

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191845** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2021.09.21**

(51) Int. Cl. *C12N 7/00* (2006.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2014.12.19**

---

(54) **ВАРИАНТ ВИРУСА РРСС, КЛОН КДНК ВИРУСА РРСС ЕВРОПЕЙСКОГО ТИПА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **13199177.0; 14175691.6**

(32) **2013.12.20; 2014.07.03**

(33) **EP**

(62) **201600476; 2014.12.19**

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

(72) Изобретатель:

**Галлай Андреас, Келлер Кристоф,  
Шахт Эрик, Херрель Мариэке (DE)**

(74) Представитель:

**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) Изобретение относится к области здоровья животных и обеспечивает средства для исследования репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), вирусного заболевания, которое поражает свиней, и для разработки вакцин, терапевтических и диагностических средств для профилактики, лечения и диагностики РРСС. В первом рассмотрении изобретение относится к новому варианту вируса РРСС. Во втором рассмотрении изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая включает геном клона вируса РРСС инфекционного генотипа I (EU). На основе этого обеспечиваются новые кандидаты для РРСС вакцины с улучшенными свойствами.

---

**A1**

**202191845**

**202191845**

**A1**

5

10

15

Заявка №

Заявитель БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ

ВЕТМЕДИКА ГМБХ, DE

20

ВАРИАНТ ВИРУСА РРСС, КЛОН КДНК ВИРУСА РРСС ЕВРОПЕЙСКОГО  
ТИПА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области здоровья животных.

25

В первом рассмотрении изобретение относится к новому варианту вируса РРСС. Изобретение также относится к применению такого вируса РРСС для изучения репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), вирусного заболевания, которое поражает свиней, и к разработке вакцин, терапевтических и диагностических средств для профилактики, лечения и диагностики РРСС.

30

Во втором рассмотрении изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая включает геном клона вируса РРСС инфекционного генотипа I (EU). Изобретение также относится к применению последовательности нуклеиновой кислоты клона вируса РРСС инфекционного

генотипа I для получения аттенуированных живых вирусов, полезных для предотвращения или лечения репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) у свиней и при разработке вакцин, терапевтических и диагностических средств для профилактики, лечения и диагностики PPCC.

5 Сочетание указанных двух рассмотрений, а также новых вирусов PPCC с улучшенными свойствами обеспечивается в соответствии с третьим рассмотрением изобретения.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ УРОВНЕ ТЕХНИКИ

10 Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) представляет собой члена семейства вирусов *Arteriviridae* и принадлежит, вместе с *Coronaviridae*, к порядку вирусов *Nidovirales*. Вирус PPCC представляет собой вирусом, который имеет оболочку и геномом на основе двухцепочечной положительно-полярной нитью РНК размером приблизительно 15 килобаз, который включает девять открытых рамок считывания (ORF), в частности,  
15 ORF1a, ORF1ab, ORF2a, ORF2ab и ORF3 - ORF7. ORF1a и 1ab кодируют большие полипротеины, которые подвергаются процессингу с образованием вирусных неструктурных белков (nsp) путем ауто-расщепления и транс-расщепления вирусных протеаз nsp1, nsp2 и nsp4 (Snijder и Meulenberg, 1998). ORF4 кодирует минорный гликопротеин (GP4), который обнаруживается рядом с  
20 основным гликопротеином (GP5) и двумя другими минорными гликопротеинами (GP2a и GP3) в оболочке вируса, где все указанные гликопротеины являются важными для продукции инфекционного вируса.

Вирус PPCC рассматривается как один из экономически наиболее важных инфекционных агентов у свиней, который вызывает позднюю репродуктивную  
25 недостаточность у свиноматок и заболевания органов дыхания у растущих свиней. Часто инфекция вирусом PPCC осложняется вторичными бактериальными инфекциями, которые относятся к иммуносупрессивной природе вируса. Кроме того, вирусемия PPCC длится в течение нескольких недель, и вирус после этого все еще можно обнаружить в лимфоидных органах в  
30 течение нескольких месяцев, что демонстрирует сложности или недостаточность иммунного ответа хозяина для того, чтобы избавиться от вируса (Allende и др., 2000).

Существует два различных вирусных генотипа PPCC, вызывающие сходные клинические симптомы, которые отличаются примерно на 40% на уровне

нуклеотидной последовательности, генотип I (EU) и генотипа II (US). Североамериканский (US) прототипный штамм представляет собой VR-2332, в то время как Европейский (EU) прототипный штамм представляет собой вирус Lelystad.

5 Тем не менее, в первом рассмотрении, поскольку штаммы вируса РРСС обладают высоким биологическим разнообразием и быстро развиваются на отдельных фермах (Badaoui и др. BMC Veterinary Research 2013, 9:58), новые изоляты вируса РРСС являются необходимыми для лучшего понимания РРСС, для воспроизведения указанного заболевания в его различных формах, для  
10 сравнительных исследований, а также в качестве основы для разработки новых вакцин, лекарственных препаратов и диагностических средств для профилактики, лечения и диагностики РРСС.

Во втором рассмотрении растущее количество инфекционных клонов кДНК вируса РРСС становится доступным для научного сообщества, большинство из  
15 которых основываются на американском типе вируса. Для типа EU, однако, являются доступными лишь немногие клоны. Таким образом, существует острая необходимость в новых клонах инфекционных кДНК европейского (генотип I) вируса РРСС для лучшего понимания РРСС, для сравнительных исследований, в качестве основы для разработки новых вакцин, лекарственных препаратов и  
20 диагностических средств для профилактики, лечения и диагностики РРСС, в которых применение клонов кДНК приводит к высокому выходу продукции вируса. Таким образом, для экспериментального удобства в исследовании вакцины РРСС необходим клон инфекционной кДНК, который обеспечивал бы возможность получения вируса РРСС генотипа I в больших количествах.

## 25 ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Решение указанных технических задач достигается за счет описания и вариантов осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения.

Таким образом, изобретение в его различных аспектах и вариантах осуществления осуществляется в соответствии с формулой изобретения.

### 30 1. Первое рассмотрение настоящего изобретения

В соответствии с первым рассмотрением, которое подробно описано в данном разделе, изобретение основано на изоляции нового вируса РРСС, который неожиданно оказался способным вызывать серьезные клинические

симптомы у боровов. Более подробный анализ этого варианта вируса РРСС выявил существенную делецию в гене *orf4* указанного вируса.

В одном аспекте изобретение, таким образом, относится к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), где указанный вирус является выбранным из группы, состоящей из следующих (а), (б), (в), (г), (д) и (е):

(а) вируса РРСС, который включает ORF4 белок, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1-12;

10 (б) вируса РРСС, предпочтительно вируса РРСС генотипа I, который включает ORF4 белок, который имеет делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков в участке, расположенном между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с ORF4 белком вируса РРСС генотипа I дикого типа;

15 (в) генотипа II вируса РРСС, который включает ORF4 белок, который имеет делецию 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков в участке между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с вирусом РРСС генотипа II дикого типа;

20 (г) вируса РРСС, предпочтительно вируса РРСС генотипа I, который включает ORF4 белок, который имеет делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков между положениями аминокислот от 50 до 71, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad;

25 (д) вируса РРСС генотипа II, который включает ORF4 белок, который имеет делецию 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков между положениями аминокислот от 50 до 67, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса РРСС VR2332;

(е) комбинации любых из (а), (б), (в), (г) и (д);

30 и в дополнительном аспекте изобретение, соответственно, относится к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), выбранному из группы, которая состоит из следующих А), Б), В), Г), Д) и Е):

А) вируса РРСС, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1-12;

Б) вируса РРСС, предпочтительно вируса РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков в участке, расположенном между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с ORF4 белком вируса РРСС генотипа I дикого типа;

В) вируса РРСС генотипа II, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков в участке между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с вирусом РРСС генотипа II дикого типа;

Г) вируса РРСС, предпочтительно вируса РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 - 71, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad;

Д) вируса РРСС генотипа II, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 - 67, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса РРСС VR2332;

Е) комбинации любых из А), Б), В), Г) и Д).

Предпочтительно, когда указанный вирус РРСС, который также называется “вирусом РРСС в соответствии с настоящим изобретением” в данной заявке ниже, представляет собой изолированный вирус РРСС.

В контексте настоящего изобретения является понятным, что фраза “аминокислотные остатки в участке” является эквивалентной фразе “аминокислотные остатки, расположенные в участке” и, соответственно, является также понятным, что термин “аминокислотные остатки между положениями аминокислот” является взаимозаменяемым с термином “аминокислотные остатки, расположенные в участке между положениями аминокислот”.

Также является понятным, что термины “генотип I” и “генотип II” являются эквивалентными терминам “генотип 1” и “генотип 2” или терминам “тип 1” и “тип 2”, как часто используется в литературе в контексте вируса PPCC.

В соответствии с первым аспектом ((a)), вирус PPCC в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, представляет собой вирус PPCC, который включает ORF4 белок, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1-12, где указанный ORF4 белок предпочтительно включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 13-24, и где указанный ORF4 белок в типичном неограничивающем варианте осуществления включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31

Таким образом, в соответствии с первым аспектом ((A)) вирус PPCC в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус PPCC, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-12, где указанный ORF4 белок предпочтительно включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 13-24, и где указанный ORF4 белок в типичном неограничивающем варианте осуществления включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В соответствии со вторым аспектом ((b)) вирус PPCC в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус PPCC, в частности, вирус PPCC генотипа I, который включает ORF4 белок, имеющий делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков в участке между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными  $\beta$ -складками, по сравнению с ORF4 белком вируса PPCC генотипа I дикого типа, где указанные первые две N-терминальные  $\beta$ -складки предпочтительно представляют собой аминокислотные последовательности, как представлено в SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, или предпочтительно представляют собой аминокислотные последовательности, как представлено в SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:30, и где в типичном неограничивающем варианте осуществления указанный ORF4 белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

Следовательно, в соответствии со вторым аспектом ((B)) вирус PPCC в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус PPCC, в

частности, вирус РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков в участке между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с ORF4 белком вируса РРСС генотипа I дикого типа, где указанные первые две спрогнозированные N-терминальные β-складки предпочтительно представляют собой аминокислотные последовательности, как представлено в SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, или предпочтительно представляют собой аминокислотные последовательности, как представлено в SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:30, и где в типичном неограничивающем варианте осуществления указанный ORF4 белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

Как описывается в данной заявке, с целью сравнения вирус РРСС генотипа I дикого типа предпочтительно представляет собой прототипный вируса генотипа I Lelystad. Геном вируса Lelystad кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:41.

В соответствии с третьим аспектом ((в)) вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус РРСС генотипа II, который включает ORF4 белок, который имеет делецию 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков в участке между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с вирусом РРСС генотипа II дикого типа, где первые две спрогнозированные N-терминальные β-складки предпочтительно представляют собой аминокислотные последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, и где указанный ORF4 белок в типичном неограничивающем примере включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33.

Следовательно, в соответствии с третьим аспектом ((B)) вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вируса РРСС генотипа II, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты которая кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков в участке между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с вирусом РРСС генотипа II дикого типа, где первые две спрогнозированные N-терминальные β-складки предпочтительно представляют собой аминокислотные последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, и где указанный ORF4 белок в

типичном неограничивающем примере включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33.

Как упомянуто в данной заявке, с целью сравнения, вирус РРСС генотип II дикого типа предпочтительно представляет собой прототипный вирус генотипа II VR2332. Геном вируса VR2332 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:42.

В контексте данного изобретения делеция аминокислотных остатков предпочтительно представляет собой делецию последовательных аминокислотных остатков. Таким образом, например, делеция 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков, как описывается в данной заявке, предпочтительно представляет собой делецию 9, 10, 11 или более последовательных аминокислотных остатков и, соответственно, делеция 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков, как описывается в данной заявке, предпочтительно представляет собой делецию 5, 6, 7 или более последовательных аминокислотных остатков.

В соответствии с четвертым аспектом ((г)) вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус РРСС, предпочтительно вирус РРСС генотипа I, который включает ORF4 белок, который имеет делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков, или предпочтительно делецию 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 аминокислотных остатков, между положениями аминокислот 50 - 71, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad, и где в неограничивающем типичном варианте реализации ORF4 белок, который имеет делецию 11 аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 - 71, представляет собой ORF4 белок, который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

Следовательно, в соответствии с четвертым аспектом ((Г)) вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус РРСС, предпочтительно вирус РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков, или предпочтительно делецию 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 - 71, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad, и где в

неограничивающем типичном варианте реализации ORF4 белок, который имеет делецию 11 аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 – 71, представляет собой ORF4 белок, который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

5 Как описывается в данной заявке, нумерация положений аминокислот, которая относится к вирусу Lelystad, относится к полноразмерной аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad. Таким образом, нумерация положений аминокислот, как упоминается в контексте данной заявки, является такой по отношению к белку ORF4 вируса Lelystad,  
10 содержащему 183 аминокислотных остатка, включая остаток метионина в (N-терминальном) аминокислотном положении 1.

Таким образом, выражение "где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad", как используется в контексте настоящего изобретения, относится к  
15 последовательности ORF4 белка, как представлено в SEQ ID NO:43.

В соответствии с пятым аспектом ((д)) вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус РРСС генотипа II, который включает ORF4 белок, который имеет делецию 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков, или предпочтительно делецию 8, 9, 10, 11 или более  
20 аминокислотных остатков, между положениями аминокислот 50 - 67, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса РРСС VR2332, и где в неограничивающем типичном варианте реализации ORF4 белок, который имеет делецию 7 аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 – 67,  
25 представляет собой ORF4 белок, который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

Следовательно, в соответствии с пятым аспектом ((Д)) вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус РРСС генотипа II, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая  
30 кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков, или предпочтительно делецию 8, 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков, между положениями аминокислот 50 - 67, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса РРСС VR2332, и где в неограничивающем типичном варианте реализации

ORF4 белок, который имеет делецию 7 аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 – 67, представляет собой ORF4 белок, который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

5 Как описывается в данной заявке, нумерация положений аминокислот, которые относятся к вирусу РРСС VR2332, относится к полноразмерной аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса РРСС VR2332. Таким образом, нумераций положений аминокислот, как упоминается в данном контексте, является такой, которая относится к ORF4 белку вируса VR2332, который имеет 178 аминокислотных остатков, включая остаток метионина в (N-терминальном) аминокислотном положении 1.

10 Таким образом, фраза "где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса РРСС VR2332, который имеет 178 аминокислотных остатков", как используется в контексте настоящего изобретения, относится к последовательности ORF4 белка, как представлено в SEQ ID NO:44.

15 В соответствии с шестым аспектом ((e)) вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой комбинацию любых из аспектов (а), (б), (в), (г) и (д), как описывается в данной заявке, предпочтительно комбинацию любых из аспектов (а), (б) и (г) или комбинацию любых из аспектов (а), (в) и (д). В этом контексте, в частности, понятно, что фраза “комбинация 20 любого из (а), (б), (в), (г) и (д)” и “комбинация любого из аспектов (а), (б), (в), (г) и (д)”, соответственно, означает вирус РРСС, который имеет комбинацию признаков любого из вирусов РРСС (а), (б), (в), (г) и (д), как описывается в данной заявке, где комбинация признаков любого из вирусов РРСС аспектов (а), 25 (б) и/или (в) или комбинация признаков любого из вирусов РРСС аспектов (а), (в) и (д) является, в частности, предпочтительной.

