in vivo* у свиней:

Для целей этого эксперимента группу из 6 поросят вакцинировали посредством $1x10^5$ $TCID_{50}$ рекомбинантного вектора CDV, кодирующего CPV-2b VP2 (CDV-VP2-2b) и Примера 1 в день исследования (SD) 0 и усилили посредством $2x10^4$ $TCID_{50}$ в SD 21. Оба применения осуществляли внутримышечно (ВМ) в шею (объем 2 мл на каждую дозу).

Четверо животных служили отрицательным контролем и были инокулированы гомогенатами клеток Vero (2 мл) в шею. Трое животных служили индикаторными и не получали никакого лечения.

Критерии включения:

- Свиньи клинически здоровы и нормально развиты по возрасту

Критерии исключения:

- Свиньи с травмами, врожденными аномалиями или клиническими признаками заболевания, которые мешали исследованию, согласно оцениванию руководителя исследования или назначенного им лица;
- Свиньи со слабым состоянием организма (масса <5 кг).

Всех исследуемых животных размещали в профильных установках, соответствующих их возрасту, и содержали в одинаковых контролируемых условиях. В помещении был или простой настил, или альтернативно, частично перфорированный настил, подходящий для возраста животных с четырьмя загонами приблизительно по 20 $м^2$ каждый. Перед вакцинацией индикаторных животных вывели из группы, поместили в отдельный загон и перегруппировали через 12 ч. после вакцинации.

По причинам биобезопасности помещения находились под давлением ниже атмосферного (-75 Па). Температура в помещении соответствовала требованиям возраста животных. Скорость вентиляции была около 9/ч. У животных было 12 часов света при >80 люкс и 12 часов без света. Для животных было обеспечено обогащение среды. Вода и корм были доступны *ad libitum* в надлежащем качестве и

ею распоряжались в соответствии с потребностями свиней в их возрасте и стандартными процедурами.

Лабораторные результаты показали, что векторы CDV реплицировались ограниченным образом в организме свиньи, нацеливаясь на лимфатические клетки. Вирус был обнаружен в основном в лимфатических узлах, селезенке или миндалинах.

Кроме того, у исследуемых животных были проведены тесты на нейтрализацию сывороточного вируса для измерения нейтрализующих антител к CDV и CPV, соответственно.

Далее приведен протокол теста сывороточной нейтрализации для CDV:

Подготовка клеток за 1 день до теста нейтрализации

- Трипсинизировать сильно слитые клетки Vero и ресуспендировать их в соответствующем объеме среды MEM Earle, содержащей 5% FCS
- Подсчитать количество клеток в суспензии и доведите до $7x10^5$ клеток/10 мл на 96-луночный планшет
- Одного планшета достаточно для 4 образцов.
- Высеять 100 мкл клеточной суспензии/лунку во все лунки 96-луночного планшета
- Инкубировать планшеты при 37°C в CO_2 инкубаторе в течение 16 – 24 ч.

Ограниченное разбавление образцов сыворотки

- Предварительно разбавить образцы 1:4 стерильным PBS
- Инактивировать предварительно разведенную сыворотку при 56°C в течение 30 минут
- Добавить 60 мкл среды MEM Earle, дополненной 1% 100x Pen/Strep в каждую лунку пустого 96-луночного планшета из колонки 1-11
- Добавить дополнительные 36 мкл среды MEM Earle, дополненной 1% 100x Pen/Strep в колонку 1 (A1-H1)
- Добавить 24 мкл образца инактивированной нагреванием сыворотки в колонку 1 (соответствует разведению 1:5)

(Для каждого образца сыворотки добавить 24 мкл в 3 лунки колонки 1 для тестирования сыворотки в трех экземплярах)

- Осуществить двойное серийное разведение сывороток путем переноса 60 мкл из колонки в колонку
- Повторить до колонки 11 (соответствуя разведению 1:5120)
- Отбросить 60 мкл из последней колонки.

Разбавление вируса CDV

- Разбавить вирус CDV до 200 $TCID_{50}$/100 мкл в среде MEM Earle, дополненной посредством 1% 100x Pen/Strep, рассчитать 6 мл на 96-луночный планшет.

Инкубация образцов сыворотки с вирусом CDV

- Добавить 60 мкл разбавленного вируса во все лунки колонки 1-11 96-луночного планшета, содержащего разведения сывороток. Начать добавление вируса в колонку 11.
- Осторожно перемешать планшет и инкубировать в течение 2 часов при 37°C, 5% CO_2

Инкубация образца сыворотки +/- вируса CDV на клетках v.d.s.

- Удалить 60 мкл среды из однодневных клеток v.d.s в 96-луночных планшетах
- После завершения 2-часового инкубационного периода перенести 100 мкл каждой лунки из сывороточно-вирусной смеси в соответствующие лунки планшетов клеток v.d.s колонки 1-11
- Добавить 100 мкл среды MEM Earle, содержащей 1% 100x Pen/Strep во все лунки колонки 12 (= контроль только на клетках)
- Инкубировать планшеты в течение 3 дней при 37°C, 5% CO_2
- Считать результаты с помощью световой микроскопии, наблюдая вызванный вирусом цитопатический эффект.

Результаты теста нейтрализации сыворотки для CDV представлены на Фиг. 5.

У всех животных не было антител, нейтрализующих CDV, в начале исследования (SD0). Через три недели после первой иммунизации (SD21, во время

второй иммунизации) у одного животного были нейтрализующие антитела против CDV. Через 21 день после второй иммунизации (SD42) все, кроме одного животного, вакцинированного CDV-VP2, продуцировали значительные уровни нейтрализующих антител против вируса чумы собак. В сочетании с результатами теста нейтрализации сыворотки для CPV (где все животные сильно реагировали на вакцинацию, включая животных, у которых на SD42 не было антител к нейтрализации) и другой ортогональной серии тестов (см. Пример 3), был сделан вывод, что это одно животное было вакцинировано успешно, но иммунный ответ относительно CDV сместился в сторону клеточного ответа.

Проводили тест на нейтрализацию сыворотки в отношении CPV соответственно, результаты которого представлены на Фиг. 6. Что касается эффективности, то все животные, вакцинированные посредством CDV-VP2, были сероконвертированными против собачьего парвовируса 2. Особое увеличение нейтрализующих титров Ab было обнаружено после 2$^{-й}$ вакцинации (см. Фиг. 6). Уровни нейтрализующих антител через 21 день после второй иммунизации (SD42) достигли уровней от 1:40 до 1:400, что в соответствии с литературными источниками представляет собой диапазон защитного титра у реального хозяина (собачьи) (Glover и соавт. 2012, Taguchi и соавт. 2011).

Важно, что все индикаторные животные оставались CDV и CPV серо-отрицательными до конца исследования, что указывает на то, что рекомбинантные вирусы CDV не были переданы от вакцинированных животных к невакцинированным животным после вакцинации.

ПРИМЕР 3:

Иммуногенность у H3N2-MDA-позитивных поросят:

В этом исследовании использовали гемагглютинин (HA)-специфический IgG ELISA и IFNγ-ELISpot анализ для изучения гуморального и клеточного иммунного ответа у животных, положительных на материнское антитело (MDA) свиного гриппа, вакцинированных вектором CDV, кодирующим H3 SwIV.

Вакцинацию животных проводили в соответствии с Примером 2 с отличиями в том, что: вставка, включенная в остов CDV имела последовательность SEQ ID NO:19 (таким образом вектор, содержащий последовательность SEQ ID NO:22,

кодирующую H3 SwIV), вектор (далее называемый CDV-H3) вводили пяти поросятам, являющимся H3N2-MDA-позитивными (MDA+ животные)) и одному поросёнку который считается (почти) серонегативным по H3N2 (или обладающим низким MDA, соответственно), и три поросенка служили отрицательным контролем.

А) HA-специфический IgG ELISA

Далее предоставлен протокол ELISA в том виде, в котором его используют:

96-луночные планшеты с плоским дном (Nunc MaxiSorp №44-2404-21) покрывают 1 мкг/мл рекомбинантного белка гемагглютинина гриппа (Trenzyme) в карбонатном буфере, 9,6 в течение ночи при 4°C. На следующий день покрывающий антиген отбрасывают и планшеты промывают 5 раз промывочным буфером (50 мМ Tris/0,14M NaCl/0,05% Tween20, pH 8.0) и затем инкубируют в течение 1 ч. при комнатной температуре с 200 мкл на лунку блокирующего буфера (50 мМ Tris/0,14M NaCl/1% BSA, pH 8.0). Разведения образца готовят в разбавителе образец/конъюгат (50 мМ Tris/0,14M NaCl/0,05% Tween20 /1% БСА). Затем 100 мкл/лунку образцов и контролей (в двух экземплярах) разливают в обозначенные лунки, закрытые планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты промывают 5 раз промывочным буфером. Затем в каждую лунку добавляют 100 мкл разведенного 1:100.00 конъюгированного с HRP козьего α-Pig IgG-H+L идентифицирующего антитела (Southern Biotech, Cat№ 6050-05), покрытые планшеты инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. После стадии промывания (5 раз промывочным буфером) добавляют 100 мкл/лунку раствора субстрата TMB (POD, готовый к использованию; Sigma №T4444) и планшеты инкубируют в течение 5-15 минут при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливают добавлением 50 мкл/лунку стоп-раствора (2 н. серной кислоты) и коэффициент поглощения измеряют при 450 нм в считывающем устройстве ELISA (Synergy 2, Biotek).

Используя этот ELISA, с помощью образцов, взятых у животных в день исследования 45 (SD45), было видно, что животные были средне чувствительными к вакцинации (животные 1 и 5, см. Фиг. 7) если базовые уровни MDA были средними (< ОП 1,0 и > ОП 0,2), за исключением животного 2, которое

преимущественно отвечало клеточно-опосредованным иммунным ответом (см. ниже). Животное 4, имеющее низкий MDA (< ОП 0,2) продемонстрировало высокий ответ антител. Напротив, у двух животных с высокими уровнями MDA выше ОП 1.0 (животные 3 и 6) не наблюдалось увеличения специфических антител H3 после вакцинации.

B) IFNγ-ELISpot

Кроме того, клеточный иммунный ответ от животных, вакцинированных CDV-H3, измеряли с использованием ELISPOT.

Ниже приведен протокол используемого анализа ELISpot:

Планшеты ELISpot (96 лунок) покрывают очищенным анти-IFN-ɣ антителом в течение по меньшей мере 12 ч. PBMC оттаивают, дважды промывают в PBS (без кальция, без магния), подсчитывают с использованием трипанового синего и доводят в среде RPMI до распределения 3x105 клеток/лунку. После интенсивной промывки планшета, содержащего покрывающее антитело с PBS, планшет блокируют по меньшей мере в течение 1 часа при 37°C и 5% CO_2. Добавляют среду для культивирования клеток, содержащую 3 мкг/мл поликлонального активатора ConA (положительный контроль высвобождения IFNɣ) или с различными концентрациями антигена, с последующим посевом PBMC. Лунки, содержащие только средние или нестимулированные клетки, служат отрицательным контролем. После стимуляции в течение 48 ч. планшеты промывают сначала два раза водой, затем посредством PBS/0,01% Tween20. Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 1,5 ч., используя детектируемое биотинилированное анти-IFNɣ антитело, разведенное в PBS/0,01% Tween20/0,1% BSA. После этого в планшеты добавляют фермент стрептавидин-щелочная фосфатаза, разведенный в PBS/0,01% Tween20/0,1% BSA (в темноте, в течение 45 мин. инкубации). Наконец, используют NBT и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат в качестве субстрата щелочной фосфатазы (фаза развития также происходит в темноте). Эти субстратные системы дают нерастворимый конечный продукт диаммазана NBT, который имеет цвет от синего до фиолетового и может быть измерен в считывающем планшете. После интенсивного промывания проточной водопроводной водой планшеты оставляют на

ночь, чтобы обеспечить полное высыхание. Подсчет точек осуществляют с использованием считывающего устройства C.T.L. ELISpot.

В этом анализе рекомбинантный белок H3 использовали для стимуляции выделенного PBMC от животных, вакцинированных рекомбинантом CDV-H3. Как показано на Фиг. 8, в образцах животных, вакцинированных двумя впрыскиваниями (образцы, взятые на 28-й день исследования (SD28)), было обнаружено значительно больше клеток, продуцирующих IFN гамма, чем в PBMC невакцинированных животных. Известно, что такая индукция клеточного иммунитета повышает эффективность вакцины и ускоряет клиренс возбудителя при заражении. Кроме того, значительный Т-клеточный ответ животных, вакцинированных рекомбинантным экспрессирующим CDV гемагглютинином (H3) вируса гриппа свиней, был получен, несмотря на наличие сильного (свиного гриппа) материнского иммунитета у вакцинированных животных. Наличие ранее существовавшего материнского иммунитета у молодых животных часто вызывает интерференцию с активной иммунизацией и является основной причиной неэффективности вакцинации у молодых животных. Эти данные существенно влияют на характеристики биологии CDV в вакцинированном организме, что ведет к развитию активного иммунитета, несмотря на наличие пассивно присутствующего материнского иммунитета.