30 Следовательно, в соответствии с шестым аспектом ((E)) вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой комбинацию любых из аспектов (А), (Б), (В), (Г) и (Д), как описывается в данной заявке, предпочтительно комбинацию любых из аспектов (А), (Б) и (Г) или комбинацию любых из аспектов (А), (В) и (Д). В этом контексте является, в частности, понятным, что фраза “комбинация любого из (А), (Б), (В), (Г) и (Д)” и “комбинация любого из аспектов (А), (Б), (В), (Г) и (Д)”, соответственно, означает вирус РРСС, который имеет комбинацию признаков любого из вирусов

PPCC (А), (Б), (В), (Г) и (Д), как описывается в данной заявке, где комбинация признаков любого из вирусов PPCC аспектов (А), (Б) и/или (В) или комбинация признаков любого из вирусов PPCC аспектов (А), (В) и (Д) является, в частности, предпочтительной.

5 Вирус PPCC в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно включает:

- ORF4 белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по крайней мере, 84,5% предпочтительно, по крайней мере, 90%, более предпочтительно, по крайней мере, 95%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 97% и, в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36, или

- ORF4 белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 83,5%, предпочтительно, по крайней мере, 90%, более предпочтительно, по крайней мере, 95%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 97% и, в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:37, где указанный вирус PPCC предпочтительно представляет собой вирус PPCC генотипа I,

и где указанный вирус PPCC, в частности, представляет собой вирус PPCC генотипа I.

Как используется в данной заявке, в частности, понятно, что термин "идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36" является эквивалентным термину "идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 по всей длине последовательности SEQ ID NO: 36" или термину "идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 по всей длине последовательности SEQ ID NO: 36", соответственно.

Кроме того, как используется в данной заявке, является особенно понятным, что термин "идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37" является эквивалентным термину "идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37 по всей длине

последовательности SEQ ID NO: 37" или термину "идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37 по всей длине последовательности SEQ ID NO: 37", соответственно.

Идентичность последовательности в контексте первого рассмотрения изобретения понимается как такая, которая основывается на прогрессивном выравнивании (Feng, D. F. и Doolittle, R. F. (1987). *Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees*. J. Mol. Evol., 25(4):351–360, которое является введенным в заявку в качестве ссылки). Этот способ основывается на комбинировании последовательностей в выравниваниях, которые, в свою очередь, могут сочетаться с другими последовательностями или выравниваниями с образованием больших выравниваний. Процедуру осуществляют до тех пор, пока все входящие в состав последовательности не будут объединены в одном множественном выравнивании. Для целей в соответствии с настоящим изобретением процент идентичности последовательности определяется с помощью программного обеспечения CLC MAIN WORKBENCH 4.1.1 (CLC BIO).

В одном типичном и неограничивающем варианте осуществления вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу РНК, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 84,5%, предпочтительно, по крайней мере, 90%, более предпочтительно, по крайней мере, 95%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 97% и, в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 38.

Как используется в данной заявке, является, в частности, понятным, что термин "идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 38" является эквивалентным термину "идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 38 по всей длине последовательности SEQ ID NO: 38" или термину "идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 38 по всей длине последовательности SEQ ID NO: 38", соответственно.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением является способным индуцировать

репродуктивные симптомы у беременных свиноматок и/или респираторные симптомы у поросят.

В соответствии с дополнительным предпочтительным аспектом вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением является способным индуцировать респираторные симптомы у боровов.

Таким образом, вирус РРСС в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой инфекционный вирус РРСС.

Термин “инфекционный вирус РРСС” в соответствии с изобретением, в частности, понимается как вирус РРС, который инфицирует свиней, вызывая ассоциированное заболевание, репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС).

Указанная инфекция свиней вирусом РРСС в соответствии с настоящим изобретением, в частности, включает прикрепление вируса к хозяйской клетке, проникновение вируса в клетку, разборку вириона, репликацию и транскрипцию вирусного генома, экспрессию вирусных белков, сборку и высвобождение новых инфекционных вирусных частиц.

В одном аспекте изобретение дополнительно относится к вирусу РРСС, предпочтительно к вирусу РРСС в соответствии с настоящим изобретением, генетически модифицированному для содержания в нем экзогенной РНК, где экзогенная РНК встраивается в ORF4 ген указанного вируса, и где экзогенная РНК предпочтительно является встроенной

а) в участок ORF4 гена указанного вируса, кодирующего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1-12 или 13-24;

б) в участок ORF4 гена указанного вируса, кодирующего участок, который размещается между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с ORF4 белком вируса РРСС генотипа I дикого типа;

с) в участок ORF4 гена указанного вируса, кодирующего участок, который размещается между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками, по сравнению с ORF4 белком вируса РРСС генотипа II дикого типа;

д) в участок ORF4 гена указанного вируса, кодирующего участок, который размещается между положениями аминокислот 50 - 71, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad; или

е) в участок ORF4 гена указанного вируса, кодирующего участок, который размещается между положениями аминокислот 50 - 67, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса PPSV VR2332.

5 Как используется в данной заявке, термин “экзогенная РНК” или “экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты”, в частности, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая введена в геном вируса PPSV из внешнего источника, такого, как из рекомбинантной последовательности. Примеры таких внешних источников включают последовательности, которые получены из вируса PPSV, а также последовательности, которые имеют происхождение не от вируса PPSV. Более конкретно, введение экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты приводит к получению генома или гена, соответственно, который имеет не существующую в природе часть. Используемый в данном описании термин 15 “экзогенная РНК”, таким образом, в частности, относится к нуклеотидной последовательности, которая является такой, которая в природе не обнаруживается в геноме вируса PPSV. Такая не существующая в природе часть или не обнаруженная в природе последовательность, соответственно, может также быть результатом встраивания одной существующей в природе нуклеотидной последовательности в другую существующую в природе нуклеотидную последовательность. 20

Экзогенная РНК, как описано в настоящей заявке, в частности, кодирует продукт экспрессии, выбранный из группы, которая состоит из эпитопа, который представляет интерес, биологического модулятора ответа, фактора роста, последовательности распознавания и слитого белка, и где указанный эпитоп, который представляет интерес, предпочтительно является эпитопом, который представляет интерес, из антигена или ветеринарного патогена или токсина. 25

В предпочтительном воплощении указанный эпитоп, который представляет интерес, представляет собой пептид, который кодируется геном ORF5 вируса PPSV, где указанный пептид, который кодируется геном ORF5 вируса PPSV, в частности, включает или состоит из, по крайней мере, 4 последовательных аминокислотных остатков последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 39 или, в частности, указанный пептид, который кодируется геном ORF5 вируса 30

PPCC, включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:39.

В другом предпочтительном воплощении указанный эпитоп, который представляет интерес, представляет собой эктодомен ORF4 белка (GP4) из отличного штамма вируса PPCC, где указанный эктодомен GP4 отличного штамма вируса PPCC, в частности, включает или состоит из, по крайней мере, 4 последовательных аминокислотных остатков последовательности, как представлено в SEQ ID NO:40, или, в частности, указанный эктодомен GP4 отличного штамма вируса PPCC включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:40.

Изобретение также обеспечивает вирус PPCC, который является генетически модифицированным для содержания в нем экзогенной РНК, как описывается в данной заявке, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также обеспечивает вирус PPCC, описанный в данной заявке, для применения в качестве вируса для стимуляции, в частности, если указанный вирус PPCC по своей природе индуцирует вакцинирующее действие при введении в организм животного.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает применение вируса PPCC в соответствии с настоящим изобретением в качестве вируса для стимуляции, в частности, если указанный вирус PPCC по своей природе индуцирует вакцинирующее действие при введении в организм животного.

Термин “животное”, как упомянуто в данной заявке, в частности, относится к свинообразным, в частности, к свиньям, предпочтительно к домашней свинье.

Предпочтительно, когда вирус PPCC должен вводиться или вводится, соответственно, при использовании интраназального, внутримышечного, перорального или внутриматочного пути введения животному.

Также, настоящее изобретение обеспечивает применение вируса PPCC, описанного в данной заявке, в качестве маркера для определения, предпочтительно для дифференциации между инфицированными и вакцинированными животными (DIVA).

В соответствии с дополнительным аспектом изобретение также относится к молекуле ДНК, которая кодирует вирус PPCC, описанный в данной заявке, где указанная молекула ДНК предпочтительно представляет собой изолированную

молекулу ДНК и/или где указанная молекула ДНК предпочтительно включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 84,5%, предпочтительно, по крайней мере, 90%, более предпочтительно, по крайней мере, 95%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 97% и в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 38.

Настоящее изобретение также обеспечивает конструкцию ДНК, которая включает молекулу ДНК, описанную в данной заявке, где указанная конструкция ДНК представляет собой, в частности, вектор ДНК такой, как плаزمид. ДНК векторы или плазмиды, в которые может быть встроена молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением, будут знакомы среднему специалисту в данной области техники. Конструкция ДНК, как описывается в данной заявке, предпочтительно представляет собой изолированную конструкцию ДНК. Как используется в данной заявке, термин “включающий молекулу ДНК”, в частности, понимается как такой, который является эквивалентным термину “включающий последовательность молекулы ДНК”.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает РНК транскрипт конструкции ДНК, описанной в данной заявке, где указанный РНК транскрипт предпочтительно представляет собой изолированный РНК транскрипт.

Настоящее изобретение также обеспечивает клетку, трансфицированную с помощью конструкции ДНК, описанной в данной заявке, где указанная клетка предпочтительно представляет собой изолированную клетку.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клетку, трансфицированную с помощью РНК транскрипта, упомянутого в данной заявке, где указанная клетка предпочтительно представляет собой изолированную клетку.

Термин “клетки” или “клетка”, как упомянуто в данной заявке, предпочтительно представляет собой клетки млекопитающих, в частности, клетки свиней или обезьян, такие как MA-104 клетки или MARC-145 клетки или клетки Vero, более предпочтительно является понятным, что термин “клетки” или “клетка” является направленным на клетки-хозяева вируса РРСС, в частности, на макрофаги свиней. Таким образом, клетка, как упомянуто в данной заявке, является предпочтительно выбранной из группы, которая состоит из

клеток свиней, клеток обезьян, MA-104 клеток, MARC-145 клеток, клеток Vero и макрофагов свиней.

В дополнительном аспекте изобретение обеспечивает способ получения вируса РРСС, описанного в данной заявке, где способ включает этап трансфекции клетки при использовании конструкции ДНК, описанной в данной заявке, и, необязательно, сбор вируса из клетки и/или среды.

В одном аспекте изобретение обеспечивает способ получения вируса РРСС, описанного в данной заявке, где способ включает этап трансфекции клетки-хозяина при использовании РНК транскрипта, описанного в данной заявке, и, необязательно, сбор вируса из клетки и/или среды.

Получение нуклеиновой кислоты/молекул ДНК, описанных в данной заявке, находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники и может осуществляться в соответствии с рекомбинантными методиками, описанными, среди прочих у Sambrook и др., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, и др., 2003, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis и др. (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; и Erlich (ред.), 1994, PCR Technology, Oxford University Press, New York, которые все являются введенными в данную заявку в качестве ссылки.

## **2. Второе рассмотрение в соответствии с настоящим изобретением**

В соответствии со вторым рассмотрением, которое подробно изложено в данном разделе, изобретение обеспечивает в одном аспекте молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует вирус РРСС генотипа I и которая является способной продуцировать живой вектор при трансфекции в клетки, где указанная молекула включает

- первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:45,

- вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая фланкирует 5' конец первой последовательности нуклеиновой кислоты и которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:46,

- третью последовательность нуклеиновой кислоты, которая фланкирует 3' конец первой последовательности нуклеиновой кислоты и которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:47, и

5 - нуклеотидную последовательность полиаденина, которая фланкирует 3' конец третьей последовательности нуклеиновой кислоты.

Является предпочтительным, когда

10 - указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты имеет, по крайней мере, 96%, предпочтительно, по крайней мере, 97%, более предпочтительно, по крайней мере, 98%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 99% и, в частности, предпочтительно 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:45; и/или

15 - указанная вторая последовательность нуклеиновой кислоты имеет, по крайней мере, 96%, предпочтительно, по крайней мере, 97%, более предпочтительно, по крайней мере, 98%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 99% и в частности, предпочтительно 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:46; и/или

20 - указанная третья последовательность нуклеиновой кислоты имеет, по крайней мере, 96%, предпочтительно, по крайней мере, 97%, более предпочтительно, по крайней мере, 98%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 99% и, в частности, предпочтительно 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID  
25 NO:47; и/или

- указанная нуклеотидная последовательность полиаденина состоит из  $n$  нуклеотидов аденина, где  $n$  представляет собой любое целое число от 1 до 51, и где  $n$  предпочтительно равно 12, 13 или 14.

30 Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой молекулу ДНК. Предпочтительно, когда указанная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты.

В контексте настоящего изобретения является, в частности, понятным, что термин “нуклеотидная последовательность полиаденина” является

эквивалентным термину “последовательность полиадениловой кислоты” или “поли (А) хвост”, соответственно. Термин “нуклеотид(ы) аденина”, как описывается в данной заявке, в частности, понимается как такой, который является эквивалентным термину “дезоксиаденилат(ы)”.

5 Фраза “нуклеотидная последовательность, которая фланкирует 5′ конец (чего-либо)”, как описывается в данной заявке, в частности, является эквивалентной фразе “нуклеотидная последовательность, ковалентно связанная с 5′ концом (чего-либо)” или, соответственно, фразе “нуклеотидная последовательность, где ее 3′ терминальный нуклеотид является ковалентно  
10 связанным с 5′ терминальным нуклеотидом”, и где является, в частности, понятным, что два указанных терминальных нуклеотида являются ковалентно связанными с группой фосфата, присоединенной к 5′ углероду пентозы и 3′ атому углерода соседней пентозы.

Фраза “нуклеотидная последовательность, которая фланкирует 3′ конец  
15 (чего-либо)”, как описывается в данной заявке, в частности, является эквивалентной фразе “нуклеотидная последовательность, ковалентно связанная с 3′ концом (чего-либо)” или, соответственно, фразе “нуклеотидная последовательность, где ее 5′ терминальный нуклеотид является ковалентно связанным с 3′ терминальным нуклеотидом”, и где, в частности, является  
20 понятным, что два указанных терминальных нуклеотида являются ковалентно связанными между 3′ атомом углерода пентозы и группой фосфата, присоединенной к 5′ углероду пентозы соседней пентозы.

Также является понятным, что фраза “имеющая 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты”, как  
25 используется в данной заявке, является эквивалентной фразе “является идентичной последовательности нуклеиновой кислоты” или “состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты”, соответственно.

В особенно предпочтительном аспекте молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включает последовательность  
30 нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 99% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:48, или где указанная молекула нуклеиновой кислоты включает или состоит из РНК копии последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет, по

крайней мере, 99% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 48.

Термин “клетки” или “клетка”, как упомянуто в данной заявке, предпочтительно представляет собой клетки млекопитающих, в частности, клетки свиней или обезьян, такие как MA-104 клетки или MARC-145 клетки или клетки Vero, более предпочтительно является понятным, что термин “клетки” или “клетка” является направленным на клетки-хозяева вируса РРСС, в частности, на макрофаги свиней. Таким образом, клетка, как упомянуто в данной заявке, является предпочтительно выбранной из группы, которая состоит из 5  
10  
клетки свиней, клетки обезьян, клетки MA-104, клетки MARC-145, клетки Vero и макрофага свиней.

Термин “живой вирус” в соответствии с изобретением, в частности, понимается как вирус РРСС, который имеет способность инфицировать приемлемого субъекта (в противовес инактивированному (убитому) вирусу) и/или инфективность которого является подобной или идентичной таковой для 15  
нативного вируса. В частности, живой вирус может инфицировать свои нативные клетки-хозяева.

Указанное инфицирование клеток-хозяев вирусом РРСС, полученным при использовании молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, в частности, включает прикрепление вируса к хозяйской клетке, проникновение вируса в клетку, разборку вириона, репликацию и транскрипцию вирусного генома, экспрессию вирусных белков, сборку и высвобождение новых инфекционных вирусных частиц. Указанное инфицирование клеток-хозяев вирусом РРСС, полученным при использовании молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, дополнительно предпочтительно 20  
включает транскрипцию последовательности кДНК, в частности, в ВНК клетках, с получением функциональной молекулы РНК, трансфекцию культивируемых клеток, предпочтительно клеток свиньи, клеток обезьян, MA-104 клеток, MARC-145 клеток, клеток Vero и макрофагов свиньи, с помощью указанной молекулы РНК, получение живых вирионов путем вирусной репликации в указанных 25  
30  
культивируемых клетках, изоляцию таких вирионов и инфицирование клеток-хозяев.

В частности, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно кодирует аттенуированный вирус РРСС генотипа

I или, соответственно, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, которая является способной продуцировать живой аттенуированный вирус при трансфекции в клетки.

В частности, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением кодирует вирус РРСС генотипа I, который не является способным индуцировать тяжелый репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) у свиней или, соответственно, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является способной продуцировать живой вирус при трансфекции в клетки, где указанный живой вирус не является способным индуцировать тяжелый репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС), подобный таковому для вируса дикого типа, у свиней, как вызывается вирулентными полевыми вирусами РРСС.

В одном особом воплощении молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением кодирует вирус РРСС генотипа I, который является способным достигать титров, по крайней мере, от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$  дозу заражения 50% культуры ткани ( $TCID_{50}$ ) на миллилитр (мл) в течение 24 часов после инфекции МА104 клеток, где указанные МА104 клетки предпочтительно являются инфицированными с помощью указанного вируса при МЗ (множественность заражения) от 0,001 до 0,1.

В частности, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением кодирует вирус РРСС генотипа I, который является способным достигать титров от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  или более дозу заражения 50% культуры ткани ( $TCID_{50}$ ) на миллилитр (мл) в течение 48 часов после инфекции МА104 клеток, где указанные МА104 клетки предпочтительно являются инфицированными с помощью указанного вируса при МЗ (множественности заражения) от 0,001 до 0,1.

Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно кодирует вирус РРСС генотипа I, который является способным

- достигать титров, по крайней мере, от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$  дозу заражения 50% культуры ткани ( $TCID_{50}$ ) на миллилитр (мл) в течение 24 часов и/или

- достигать титров, по крайней мере, от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  дозу заражения 50% культуры ткани ( $TCID_{50}$ ) на миллилитр (мл) в течение 48 часов после инфекции МА104 клеток

при МЗ (множественности заражения) от 0,001 до 0,1,  
в частности, при МЗ от 0,001 или 0,01, или 0,1.

В контексте вируса РРСС, как описывается в данной заявке, является понятным, что термин “генотип I” является эквивалентным терминам “генотип 1” или “тип 1” или “европейский (EU)”, как часто используется в литературе в контексте вируса РРСС.

В другом предпочтительном воплощении молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 99,1% или 99,2%, предпочтительно, по крайней мере, 99,3% или 99,4%, более предпочтительно, по крайней мере, 99,5% или 99,6%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 99,8% или 99,9% и, в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99,95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:48.

Идентичность последовательностей в контексте второго рассмотрения изобретения понимают как такую, которая основывается на попарном определении сходства между нуклеотидными последовательностями. Определение процента идентичности между двумя последовательностями предпочтительно осуществляют при использовании математического алгоритма, в частности, хорошо известного алгоритма Смита-Уотермана (Smith и Waterman, M. C. (1981) Mol Biol J, 147 (1): 195-197). Для целей настоящего изобретения процент идентичности нуклеотидной последовательности определяется с помощью алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана при использовании штрафа за открытие пробела 25 и штрафа за удлинение пробела 5. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана является описанным у Smith и Waterman (1981) Adv. Appl. Math 2: 482-489, который включен в данную заявку в качестве ссылки. Такое определение идентичности последовательностей может быть осуществлено при использовании, например, DeCypher Hardware Accelerator от TimeLogic Version G, или идентичность последовательности может определяться при использовании программного обеспечения CLC MAIN WORKBENCH 4.1.1 (КРК ВЮ).

Как используется в данной заявке, является, в частности, понятным, что термин “имеющая, по крайней мере, X% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:Y” (или, альтернативно,

термин “имеющая, по крайней мере, X% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:Y”) является эквивалентным термину “имеющая, по крайней мере, X% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:Y по всей длине последовательности SEQ ID NO:Y” или термину “имеющая, по крайней мере, X% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:Y по всей длине последовательности SEQ ID NO:Y”, соответственно. В этом контексте “X” представляет собой любое целое число от 95 до 100, в частности, любое целое число, выбранное из 95 - 99, так что “X% идентичности последовательности” представляет собой любой процент идентичности последовательности, упомянутый в данной заявке. Соответственно, “Y” в этом контексте представляет собой любое целое число, выбранное из 1 - 6, так, что “SEQ ID NO:Y” представляет собой любую SEQ ID NO, упомянутую в данной заявке.

В особенно предпочтительном воплощении молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:48.

В другом предпочтительном воплощении молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением кодирует вирус РРСС генотипа I, который не является способным индуцировать репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) у свинообразных или, соответственно, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является способной продуцировать живой вирус при трансфекции в клетки, где указанный инфекционный вирус не является способным индуцировать репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) у свинообразных.

Как используется в данной заявке, термин “не является способным индуцировать репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС)” в частности, относится к уменьшению клинических симптомов РРСС или симптомов, связанных с инфекцией РРСС, соответственно, таких как поражения легких у поросят, репродуктивная недостаточность у беременных свиноматок, и/или длительная РРСС виремия, по сравнению с диким типом вируса РРСС. В одном из аспектов вирус РРСС генотипа I, который не является способным индуцировать РРСС у свиней, таким образом, представляет собой вирус, который демонстрирует один или более клинических признаков, когда вводится

свиньям, по сравнению с диким типом вируса РРСС, который вводится свинообразным. Термин “вируса РРСС дикого типа”, как упомянуто в данной заявке, в частности, относится к вирусу РРСС генотипа I дикого типа.

Настоящее изобретение также обеспечивает конструкцию ДНК, которая  
5 включает молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с данным изобретением, где указанная конструкция ДНК представляет собой, в частности, вектор ДНК такой, как плазида. Термины ДНК векторы или плазмиды, в которые может быть встроена нуклеотидная молекула в соответствии с настоящим изобретением, являются понятными специалисту в данной области  
10 техники. Конструкция ДНК, как описывается в данной заявке, предпочтительно представляет собой изолированную конструкцию ДНК. Как используется в данной заявке, термин “включающий молекулу нуклеиновой кислоты” или “включающий молекулу ДНК”, соответственно, понимается, в частности, как такой, который является эквивалентным термину “включающий  
15 последовательность молекулы нуклеиновой кислоты” или “включающий последовательность молекулы ДНК”, соответственно.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает РНК транскрипт конструкции ДНК, описанный в данной заявке, где указанный РНК транскрипт предпочтительно представляет собой изолированный РНК транскрипт.

Настоящее изобретение также обеспечивает клетку, трансфицированную с  
20 помощью конструкции ДНК, описанной в данной заявке, где указанная клетка предпочтительно представляет собой изолированную клетку.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает вирус РРСС генотипа I, который продуцируется в упомянутой выше клеткой, где указанный  
25 вирус РРСС генотипа I предпочтительно представляет собой изолированный вирус РРСС генотипа I.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клетку, трансфицированную с помощью РНК транскрипта, упомянутого в данной заявке, где указанная клетка предпочтительно представляет собой изолированную  
30 клетку.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает вирус РРСС генотипа I, который продуцируется в упомянутой выше клеткой, где указанный вирус РРСС генотипа I предпочтительно представляет собой изолированный вирус РРСС генотипа I.

Настоящее изобретение также обеспечивает вирус РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или геном которого включает молекулу РНК, которая кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, где  
5 указанный вирус РРСС генотипа I предпочтительно представляет собой изолированный вирус РРСС генотипа I.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения вируса РРСС генотипа I, где указанный способ включает трансфекцию клетки с помощью конструкции ДНК, описанной в данной заявке.

10 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения вируса РРСС генотипа I, где указанный способ включает трансфекцию клетки с помощью РНК транскрипта, упомянутого в данной заявке.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, где указанная композиция включает молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии  
15 с изобретением, суспендированную в приемлемом количестве фармацевтически приемлемого разбавителя или наполнителя.

Получение молекул нуклеиновой кислоты, описанных в данной заявке, находится в компетенции специалиста в данной области техники и может быть осуществлено в соответствии с рекомбинантными методиками, описанными в  
20 других источниках, например, у Sambrook и др., 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, и др., 2003, *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis и др. (eds), 1995, *PCR Strategies*, Academic Press, Inc., San Diego; и Erlich (ed), 1994, *PCR Technology*, Oxford  
25 University Press, New York, которые все являются введенными в данную заявку в качестве ссылки.

В еще одном аспекте изобретение также относится к применению молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением или конструкции ДНК, описанный в данной заявке для получения аттенуированного вируса генотипа I,  
30 где одна или более мутаций являются введенными в молекулу нуклеиновой кислоты или в конструкцию ДНК.

Изобретение также обеспечивает способ получения аттенуированного вируса РРСС генотипа I, который включает этап введения одной или более

мутаций в молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением или в конструкцию ДНК, описанную в данной заявке.

Предпочтительно, одна или более мутаций, описанных в данной заявке, вводят в первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:45.

Термин "аттенуированный вирус РРСС", как описывается в данной заявке, в частности, относится к вирусу РРСС, который является аттенуированным *in vitro* и/или *in vivo*, в частности, в чувствительных клеточных линиях и/или хозяине.

Термин "хозяин", как используется в данной заявке, в частности, относится к животным, которые инфицированы с помощью вируса РРСС, в частности, к свинообразным, более конкретно, к свиньям, таким, как домашняя свинья.

Как упомянуто в данной заявке, "аттенуированный", в частности, относится к сниженной вирулентности патогена, в частности, вируса РРСС дикого типа, где под "вирулентностью" понимается степень патогенности, и где "патогенность" относится к способности возбудителя вызывать клинические признаки у хозяина или потомства хозяина, например, репродуктивную недостаточность.

Термин "вирус РРСС дикого типа" или "РРСС дикого типа", соответственно, как используется в данной заявке, в частности, относится к инфекционному патогенному вирусу РРСС, который является, в частности, способным вызывать РРСС у свиней. В одном особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения термин "вирус РРСС дикого типа" относится к вирусу РРСС, геном которого содержит последовательность РНК или состоит из РНК полинуклеотида, в котором указанная РНК последовательность или РНК полинуклеотид представляет собой РНК копию последовательности SEQ ID NO: 41 (что соответствует вирусу Lelystad с полным геномом).

Предпочтительно, одна или более мутаций, как описывается в данной заявке, включают или состоят из одной или более точечных мутаций и/или одной или более геномных делеций и/или одной или более инсерций.

Кроме того, изобретение обеспечивает аттенуированный вирус РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу РНК, которая кодируется

молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, но где указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:45, содержит одну или более мутаций, которые аттенуируют кодируемый вирус РРСС и/или которые отключают кодируемый вирус РРСС для супрессии продукции интерферона типа I и секреции клеткой, инфицированной указанным вирусом, и где указанный аттенуированный вирус РРСС генотипа I предпочтительно представляет собой изолированный аттенуированный вирус РРСС генотипа I.

10 Изобретение также обеспечивает применение аттенуированного вируса РРСС генотипа I, описанного в данной заявке, для получения лекарственного средства, в частности, вакцины или вакцинной композиции, для предотвращения клинических симптомов инфекции вирусом РРСС, как например, путем уменьшения симптомов инфекции вирусом РРСС, например, снижения 15 длительности виремии вируса РРСС.

Термин “предотвращение” или “снижение”, соответственно, как используется в данной заявке, означает, но без ограничения, способ, который включает введение антигена вируса РРСС, в частности, аттенуированного вируса РРСС генотипа I, описанного в данной заявке, животному, где указанный 20 антиген вируса РРСС, при введении указанному животному вызывает или способен вызвать иммунный ответ у указанного животного против вируса РРСС. В совокупности такое лечение приводит к снижению клинических симптомов РРСС или симптомов, ассоциированных с инфекцией вирусом РРСС, соответственно. В частности, термин “предотвращение”, как используется в 25 данной заявке, означает в общем случае процесс профилактики, при котором животное подвергают воздействию иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением перед индукцией или началом процесса болезни (РРСС).

В данной заявке “снижение клинических симптомов инфекции вирусом РРСС” означает, но без ограничения таковыми, как снижение количества инфицированных субъектов в группе, снижение или устранение количества субъектов, которые демонстрируют клинические симптомы инфекции, или снижение тяжести каких-либо клинических симптомов, которые присутствуют у субъекта, по сравнению с инфекцией вирусом РРСС дикого типа. Например, оно 30

должно относиться к любому снижению патогенной нагрузки, распространения патогена, снижению передачи патогена или уменьшению любого клинического признака, типичного для РРСС инфекции, в частности, репродуктивной недостаточности и/или индукции поражения легких. Предпочтительные эти

5 клинические признаки уменьшаются у субъектов, получающих аттенуированный вирус РСС генотипа I соответствии с настоящим изобретением, по крайней мере, на 10% по сравнению с субъектами, не получающими композицию и которые могут подвергаться инфицированию. Более предпочтительным является, когда

10 клинические признаки снижаются у пациентов, получающих композицию в соответствии с настоящим изобретением, по крайней мере, на 20%, предпочтительно, по крайней мере, на 30%, более предпочтительно, по крайней мере, на 40%, еще более предпочтительно, по крайней мере, на 50%, еще более предпочтительно, по крайней мере, на 60% и более предпочтительным, по крайней мере, на 70%, еще более предпочтительно, по крайней мере, на 80%, еще более

15 предпочтительно, по крайней мере, на 90% и наиболее предпочтительно на 100%.