ПРИМЕР 4:

Исследование эффективности вакцины

Эпидемическая диарея свиней (PED) представляет собой высоко заразное заболевание свиней, которое может иметь колоссальные экономические последствия. В то время как к заражению восприимчивы все возрастные группы свиней, тяжелые клинические признаки и смертность в основном наблюдаются у поросят. Возбудителем является вирус PED (PEDV), оболочечный одноцепочечный РНК-вирус рода *Alphacoronavirus* из семейства вирусов *Coronaviridae*. В Европе PEDV впервые появился в конце 1970-х годов в Англии. После этого он распространился по всей Европе, вызывая спорадические вспышки. В конце 1990-х годов PEDV исчез с европейских свиноферм, о чем свидетельствует очень низкая серопревалентность и отсутствие данных о заболеваниях. Вспышки и эндемические

заражения по-прежнему поступали из Азии, где заболевание оказывает сильное влияние на продуктивность промышленных свиноводческих ферм. Начиная с 2005 года, о случаях PED снова сообщали из Европы, то есть Италии. После представления в 2013 году, по-видимому, высоко вирулентного PEDV в США, также были зарегистрированы случаи заболевания в Центральной Европе, включая Германию и соседние страны. Последние случаи были вызваны родственными, но отличающимися штаммами PEDV (так называемые штаммы S-INDEL). В Германии с мая 2014 г. были зарегистрированы случаи с высокой заболеваемостью и переменной летальностью у поросят.

Это исследование, в котором остов CDV, полученный из вакцинного штамма Lederle со вставкой последовательности SEQ ID NO:38 (кодирующей шиповидный белок PEDV) между геном P и геном M (вектор таким образом, содержащий последовательность SEQ ID NO:41) был протестирован в качестве векторной вакцины (именуемой в дальнейшем «CDV_PEDV-Spike вакцина» или «CDV PEDV-Spike векторная вакцина», соответственно), включало в себя шесть свиноматок и их потомство.

Всех животных проверяли на PEDV с помощью RT-qPCR, нацеленного на S-ген, и антитела, специфичные к PEDV. В исследование были включены только отрицательные животные.

Получали три группы лечения (см. ниже) случайно распределенных животных:

- Группа 1 (отрицательный контроль): две свиноматки (обозначенные №1 и №2), невакцинированная;

- Группа 2 (положительный контроль): две свиноматки (обозначенные №3 и №4), невакцинированная;

- Группа 3 (CDV_PEDV-Spike): две свиноматки (обозначенные №5 и №6), вакцинированная посредством CDV_PEDV-шиповидная векторная вакцина.

Вакцинацию двух свиноматок из группы 3 проводили по следующей схеме, в которой исходный титр CDV_PEDV-Spike вакцины, определенный по конечной точке титрования, составлял 7,94 x 10^4 TCID50/мл:

За 9 недель до предполагаемой даты опороса: каждая из двух свиноматок интраназально получила 4 мл вакцины (по 2 мл в каждую ноздрю);

За 6 недель до предполагаемой даты опороса: каждая из двух свиноматок интраназально получила 4 мл вакцины (по 2 мл в каждую ноздрю);

За 3 недели до предполагаемой даты опороса: каждая из двух свиноматок интраназально получила 4 мл соответствующей вакцины (по 2 мл в каждую ноздрю) и дополнительно 2 мл внутримышечно.

Поросят, рожденных от свиноматок группы 1 (13 поросят свиноматок №1 и 12 поросят свиноматки №2), подвергали имитационной инокуляции перорально. Поросят, рожденных от свиноматок группы 2 (12 поросят свиноматки №3 и 14 поросят свиноматки №4), и группу 3 (5 поросят свиноматки №5 и 15 поросят свиноматки №6) перорально заражали полевым штаммом PEDV (именуемый в дальнейшем «PEDV EU») в возрасте 4 дней жизни.

Для инокуляции поросят из групп 2 и 3 использовали адаптированную культуру клеток PEDV EU. Титр составлял 2,15 x10^5 TCID50/мл. Поросят из групп 2 и 3 инокулировали перорально. В этом случае каждый поросенок получал 1 мл разведенного 1:10 вирусного исходного раствора (титр 2,15 x10^4 TCID50) с использованием 2 мл шприцев.

Поросят группы 1 подвергали имитационной инокуляции перорально с использованием 1 мл среды для культивирования клеток в 2 мл шприцах.

В течение всего испытания были взяты ректальные мазки (обычные мазки COPAN без среды) в день инокуляции и на 1 - 10 день после инокуляции (пи), а также на 14, 17 и 20/21 день пи у всех животных для анализов RT-qPCR. Дополнительные ректальные мазки были взяты у 4 поросят каждой свиноматки до инокуляции и через два дня после заражения для бактериологического исследования. Кроме того, клинические признаки, указывающие на PED, регистрировали ежедневно с использованием установленной стандартизированной системы кумулятивных баллов (см. ниже). Образцы крови брали в день инокуляции и в день 14 и 20/21 пи (конец испытания) или в день эвтаназии или смерти соответствующего животного.

Клинический мониторинг

Установленный совокупный клинический показатель использовали для ежедневного мониторинга клинических признаков, указывающих на PED (см. Таблицу ниже).

Показатель	Общее поведение	Потребление корма/ сосание	Желудочно-кишечные симптомы
0	Подвижный, внимательный, без отклонений	Жадное сосание, хорошо наполненный желудок, потребление корма для поросят	Физиологические испражнения
1	Легкая депрессия	Медленное сосание, низкий интерес к корму для поросят	Пастообразный кал, рвота
2	Депрессия, изоляция от группы, вокализация (стоны)	Неохотное потребление корма, почти отсутствует интерес к сосанию/корму для поросят, впавшие бока	Водянистые испражнения, покрасневшая анальная область, рвота
3	Боковое положение, признаки сильного обезвоживания, низкая температура тела	Общая анорексия, снижение молочной продуктивности свиноматок	Водянистые испражнения с примесями крови или фибрина, сильно покрасневшая анальная область, рвота

Таблица 1: Совокупный клинический показатель для клинических признаков, указывающих на PED

Подготовка проб и экстракция нуклеиновых кислот

Ректальные мазки погружали в 1 мл модифицированной по Дульбекко среды Игла и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Вирусную РНК экстрагировали с использованием или мини-набора QIAmp ViralRNA (Qiagen), или NucleoMagVet-Kit в сочетании с экстракционной платформой KingFisher. РНК хранили при -20° градусах до дальнейшего использования.

Образцы крови центрифугировали при 2031 x g в течение 20 мин. при комнатной температуре для получения сыворотки. Полученную сыворотку аликвотировали и хранили при -20°C.

Обнаружение вирусов

Для обнаружения выделения PEDV использовали системы RT-qPCR, нацеленные на S-ген PEDV, как описано выше (Stadler и соавт., BMC Vet Res. 11:142 (2015)). Образцы, взятые в дни 0 - 7 дпи и в 10 и 20/21 дпи тестировали на геном PEDV. Количество копий генома/мкл рассчитывали с использованием внутреннего стандарта.

Обнаружение антител

Коммерческий непрямой ELISA (INgezim PEDV, INGENASA, Мадрид, Испания) осуществляли со всеми сыворотками в соответствии с руководством производителя.

Бактериология

Фекальные мазки четырех поросят на помет были взяты в 0 и 2 дпи для дифференциальной бактериологии.

Статистика

Тест Шапиро-Уилка использовали для проверки нормальности, а критерий суммы рангов Манна-Уитни проводили, как реализовано в программном пакете. Статистическая значимость была проверена с использованием программного обеспечения SigmaPlot.

Результаты

Обнаружение антител в сыворотке:

Все поросята из группы CDV показали положительные результаты в ELISA (обнаружение антител против шиповидного белка PEDV) перед заражением инокуляцией вследствие приема антител с положительным молозивом, в то время как все животные группы положительного и отрицательного контроля показали явно отрицательные результаты.

В 14 дпи все, кроме трех поросят в группе положительного контроля, сероконвертировали, в то время как у всех животных в группе вакцины в образцах сыворотки все еще оставалось высокое количество специфического IgG к PEDV.

В конце исследования все поросята группы CDV и группы положительного контроля показали сильные положительные результаты в ELISA. Ни одно из животных в отрицательном контроле не было сероконвертировано в течение всего испытания.

В дальнейшем исследовании также было показано, что соответствующие результаты антител также были достигнуты, когда маточные свиноматки были только дважды вакцинированы через интраназальный путь.

Бактериология:

Фекальные мазки, взятые в 0 и 2 дпи, не показали каких-либо патогенных бактерий. Бактериальная флора не претерпела значительных изменений после заражения.

Клинические признаки:

Поросята из группы положительного контроля (группа 2) четко показали клинические признаки, указывающие на PEDV в течение 7 дней, начиная с рвоты 24 чпи с последующей диареей. 8 из 26 поросят были подвергнуты эвтаназии из-за сильной дегидратации и клинических показателей выше 6 (гуманная конечная точка). Первые клинические признаки, указывающие на PEDV, были обнаружены в 36 чпи.

В целом, клинические признаки вакцинированных вектором CDV и зараженных PEDV поросят (группа 3) были лучше в отношении общего поведения, и только 2 из 20 (10%) свиней группы 3 были подвергнуты эвтаназии из-за сильного обезвоживания и значений клинического показателя выше 6 (по сравнению с 31% поросят из группы 2).

Животные в отрицательном контроле оставались здоровыми в течение всего испытания.

Выделение вируса

Четкая разница в выделении вируса может быть обнаружена между зараженными группами. В 1 дпи все зараженные поросята были положительными на вирусный геном в ректальных мазках, но животные в вакцинированной группе CDV-PEDV показали значительно более низкие числа копий генома PEDV (среднее значение CT 32,79), затем в группе заражения (среднее значение CT 26,65).

Кроме того, хотя в течение следующих пяти дней пи нагрузка генома в ректальных мазках группы CDV была довольно похожа на положительный контроль, начиная с 7 дпи, определяемое количество вирусного генома снижалось ниже уровня отсечения у поросят, защищенных вакцинированными свиноматками. в то время как все животные в группе положительного контроля все еще выделяют PEDV.

Генотип PEDV не был обнаружен в мазках группы отрицательного контроля.

В заключение, результат исследования состоял в том, что поросята, рожденные от свиноматок, вакцинированных рекомбинантной вакциной CDV PEDV-Spike, показали уменьшение клинических признаков по сравнению с положительным контролем, и, в частности, значительное улучшение наблюдалось в отношении смертности/летальности поросят. Кроме того, распространение вируса после заражения PEDV было значительно снижено.

Все композиции и способы, раскрытые и заявленные в настоящей заявке, могут быть изготовлены и выполнены без чрезмерных экспериментов в свете настоящего раскрытия. Хотя композиции и способы в соответствии с настоящим изобретением были описаны в с точки зрения предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что к композициям и способам и на стадиях или в последовательности стадий способа, описанного в настоящей заявке можно применять вариации, без отступления от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные агенты, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены агентами, описанными в настоящей заявке, в то время как будут достигнуты такие же или аналогичные результаты. Считается, что все такие подобные заменители и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в пределах сущности, объема и концепции изобретения, как определено в нижеследующей формуле изобретения.

В настоящей заявке также раскрыты нижеследующие пункты:

1. Экспрессионная кассета для вставки между двумя смежными жизненно необходимыми генами (1; 2) вируса *Paramyxoviridae*, так что первый ген (1)

расположен в 3′-направлении, а второй ген (2) расположен в 5′-направлении экспрессионной кассеты, где указанная экспрессионная кассета содержит:

- первую нуклеотидную последовательность, где указанная первая нуклеотидная последовательность представляет собой интересующую нуклеотидную последовательность, и

- вторую нуклеотидную последовательность, фланкирующую 5′-конец первой нуклеотидной последовательности, где указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1), и

- третью нуклеотидную последовательность, фланкирующую 3′-конец первой нуклеотидной последовательности, где указанная третья нуклеотидная последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующей области гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2).

2. Экспрессионная кассета по пункту 1, где указанная экспрессионная кассета состоит из:

- указанной первой нуклеотидной последовательности, и

- указанной второй нуклеотидной последовательности, и

- указанной третьей нуклеотидной последовательности, и

- дополнительной нуклеотидной последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной второй нуклеотидной последовательности или фланкирующей 3′-конец указанной третьей нуклеотидной последовательности, причем указанная дополнительная нуклеотидная последовательность представляет собой межгенную последовательность вируса *Paramyxoviridae*.