Термин “субъект”, как упомянуто в данной заявке, в частности, относится к животному.

20 Термин “животное”, как упомянуто в данной заявке, в частности, относится к свинообразным, например, к свинье, предпочтительно к домашней свинье.

Термин “снижение длительности вiremии вируса РРСС” означает, но без ограничения, снижение длительности поступления вируса РРСС в кровь животного, по крайней мере, на один день по сравнению с субъектами, которые не получали композиции, и были инфицированы вирусом РРСС дикого типа.

25 Термин “viremия” относится к присутствию вируса РРСС в крови инфицированных животных, как отражается, например, путем определения числа копий РНК вируса РРСС в сыворотке крови.

Также, изобретение относится к вакцинной композиции, которая включает вирус РРСС с аттенуированным генотипом I, описанный в данной заявке, суспендированный в приемлемом количестве фармацевтически приемлемого

30 разбавителя или наполнителя.

Один или более фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, как упомянуто в данной заявке, являются предпочтительно выбранными из группы, которая состоит из растворителей, дисперсионной

среды, адъювантов, стабилизирующих агентов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и антигрибковых агентов, изотонических агентов и агентов, которые замедляют адсорбцию.

5 В предпочтительном аспекте иммуногенная композиция в соответствии с изобретением включает количество от  $10^1$  до  $10^7$  вирусных частиц вируса РРСС аттенуированного генотипа I, описанного в данной заявке, на дозу, предпочтительно от  $10^3$  до  $10^6$  частиц на дозу, более предпочтительно от  $10^4$  до  $10^6$  частиц на дозу.

10 В другом предпочтительном аспекте иммуногенная композиция в соответствии с изобретением включает количество вируса РРСС в соответствии с изобретением, которое является эквивалентным титру вируса, по крайней мере, приблизительно  $10^3$  TCID<sub>50</sub> (инфицирующая доза для тканевой культуры)<sub>50</sub>/мл на дозу, предпочтительно от  $10^3$  до  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/мл на дозу

15 Как используется в данной заявке, термин "вакцинная композиция" в частности, относится к композиции, которая будет вызывать протективный иммунный ответ у животного, которое подвергается воздействию композиции. Иммунный ответ может включать индукцию антител и/или индукцию Т-клеточного ответа.

20 Обычно "иммунный ответ" включает, но не ограничивается, одним или более из следующих эффектов: продукция и активация антител, В-клеток, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, специфически направленных на антиген или антигены, включенные в состав композиции или вакцины, которые представляют интерес. Предпочтительно, хозяин будет демонстрировать либо терапевтический, либо протективный  
25 иммунный (память) ответ так, что устойчивость к новой инфекции будет повышаться и/или клиническая тяжесть заболевания будет снижаться. Такая защита будет демонстрироваться либо снижением количества, либо тяжести клинических симптомов, либо отсутствием одного или более клинических симптомов, ассоциированных с инфекцией патогеном, отсрочкой начала  
30 виремии, сниженной персистенцией вируса, снижением общей вирусной нагрузки и/или снижением экскреции вируса.

Таким образом, "иммунный ответ", в частности, означает, но без ограничения таковым, как развитие подмножества факторов клеточного и/или

опосредованного антителами иммунного ответа на композицию или вакцину, которые представляют интерес.

Кроме того, изобретение относится к вакцинной композиции в соответствии с изобретением для применения в способе для предотвращения клинических симптомов инфекции вирусом РРСС, например, путем уменьшения 5 клинических симптомов инфекции вирусом РРСС, например, снижения длительности вiremии вируса РРСС.

Кроме того, изобретение обеспечивает способ для предотвращения клинических симптомов инфекции РРСС, например, путем уменьшения 10 клинических симптомов инфекции вирусом РРСС, например, путем снижения длительности вiremии вируса РРСС, где указанный способ включает этап введения вакцины в соответствии с изобретением животному, которое в этом нуждается.

Воплощения в соответствии со вторым рассмотрением настоящего  
15 изобретения

Следующие пункты также являются описанными в данной заявке:

1. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует вирус РРСС генотипа I и которая является способной продуцировать живой вирус при трансфекции в клетки, где указанная молекула включает

20 - первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:45,

25 - вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая фланкирует 5' конец первой последовательности нуклеиновой кислоты и которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:46,

30 - третью последовательность нуклеиновой кислоты, которая фланкирует 3' конец первой последовательности нуклеиновой кислоты и которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:47, и

нуклеотидную последовательность полиаденина, которая фланкирует 3' конец третьей последовательности нуклеиновой кислоты.

2. Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом 1, где

- указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты имеет, по крайней мере, 96%, предпочтительно, по крайней мере, 97%, более предпочтительно, по крайней мере, 98%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 99% и в частности, предпочтительно 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:45; и/или

- указанная вторая последовательность нуклеиновой кислоты имеет, по крайней мере, 96%, предпочтительно, по крайней мере, 97%, более предпочтительно, по крайней мере, 98%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 99% и, в частности, предпочтительно 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:46; и/или

- указанная третья последовательность нуклеиновой кислоты имеет, по крайней мере, 96%, предпочтительно, по крайней мере, 97%, более предпочтительно, по крайней мере, 98%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 99% и в частности, предпочтительно 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:47; и/или

- указанная нуклеотидная последовательность полиаденина состоит из нуклеотидов аденина, где n представляет собой целое число от 1 до 51, и где n предпочтительно равно 12, 13 или 14.

3. Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом 1 или 2, где указанный вирус является аттенуированным и/или где указанный вирус является способным индуцировать протективный иммунный ответ против респираторных и/или репродуктивных симптомов заболевания после инфекции вирусом репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCS) у свинообразных.

4. Молекула нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 3, где указанный вирус является способным достигать титров, по крайней мере, от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$  дозы заражения 50% культуры ткани (TCID<sub>50</sub>) на миллилитр (мл) в течение 24 часов после инфекции клеток MA104, предпочтительно при МЗ (множественности заражения) от 0,001 до 0,1.

5. Молекула нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 4, где указанный вирус является способным достигать титров, по крайней мере, от

$5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  дозы заражения 50% культуры ткани (TCID<sub>50</sub>) на миллилитр (мл) в течение 48 часов после инфекции клеток MA104, предпочтительно при МЗ (множественности заражения) от 0,001 до 0,1.

6. Молекула нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 5, где указанная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 91% или 92%, предпочтительно, по крайней мере, 93% или 94%, более предпочтительно, по крайней мере, 95% или 96%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 98% или 99% и, в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:48.

7. Молекула нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 6, где указанная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 99,1% или 99,2%, предпочтительно, по крайней мере, 99,3% или 99,4%, более предпочтительно, по крайней мере, 99,5% или 99,6%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 99,8% или 99,9% и в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99,95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:48.

8. Молекула нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 7, где указанная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:48.

9. Молекула нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 8, где указанный вирус не является способным индуцировать тяжелый репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPCC) у свинообразных, как вызывается с помощью вирулентных полевых штаммов вируса PPCC.

10. Молекула нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 9, где указанная молекула представляет собой молекулу ДНК.

11. Конструкция ДНК, которая включает молекулу ДНК в соответствии с пунктом 10.

12. РНК транскрипт конструкции ДНК в соответствии с пунктом 11.

13. Клетка, трансфицированная с помощью конструкция ДНК в соответствии с пунктом 11.

14. Клетка, трансфицированная с помощью РНК транскрипта в соответствии с пунктом 12.

15. Вирус РРСС генотипа I, полученный с помощью клетки в соответствии с пунктом 13.

16. Вирус РРСС генотипа I, полученный с помощью клетки в соответствии с пунктом 14.

5 17. Вирус РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из пунктов от 1 до 9 или геном которого включает молекулу РНК, которая кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из пунктов 1 - 10.

10 18. Способ получения вируса РРСС генотипа I, который включает трансфекцию клетки с помощью конструкции ДНК в соответствии с пунктом 11.

19. Способ получения вируса РРСС генотипа I, который включает трансфекцию клетки-хозяина с помощью РНК транскрипта в соответствии с пунктом 12.

15 20. Композиция, которая включает молекулу нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 – 10, суспендированную в приемлемом количестве фармацевтически приемлемого разбавителя или наполнителя.

20 21. Применение молекулы нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 10 или конструкции ДНК в соответствии с пунктом 11 для получения аттенуированного вируса РРСС генотипа I, где одна или более мутаций являются введенными в молекулу нуклеиновой кислоты или в конструкцию ДНК.

22. Способ получения аттенуированного вируса РРСС генотипа I, который включает этап введения одной или более мутаций в молекулу нуклеиновой в соответствии с любым из пунктов 1 - 10 или в конструкцию ДНК в соответствии с пунктом 11.

25 23. Аттенуированный вирус РРСС генотипа I, геном которого включает молекулу РНК, которая кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из пунктов 1 – 10, но где указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:45 содержит одну или более мутаций, которые не позволяют  
30 кодируемому вирусу РРСС супрессировать продукцию интерферона типа I и его секрецию клеткой, инфицированной с помощью указанного вируса.

24. Применение аттенуированного вируса РРСС генотипа I в соответствии с любым из пунктов 21 - 23 для получения лекарственного средства для предотвращения клинических симптомов инфекции РРСС.

25. Вакцинная композиция, которая включает аттенуированный вирус РРСС генотипа I в соответствии с любым из пунктов 21 – 23, суспендированный в приемлемом количестве фармацевтически приемлемого разбавителя или наполнителя.

26. Вакцинная композиция в соответствии с пунктом 25 для применения в способе для предотвращения клинических симптомов инфекции РРСС.

27. Способ для предотвращения клинических симптомов инфекции РРСС, который включает этап введения вакцинной композиции в соответствии с пунктом 26 животному, которое в этом нуждается.

### **3. Третье рассмотрение в соответствии с настоящим изобретением**

В соответствии с третьим рассмотрением, которое подробно изложено в этом разделе, изобретение базируется на обнаружении того, что первое рассмотрение в соответствии с настоящим изобретением может сочетаться со вторым рассмотрением в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, третье рассмотрение в соответствии с настоящим изобретением относится к комбинации (1) аспектов и воплощений первого рассмотрения в соответствии с настоящим изобретением и (2) аспектов и воплощений второго рассмотрения в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, является понятным, что все возможные признаки и определения, в частности, признаки и определения, которые относятся к вирусу РРСС генотипа I первого рассмотрения в соответствии с настоящим изобретением могут произвольным образом сочетаться с признаками и определениями второго рассмотрения в соответствии с настоящим изобретением.

В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым рассмотрением настоящего изобретения, таким образом, кодирует вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) в соответствии с первым рассмотрением настоящего изобретения, как указано в любом из пунктов 36 - 42.

В одном аспекте, соответственно, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) в соответствии с первым рассмотрением настоящего

изобретения, таким образом, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым рассмотрением настоящего изобретения, как указано в пунктах 56 или 57.

5 Таким образом, комбинация первого рассмотрения в соответствии с настоящим изобретением со всеми возможными аспектами второго рассмотрения в соответствии с настоящим изобретением, в частности, также отражена в указанных пунктах и в зависимых от них пунктах формулы изобретения.

10 Изобретение также является направленным на вирус РРСС генотипа I, в частности, упомянутый выше вирус РРСС, геном которого кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует вирус РРСС генотипа I и которая является способной продуцировать живой вирус при трансфекции в клетки, где указанная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 91% или 92%, предпочтительно, по 15 крайней мере, 93% или 94%, более предпочтительно, по крайней мере, 95% или 96%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 98% или 99% и в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:48, но где указанная последовательность нуклеиновой кислоты содержит 20 мутацию, которая приводит к получению указанного вируса, который включает ORF4 белок, имеющий делецию 9, 10, 11 или более аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 - 71, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad.

25 Изобретение также относится к вирусу РРСС генотипа I, геном которого кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует вирус РРСС генотипа I и которая является способной продуцировать живой вирус при трансфекции в клетки, где указанная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 91% или 92%, 30 предпочтительно, по крайней мере, 93% или 94%, более предпочтительно, по крайней мере, 95% или 96%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 98% или 99% и в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:48, но где указанная последовательность нуклеиновой кислоты

содержит мутацию, которая приводит к получению указанного вируса, который включает ORF4 белок, имеющий делецию 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 аминокислотных остатков между положениями аминокислот 50 - 71, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad.

Изобретение также предполагает вирус РРСС генотипа I, геном которого кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует вирус РРСС генотипа I и которая является способной продуцировать живой вирус при трансфекции в клетки, где указанная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 91% или 92%, предпочтительно, по крайней мере, 93% или 94%, более предпочтительно, по крайней мере, 95% или 96%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 98% или 99% и, в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:48, но где указанная последовательность нуклеиновой кислоты содержит мутацию, которая приводит к получению указанного вируса, который включает ORF4 белок, имеющий делецию 13 аминокислотных остатков между положениями аминокислот 56 - 70 или между положениями аминокислот 57 - 69, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad.

Мутация, как упоминается в данной заявке, предпочтительно представляет собой делецию.

Предпочтительно, вирус РРСС в соответствии с изобретением является генетически модифицированным для содержания в нем экзогенной РНК, где экзогенная РНК встраивается в orf4 ген указанного вируса, и где экзогенная РНК является, в частности, встроенной в участок orf4 гена указанного вируса, кодирующего участок, который размещается между положениями аминокислот 50 - 71, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad.

В другом предпочтительном аспекте экзогенная РНК встраивается в orf4 ген вируса и заменяет нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотные остатки, делетированные в контексте данного изобретения.

В соответствии с дополнительным предпочтительным аспектом экзогенная РНК кодирует продукт экспрессии, выбранный из группы, которая состоит из

эпитопа, который представляет интерес, модулятора биологического ответа, фактора роста, последовательности узнавания, слитого белка, где эпитоп, который представляет интерес, предпочтительно является эпитопом, который представляет интерес, из антигена или ветеринарного патогена, или токсина.

5 В частности, эпитоп, который представляет интерес, является пептидом, который кодируется *orf5* геном вируса РРСС, или представляет собой аминокислотную последовательность, которая кодируется геном *orf5* вируса РРСС, где указанный пептид или аминокислотная последовательность, которая кодируется геном *orf5* вируса РРСС предпочтительно включает или состоит из  
10 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:50 или предпочтительно включает или состоит из, по крайней мере, 4 последовательных аминокислотных остатков последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO:50, или предпочтительно включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:51 или SEQ ID NO:52.

15 В соответствии с другим предпочтительным аспектом экзогенная РНК кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 53-55.

В особенно предпочтительном аспекте изобретение обеспечивает, в качестве неограничивающего примера, вирус РРСС генотипа I, геном которого  
20 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая включает последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, которая состоит из любой из SEQ ID NO:56-59.

Вирус РРСС в соответствии с любым из пунктов 58 - 73, где указанный вирус представляет собой изолированный вирус и/или где указанная мутация  
25 представляет собой делецию.

Вирус РРСС, как упомянуто в данной заявке, который предпочтительно представляет собой изолированный вирус и/или не существующий в природе вирус.

Изобретение также является направленным на вирус РРСС генотипа I, где  
30 указанный вирус включает ORF4 белок, который имеет остаток пролина в положении аминокислоты 56 и/или который имеет остаток глутамина в положении аминокислоты 66, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad, и где

аминокислотная последовательность ORF4 белка вируса Lelystad представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:43.

Изобретение также касается вируса PPCC генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ORF4 белок, который имеет остаток пролина в положении аминокислоты 56 и/или который имеет остаток глутамина в положении аминокислоты 66, где нумерация положений аминокислот относится к аминокислотной последовательности ORF4 белка вируса Lelystad, и где геном указанного вируса предпочтительно кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, где указанная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 91% или 92%, предпочтительно, по крайней мере, 93% или 94%, более предпочтительно, по крайней мере, 95% или 96%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 98% или 99% и, в частности, предпочтительно, по крайней мере, 99% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:48.

Такой вирус PPCC генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ORF4 белок, имеющий остаток пролина в положении аминокислоты 56, представляет собой типичный неограничивающий аспект вируса PPCC, геном которого кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:58.

В другом типичном неограничивающем аспекте такой вирус PPCC генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ORF4 белок, который имеет остаток глутамина в положении аминокислоты 66, представляет собой вирус PPCC, геном которого кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:57.

Вирус PPCC в соответствии с изобретением предпочтительно предназначен для применения в качестве лекарственного средства или для использования в профилактике или лечении репродуктивно-респираторного синдрома свиней, в частности, у свинообразных, и где, необязательно, указанный вирус, который предназначен для введения, или вводится, соответственно, путем интраназального, внутримышечного, перорального или внутриматочного способа введения животному, в частности, свинье.

Лекарственное средство, как упоминается в данном описании, предпочтительно представляет собой вакцину.

В соответствии с другим аспектом вирус РРСС по изобретению предпочтительно используется в качестве маркера для определения, предпочтительно для дифференциации между инфицированными и вакцинированными животными (DIVA).

Еще в одном аспекте изобретение относится к молекуле ДНК, которая кодирует вирус РРСС в соответствии с изобретением и где указанная молекула ДНК предпочтительно включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO:56-58.

Еще в одном аспекте изобретение предпочтительно относится к изолированной конструкции ДНК, которая включает указанную молекулу ДНК, предпочтительно включает ее изолированный РНК транскрипт.

В соответствии с еще одним аспектом изобретение также предпочтительно относится к изолированной клетке, трансфицированной с помощью указанной конструкции ДНК или указанного РНК транскрипта.

Изобретение также относится к способу получения вируса РРСС в соответствии с изобретением, где указанный способ включает этап трансфекции клетки при использовании указанной конструкции ДНК или включает этап трансфекции клетки-хозяина с помощью указанного РНК транскрипта.

В заключение следует отметить, что информация, которая обеспечивает возможность встраивания делеции в соответствии с настоящим изобретением в последовательность, кодирующую эктодомен GP4 вируса РРСС, такого как вирус РРСС генотипа I, в настоящее время обеспечивает ряд полезных применений:

- Вирус, который основывается на этой информации, может быть использован в качестве изолята для контрольного заражения для парентерального, перорального, интраназального, внутриматочного инфицирования и для инфицирования при использовании спермы у положительных по РРСС и интактных по РРСС и/или чувствительных к РРСС видов.

- Изобретение обеспечивает делеционные маркеры для серологической дифференциации или для дифференциации последовательностей (DIVA

концепция), каждого возможного штамма вируса РРСС, для того, чтобы отличить штаммы вируса РРСС генотипа II, невзирая на то, присутствуют ли уже делеции в соответствующем сайте или нет.

5 - Кроме того, делеционные маркеры обеспечиваются для серологической дифференциации также в связи или в комбинации с другими эпитопами. Например, вирусы РРСС без делеции могут отличаться серологически от вирусов РРСС с полной или частичной делецией этих эпитопов (например, Lelystad GP4 aa60-aa71: AAQEKISFGKS, как включено в последовательность SEQ ID NO:43), путем использования антител, направленных против этого  
10 эпитопа. Например, два вируса РРСС, которые имеют делецию в этом участке/домене, могут быть дифференцированы друг от друга в сочетании с другими эпитопами.

Изобретение также обеспечивает инсерционный участок/домен для введения "чужеродной" РНК вместо вирусной РНК в положении, где  
15 размещается делеция в соответствии с изобретением (эктодомен GP4).

Инсерция может быть осуществлена как для различных целей, так и для всех возможных штаммов вируса РРСС, а также для штаммов вируса РРСС генотипа II, которые уже имеют небольшую делецию в этом участке.

Встраивание чужеродной последовательности может иметь место,  
20 например, в штамм VI EU РРСС генотипа I, описанный в данной заявке, и может заменять последовательность, кодирующую эктодомен GP4 указанного штамма аминокислотной последовательностью (aa) aa54-aa70 (QSHRASTAQGTTPLRRS (SEQ ID NO: 40)) или ее укороченными производными или производными, полученными в результате мутагенеза.

25 Кроме того, для улучшения иммунного ответа также является возможным встраивать один или два последовательных эпитопа Т- или В-клеток

а) из других генных/геномных участков вируса РРСС, например, из (i) участка, кодирующего гликопротеин 5 (aa) штамма VI EU РРССV генотипа I, описанного в данной заявке, например, последовательности, которые кодируют  
30 аминокислотные остатки (aa) aa36-aa52 (SSHLQLIYNLTICELNG (SEQ ID NO:39)), или их укороченные производные или производные, полученные в результате мутагенеза, дополнительно с приемлемым(и) линкером(ами), например, с aa мотивом GSS; соответственно, также из других изолятов вируса РРСС, например, из прототипного изолята Lelystad вируса РРСС генотипа I или,

соответственно, из вирусов РРСС других генотипов, таких, как, например, из прототипного изолята VR2332 вируса РРСС генотипа II;

5 б) из других патогенов, например, из другого патогена свиньи, для установления или улучшения иммунного ответа против указанного(ых) патогена(ов);

с) из неспецифических для вируса эпитопов Т- или В-клеток в качестве генетического или серологического позитивного маркера, также в комбинации с а);

10 д) из иммунологических энхансеров, отличных от а), например, цитокинов, в качестве примера, интерлейкинов, также в комбинации с б).

Для улучшения иммунного ответа является также возможным встраивать один или более последовательных эпитопов Т- или В-клеток для снижения патогенности вируса.

#### ПРИМЕРЫ

##### 15 **Пример 1**

###### *а) Изоляция вируса РРСС*

Вирус РРСС изолировали из образцов крови (bS-720789), которые ранее были тестированы как позитивные в ПЦР определении вируса РРСС EU-типа. Изоляцию вируса осуществляли на MA104 клетках. После размножения 20 изолированного вируса РРСС EU-типа на MA104 клетках исходный материал вируса для полного геномного секвенирования получали путем ультрацентрифугирования на сахарозной подушке, после чего осуществляли обработку РНКазой и ДНКазой. В завершение, вирусную РНК экстрагировали из полученного материала вируса и подвергали полному секвенированию генома 25 (Roche 454 platform). Полученная последовательность генома (14 854 нуклеотидов) продемонстрировала делецию из 33 нуклеотидов в ORF4 по сравнению с последовательностью эталонного генома EU-типа штамма Lelystad.

###### *б) Инфекция*

30 Инфекция боровов с помощью вируса а) вызывает серьезные клинические симптомы РРСС.

##### **Пример 2**

*а) Получение и характеристика нового клона инфекционной кДНК вируса РРСС EU типа*

Этот пример описывает получение и характеристику нового клона инфекционной кДНК вируса РРСС EU типа, который обозначен "VI EU" в данной заявке. VI EU базируется на аттенуированном штамме вируса РРСС EU типа, но не является идентичным ему, и является на 89% идентичным на нуклеотидном уровне EU прототипному штамму вируса Lelystad или на 87% идентичным вставке кДНК вируса РРСС инфекционного клона кДНК вируса РРСС типа EU LoN94-13 (WO 2013017568 A1) соответственно. Последовательность кДНК VI EU представлена в SEQ ID NO: 48

Живой вирус восстанавливали из клона кДНК VI EU после трансфекции синтетических экзипированных транскриптов в ВНК21 клетки и путем последующего переноса супернатанта культуры клеток из трансфицированных клеток в чувствительные к вирусу РРСС МА104 клетки. Определяли сильный цитопатический эффект (ЦПЭ) в течение 3 - 4 дней после переноса супернатанта культуры клеток из трансфицированных ВНК21 клеток в МА104 клетки (Фигура 1 А). После окрашивания клеток при использовании моноклонального антитела, специфического для капсидного белка SDOW17 вируса РРСС (Rural Technologies), определяли сильный сигнал в ЦПЭ позитивных МА104 клетках (Фигура 1 В), но не в клетках, которые трансфицировали супернатантами, полученными при имитации трансфекции ВНК21 клеток (не показано).

Для анализа роста вируса VI EU, имеющего происхождение от кДНК клона, МА104 клетки инфицировали восстановленным вирусом при использовании множественности заражения (МЗ), которая составляла 0,001, 0,01 или 0,1, соответственно. Супернатанты инфицированных клеток собирали через 0, 24, 48, 72 и 96 часов после инфекции и определяли титры вируса с помощью серийных разведений вируса на планшетах на 96 ячеек, которые содержали МА104 клетки. Полученная кривая роста для восстановленного из VI EU вируса показана на **Фигуре 2**.

Вне зависимости от МЗ, используемой для МА104 клеток, вирус VI EU достигал титров  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  дозу заражения 50% культуры ткани (TCID<sub>50</sub>) на миллилитр (мл) в течение 24 часов после инфекции. Титры достигали максимума приблизительно через 48 часов после инфицирования при использовании  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл, демонстрируя высокую эффективность репликации VI EU вируса на клетках МА104.

Этот факт позволял использовать В1 EU в качестве платформы для исследования вакцины вируса РРСС, например, в качестве одного из множества применений, для исследования взаимодействия вируса РРСС с иммунными ответами хозяина на вирусную инфекцию.

5            *b)        Применение нового клона инфекционной кДНК вируса РРСС EU типа в исследовании РРСС вакцины*

10            Специфический иммунный ответ на инфекцию вирусом РРСС характеризуется отсроченной индукцией нейтрализующих антител (Lopez и Osorio, 2004) и коротким клеточно-опосредованным иммунным ответом (Xiao и др., 2004). Является общепризнанным, что эти эффекты могут частично быть приписаны, наряду с презентацией эпитопов-ловушек (Ostrowski и др., 2002; Ansari и др., 2006) и гликановым экранированием белков оболочки вируса (Ansari и др., 2006), ингибированию вирусом врожденной иммунной системы хозяина. Было продемонстрировано, что инфекция вирусом РРСС не индуцирует  
15            или только слабо или отсроченным образом индуцирует продукцию интерферона типа I (IFN), (интерферон- $\alpha$  и интерферон- $\beta$ ; (Miller и др., 2004)) или IFN типа II, (интерферон- $\gamma$ ; (Meier и др., 2003)) в чувствительных линиях клеток (альвеолярные макрофаги легких свиньи, клетки почек обезьян MARC-145) и/или у свиней (Buddaert и др., 1998).

20            Интерфероны играют важную роль в установлении эффективного адаптивного иммунного ответа против вирусных инфекций, и многие вирусы, таким образом, развили стратегии для противодействия проявлению ответа врожденной иммунной системы хозяина (Haller и Weber, 2009). В интересах идентификации предполагаемого(ых) РРСС антагониста(ов) IFN, всесторонние  
25            скрининг-анализы, которые базируются на клеточных линиях, которые стабильно экспрессируют гены, представляющие интерес, или на клетках, трансфицированных при использовании экспрессирующих белок плазмид, идентифицировали несколько неструктурных белков вируса РРСС (nsp), в том числе nsp1 (смотри выше), nsp2 (Beuga и др., 2010; Li и др., 2010), nsp4 (Beuga и др., 2010) и nsp11 (Beuga и др., 2010; Shi и др., 2011a), которые являются  
30            вовлеченными в блокирование индукции IFN типа I.

              nsp1 размещается на N-терминальном конце полипротеина 1a, который имеет происхождение от ORF1a вируса РРСС и подвергается процессингу с образованием двух мультифункциональных субъединиц, nsp1 $\alpha$  и nsp1 $\beta$ , каждая

из которых содержит домен подобной папаину цистеинпротеазы (PCP), существенный для самовысвобождения из вирусного полипротеина (den Boon и др., 1995; Chen и др., 2010). nspl $\alpha$  содержит N-терминальный домен цинковых пальцев и домен PCP $\alpha$  протеазы, в то время как nspl $\beta$  содержит PCP $\beta$ . Для обоих nspl субъединиц, nspl $\alpha$  и nspl $\beta$ , была определена трехмерная пространственная структура (Sun и др., 2009; Xue и др., 2010). В соответствии с этими анализами, nspl $\beta$  состоит из N-терминального домена (NTD), линкерного домена (LKD), PCP домена (PCP бета) и C-терминального удлинения (СТЕ); (Xue и др., 2010). C-терминальное, опосредованное nspl $\beta$  отщепление nspl от nspl2 происходит в сайте WYG/AGR для US штаммов вируса PPCC (Kroese и др., 2008) или прогнозируется в сайте WYG/AAG для EU штаммов вируса PPCC (Chen и др., 2010), в то время как nspl $\alpha$ /nspl $\beta$  расщепление происходит в сайте ECAM/AxVYD для US штаммов вируса PPCC или прогнозируется в сайте EEAN/SxVYR для EU штаммов вируса PPCC (Chen и др., 2010).

Несколько исследований продемонстрировали, что механистическая деталь, которая заключается в том, что nspl вируса PPCCV и/или его субъединиц, которые получены путем ауторасщепления nspl $\alpha$  и/или nspl $\beta$  ингибируют продукцию интерферона типа I путем препятствования транскрипции IFN (Song и др., 2010; Kim и др., 2010; Chen и др., 2010; Veuga и др., 2010). Кроме того, было продемонстрировано, что nspl $\beta$  препятствует клеточному ответу на интерферон (сигнальная система интерферона); (Chen и др., 2010). Кроме того, было продемонстрировано, что инфекция вирусом PPCC ингибирует продукцию IFN- $\alpha$  и/или IFN- $\beta$  инфицированными вирусом PPCC клетками *in vitro* (Kim и др., 2010; Veuga и др., 2010), была определена субклеточная локализация nspl (субъединицы) (Song и др., 2010; Chen и др., 2010) и механистические аспекты ингибирования IFN типа I, которые были получены при использовании экспериментов, отличных от экспериментов по экспрессии единичного белка, были подтверждены в клетках, инфицированных вирусом PPCC (Shi и др., 2010). В завершение, исследование мутагенеза nspl, которое базируется на экспрессии nspl белка, изучило влияние на вирусное ингибирование IFN (Shi и др., 2011b).

Были получены существовавшие ранее жизнеспособные штаммы вируса PPCC (EU) (как описывается в WO 2013017570 A1), которые содержали мутации (делеции) в гене nspl $\beta$ , который индуцирует продукцию IFN типа I (IFN- $\beta$ ) в

чувствительных клетках (MARC145), и которые являются чувствительными к IFN типа I (IFN- $\beta$ ).