3. Экспрессионная кассета по пункту 1 или 2, где указанная третья нуклеотидная последовательность состоит из:

- 3′-некодирующей области гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2), и

- последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области кодирует консенсусную последовательность для инициации или усиления трансляции, и причем указанная консенсусная последовательность для инициации или усиления трансляции необязательно является последовательностью Козак.

4. Экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 - 3, где указанные два смежных гена (1; 2) вируса *Paramyxoviridae* выбраны из группы, состоящей из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, и/или

где указанными жизненно необходимыми генами вируса *Paramyxoviridae* являются:

- ген N, P, M, F, H и L вируса *Paramyxoviridae*, или
- ген N, P, M, F, HN и L вируса *Paramyxoviridae*, или
- ген N, P, M, F, G и L вируса *Paramyxoviridae*.

5. Экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 - 4 для вставки между геном P и геном M вируса *Paramyxoviridae*, где

- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1) представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, за исключением гена P вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген N, M, F, H и L вируса *Paramyxoviridae*, и
- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2) представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, за исключением гена M вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген H, P, F, L и N вируса *Paramyxoviridae*.

6. Экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 - 5, где

- указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена, выбранного из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae,* расположенную в 3′-направлении экспрессионной кассеты, за исключением 5′-некодирующей области первого гена (1), и/или

- указанная третья нуклеотидная последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующей области жизненно важного гена вируса *Paramyxoviridae*, расположенной в 5′-направлении экспрессионной кассеты, за исключением 3′-некодирующей области второго гена (2).

7. Экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 - 6, где указанная первая нуклеотидная последовательность функционально связана с последовательностью начала гена (GS), включенной в указанную третью нуклеотидную последовательность и/или с промотором генома вируса *Paramyxoviridae*.

8. Экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 - 7, где указанные нуклеотидные последовательности представляют собой последовательности РНК.

9. Вирусный вектор *Paramyxoviridae*, содержащий экспрессионную кассету по любому из пунктов 1 - 8.

10. Экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 - 8 или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по пункту 9, где

- указанная 5′-некодирующая область представляет собой 5′-некодирующую область гена N вируса *Paramyxoviridae*, и/или
- указанная 3′-некодирующая область представляет собой 3′-некодирующую область гена H вируса *Paramyxoviridae*,

и/или где указанная экспрессионная кассета является вставкой между геном P и геном M вируса *Paramyxoviridae*.

11. Вирусный вектор *Paramyxoviridae*, содержащий последовательность РНК, вставленную между двумя смежными жизненно необходимыми генами (1; 2) вируса *Paramyxoviridae*, так что первый ген (1) расположен в 3′-направлении, а второй ген (2) расположен в 5′-направлении указанной вставленной последовательности РНК, и где указанная вставленная последовательность РНК содержит или состоит из:

- первой последовательности РНК, где указанная первая последовательность РНК представляет собой соответствующую нуклеотидную последовательность, и
- второй последовательности РНК, фланкирующей 5′-конец первой последовательности РНК, где указанная вторая последовательность РНК представляет собой 5′-некодирующую область гена, где указанный ген выбирают из

группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1), и

- третьей последовательности РНК, фланкирующей 3′-конец первой последовательности РНК, где указанная третья последовательность РНК содержит или состоит из 3′-некодирующей области гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2).

12. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по пункту 11, где указанная третья последовательность РНК состоит из:

- 3′-некодирующей области гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2), и
- последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области кодирует консенсусную последовательность для инициации или усиления трансляции, и причем указанная консенсусная последовательность для инициации или усиления трансляции необязательно является последовательностью Козак.

13. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по пункту 11 или 12, дополнительно содержащий:

- четвертую последовательность РНК, фланкирующую 5′-конец второй последовательности РНК, где указанная четвертая последовательность РНК представляет собой межгенную последовательность вируса *Paramyxoviridae*, и/или
- пятую последовательность РНК, фланкирующую 3′-конец четвертой последовательности РНК, где указанная пятая последовательность РНК представляет собой межгенную последовательность вируса *Paramyxoviridae*.

14. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пунктов 11 - 13, где указанные два смежных гена (1; 2) вируса *Paramyxoviridae* выбраны из группы, состоящей из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, и/или

где указанные жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae* представляют собой:

- ген N, P, M, F, H и L вируса Paramyxoviridae, или
- ген N, P, M, F, HN и L вируса *Paramyxoviridae*, или
- ген N, P, M, F, G и L вируса *Paramyxoviridae*.

15. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пунктов 11 - 14, где указанные два смежных жизненно необходимых гена (1; 2) вируса *Paramyxoviridae* представляют собой ген P и ген M вируса *Paramyxoviridae*, и где

- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1), представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, за исключением гена P вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген N, M, F, H и L вируса *Paramyxoviridae*, и
- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2), представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, за исключением гена M вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген H, P, F, L и N вируса *Paramyxoviridae*.

16. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пунктов 11 - 15, где

- указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена, выбранного из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, расположенную в 3′-направлении экспрессионной кассеты, за исключением 5′-некодирующей области первого гена (1), и/или
- указанная третья нуклеотидная последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующей области жизненно важного гена вируса *Paramyxoviridae*, расположенной в 5′-направлении экспрессионной кассеты, за исключением 3′-некодирующей области второго гена (2).

17. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пунктов 11 - 16, где

- указанная 5′-некодирующая область представляет собой 5′-некодирующую область гена N вируса *Paramyxoviridae*, и/или
- указанная 3′-некодирующая область представляет собой 3′-некодирующую область гена H вируса *Paramyxoviridae*.

18. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пунктов 11 - 17, где

указанная первая последовательность РНК функционально связана с последовательностью начала гена (GS), включенной в указанную третью нуклеотидную последовательность РНК и/или с промотором генома вируса *Paramyxoviridae*.

19. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанный вирус *Paramyxoviridae* представляет собой вирус рода *Morbillivirus*, и где вирус рода *Morbillivirus* предпочтительно выбран из группы, состоящей из вируса чумы собак (CDV), кошачий морбилливирус (FeMV) и вирус чумы мелких жвачных животных (PPRV), и где вирус рода *Morbillivirus* наиболее предпочтительно представляет собой вирус чумы собак (CDV).

20. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанный вирус *Paramyxoviridae* представляет собой CDV, и где указанная 5′-некодирующая область гена CDV выбрана из группы, состоящей из:

5′-некодирующей области гена N CDV, где 5′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:1,

5′-некодирующей области гена P CDV, где 5′-некодирующая область гена P CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:2,

5′-некодирующей области гена M CDV, где 5′-некодирующая область гена M CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:3,

5′-некодирующей области гена F CDV, где 5′-некодирующая область гена F CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:4,

5′-некодирующей области гена H CDV, где 5′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:5, и

5′-некодирующей области гена L CDV, где 5′-некодирующая область гена L CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:6.

21. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанный вирус *Paramyxoviridae* представляет собой CDV, и где указанная 3′-некодирующая область гена CDV выбрана из группы, состоящей из:

3′-некодирующей области гена H CDV, где 3′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:7,

3′-некодирующей области гена N CDV, где 3′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:8,

3′-некодирующей области гена P CDV, где 3′-некодирующая область гена P CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:9,

3′-некодирующей области гена M CDV, где 3′-некодирующая область гена M CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:10,

3′-некодирующей области гена F CDV, где 3′-некодирующая область гена F CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая

по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:11 и

3′-некодирующей области гена L CDV, где 3′-некодирующая область гена L CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:12.

22. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная вторая нуклеотидная последовательность или указанная вторая последовательность РНК представляет собой 5′-некодирующую область гена N CDV, и где указанная 5′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:1.

23. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где

- указанная 3′-некодирующая область гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2) представляет собой 3′-некодирующую область гена H CDV, и где указанная 3′-некодирующая область гена H - CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:7, и/или

- указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области последовательности, кодирует последовательность Козак длиной от 5 до 8 нуклеотидов, и где последовательность Козак предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:13.

24. Экспрессионная кассета по любому из пунктов 2 - 8 и 19 - 23 или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пунктов 9 и 13 - 23, где указанная межгенная последовательность вируса *Paramyxoviridae* представляет собой

межгенную последовательность CDV, и где указанная межгенная последовательность CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 66% идентична последовательности SEQ ID NO:14.

25. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность представляет собой представляющий интерес ген или последовательность, кодирующую антиген, и/или где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность является не встречающейся в природе и/или рекомбинантной.

26. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность является рекомбинантной, и/или гетерологичной и/или экзогенной.

27. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует антиген от вызывающего заболевание агента, где агент, вызывающий заболевание предпочтительно представляет собой агент, вызывающий заболевание, способный инфицировать домашнее животное, такое как собака или кошка и/или любое другое домашнее или дикое плотоядное животное, или способный инфицировать животное, выращиваемое в продовольственных целях, такое как свинья или крупный рогатый скот.

28. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где:

- вирус *Paramyxoviridae* представляет собой вирус *Paramyxoviridae,* способный инфицировать животное первого биологического семейства, и
- представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует антиген от вызывающего заболевание агента, способного инфицировать животное указанной первого биологического семейства, и где указанный вызывающий заболевание агент предпочтительно отличается от указанного вируса *Paramyxoviridae*,

и где указанное животное указанного первого биологического семейства предпочтительно выбрано из группы, состоящей из животного семейства собачьих, животного семейства кошачьих и животного семейства свиней, и где указанное животное указанного первого биологического семейства наиболее предпочтительно представляет собой представителя семейства собачьих, кошачьих или свиней, такого как собака, кошка или свинья.

29. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по пункту 28, где

- указанный вирус *Paramyxoviridae*, способный инфицировать животное первого биологического семейства представляет собой CDV и

– указанный агент, вызывающий заболевание, способный инфицировать животное указанного первого биологического семейства представляет собой собачий парвовирус (CPV),

или где

- указанный вирус *Paramyxoviridae*, способный инфицировать животное первого биологического семейства представляет собой вирус Ла-Пьедад-Мичоакан-Мексика (LPMV) и

- указанный вызывающий заболевание агент, способный инфицировать животное указанного первого биологического семейства, представляет собой вирус свиного гриппа (SwIV) или вирус эпидемической диареи свиней (PEDV).

30. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует антиген из собачьего парвовируса (CPV), кошачьего парвовируса (FPV), вируса свиного гриппа (SwIV) или вируса эпидемической диареи свиней (PEDV).

31. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует:

- капсидный белок *Protoparvovirus*, и где указанный капсидный белок *Protoparvovirus* предпочтительно выбран из группы, состоящей из капсидного белка *Carnivore protoparvovirus 1* (CPV или FPV), капсидного белка *Primate*

protoparvovirus 1, капсидного белка *Rodent protoparvovirus 1*, капсидного белка *Rodent protoparvovirus 2,* капсидного белка *Ungulate parvovirus 1 (PPV)*; или

- белок оболочки вируса гриппа, где указанный белок оболочки представляет собой необязательно гемагглютинин и/или где указанный вирус гриппа необязательно выбран из группы, состоящей из вируса гриппа A, вируса гриппа B и вируса гриппа C, и при этом вирус гриппа A предпочтительно выбран из группы вирусов гриппа H3N2, H3N1, H1N1, H1N2, H2N1, H2N3 и H911; или

- шиповидный (S) белок коронавируса, и где указанный S белок коронавируса предпочтительно выбирают из группы, состоящей из S белка *Alpaca coronavirus*, S белка *Alphacoronavirus 1*, S белка *Human coronavirus 229E*, S белка *Human Coronavirus NL63*, S белка *вируса эпидемической диареи свиней* (PEDV), S белка *Human coronavirus OC43*, S белка *Human coronavirus HKU1*, S белка *мышиного коронавируса*, S белка *коронавируса, связанного с тяжелым острым респираторным синдромом* (SARS-CoV), S белка *коронавируса, связанного с ближневосточным респираторным синдромом* (MERS-CoV) и S белка *вируса птичьего инфекционного бронхита* (IBV).

32. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует

- белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и где указанный белок VP2 CPV предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35; или

- гемагглютинин подтипа H3 (H3), в частности H3 вируса свиного гриппа, и где указанный H3 предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:36; или

- шиповидный (S) белок вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), и где указанный S белок PEDV предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере 70%, 80%, 85%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45.

33. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует

- белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и где указанная последовательность, кодирующая белок VP2 CPV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:15; или
- гемагглютинин подтипа H3 (H3), предпочтительно H3 вируса свиного гриппа, и где указанная последовательность, кодирующая H3, предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:16; или
- шиповидный (S) белок вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), и где указанная последовательность, кодирующая S белок PEDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:37 или SEQ ID NO:38.

34. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная экспрессионная кассета состоит из или указанный вирусный вектор *Paramyxoviridae* содержит:

- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:18; или
- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20; или

- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:40.

35. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов содержащий:

- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:21; или
- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:22; или
- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:41.

36. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пунктов 13 - 35, дополнительно содержащий:

- шестую последовательность РНК, фланкирующую 5′-конец четвертой последовательности РНК, где указанная шестая последовательность РНК состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:23, и/или
- седьмую последовательность РНК, фланкирующую 3′-конец пятой последовательности РНК, где указанная седьмая последовательность РНК состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:24.

37. Вектор CDV, содержащий гетерологичную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, где указанная гетерологичная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует белок VP2 собачьего парвовируса (CPV).

38. Вектор CDV по пункту 37, где указанная гетерологичная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, кодирующая белок VP2 CPV, состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:15.

39. Вектор CDV по пункту 37 или 38, где указанный белок VP2 CPV содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35.

40. Вектор CDV по любому из пунктов 37 - 39, где

- указанная гетерологичная представляющая интерес нуклеотидная последовательность расположена между геном P и геном M CDV; и/или
- указанная гетерологичная представляющая интерес нуклеотидная последовательность функционально связана с последовательностью начала гена (GS), расположенной в 3′-направлении указанной гетерологичной последовательности РНК и/или с промотором генома CDV.

41. Вектор CDV по пункту 40, где указанная последовательность GS включена в экзогенную 3′-некодирующую область гена CDV, и где указанная экзогенная 3′-некодирующая область гена CDV предпочтительно фланкирует 3′-конец гетерологичной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, и/или

где указанная гетерологичная представляющая интерес нуклеотидная последовательность представляет собой соответствующую последовательность РНК.

42. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует экспрессионную кассету или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, и где указанная молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой молекулу ДНК.

43. Молекула ДНК, в частности молекула ДНК по пункту 42, где указанная молекула содержит:

(i) последовательность ДНК, кодирующую соответствующий полипептид,

(ii) последовательность ДНК, фланкирующую 3′-конец последовательности (i), и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:25,

(iii) последовательность ДНК, фланкирующую 5′-конец последовательности (i), и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:26, и

(iv) последовательность ДНК, фланкирующую 5′-конец последовательности (iii), и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:27.

44. Молекула ДНК по пункту 43, дополнительно содержащая:

(v) последовательность ДНК, фланкирующую 5′-конец последовательности (ii), и которая по меньшей мере на 66% идентична последовательности SEQ ID NO:28, и/или

(vi) последовательность ДНК, фланкирующую 3′-конец последовательности (iv), и которая по меньшей мере на 66% идентична последовательности SEQ ID NO:28.

45. Молекула ДНК по пункту 44, дополнительно содержащая:

(vii) последовательность ДНК, фланкирующую 3′-конец последовательности (v), и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:29, и/или

(viii) последовательность ДНК, фланкирующую 5′-конец последовательности (vi) и которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:30.

46. Молекула ДНК по любому из пунктов 42 - 45, где последовательность (i) представляет собой:

- последовательность ДНК, кодирующую белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и где указанная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:31, или

- последовательность ДНК, кодирующую гемагглютинин подтипа H3 (H3), предпочтительно H3 вируса свиного гриппа, и где указанная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:32; или

- последовательность ДНК, кодирующую S белок PEDV, и где указанная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:42 или SEQ ID NO:43.

47. Молекула ДНК по любому из пунктов 42 - 46, где указанная молекула ДНК содержит:

- последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:33; или

- последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:34; или

- последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:44.

48. Клетка-хозяин млекопитающего, содержащая экспрессионную кассету или вирусный вектор *Paramyxoviridae* или молекулу ДНК по любому из предыдущих пунктов.

49. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae,* или молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины.

50. Конструкция ДНК, содержащая молекулу ДНК по любому из пунктов 42 - 47.

51. Транскрипт РНК конструкции ДНК по пункту 50.

52. Клетка, трансфицированная конструкцией ДНК по пункту 50.

53. Клетка, трансфицированная транскриптом РНК по пункту 51.

54. Способ получения инфекционного вируса *Paramyxoviridae*, содержащего гетерологичный ген, в частности для получения вирусного вектора *Paramyxoviridae* по любому из пунктов 9 - 41, где указанный способ включает в себя следующие стадии:

а. обеспечение клетки-хозяина, экспрессирующей гетерологичную РНК-полимеразу;

б. трансфекция клетки-хозяина конструкцией ДНК по пункту 50, и где молекула ДНК транскрибируется гетерологичной РНК-полимеразой, и

в. выделение вирусов, продуцируемых клетками.

55. Применение вектора по любому из пунктов 9 - 41 или клетки по любому из пунктов 48, 52 и 53 для изготовления иммуногенной композиции или вакцины.

56. Иммуногенная композиция, содержащая:

вектор по любому из пунктов 9 - 41, где указанный вектор необязательно представляет собой инфекционный и/или аттенуированный вирус или указанный вектор необязательно представляет собой аттенуированный и/или модифицированный живой вирус, и необязательно

рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, и/или вирусоподобную частицу, содержащую множество рекомбинантных белков, экспрессируемых указанным вектором, и необязательно

приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, где указанный носитель предпочтительно подходит для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения.

57. Иммуногенная композиция по пункту 56, где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый вектором, представляет собой:

- антиген VP2 парвовируса, такой как белок VP2 CPV или
- белок оболочки вируса гриппа, где указанный белок оболочки необязательно представляет собой гемагглютинин, такой как H3.

58. Иммуногенная композиция по пункту 56 или 57, содержащая или состоящая из:

вектора CDV по любому из пунктов 37 - 41, и где указанный вектор предпочтительно представляет собой вектор по любому из пунктов 19 - 36, и необязательно

полипептида или рекомбинантного белка, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36, и необязательно

приемлемого в фармацевтике или ветеринарии носителя или наполнители, где указанный носитель предпочтительно подходит для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения.

59. Иммуногенная композиция по пункту 56 или 57, содержащая или состоящая из:

вектора по любому из пунктов 19 - 36, и где указанный вектор предпочтительно представляет собой вектор CDV по любому из пунктов 37 - 41, и необязательно

рекомбинантного белка, экспрессируемого указанным вектором, где указанный рекомбинантный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36, и необязательно

приемлемого в фармацевтике или ветеринарии носителя или наполнителя, где указанный носитель предпочтительно подходит для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения.

60. Иммуногенная композиция по пункту 56, где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором представляет собой S белок коронавируса, и где указанный S белок коронавируса необязательно представляет собой S белок PEDV.

61. Иммуногенная композиция по пункту 56 или 60, где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, представляет собой S белок PEDV, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45.

62. Вакцина или фармацевтическая композиция, содержащая:

а. вектор по любому из пунктов 9 - 41, и

б. рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, и/или вирусоподобную частицу, содержащую множество рекомбинантных белков, экспрессируемых указанным вектором, и

в. приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения, и

г. необязательно указанная вакцина дополнительно содержит вспомогательное средство.

63. Вакцина или фармацевтическая композиция по пункту 62, где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый вектором, представляет собой

- антиген VP2 парвовируса, такой как белок VP2 CPV или
- белок оболочки вируса гриппа, где указанный белок оболочки необязательно представляет собой гемагглютинин, такой как H3.

64. Вакцина или фармацевтическая композиция по пункту 62 или 63, содержащая или состоящая из:

а. вектора CDV по любому из пунктов 37 - 41, и где указанный вектор предпочтительно представляет собой вектор по любому из пунктов 19 - 36, и

б. полипептида или рекомбинантного белка, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36, и

в. приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения,

г. и необязательно вспомогательное средство.

65. Вакцина или фармацевтическая композиция по пункту 62 или 63, содержащая или включающая в себя:

а. вектор CDV по любому из пунктов 19 - 36, и где указанный вектор предпочтительно представляет собой вектор по любому из пунктов 37 - 41, и

б. рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, где указанный рекомбинантный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36, и

в. приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения,

г. и необязательно вспомогательное средство.

66. Вакцина или фармацевтическая композиция по пункту 62, где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором представляет собой S белок коронавируса, и где указанный S белок коронавируса необязательно представляет собой S белок PEDV.

67. Вакцина или фармацевтическая композиция по пункту 62 или 66, где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором представляет собой S белок PEDV, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:45.

68. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56 - 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62 - 67, где указанный вектор представляет собой вектор по пункту 27.

69. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56 - 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62 - 67, где указанный вектор представляет собой вектор по пункту 28.

70. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56 - 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62 - 67, где указанный вектор представляет собой вектор по пункту 29.

71. Способ получения иммуногенной композиции или вакцины для снижения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с инфекцией или вызванных ими, включающей следующие стадии:

а. заражение клетки-хозяина млекопитающего вектором по любому из пунктов 9 - 41,

б. культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,

в. сбор инфицированных клеточных культур,

г. необязательно очистка собранных инфицированных клеточных культур из стадии в),

д. необязательно смешивание указанной собранной инфицированной клеточной культуры с фармацевтически приемлемым носителем.

72. Способ по пункту 71, где указанная иммуногенная композиция или указанная вакцина снижает, в частности у животного, тяжесть одного или нескольких клинических признаков, связанных с или вызванных посредством:

- заражения вирусом чумы собак (CDV) и/или собачим парвовирусом (CPV) или
- заражения вирусом гриппа, где указанный вирус гриппа необязательно выбран из группы, состоящей из вируса гриппа A, вируса гриппа B и вируса гриппа C, и при этом вирус гриппа A предпочтительно выбран из группы вирусов гриппа H3N2, H3N1, H1N1, H1N2, H2N1, H2N3 и H911, или
- заражения коронавирусом, где указанный коронавирус необязательно выбран из группы, включающей в себя *Alpaca coronavirus*, *Alphacoronavirus 1*, *Human coronavirus 229E*, *Human Coronavirus NL63*, *вирус эпидемической диареи свиней* (PEDV), *Human coronavirus OC43*, *Human coronavirus HKU1*, *мышиный коронавирус*, *коронавирус, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом* (SARS-CoV), *коронавирус, связанный с ближневосточным респираторным синдромом* (MERS-CoV) и *вирус птичьего инфекционного бронхита* (IBV).

73. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56 - 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62 - 67 для применения в способе снижения или предотвращения клинических признаков или заболевания,

вызванного заражением по меньшей мере одним патогеном у животного или для применения в способе лечения или предотвращения заражения по меньшей мере одним патогеном у животного, предпочтительно указанное животное является домашним животным, таким как собака или кошка и/или любым другим домашним или диким плотоядным животным, или животным, выращиваемым в продовольственных целях, таким как свинья.

74. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56 - 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62 - 67 для применения по пункту 73, где указанное заражение по меньшей мере одним патогеном представляет собой:

- заражение посредством CDV и/или CPV или
- заражение вирусом свиного гриппа, где вирус свиного гриппа необязательно представляет собой вирус гриппа подтипа H3, и где указанный вирус гриппа подтипа H3 предпочтительно представляет собой вирус свиного гриппа подтипа H3N2 или H3N1 или
- заражение посредством PEDV.

75. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56 - 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62 - 67 для применения в способе для:

индуцирования иммунного ответа против CPV и CDV у животного, предпочтительно у собаки, или

индуцирования иммунного ответа против вируса свиного гриппа у свиньи, где вирус свиного гриппа необязательно представляет собой вирус гриппа подтипа H3, и где указанный вирус гриппа подтипа *H3* предпочтительно представляет собой вирус свиного гриппа подтипа H3N2 или H3N1, или

включая иммунный ответ против PEDV у свиньи, в особенности предпочтительно у беременной свиноматки.

76. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56, 60 и 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62, 66 и 67 для применения в способе снижения или предотвращения клинических признаков или заболеваний, вызванных заражением посредством PEDV у поросенка, причем

поросенка следует вскармливать молоком свиноматки, которой вводили иммуногенную композицию.

77. Иммуногенная композиция для применения по пункту 76, где указанная свиноматка, которой была введена иммуногенная композиция, представляет собой свиноматку, которой иммуногенная композиция была введена в то время, когда указанная свиноматка была беременна, в частности указанным поросёнком.

78. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56 - 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62 - 67 для применения по любому из пунктов 73 77, где указанную иммуногенную композицию или указанную вакцину или фармацевтическую композицию вводят через слизистую оболочку, предпочтительно интраназально.

79. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 56 - 61 или вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 62 - 67 для применения по любому из пунктов 75 - 77, где указанную иммуногенную композицию или указанную вакцину или фармацевтическую композицию вводят указанной свиноматке через слизистую оболочку, предпочтительно интраназально.

80. Способ иммунизации животного, такого как домашнее животное, такого как собака или кошка и/или любого другого домашнего или дикого плотоядного животного, или животного, выращиваемого в продовольственных целях включая свиней против клинического заболевания, вызванного по меньшей мере одним патогеном у указанного животного, где указанный способ включает в себя стадию введения животному иммуногенной композиции по любому из пунктов 56 - 61 или вакцины или фармацевтической композиции по любому из пунктов 62 - 67, где указанная иммуногенная композиция или вакцина не вызывает клинических признаков заражения, но способна вызывать иммунный ответ, который иммунизирует животное против патогенных форм указанного по меньшей мере одного патогена.