Для того чтобы проверить, могут быть получены такие же, а также различные индуцирующие IFN вирусные мутанты на основе нового  
 5 инфекционного клона ВІ EU, конструировали набор вирусов, несущих делеции в гене *nsp1 $\beta$* . Точнее, эти делеции были расположены в N-терминальном домене (NTD) *nsp1 $\beta$* , который был продемонстрирован как такой, который является необходимым для гомодимеризации белка (Хуе и др., 2010). **Фигура 3** показывает *nsp1 $\beta$*  выравнивание аминокислотных последовательностей  
 10 нескольких штаммов вируса РРСС US и EU типов. Были указаны аминокислоты, которые, как прогнозируется, образуют нити (выделены голубым) или альфа-спирали (выделены красным).

Было получено десять *nsp1 $\beta$*  делеционных мутантов на основе инфекционного клона кДНК ВІ EU. Делеции включали аминокислоты, которые  
 15 были спрогнозированы как такие, которые не вовлечены в образование бета-нитей или альфа-спиралей, которые были (частично) сохранены в рамках всех штаммов вируса РРСС EU типа, проанализированных при выравнивании (выделены рамками красного цвета на **Фигуре 3**).

Делеции, введенные в ген *nsp1 $\beta$* , визуализировали при выравнивании  
 20 аминокислотных последовательностей, что представлено на **Фигуре 4**. Были сконструированы ВІ EU-*nsp1 $\beta$*  делеционные мутанты ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delALEV, ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delEV, ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delLEVL, ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delLE, ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delDD, ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delSDDS, ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delHH, ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delGRSR, ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delRSR и ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delSDGRSR, соответственно.

Для проверки жизнеспособности *nsp1 $\beta$*  делеционных мутантов, синтетические транскрипты кДНК ВІ EU, которые несут соответствующую делецию, трансфицировали в ВНК21 клетки. После переноса супернатантов  
 25 клеточной культуры из трансфицированных клеток на чувствительные к РРСС МА104 клетки, определяли цитопатический эффект (ЦПЭ) и специфическое для нуклеокапсида иммунофлуоресцентное окрашивание, которое указывает на  
 30 жизнеспособность мутантов вируса РРСС, в девяти из десяти полученных *nsp1 $\beta$*  делеционных мутантов (не показано). Эти результаты продемонстрировали, что, за исключением ВІ EU-*nsp1 $\beta$* -delLEVL, все делеционные мутанты были жизнеспособными. Для дальнейшего анализа, можно ли выращивать *nsp1 $\beta$*

делеционные мутанты до высоких титров на IFN-компетентных клетках MA104, получали кривые роста существенно так, как описано выше для вируса ВІ EU. Вкратце, клетки MA104 инфицированы при использовании одного из девяти nsp1 $\beta$  делеционных мутантов или вируса ВІ EU в качестве контроля.

5 Супернатанты культуры клеток собирали через 0, 24, 48, 72 и 93 часов после заражения и титровали на клетках MA104 при использовании планшетов на 96 ячеек. Титры вируса рассчитывали на основе положительных по ЦПЭ лунок. **Фигура 5** показывает результат двух независимых экспериментов и демонстрирует, что ВІ EU-nsp1 $\beta$  делеционные мутанты можно выращивать на

10 клетках MA104 так же эффективно, как и исходный вирус ВІ EU. Максимальные титры от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл наблюдали через 48 часов после заражения.

После этого подвергали анализу, могут ли делеции, введенные в ген nsp1 $\beta$ , действительно устранять антагонистическую активность nsp1 $\beta$  белка в отношении IFN. С этой целью измеряли уровни IFN- $\beta$  в 100 мкл пробах,

15 отобранных через 0, 24, 48, 72 и 93 часа после заражения в экспериментах по изучению кривой роста, так как описано выше, с помощью коммерческого ELISA, специфичного для человеческого IFN-бета (Invitrogen). По утверждению производителя, этот ELISA может также применяться для обнаружения IFN-бета приматов, отличных от человека, и хорошо работает для образцов из клеток

20 MA104, которые представляют собой эпителиальные клетки почки зеленой мартышки (смотрите **Фигуру 6**). Для количественной оценки полученных результатов включали кривую калибровки с использованием положительного контроля ELISA от производителя.

Уровни IFN- $\beta$ , измеренные в супернатантах MA104 клеток,

25 инфицированных одним из девяти жизнеспособных nsp1 $\beta$  делеционных мутантов или исходным вирусом ВІ EU, полученные из двух независимых экспериментов, представлены на **Фигуре 6**.

Как и ожидалось, исходный ВІ EU эффективно блокировал секрецию IFN-бета в процессе инфекции, что приписывается функциональному(ым)

30 вирусному(ым) антагонисту(ам) IFN. Не определяли или определяли только незначительные количества IFN- $\beta$  в супернатанте культуры клеток через 0, 24 и 48 часов после инфицирования с помощью различных делеционных мутантов ВІ EU nsp1 $\beta$ . Однако, в более поздние моменты времени некоторые мутанты были неспособны ингибировать экспрессию IFN- $\beta$  в инфицированных клетках MA104,

что указывает на дефект в IFN антагонистической активности nsp1 $\beta$ . Интересно отметить, что этот дефект значительно варьировал среди девяти проанализированных ВІ EU делеционных мутантов nsp1 $\beta$ . В то время как большинство мутантов индуцировали уровни IFN- $\beta$  ниже 50 международных единиц (МЕ) в 100 мкл супернатанта клеточной культуры, мутантный ВІ EU nsp1 $\beta$ -delALEV был совершенно не в состоянии противодействовать экспрессии IFN- $\beta$  в инфицированных клетках МА104. Количества IFN-бета, измеренные через 72 и 93 часа после инфицирования даже превышали предел теста ELISA, который устанавливается на уровне  $\sim$  200 МЕ на 100 мкл. Этот результат наглядно продемонстрировал, что антагонистическая активность белка nsp1 $\beta$  в отношении IFN может быть упразднена путем удаления A<sub>30</sub>LEV<sub>33</sub> аминокислот в инфекционном клоне кДНК ВІ EU.

Таким образом, получали новый инфекционный кДНК клон вируса РРСС EU типа, который можно эффективно выращивать до титров  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл в МА104 клетках почки зеленой мартышки. На основе этого клона было получено девять жизнеспособных ВІ EU-nsp1 $\beta$  мутантов, которые несли делеции в NTD nsp1 $\beta$ , который был продемонстрирован как такой, который является необходимым для гомодимеризации белка (Хуе и др., 2010). Все эти мутанты могут выращиваться до получения высоких титров на МА104 клетках. Все мутанты ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delALEV, ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delEV, ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delLE, ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delSDDS, ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delGRSR, ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delRSR и ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delSDGRSR индуцировали секрецию IFN- $\beta$  в поздние моменты времени инфекции, что находится в строгом отличии от исходного вируса ВІ EU. Из этих семи мутантов четыре мутанта ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delALEV, ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delEV, ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delLE и ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delSDDS представляли новый класс мутантов, которые ранее не были описаны в WO 2013017570 A1. В частности, инфекция при использовании мутанта ВІ EU-nsp1 $\beta$ -delALEV индуцировала чрезвычайно высокие количества IFN- $\beta$  в МА104 клетках, что приводило к выводу, что этот вирус является существенно поврежденным в отношении блокирования индукции IFN типа I.

Это открытие имеет серьезные последствия для разработки вакцины против вируса РРСС, поскольку можно предположить, что иммунный ответ естественного хозяина против РРСС может быть существенно улучшен за счет

введения делеции, например, путем удаления аминокислот A<sub>30</sub>LEV<sub>33</sub> в nsp1β белке штаммов вируса РРСС генотипа I.

nsp1β делеционные мутанты, описанные в данной заявке, либо отдельно, либо в сочетании с другими аттенуирующими мутациями, представляют собой перспективных кандидатов для живых аттенуированных вакцин против вируса РРСС.

### Пример 3

#### *а) Введение делеции в ORF4 белок инфекционного клона кДНК В1 вируса РРСС EU типа*

Исследовали, может ли быть введена делеция, как описано в соответствии с первым рассмотрением настоящего изобретения, в ген orf4 любого штамма вируса РРСС без отрицательного влияния на репликацию вируса. Таким образом, делецию вводили в геномный участок, кодирующий эктодомен белка orf4 между положениями аминокислот 50 - 71 инфекционного клона кДНК В1 EU вируса РРСС типа EU (содержащего последовательность SEQ ID NO: 48). Делеция в белке orf4 В1 EU включала аминокислоты 57-69 (как кодируется SEQ ID NO: 49).

Для проверки жизнеспособности ORF4 делеционного мутанта, синтетический транскрипт кДНК В1 EU, который несет делецию, трансфицировали в ВНК21 клетки. После переноса супернатантов клеточных культур из трансфицированных клеток на чувствительные к вирусу РРСС МА104 клетки, цитопатический эффект (ЦПЭ) определяли в течение от 3 до 4 дней после переноса супернатантов клеточных культур из трансфицированных ВНК21 клеток в МА104 клетки. После окрашивания клеток с помощью специфических для белка капсида вируса РРСС моноклональных антител SDOW17 (Rural Technologies), сильный сигнал определяли в ЦПЭ-положительных МА104 клетках, но не в клетках, которые получали супернатанты иммитационно трансфицированных клеток ВНК21 (не показано). Эти результаты продемонстрировали, что ORF4 делеционный мутант В1 EU является жизнеспособным. Выделенный мутантный вирус обозначается как В1 EU-GP5-36-46-ctr (сравни Пример б).

Для дальнейшего анализа, может ли В1 EU-GP5-36-46-ctr выращиваться до высоких титров на МА104 клетках, исследовали кинетики роста. Так, МА104 клетки инфицировали с помощью восстановленного вируса и при использовании

исходного ВІ ЕВ вируса в качестве контроля с множественностью заражения (МЗ) 0,01. Супернатанты инфицированных клеток собирали через 0, 24, 48, 72 и 96 часов после инфекции, и определяли титры вируса с помощью серийных разведений вируса на планшетах на 96 лунок, содержащих МА104 клетки.

5 **Фигура 7** показывает результаты трех независимых экспериментов и демонстрирует, что ВІ ЕВ-GP5-36-46-ctg может выращиваться на МА104 клетках так же эффективно, как и исходный ВІ ЕВ вирус. Наблюдали максимальные титры  $\sim 1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл для обоих вирусов через 48 часов после инфекции.

10 В целом, делеция аминокислот 57-69 в ORF4 белке не оказывает негативного влияния на рост ВІ ЕВ, что свидетельствует о том, что вариации последовательности в этом участке хорошо переносятся вирусом РРСС *in vitro*. Исходя из этих результатов, участок, который размещается между положениями аминокислот 50 - 71 ВІ ЕВ ORF4 белка, может также использоваться в качестве сайта инсерции для экзогенных последовательностей.

15 **б) Применение сайта делеции ORF4 белка для инсерции экзогенной РНК: Инсерция последовательности нейтрализующего эпитопа ORF5 белка вируса РРСС в ORF4 ген инфекционного кДНК клона ВІ ЕВ**

Этот пример описывает инсерцию экзогенной РНК в участок, который размещается между положениями аминокислот 50 - 71 ВІ ЕВ ORF4 белка. Экзогенная РНК в этом примере кодирует нейтрализующий эпитоп, который размещается в ORF5 белке вируса РРСС (Ostrowski, M. и др.) и состоит из аминокислот 1-11 SEQ ID NO:39. Эта последовательность (SEQ ID NO:51) была выбрана для встраивания в эктодомен ORF4 белка для того, чтобы повысить доступность ORF5 нейтрализующего эпитопа в потенциальной вакцине, которая позволяет получить улучшенные иммунные ответы у вакцинированных животных.

Для получения вируса экзогенную последовательность встраивали в ORF4 делеционный сайт, описанный в Примере а), и заменяли аминокислоты 57-69 ВІ ЕВ ORF4 белка аминокислотами 1-11 последовательности SEQ ID NO: 39 (представляющей аминокислоты 36-46 в ORF5 белке штаммов вируса РРСС типа 2), и фланкировали G-G линкером. Инсерция приводила к получению последовательности Gly<sub>57</sub>-Ser-Ser-His-Leu-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asn-Leu-Thr-Gly<sub>69</sub> (SEQ ID NO:53) в ORF4 белке ВІ ЕВ. Рекомбинантный вирус, который несет

инсерцию, в дальнейшем обозначали как ВІ EU-GP5-36-46 (который включает последовательность SEQ ID NO:56).

Для анализа, может ли ВІ EU-GP5-36-46 быть восстановленным, синтетический транскрипт кДНК ВІ EU, который несет мутацию, трансфицировали в ВНК21 клетки. Рекомбинантный вирус может быть восстановлен тем же способом, как описано выше. Цитопатический эффект (ЦПЭ) наблюдали через 3 - 4 дня после переноса супернатантов клеточной культуры из трансфицированных ВНК21 клеток на чувствительные к вирусу РРСС клетки МА104. Кроме того, определяли специфическое для капсидного белка вируса РРСС окрашивание в позитивных по ЦПЭ МА104 клетках, но не в клетках, которые получали супернатанты иммитационно трансфицированных клеток ВНК21 (не показано).

Исследовали ростовые кинетики для определения, может ли рекомбинантный вирус выращиваться до высоких титров. Таким образом, МА104 клетки инфицировали с помощью ВІ EU-GP5-36-46 и при использовании исходного ВІ EU вируса в качестве контроля при множественности заражения (МЗ) 0,01. Супернатанты инфицированных клеток собирали через 0, 24, 48, 72 и 96 часов после инфекции, и определяли титры вируса с помощью серийных разведений вируса на планшетах на 96 лунок, содержащих МА104 клетки. Результаты трех независимых экспериментов представлены на **Фигуре 7**. Через 48 часов после инфекции мутантный вирус ВІ EU-GP5-36-46 достигал того же максимального значения титра  $\sim 1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл, что и исходный ВІ EU вирус, демонстрируя, что встроенная в ORF4 белок последовательность не оказывает отрицательного влияния на высокий титр выращивания вируса.

Дополнительные эксперименты на МА104 клетках выявили, что экзогенная последовательность РНК стабильно поддерживается при множественных пассажах. Анализ последовательности продемонстрировал стабильность вставки при всех проанализированных пассажах. Интересно отметить, что единственная нуклеотидная мутация аденина на тимин, которая приводила к аминокислотной замене His на Pro в положении 56, выше сайта инсерции определялась после 1 пассажа в независимых экспериментах. Таким образом, дополнительную мутацию встраивали в ВІ EU-GP5-36-46 с помощью методов реверсивной генетики. Для получения рекомбинантного вируса экзогенную последовательность встраивали в сайт делеции ORF4, описанный в Примере а), и

заменяли аминокислоты 56-69 ВІ ЕU ORF4 белка аминокислотами 1-11 последовательности SEQ ID NO: 39 (представляющей аминокислоты 36-46 в ORF5 белке штаммов вируса PPCC типа 2), N-терминально фланкированными аминокислотной последовательностью PG и C-терминально фланкированными G-линкером. Эта инсерция приводила к получению заключительной последовательности Pro<sub>56</sub>-Gly-Ser-Ser-His-Leu-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asn-Leu-Thr-Gly<sub>69</sub> (SEQ ID NO:55) в ORF4 белке ВІ ЕU. Полученный рекомбинантный вирус обозначали в дальнейшем как ВІ ЕU-GP5-36-46-AtoC (который включал последовательность SEQ ID NO:58). Ростовые кинетики, представленные на **Фигуре 7**, показывают, что ВІ ЕU-GP5-36-46-AtoC может выращиваться с такими же титрами, что и ВІ ЕU-GP5-36-46 и ВІ ЕU дикого типа, соответственно.

Исследовали, будут ли последовательности, имеющие происхождение от ORF5-в участка, кодирующего эктодомен ORF4 в ВІ ЕU-GP5-36-46-AtoC, обеспечивать мутантный вирус, который является более чувствительным к сывороточной нейтрализации. С этой целью проводили реакции сывороточной нейтрализации (SNT). Предполагается, что повышенная доступность встроенного нейтрализующего эпитопа, который имеет происхождение от ORF5, расположенного в ORF4 белке эктодомена, будет приводить к улучшенной чувствительности рекомбинантного вирус на действие нейтрализующих антител по сравнению с исходным вирусом ВІ ЕU.

SNT сыворотки, которые были взяты от шести свиней через 48 дней после вакцинации с помощью ВІ ЕU вируса дикого типа, серийно разводили и смешивали либо с ВІ ЕU-GP5-36-46-AtoC, либо с ВІ ЕU дикого типа.

После инкубации в течение одного часа при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> прибавляли МА104 клетки к образцам. Титры сыворотки определяли через 4 дня на основе ЦПЭ, индуцированного вирусом, который не подвергся нейтрализации. Сыворотка, которую брали у тех же животных перед вакцинацией, служила в качестве негативных контролей (не показано). Средние значения и стандартные отклонения двух независимых экспериментов представлены на **Фигуре 8**.

Может быть продемонстрировано, что ВІ ЕU-GP5-36-46-AtoC является последовательно более чувствительным к *in vitro* нейтрализации по сравнению с ВІ ЕU вирусом дикого типа, несмотря на вариации, которые наблюдали между шестью животными, подвергшихся анализу. Титры сыворотки, измеренные для

ВІ EU-GP5-36-46-AtoC составляли в 3 - 15 раз выше, чем титры, которые определяли для исходного ВІ EU вируса (**Фигура 8**). Данные, полученные из различных экспериментов, дополнительно предполагают, что титры сыворотки для ВІ EU-GP5-36-46-AtoC могут быть дополнительно повышены путем мутации сайта N-гликозилирования (аминокислота N<sub>9</sub> SEQ ID NO: 39), присутствующего в последовательности, которая имеет происхождение от ORF5 от Asn<sub>9</sub> до Gln<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 50 и 52) в качестве природного экрана N-гликозилирования ORF5 нейтрализующего эпитопа ((Ansaгі и др., 2006) и данные, которые не представлены). Таким образом, данные **Фигуры 8** ясно показывают, что 5  
10  
15  
нейтрализующий эпитоп, который имеет происхождение от ORF5, встроенный в эктодомен ORF4 белка, является в высокой степени доступным в рекомбинантном вирусе ВІ EU-GP5-36-46-AtoC, что делает последний многообещающим вакцинным кандидатом. Продемонстрированная высокая чувствительность к сыворотке, содержащей специфические для вируса РРСС 20  
25  
нейтрализующие антитела, позволит осуществлять более быстрое выведение и гарантировать повышенную безопасность вакцинного вируса.

Также можно ожидать, что специфические для вируса РРСС нейтрализующие антитела будут индуцироваться до более высоких уровней и в более ранние временные точки у поросят или свиноматок, которые были 20  
25  
вакцинированы с помощью ВІ EU-GP5-36-46-AtoC, по сравнению с животными, которые были вакцинированы при использовании исходного вируса ВІ EU. Ранняя индукция нейтрализующих антител после вакцинации будет приводить к более быстрому выведению и, таким образом, к меньшему выделению вакцинного вируса (повышенная безопасность), а также к более эффективному 25  
30  
иммунному ответу после природной инфекции с помощью вируса РРСС (повышенная эффективность).

Рекомбинантный вирус ВІ EU-GP5-36-46-AtoC, таким образом, представляет собой многообещающего кандидата для вакцины на основе живого аттенуированного вируса РРСС с улучшенной безопасностью и эффективностью.

## СПИСОК ФИГУР

**Фигура 1:** А. Инфекционный вирус, восстановленный из клона кДНК ВІ EU, вызывает сильный ЦПЭ на MA104 клетках, как показано с помощью светлопольной микроскопии. В. Специфическое для капсидного белка вируса

PPCC иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание инфицированных ВІ EU МА104 клеток.

**Фигура 2:** Рост вируса, восстановленного из инфекционного клона кДНК ВІ EU, на МА104 клетках.

5 **Фигура 3:** Выравнивание аминокислотной последовательности nsp1 $\beta$  N-терминального домена (NTD) нескольких штаммов US (типа II, вверху) и EU (типа I, внизу) вируса PPCC. NTD аминокислотная последовательность ВІ EU приведена в самой нижней части. Аминокислоты R22, PR24, E32, SFP и H52 обозначены сверху от выравнивания и продемонстрированы как критические для  
10 nsp1 $\beta$  гомодимеризации (Хуе и др., 2010). Целевые участки для nsp1 $\beta$  мутагенеза обозначены в красных рамках. Мотив SDGRSR соответствует участку, описанному в WO 2013017570 A1 при использовании LoN94-13 клона кДНК вируса PPCC EU.

15 **Фигура 4:** Выравнивание аминокислотной последовательности ВІ EU-nsp1 $\beta$  делеционных мутантов.

**Фигура 5:** Рост ВІ EU-nsp1 $\beta$  делеционных мутантов на IFN-компетентных МА104 клетках.

20 **Фигура 6:** Уровни IFN- $\beta$ , которые измеряются в различные моменты времени в супернатантах культуры клеток МА104, инфицированных при использовании ВІ EU-nsp1 $\beta$  делеционных мутантов или при использовании исходного ВІ EU вируса.

**Фигура 7:** Кинетика роста рекомбинантных ВІ EU вирусов, которые несут делеции или инсерции в ORF4 белке.

25 **Фигура 8:** Реакции сывороточной нейтрализации для рекомбинантного вируса ВІ EU-GP5-36-46-AtoC и для исходного вируса ВІ EU.

В списке последовательностей:

SEQ ID NO:1-24 соответствуют последовательностям эктодомена ORF4 белка вируса PPCC с делецией;

30 SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26 соответствуют последовательностям первых двух спрогнозированных N-терминальных  $\beta$ -складок ORF4 белка вируса PPCC (генотипа I);

SEQ ID NO:27 и SEQ ID NO:28 соответствуют последовательностям первых двух спрогнозированных N-терминальных  $\beta$ -складок ORF4 белка вируса PPCC (генотипа II);

SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:30 соответствуют последовательностям первых двух спрогнозированных N-терминальных β-складок ORF4 белка вируса PPCC (генотипа I);

5 SEQ ID NO:31 и SEQ ID NO:32 соответствуют последовательностям первых двух спрогнозированных N-терминальных β-складок ORF4 белка вируса PPCC (генотип II);

10 SEQ ID NO:32 соответствует (частичной) последовательности ORF4 белка вируса PPCC (генотипа I), который имеет делецию 11 аминокислотных остатков в участке между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками;

SEQ ID NO:33 соответствует (частичной) последовательности ORF4 белка вируса PPCC (генотипа II), который имеет делецию 7 аминокислотных остатков в участке между первыми двумя спрогнозированными N-терминальными β-складками;

15 SEQ ID NO:34 соответствует последовательности эктодомена ORF4 белка вируса PPCC, который имеет делецию 11 аминокислотных остатков;

SEQ ID NO:35 соответствует последовательности эктодомена ORF4 белка вируса PPCC, который имеет делецию 7 аминокислотных остатков;

20 SEQ ID NO:36 соответствует последовательности ORF4 белка вируса PPCC (генотипа I), который имеет делецию 11 аминокислотных остатков (и включает последовательность SEQ ID NO:34, соответственно);

SEQ ID NO:37 соответствует нуклеотидной последовательности, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:36;

25 SEQ ID NO:38 соответствует нуклеотидной последовательности, которая кодирует вирус PPCC генотипа I, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:36;

SEQ ID NO:39 соответствует последовательности пептида, который кодируется геном ORF5 вируса PPCC;

30 SEQ ID NO:40 соответствует последовательности пептида, который кодируется геном ORF5 вируса PPCC;

SEQ ID NO:41 соответствует полному геному вируса Lelystad;

SEQ ID NO:42 соответствует полному геному вируса VR2332;

SEQ ID NO:43 соответствует последовательности ORF4 белка вируса Lelystad;

SEQ ID NO:44 соответствует последовательности ORF4 белка вируса VR2332;

SEQ ID NO:45 соответствует первой последовательности нуклеиновой кислоты, как описывается в данной заявке;

5 SEQ ID NO:46 соответствует второй последовательности нуклеиновой кислоты, как описывается в данной заявке, которая фланкирует 5' конец первой последовательности нуклеиновой кислоты;

10 SEQ ID NO:47 соответствует третьей последовательности нуклеиновой кислоты, как описывается в данной заявке, которая фланкирует 3' конец первой последовательности нуклеиновой кислоты;

SEQ ID NO:48 соответствует полной вставке вирусной кДНК BI EU;

SEQ ID NO:49 соответствует последовательности SEQ ID NO:48 с делецией, которая, таким образом, кодирует ORF4 белок, который имеет делецию 13aa (aa 57-69);

15 SEQ ID NO:50 соответствует последовательности SEQ ID NO:39 с заменой N->Q в положении 9;

SEQ ID NO:51 соответствует последовательности aa 1-11 SEQ ID NO:39;

SEQ ID NO:52 соответствует последовательности SEQ ID NO:51 с заменой N->Q в положении 9;

20 SEQ ID NO:53 соответствует последовательности SEQ ID NO:51 с Gly-Gly линкером;

SEQ ID NO:54 соответствует последовательности SEQ ID NO:52 с Gly-Gly линкером;

25 SEQ ID NO:55 соответствует последовательности SEQ ID NO:53 с N-терминальным остатком пролина;

SEQ ID NO:56 соответствует последовательности SEQ ID NO:49 с инсерцией, которая, таким образом, кодирует последовательность SEQ ID NO:53;

30 SEQ ID NO:57 соответствует последовательности SEQ ID NO:49 с инсерцией, которая, таким образом, кодирует последовательность SEQ ID NO:54;

SEQ ID NO:58 соответствует последовательности SEQ ID NO:48 с делецией, которая, таким образом, кодирует ORF4 белок, который имеет

делецию 14aa (aa 56-69), куда включена вставка, кодирующая последовательность SEQ ID NO: 55.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J. Virol.* 74, 10834-10837.
- 5      Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2006. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* 80, 3994-4004.
- 10      Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J. Virol.* 84, 1574-1584.
- 15      Buddaert, W., Van, R.K., Pensaert, M., 1998. In vivo and in vitro интерферон (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 461-467.
- 20      Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Fang, Y., 2010. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as интерферон antagonist. *Virology* 398, 87-97.
- 25      den Boon, J.A., Faaberg, K.S., Meulenberg, J.J., Wassenaar, A.L., Plagemann, P.G., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., 1995. Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. *J. Virol.* 69, 4500-4505.
- 30      Haller, O., Weber, F., 2009. The интерферон response circuit in antiviral host defense. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* 71, 73-86.
- Kim, O., Sun, Y., Lai, F.W., Song, C., Yoo, D., 2010. Modulation of type I интерферон induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and degradation of CREB-binding protein by non-structural protein 1 in MARC-145 and HeLa cells. *Virology* 402, 315-326.
- Kroese, M.V., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Bos-de Ruijter, J.N., Peeters, B.P., Meulenberg, J.J., Cornelissen, L.A., Snijder, E.J., 2008. The nsp1alpha and nsp1 papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* 89, 494-499.

Li, H., Zheng, Z., Zhou, P., Zhang, B., Shi, Z., Hu, Q., Wang, H., 2010. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 2 antagonizes интерферон regulatory factor 3 activation. *J. Gen. Virol.* 91, 2947-2958.

5 Lopez, O.J., Osorio, F.A., 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 155-163.

Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., 2003. Gradual development of the интерферон-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or  
10 vaccination. *Virology* 309, 18-31.

Miller, L.C., Laegreid, W.W., Bono, J.L., Chitko-McKown, C.G., Fox, J.M., 2004. Интерферон type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. *Arch. Virol.* 149, 2453-2463.

Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J.,  
15 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241-4250.

Shi, X., Wang, L., Li, X., Zhang, G., Guo, J., Zhao, D., Chai, S., Deng, R.,  
20 2011a. Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN-beta induction. *Mol. Immunol.* 48, 1568-1572.

Shi, X., Wang, L., Zhi, Y., Xing, G., Zhao, D., Deng, R., Zhang, G., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) could be sensed by professional beta интерферон-producing system and had mechanisms to inhibit this  
25 action in MARC-145 cells. *Virus Res.* 153, 151-156.

Shi, X., Zhang, G., Wang, L., Li, X., Zhi, Y., Wang, F., Fan, J., Deng, R., 2011b. The Nonstructural Protein 1 Papain-Like Cysteine Protease Was Necessary for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nonstructural Protein 1 to Inhibit Интерферон-beta Induction. *DNA Cell Biol.* 30, 355-362.

30 Snijder, E.J., Meulenberg, J.J., 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 5), 961-979.

Song, C., Krell, P., Yoo, D., 2010. Nonstructural protein 1alpha subunit-based inhibition of NF-kappaB activation and suppression of интерферон-beta production by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 407, 268-280.

Sun, Y., Xue, F., Guo, Y., Ma, M., Hao, N., Zhang, X.C., Lou, Z., Li, X., Rao, Z., 2009. Crystal structure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus leader protease Nsp1alpha. *J. Virol.* 83, 10931-10940.

5 Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P., 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J. Virol.* 78, 5923-5933.

10 Xue, F., Sun, Y., Yan, L., Zhao, C., Chen, J., Bartlam, M., Li, X., Lou, Z., Rao, Z., 2010. The crystal structure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein Nsp1beta reveals a novel metal-dependent nuclease. *J. Virol.* 84, 6461-6471.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует геном вируса репродуктивно-респираторного синдрома (PPCC) генотипа I и включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:49, 56, 57 и 58.

2. Молекула нуклеиновой кислоты п. 1, которая включает последовательность SEQ ID NO:49.

3. Молекула нуклеиновой кислоты п.1, которая включает последовательность SEQ ID NO:56.

4. Молекула нуклеиновой кислоты п. 1, которая включает последовательность SEQ ID NO:57.

5. Молекула нуклеиновой кислоты п. 1, которая включает последовательность SEQ ID NO:58.

6. Вакцина, содержащая вирус, геном которого кодируется молекулой нуклеиновой кислоты по любому из п.п.1-5, необязательно дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из растворителя, дисперсионной среды, адьюванта, стабилизирующего агента, дилуэнта, консерванта, антибактериального агента, противогрибкового агента, изотонического агента и задерживающего адсорбцию агента.