81. Способ по пункту 80,

где указанный по меньшей мере один патоген представляет собой CDV или CPV или SwIV или PEDV, или

где указанный по меньшей мере один патоген представляет собой CDV и CPV.

82. Способ индукции выработки антител, специфичных к PEDV, у свиноматки, где указанный способ включает в себя введение указанной свиноматке иммуногенной композиции по любому из пунктов 56, 60 и 61 или вакцины или фармацевтической композиции по любому из пунктов 62, 66 и 67.

83. Способ снижения или предотвращения клинических признаков или заболеваний, вызванных заражением посредством PEDV у поросёнка, где указанный способ содержит:

- введение свиноматке иммуногенной композиции по любому из пунктов 56, 60 и 61 или вакцины или фармацевтической композиции по любому из пунктов 62, 66 и 67, и

- вскармливание указанного поросёнка указанной свиноматкой.

84. Способ по пункту 83, где указанная свиноматка является свиноматкой, которая беременна, в частности, указанным поросёнком.

85. Способ по пункту 83 или 84, включающий в себя следующие стадии:

- введение иммуногенной композиции по любому из пунктов 56, 60 и 61 или вакцины или фармацевтической композиции по любому из пунктов 62, 66 и 67 свиноматке, которая беременна указанным поросёнком,

- рождение указанной свиноматкой указанного поросёнка и

- вскармливание указанного поросенка указанной свиноматкой.

86. Способ по любому из пунктов 82 - 85, где указанную иммуногенную композицию или указанную вакцину или фармацевтическую композицию вводят указанной свиноматке через слизистую оболочку, предпочтительно интраназально.

87. Набор для индукции иммунного ответа против по меньшей мере одного патогена у животного или для вакцинации животного, предпочтительно домашнего животного, такого как собака или кошка и/или любого другого домашнего или дикого плотоядного животного, или животного, выращиваемого в продовольственных целях, такого как свинья или крупный рогатый скот, против заболевания, связанного с и/или для снижения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с или вызванных по меньшей мере одним патогеном у животного, содержащий:

а) шприц или распылитель, пригодный для введения вакцины указанному животному; и

б) иммуногенную композицию по любому из пунктов 56 - 61 или вакцину по любому из пунктов 62 - 67, и

в) необязательно листок-вкладыш с инструкцией,

и где указанный по меньшей мере один патоген предпочтительно представляет собой CDV и/или CPV

или где указанный по меньшей мере один патоген необязательно представляет собой SwIV или PEDV.

88. Способ по пункту 71 или 72, иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов 73 - 79, способ по любому из пунктов 80 - 86 или набор по пункту 87, где указанная иммуногенная композиция представляет собой иммуногенную композицию по пункту 68, и где указанный по меньшей мере один патоген представляет собой указанный вызывающий заболевание агент, антиген которого кодируется представляющей интерес нуклеотидной последовательностью.

89. Способ по пункту 71 или 72, иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция для применение по любому из пунктов 73 - 79, способ по любому из пунктов 80 - 86 или набор по пункту 87, где указанная иммуногенная композиция представляет собой иммуногенную композицию по пункту 69, и где указанный по меньшей мере один патоген представляет собой указанный вирус *Paramyxoviridae*, указанный вызывающий заболевание агент, антиген которого кодируется представляющей интерес нуклеотидной последовательностью.

90. Способ по пункту 71 или 72, иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов 73 - 79, способ по любому из пунктов 80 - 86 или набор по пункту 87, где указанная иммуногенная композиция представляет собой иммуногенную композицию по пункту 70, и где указанный по меньшей мере один патоген представляет собой указанный вирус *Paramyxoviridae* и указанный вызывающий заболевание агент,

антиген которого кодируется представляющей интерес нуклеотидной последовательностью.

91. Способ по пункту 71 или 72, иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов 73 - 79, способ по любому из пунктов 80 - 86 или набор по пункту 87, где указанная иммуногенная композиция представляет собой иммуногенную композицию по пункту 70, и где указанный по меньшей мере один патоген представляет собой CDV и CPV.

92. Способ по любому из пунктов 72, 80, 81 и 88 - 91, где указанное животное является представителем семейства собачьих, и где указанный представитель семейства собачьих предпочтительно является собакой.

93. Способ по любому из пунктов 72, 80, 81 и 88 - 91, где указанное животное является представителем семейства кошачьих, и где указанный представитель семейства кошачьих предпочтительно является кошкой.

94. Иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов 73 - 75, и 88 - 91, где указанное животное является представителем семейства собачьих, и где указанный представитель семейства собачьих предпочтительно является собакой.

95. Иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов 73 - 75, и 88 - 91, где указанное животное является представителем семейства кошачьих, и где указанный представитель семейства кошачьих предпочтительно является кошкой.

96. Набор по любому из пунктов 87 и 88 - 91, где указанное животное является представителем семейства собачьих, и где указанный представитель семейства собачьих предпочтительно является собакой.

97. Набор по любому из пунктов 87 и 88 - 91, где указанное животное является представителем семейства кошачьих, и где указанный представитель семейства кошачьих предпочтительно является кошкой.

СПИСОК ПРОЦИТИРОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ:

Нижеследующие ссылки в той мере, в которой они предоставляют примерные процедурные или иные подробности, дополняющие изложенные в настоящей заявке, специально включены в настоящую заявку посредством ссылки.

1. Parks CL, Wang HP, Kovacs GR, Vasilakis N, Kowalski J, Nowak RM, Lerch RA, Walpita P, Sidhu MS, Udem SA. 2002. Expression of a foreign gene by recombinant canine distemper virus recovered from cloned DNAs. Virus Res;83(1-2):131-47.

2. von Messling V, Milosevic D, Devaux P, Cattaneo R. 2004. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. J Virol. 78(15):7894-903.

3. Wang X, Feng N, Ge J, Shuai L, Peng L, Gao Y, Yang S, Xia X, Bu Z. 2012 Recombinant canine distemper virus serves as bivalent live vaccine against rabies and canine distemper. Vaccine 30(34):5067-72. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.001. Epub 2012 Jun 12.

4. Glover S, Anderson C, Piontkowski M, Terry N (2012) Canine Parvovirus (CPV) type 2b vaccine protect puppies with maternal antibodies to CPV when challenged with virulent CPV 2 C virus. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine 10: 217-224

5. Taguchi M, Namikawa K, Maruo T, Orito K, Lynch J, Sahara H. Antibody titers for canine parvovirus type-2, canine distemper virus, and canine adenovirus type-1 in adult household dogs. The Canadian Veterinary Journal. 2011;52(9):983-986.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экспрессионная кассета для вставки между двумя смежными жизненно необходимыми генами (1; 2) вируса *Paramyxoviridae*, так что первый ген (1) расположен в 3′-направлении, а второй ген (2) расположен в 5′-направлении экспрессионной кассеты, где указанная экспрессионная кассета содержит:

- первую нуклеотидную последовательность, где указанная первая нуклеотидная последовательность представляет собой гетерологичную или экзогенную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, и

- вторую нуклеотидную последовательность, фланкирующую 5′-конец первой нуклеотидной последовательности, где указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1), и

- третью нуклеотидную последовательность, фланкирующую 3′-конец первой нуклеотидной последовательности, где указанная третья нуклеотидная последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующей области гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из жизненно важных генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2).

2. Экспрессионная кассета по п. 1, где указанная экспрессионная кассета состоит из:

- указанной первой нуклеотидной последовательности, и

- указанной второй нуклеотидной последовательности, и

- указанной третьей нуклеотидной последовательности, и

- дополнительной нуклеотидной последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной второй нуклеотидной последовательности или фланкирующей 3′-конец указанной третьей нуклеотидной последовательности, причем указанная дополнительная нуклеотидная последовательность представляет собой межгенную последовательность вируса *Paramyxoviridae*.

3. Экспрессионная кассета по п. 1 или 2, где указанная третья нуклеотидная последовательность состоит из:

- 3′-некодирующей области гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2), и

- последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′ некодирующей области кодирует консенсусную последовательность для инициации или усиления трансляции, и причем указанная консенсусная последовательность для инициации или усиления трансляции необязательно является последовательностью Козак.

4. Экспрессионная кассета по любому из пп. 1 - 3 для вставки между геном P и геном M вируса *Paramyxoviridae*, где

- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая первый ген (1), представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, за исключением гена P вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген N, M, F, H и L вируса *Paramyxoviridae*, и

- указанная группа, состоящая из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2), представляет собой группу, состоящую из жизненно необходимых генов вируса *Paramyxoviridae*, за исключением гена M вируса *Paramyxoviridae*, и где указанный ген необязательно выбран из группы, включающей в себя ген H, P, F, L и N вируса *Paramyxoviridae*.

5. Экспрессионная кассета по любому из пп. 1 - 4, где указанные нуклеотидные последовательности являются последовательностями РНК, и/или

где указанная первая нуклеотидная последовательность функционально связана с последовательностью начала гена (GS), включенной в указанную третью нуклеотидную последовательность, и/или с промотором генома вируса *Paramyxoviridae*.

6. Вирусный вектор *Paramyxoviridae*, содержащий экспрессионную кассету по любому из пп. 1 - 5.

7. Экспрессионная кассета по любому из пп. 1 - 5 или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по п. 6, где

- указанная 5′-некодирующая область представляет собой 5′-некодирующую область гена N вируса *Paramyxoviridae*, и/или
- указанная 3′-некодирующая область представляет собой 3′-некодирующую область гена H вируса *Paramyxoviridae*,

и/или где указанная экспрессионная кассета является вставкой между геном P и геном M вируса *Paramyxoviridae*.

8. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанный вирус *Paramyxoviridae* представляет собой CDV, и где 5′-некодирующая область гена CDV выбрана из группы, состоящей из:

5′-некодирующей области гена N CDV, где 5′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:1,

5′-некодирующей области гена P CDV, где 5′-некодирующая область гена P CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:2,

5′-некодирующей области гена M CDV, где 5′-некодирующая область гена M CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:3,

5′-некодирующей области гена F CDV, где 5′-некодирующая область гена F CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая

по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:4,

5′-некодирующей области гена H CDV, где 5′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:5, и

5′-некодирующей области гена L CDV, где 5′-некодирующая область гена L CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:6.

9. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанный вирус *Paramyxoviridae* представляет собой CDV, и где 3′-некодирующая область гена CDV выбрана из группы, состоящей из:

3′-некодирующей области гена H CDV, где 3′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:7,

3′-некодирующей области гена N CDV, где 3′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:8,

3′-некодирующей области гена P CDV, где 3′-некодирующая область гена P CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:9,

3′-некодирующей области гена M CDV, где 3′-некодирующая область гена M CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:10,

3′-некодирующей области гена F CDV, где 3′-некодирующая область гена F CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:11 и

3′-некодирующей области гена L CDV, где 3′-некодирующая область гена L CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:12.

10. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная вторая нуклеотидная последовательность представляет собой 5′-некодирующую область гена N CDV, и где указанная 5′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:1.

11. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где

- указанная 3′-некодирующая область гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены вируса *Paramyxoviridae*, исключая второй ген (2) представляет собой 3′-некодирующую область гена H CDV, и где указанная 3′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:7, и/или

- указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области последовательности, кодирует последовательность Козак длиной от 5 до 8 нуклеотидов, и где последовательность Козак предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на

70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:13.

12. Экспрессионная кассета по любому из пп. 2 - 5 и 8 - 11 или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пп. 6, и 8 - 11, где указанная межгенная последовательность вируса *Paramyxoviridae* представляет собой межгенную последовательность CDV, и где указанная межгенная последовательность CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 66% идентична последовательности SEQ ID NO:14.

13. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из пп. 6 - 12, дополнительно содержащий:

- последовательность РНК, которая фланкирует 5′-конец межгенной последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной второй нуклеотидной последовательности, где указанная последовательность РНК состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:23, и/или
- последовательность РНК, которая фланкирует 3′-конец межгенной последовательности, фланкирующей 3′-конец указанной третьей нуклеотидной последовательности, где указанная последовательность РНК состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:24.

14. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность кодирует:

- белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и где указанная последовательность, кодирующая белок VP2 CPV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:15; или

- гемагглютинин подтипа H3 (H3), предпочтительно H3 вируса свиного гриппа, и где указанная последовательность, кодирующая H3, предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:16; или

- белок VP2 собачьего парвовируса (CPV), и где указанный белок VP2 CPV предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35; или

- гемагглютинин подтипа H3 (H3), в частности H3 вируса свиного гриппа, и где указанный H3 предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:36.

15. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, где указанная экспрессионная кассета состоит из или указанный вирусный вектор *Paramyxoviridae* содержит:

- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:18; или

- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20.

16. Вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов содержащий:

- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:21; или
- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:22.

17. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует экспрессионную кассету или вирусный вектор *Paramyxoviridae* по любому из предыдущих пунктов, и где указанная молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой молекулу ДНК.

18. Клетка-хозяин млекопитающего, содержащая экспрессионную кассету или вирусный вектор *Paramyxoviridae*, или молекулу ДНК или молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов.

19. Экспрессионная кассета или вирусный вектор *Paramyxoviridae* или молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины.

20. Конструкция ДНК, содержащая молекулу ДНК по п. 17.

21. Способ получения инфекционного вируса *Paramyxoviridae*, содержащего гетерологичный ген, в частности для получения вирусного вектора *Paramyxoviridae* по любому из пп. 6 - 16, где указанный способ содержит стадии:

а. обеспечение клетки-хозяина, экспрессирующей гетерологичную РНК-полимеразу;

б. трансфекция клетки-хозяина конструкцией ДНК по п. 20, и где молекула ДНК транскрибируется гетерологичной РНК-полимеразой и

в. выделение вирусов, продуцируемых клетками.

22. Вакцина или фармацевтическая композиция, содержащая:

а. вектор по любому из пп. 6 - 16 и

б. рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором, и/или вирусоподобную частицу, содержащую множество рекомбинантных белков, экспрессируемых указанным вектором и

в. приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения и

г. необязательно указанная вакцина дополнительно содержит вспомогательное средство.

23. Вакцина или фармацевтическая композиция по п. 22, где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый вектором, представляет собой

- антиген VP2 парвовируса, такой как белок VP2 CPV или
- белок оболочки вируса гриппа, где указанный белок оболочки необязательно представляет собой гемагглютинин, такой как H3.

24. Вакцина или фармацевтическая композиция по п. 22 или 23, содержащая или состоящая из:

а. вектора CDV по любому из пп. 14 - 16 и

б. полипептида или рекомбинантного белка, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36 и

в. приемлемого в фармацевтике или ветеринарии носителя или наполнителя, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения

г. и необязательно вспомогательного средства.

25. Вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пп. 22 - 24 для применения в способе снижения или предотвращения клинических признаков или

заболевания, вызванного заражением по меньшей мере одним патогеном у животного, и где указанное заражение по меньшей мере одним патогеном необязательно представляет собой:

- заражение посредством CDV и/или CPV или
- заражение вирусом свиного гриппа, где вирус свиного гриппа необязательно представляет собой вирус гриппа подтипа H3, и где указанный вирус гриппа подтипа H3 предпочтительно представляет собой вирус свиного гриппа подтипа H3N2 или H3N1.

26. Набор для вакцинации животного, предпочтительно домашнего животного, такого как собака или кошка и/или любого другого домашнего или дикого плотоядного животного, или животного, выращиваемого в продовольственных целях, такого как свинья или крупный рогатый скот, против заболевания, связанного с и/или для снижения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с или вызванных по меньшей мере одним патогеном у животного, включающий в себя:

а) шприц или распылитель, пригодный для введения вакцины указанному животному; и

б) вакцину или фармацевтическую композицию по любому из пп. 22 - 24, и

в) необязательно листок-вкладыш с инструкцией,

и где указанный по меньшей мере один патоген предпочтительно представляет собой CDV и/или CPV

или где указанный по меньшей мере один патоген необязательно представляет собой SwIV.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экспрессионная кассета встроена между P геном и M геном вируса чумы собак (CDV), где указанная экспрессионная кассета содержит:

- первую РНК последовательность, где указанная первая РНК последовательность представляет собой гетерологичную или экзогенную представляющую интерес РНК последовательность, и

- вторую РНК последовательность, фланкирующую 5′-конец первой РНК последовательности, где указанная вторая РНК последовательность представляет собой 5′-некодирующую область N-гена CDV и

- третью РНК последовательность, фланкирующую 3′-конец первой РНК последовательности, где указанная третья РНК последовательность содержит или состоит из 3′-некодирующей области гена, где указанный ген выбирают из группы, состоящей из H, P, F, L и N генов CDV.

2. Экспрессионная кассета по п. 1, где указанная экспрессионная кассета состоит из:

- указанной первой РНК последовательности, и

- указанной второй РНК последовательности, и

- указанной третьей РНК последовательности, и

- дополнительной РНК последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной второй РНК последовательности или фланкирующей 3′-конец указанной РНК последовательности, причем указанная дополнительная РНК последовательность представляет собой межгенную последовательность CDV.

3. Экспрессионная кассета по п. 1 или п. 2, где указанная третья РНК последовательность состоит из:

- 3′-некодирующей области гена, выбранного из группы, включающей H, P, F, L и N гены CDV, и

- последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной 3′-некодирующей области, где указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′ некодирующей области, кодирует консенсусную последовательность для инициации или усиления трансляции, и причем указанная консенсусная

последовательность для инициации или усиления трансляции необязательно является последовательностью Козак.

4. Экспрессионная кассета по любому из пп. 1 - 3,

где указанная первая РНК последовательность функционально связана с последовательностью начала гена (GS), включенной в указанную третью РНК последовательность, и/или с промотором генома CDV.

5. CDV вектор, содержащий экспрессионную кассету по любому из пп. 1 - 4.

6. Экспрессионная кассета по любому из пп. 1 - 4 или CDV вектор по п.5, где

- указанная 3′-некодирующая область представляет собой 3′-некодирующую область гена H CDV,

7. Экспрессионная кассета или CDV вектор по любому из п.п. 1-4 и 6, где 3′-некодирующая область гена CDV выбрана из группы, состоящей из:

3′-некодирующей области гена H CDV, где 3′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:7,

3′-некодирующей области гена N CDV, где 3′-некодирующая область гена N CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:8,

3′-некодирующей области гена P CDV, где 3′-некодирующая область гена P CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:9,

3′-некодирующей области гена F CDV, где 3′-некодирующая область гена F CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:11 и

3′-некодирующей области гена L CDV, где 3′-некодирующая область гена L CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:12.

8. Экспрессионная кассета или CDV вектор по любому из предыдущих пунктов, где указанная 5′-некодирующая область гена N CDV состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:1.

9. Экспрессионная кассета или CDV вектор по любому из предыдущих пунктов, где

- указанная 3′-некодирующая область гена, выбранного из группы, включающей в себя жизненно необходимые гены CDV, исключая второй ген (2) представляет собой 3′-некодирующую область гена H CDV, и где указанная 3′-некодирующая область гена H CDV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:7, и

- указанная последовательность, фланкирующая 5′-конец указанной 3′-некодирующей области последовательности, кодирует последовательность Козак длиной от 5 до 8 рибонуклеиновых кислот, и где последовательность Козак предпочтительно содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:13.

10. Экспрессионная кассета по любому из пп. 2 - 4 и 7 - 9 или вектор CDV по любому из пп. 5 и 7 - 9, где указанная межгенная последовательность CDV представляет собой межгенную последовательность CDV, и где указанная межгенная последовательность CDV предпочтительно содержит последовательность РНК SEQ ID NO:14.

11. CDV вектор по любому из пп. 5 - 10, дополнительно содержащий:

- последовательность РНК, которая фланкирует 5′-конец межгенной последовательности, фланкирующей 5′-конец указанной второй последовательности РНК, где указанная последовательность РНК состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:23, и/или

- последовательность РНК, которая фланкирует 3′-конец межгенной последовательности, фланкирующей 3′-конец указанной третьей последовательности РНК, где указанная последовательность РНК состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:24.

12. Экспрессионная кассета или CDV вектор по любому из предыдущих пунктов, где указанная представляющая интерес последовательность РНК кодирует:

- белок VP2 парвовируса у собаки (CPV), и где указанная последовательность, кодирующая белок VP2 CPV предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:15; или

- гемагглютинин подтипа H3 (H3), предпочтительно H3 вируса свиного гриппа, и где указанная последовательность, кодирующая H3, предпочтительно состоит из или содержит последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:16; или

- белок VP2 парвовируса собаки (CPV), и где указанный белок VP2 CPV предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35; или

- гемагглютинин подтипа H3 (H3), в частности H3 вируса свиного гриппа, и где указанный H3 предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:36.

13. Экспрессионная кассета или CDV вектор по любому из предыдущих пунктов, где указанная экспрессионная кассета состоит из или указанный CDV вектор содержит:

- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:18; или

- полинуклеотид, имеющий последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:20.

14. CDV вектор по любому из предыдущих пунктов содержащий:

- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:21; или

- последовательность РНК, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:22.

15. Молекула ДНК, которая кодирует экспрессионную кассету, или CDV вектор по любому из предыдущих пунктов.

16. Клетка-хозяин млекопитающего, содержащая экспрессионную кассету или CDV вектор, или молекулу ДНК по любому из предыдущих пунктов.

17. Экспрессионная кассета или CDV вектор или молекула ДНК по любому из предыдущих пунктов для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины.

18. Конструкция ДНК, содержащая молекулу ДНК по п. 15.

19. Способ получения инфекционного CDV, содержащего гетерологичный ген, в частности для получения CDV вектора по любому из пп. 5 - 14, где указанный способ содержит стадии:

а. обеспечение клетки-хозяина, экспрессирующей гетерологичную РНК-полимеразу;

б. трансфекции клетки-хозяина конструкцией ДНК по п. 18, и где молекула ДНК транскрибируется гетерологичной РНК-полимеразой и

в. выделения вирусов, продуцируемых клетками.

20. Вакцина или фармацевтическая композиция, содержащая:

а. вектор по любому из пп. 5 – 14, и

б. рекомбинантный белок, экспрессируемый указанным вектором и/или вирусоподобную частицу, содержащую множество рекомбинантных белков, экспрессируемых указанным вектором, и

в. приемлемый в фармацевтике или ветеринарии носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения, и

г. необязательно указанная вакцина дополнительно содержит вспомогательное средство.

21. Вакцина или фармацевтическая композиция по п. 20, где указанный рекомбинантный белок, экспрессируемый вектором, представляет собой

- антиген VP2 парвовируса, такой как белок VP2 CPV или

- белок оболочки вируса гриппа, где указанный белок оболочки необязательно представляет собой гемагглютинин, такой как H3.

22. Вакцина или фармацевтическая композиция по п. 20 или 21, содержащая или состоящая из:

а. вектора CDV по любому из пп. 12 - 14 и

б. полипептида или рекомбинантного белка, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36 и

в. приемлемого в фармацевтике или ветеринарии носителя или наполнителя, предпочтительно указанный носитель пригоден для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального применения

г. и необязательно вспомогательного средства.

23. Вакцина или фармацевтическая композиция по любому из пп. 20 - 22 для применения в способе снижения или предотвращения клинических признаков или заболевания, вызванного заражением по меньшей мере одним патогеном у животного, и где указанное заражение по меньшей мере одним патогеном необязательно представляет собой:

- заражение посредством CDV и/или CPV или
- заражение вирусом свиного гриппа, где вирус свиного гриппа необязательно представляет собой вирус гриппа подтипа H3, и где указанный вирус гриппа подтипа H3 предпочтительно представляет собой вирус свиного гриппа подтипа H3N2 или H3N1.

24. Набор для вакцинации животного, предпочтительно домашнего животного, такого как собака или кошка и/или любого другого домашнего или дикого плотоядного животного, или животного, выращиваемого в продовольственных целях, такого как свинья или крупный рогатый скот, против заболевания, связанного с и/или для снижения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с или вызванных по меньшей мере одним патогеном у животного, включающий в себя:

а) шприц или распылитель, пригодный для введения вакцины указанному животному; и

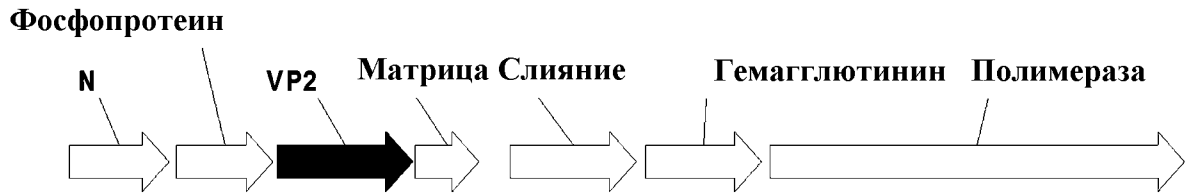
б) вакцину или фармацевтическую композицию по любому из пп. 20 - 22, и

в) необязательно листок-вкладыш с инструкцией,

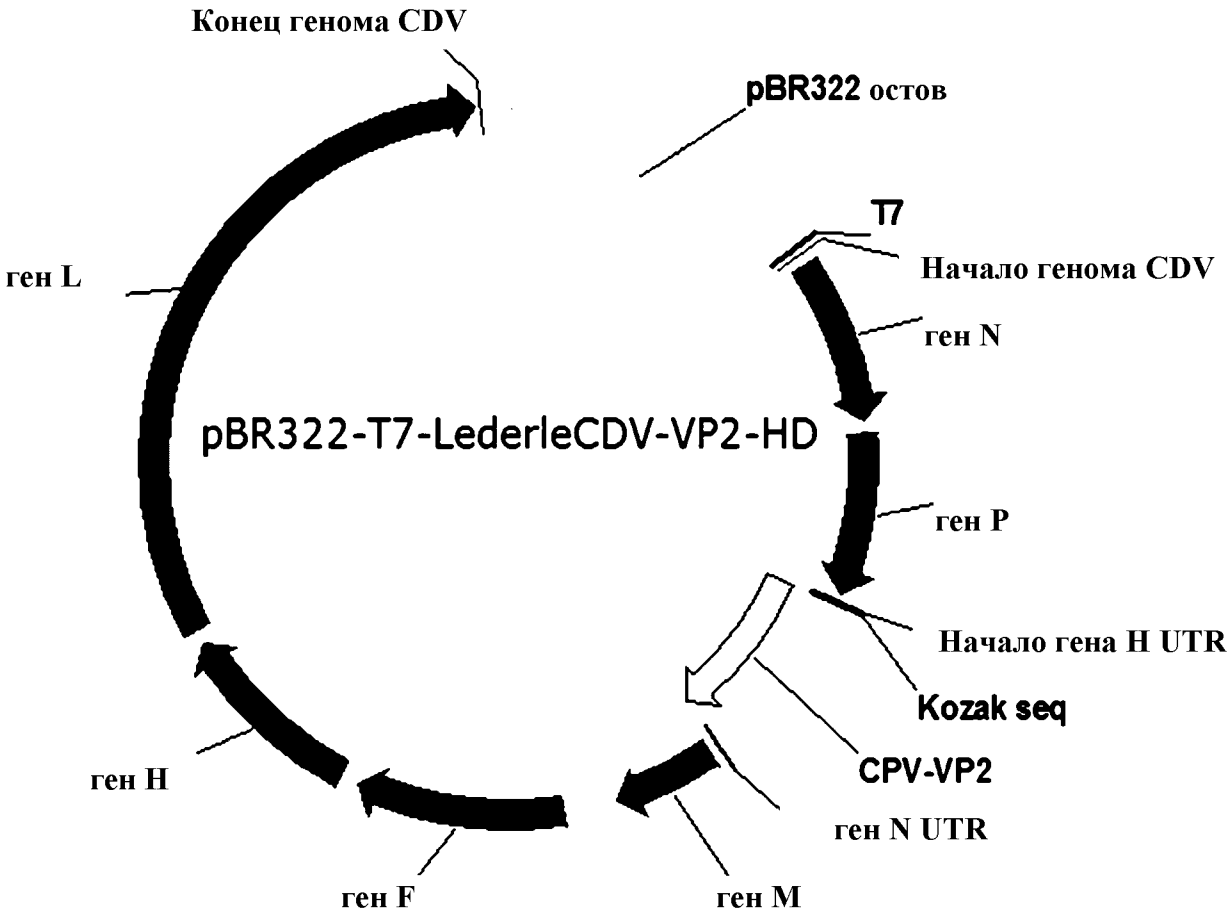
и где указанный по меньшей мере один патоген предпочтительно представляет собой CDV и/или CPV

или где указанный по меньшей мере один патоген необязательно представляет собой SwIV.

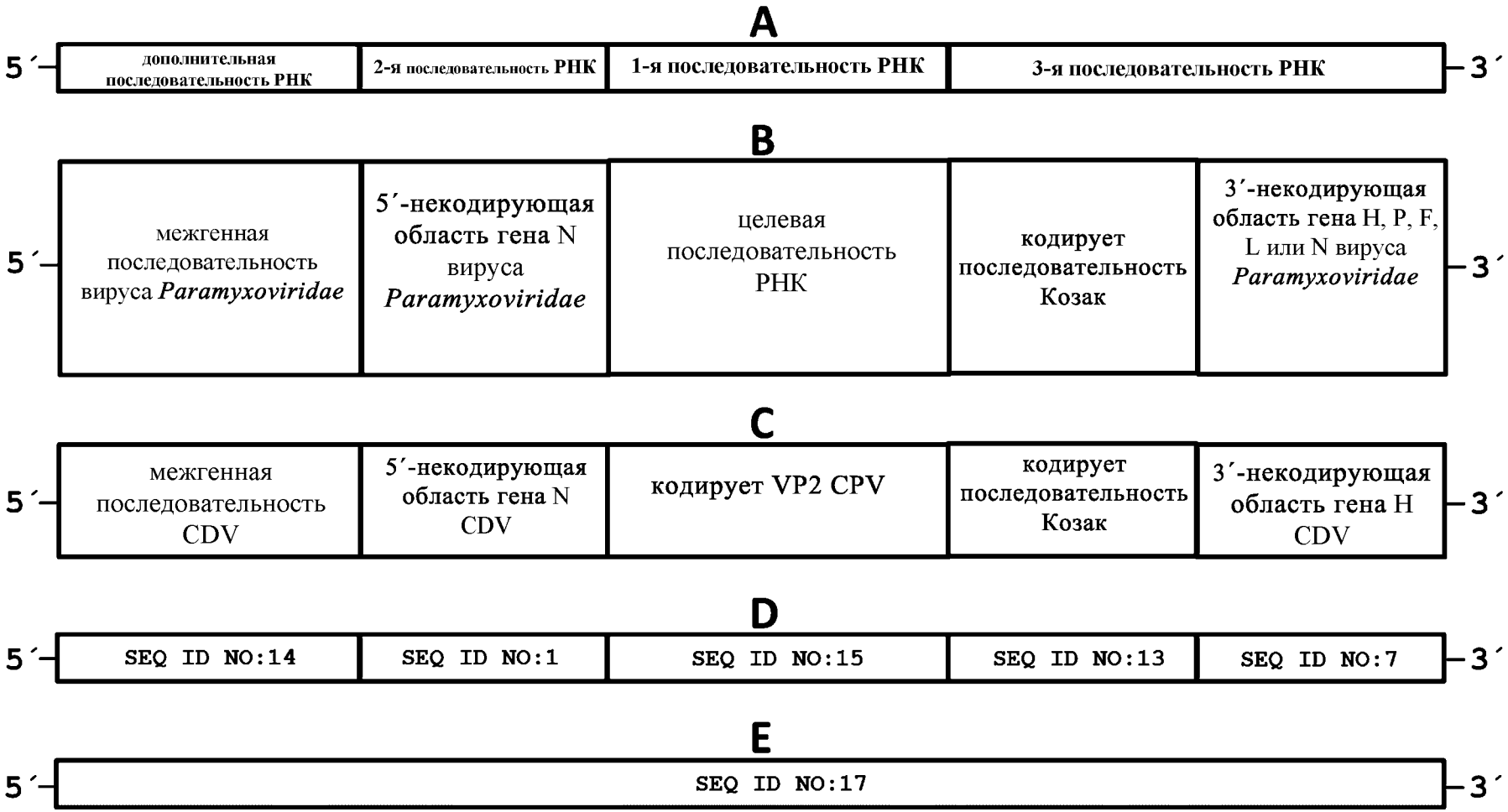
Фиг. 1


Фосфопротеин
N
VP2
Матрица
Слияние
Гемагглютинин
Полимераза

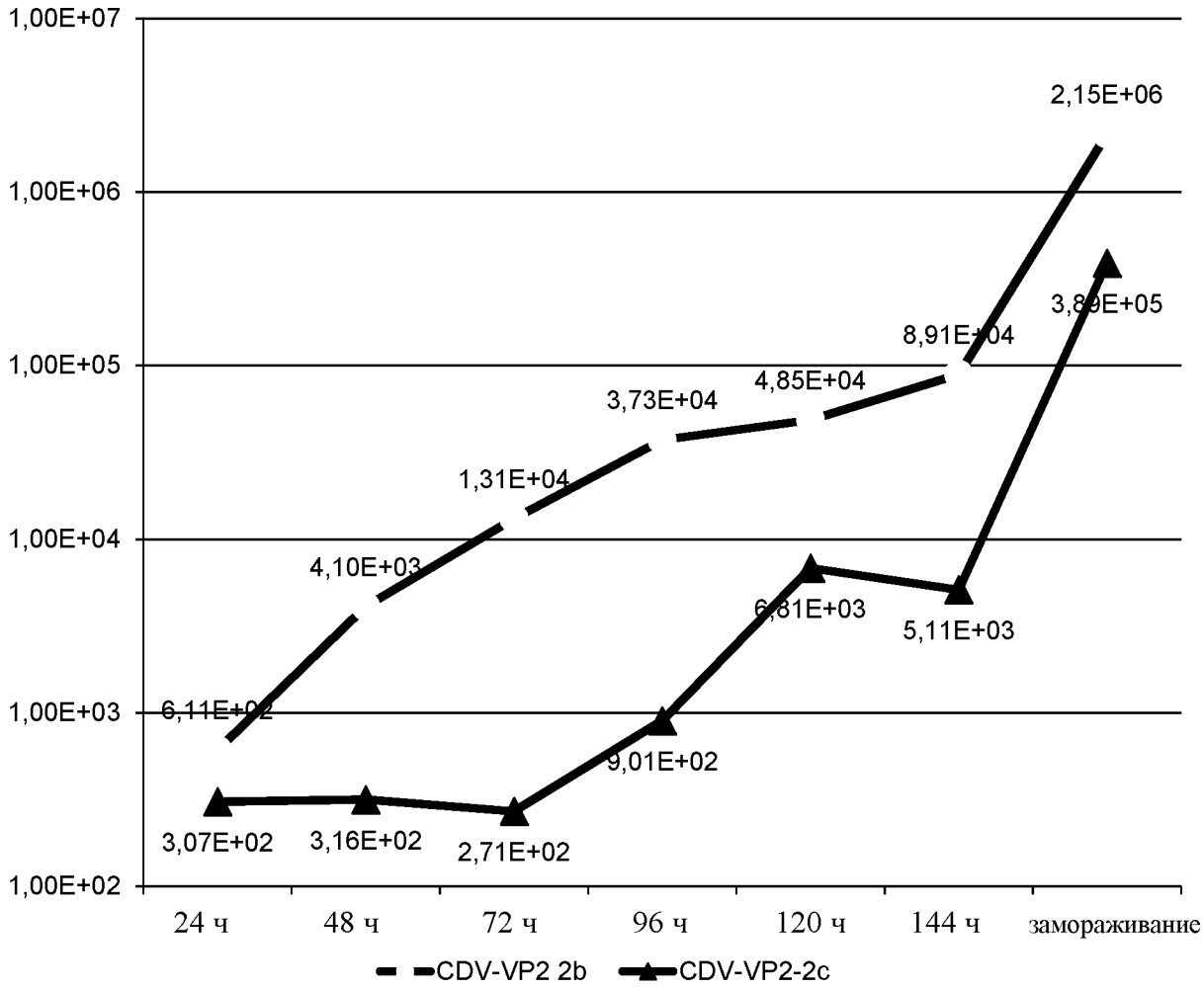
Фиг. 2


Конец генома CDV
pBR322 остов
T7
Начало генома CDV
ген N
ген P
Начало гена H UTR
Kozak seq
CPV-VP2
ген N UTR
ген M
ген F
ген H
ген L
pBR322-T7-LederleCDV-VP2-HD

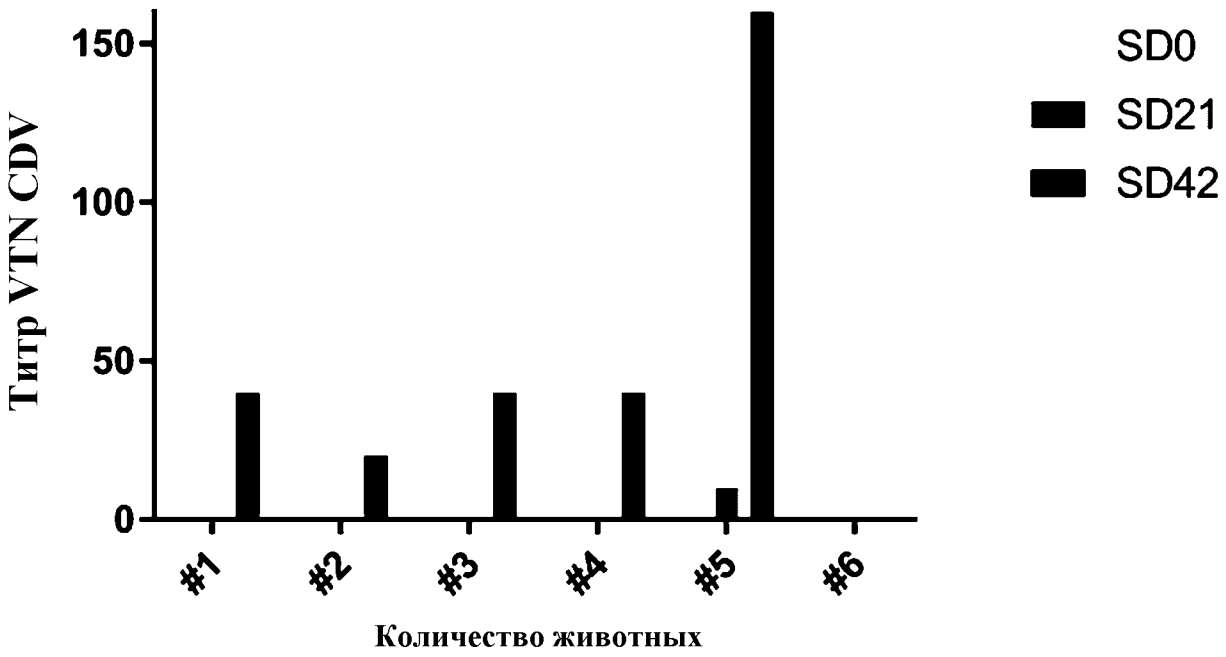
Фиг. 3


A
5′
дополнительная последовательность РНК
2-я последовательность РНК
1-я последовательность РНК
3-я последовательность РНК
3′
B
5′
межгенная последовательность вируса *Paramyxoviridae*
5′-некодирующая область гена N вируса *Paramyxoviridae*
целевая последовательность РНК
кодирует последовательность Козак
3′-некодирующая область гена H, P, F, L или N вируса *Paramyxoviridae*
3′
C
5′
межгенная последовательность CDV
5′-некодирующая область гена N CDV
кодирует VP2 CPV
кодирует последовательность Козак
3′-некодирующая область гена H CDV
3′
D
5′
SEQ ID NO:14
SEQ ID NO:1
SEQ ID NO:15
SEQ ID NO:13
SEQ ID NO:7
3′
E
5′
SEQ ID NO:17
3′

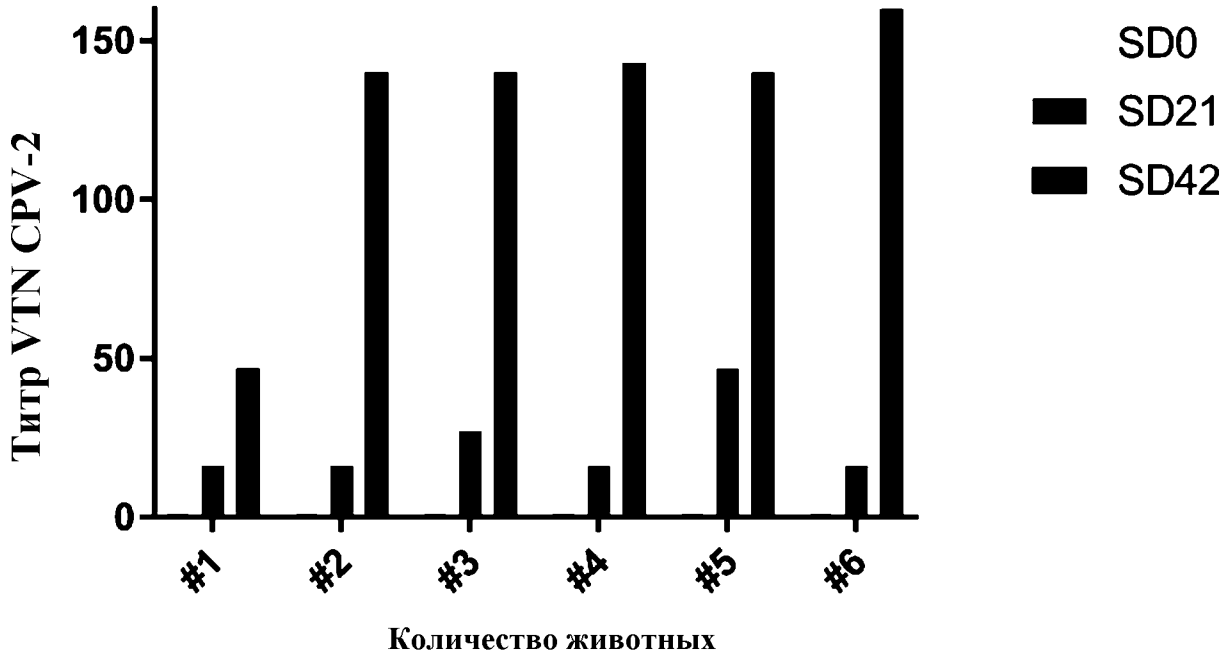
Фиг. 4


1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
1,00E+04
1,00E+03
1,00E+02
2,15E+06
3,89E+05
8,91E+04
4,85E+04
3,73E+04
1,31E+04
4,10E+03
6,11E+02
6,81E+03
5,11E+03
9,01E+02
3,07E+02
3,16E+02
2,71E+02
24 ч
48 ч
72 ч
96 ч
120 ч
144 ч
замораживание
CDV-VP2 2b
CDV-VP2-2c

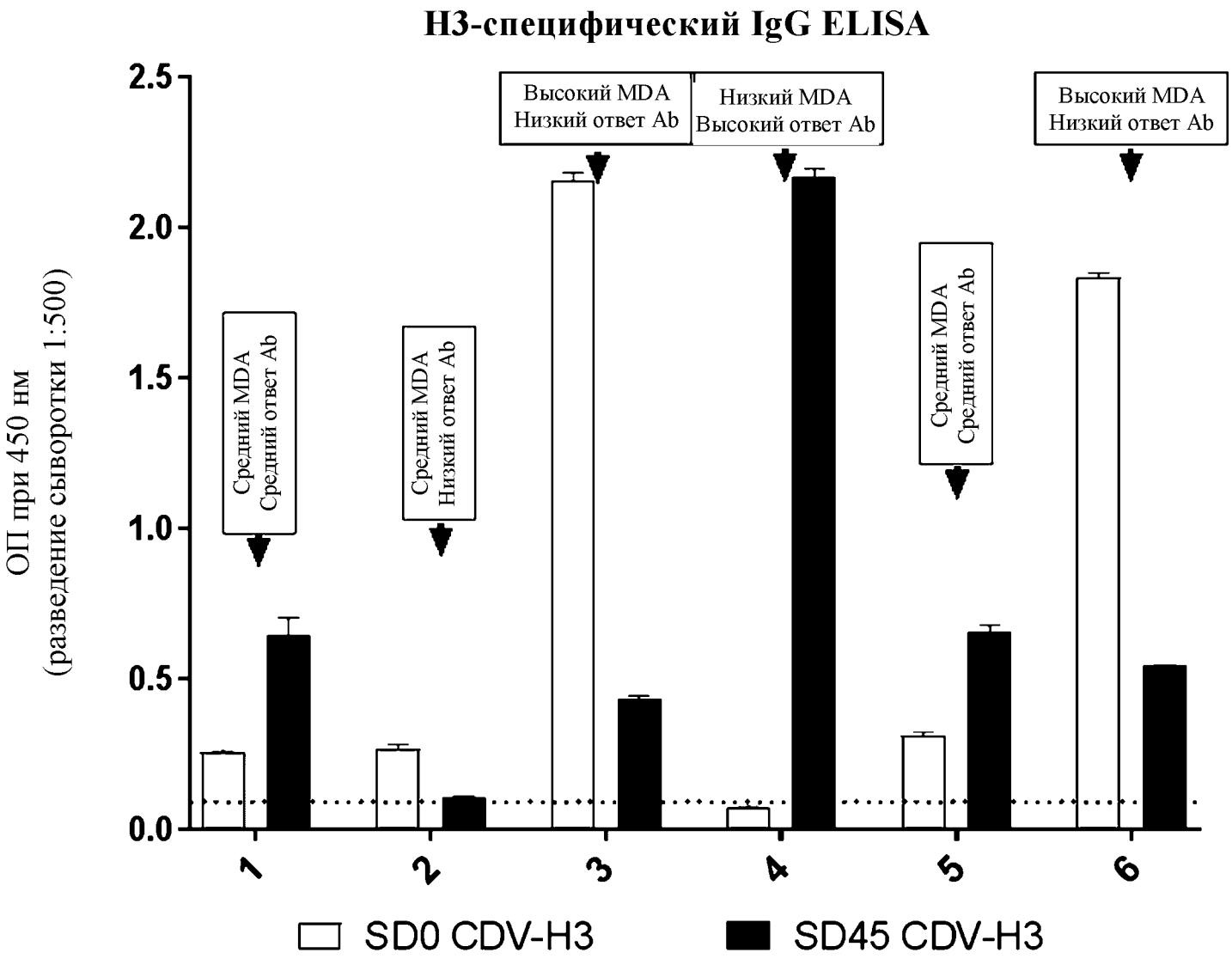
Фиг. 5

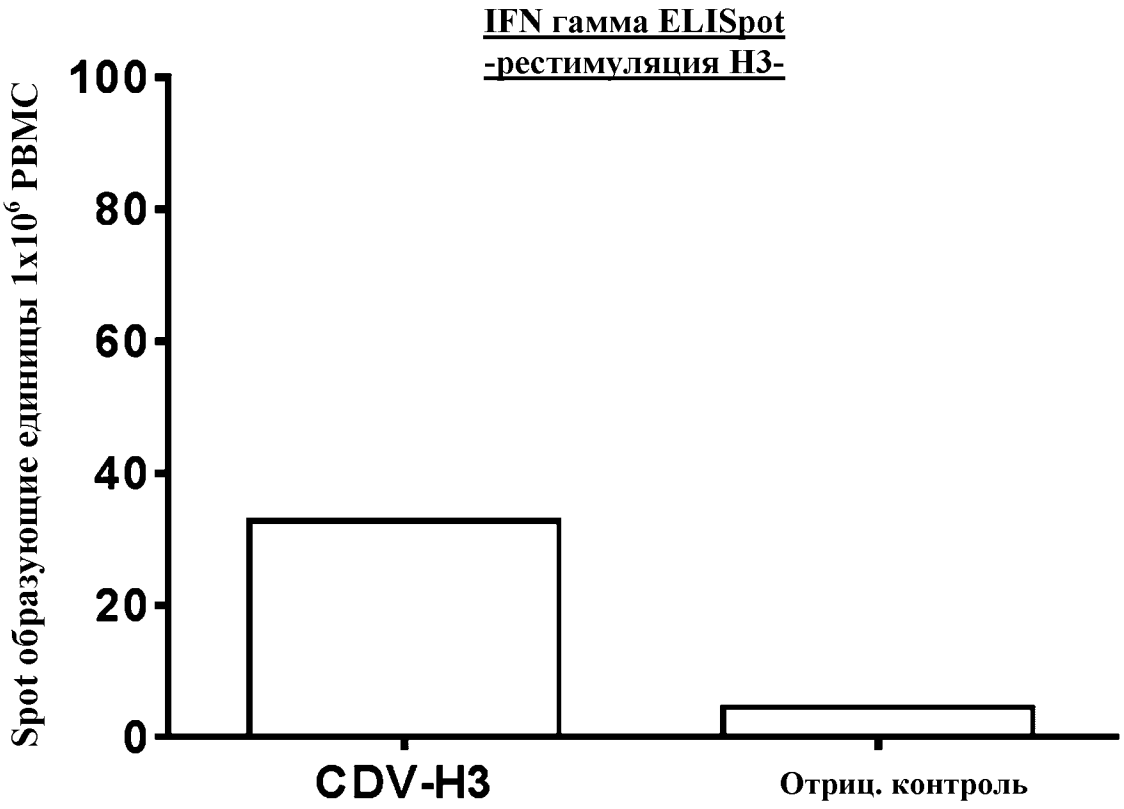

Титр VTN CDV
150
100
50
0
#1
#2
#3
#4
#5
#6
Количество животных
SD0
SD21
SD42

Фиг. 6


Титр VTN CPV-2
150
100
50
0
#1
#2
#3
#4
#5
#6
Количество животных
SD0
SD21
SD42

Фиг. 7


H3-специфический IgG ELISA
ОП при 450 нм
(разведение сыворотки 1:500)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Средний MDA
Средний ответ Ab
Средний MDA
Низкий ответ Ab
Высокий MDA
Низкий ответ Ab
Низкий MDA
Высокий ответ Ab
Средний MDA
Средний ответ Ab
Высокий MDA
Низкий ответ Ab
1
2
3
4
5
6
SD0 CDV-H3
SD45 CDV-H3


IFN гамма ELISpot
-рестимуляция H3-
Spot образующие единицы 1x10^6 PBMC
100
80
60
40
20
0
CDV-H3
Отриц. контроль

Фиг. 8