7. Вакцина по п.6, которая содержит  $10^4 - 10^6$  частиц вируса на дозу.

8. Применение вакцины по п.6 или п.7 для лечения и/или профилактики PPCC у свиней.

9. Применение по п. 8, где нуклеиновая кислота, кодирующая геном вируса, содержит последовательность SEQ ID NO:56 или SEQ ID NO:58.

10. Способ лечения и/или профилактики РРСС у свиней, предусматривающий введение вакцины по п.6 или п.7.

5 11. Способ по п. 10, где вакцина вводится интраназальным, внутримышечным, оральным или внутриматочным путем.

10 12. Способ по п. 10 или п. 11, где введение индуцирует защитный иммунный ответ против РРСС у свиней, что уменьшает и/или предотвращает симптомы.

13. Способ по любому из п.п.10-12, где нуклеиновая кислота, кодирующая геном вируса, содержит последовательность SEQ ID NO:56 или SEQ ID NO:58.

15 14. Конструкция ДНК, которая включает молекулу ДНК по любому из п.п. 1 5.

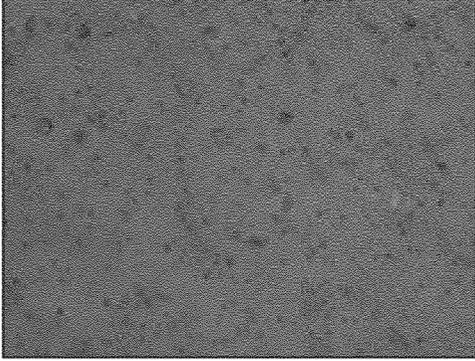
15. РНК транскрипт конструкции ДНК по п. 14.

20 16. Клетка, содержащая конструкцию ДНК по п. 14 или РНК транскрипт по п. 15.

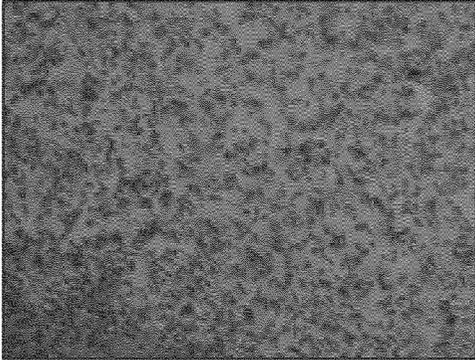
25 17. Композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 1-5, суспендированная в приемлемом количестве фармацевтически приемлемого разбавителя или наполнителя.

**A**

**имитация  
заражения**

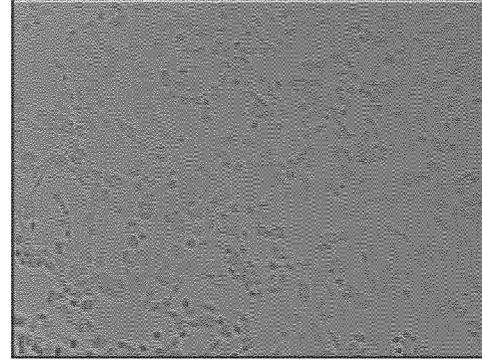


**ВІ EU**

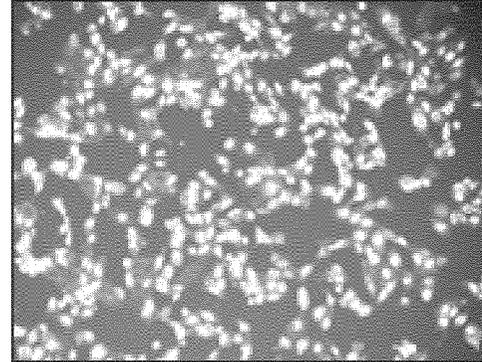


**B**

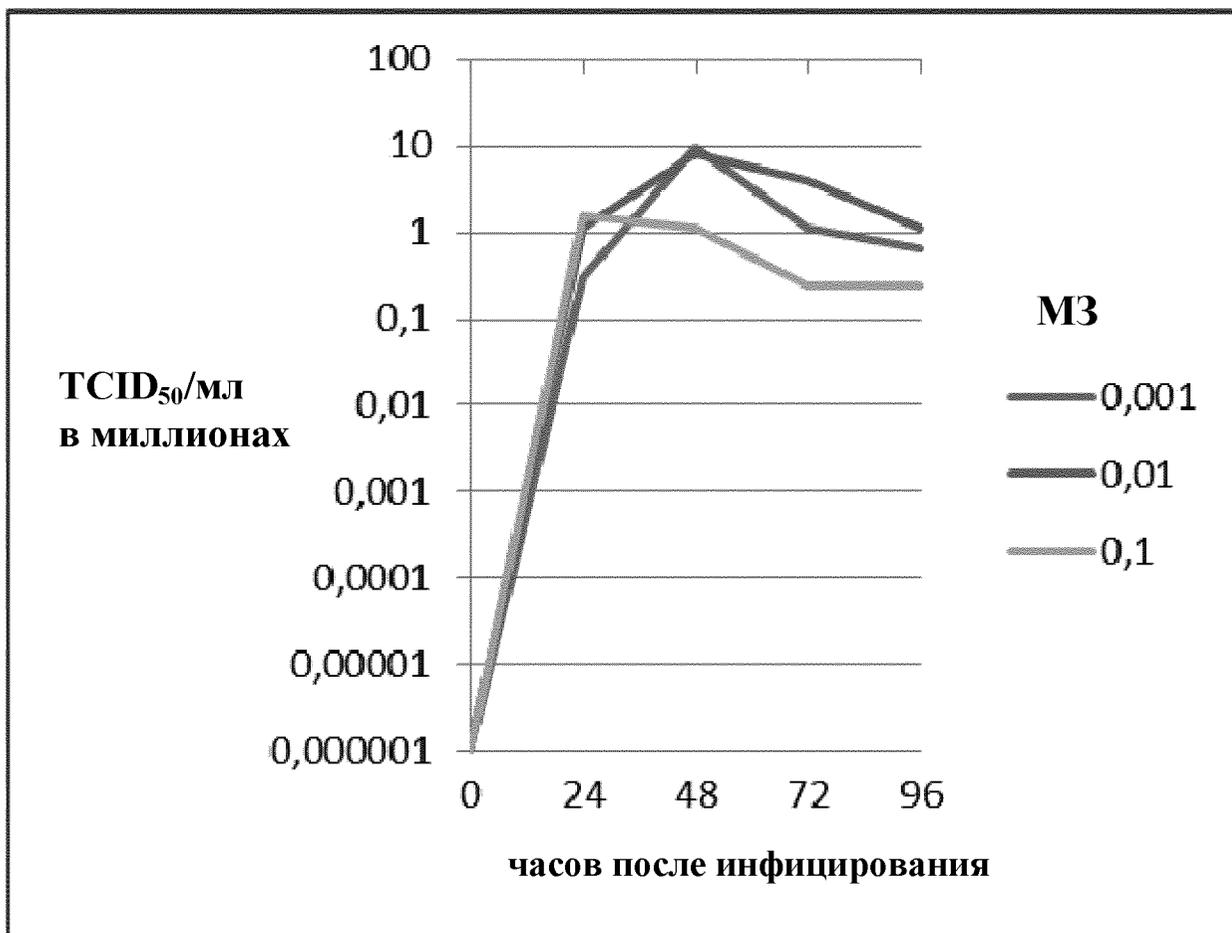
**светлопольная**



**ИФ**



**Фигура 1**

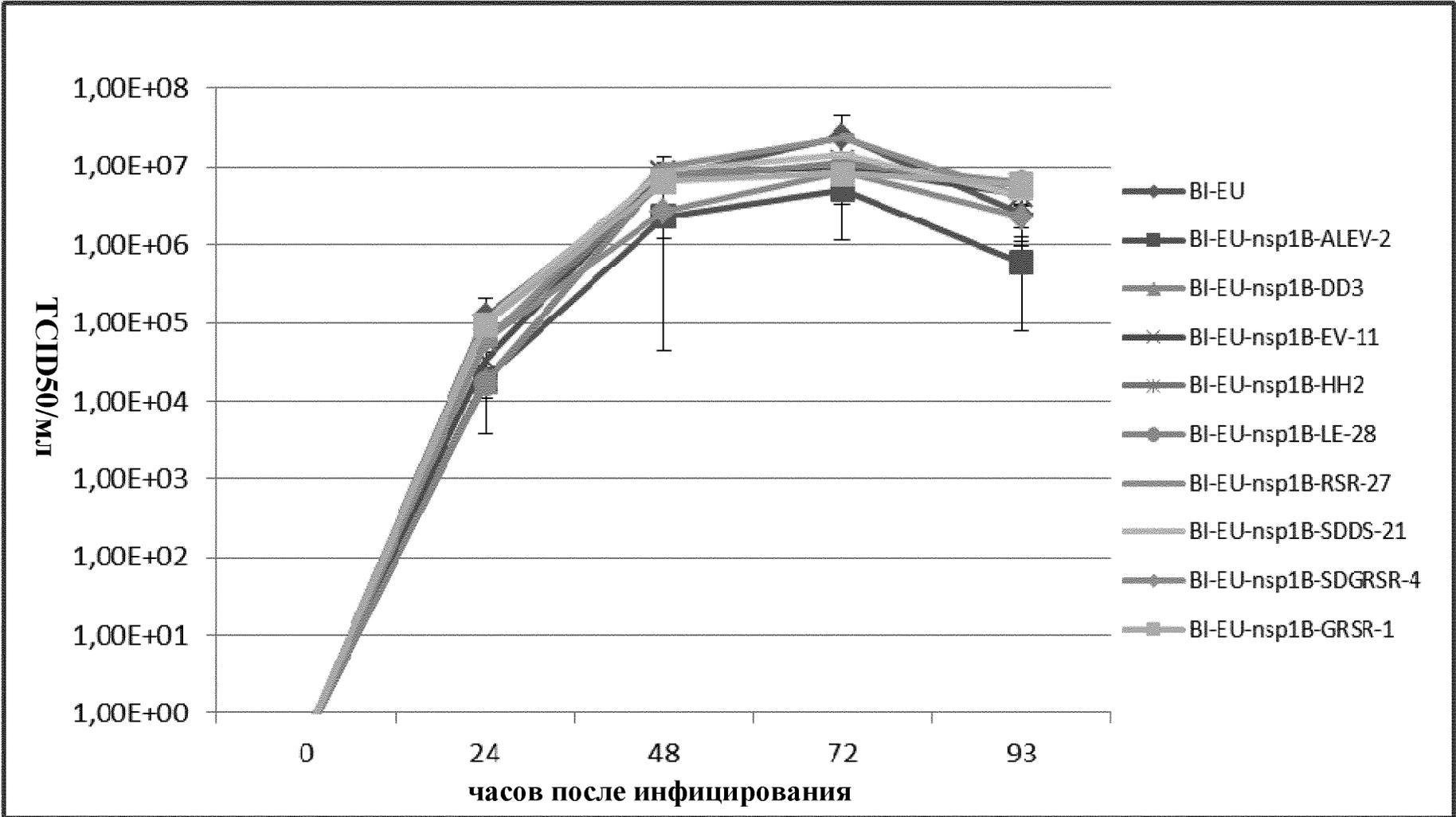


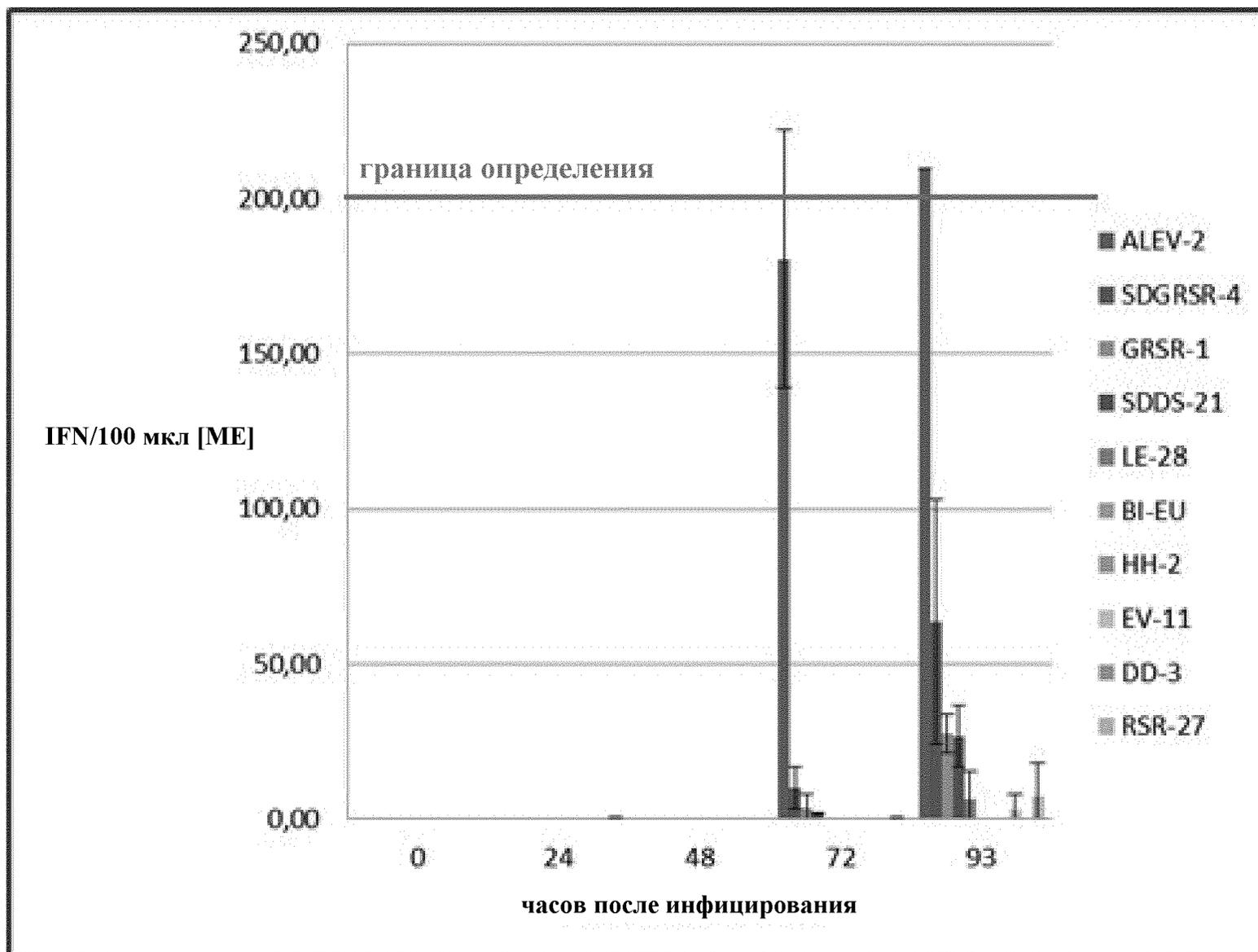
Фигура 2

					RMM	RGG		SFP		
					R22	PR24	E32	H52		
gi		325534751		gb		AD22	0000	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		325534724		gb		AD22	0001	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		156181651		gb		ABU5	0002	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		159147384		gb		ABW9	0003	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		194338901		gb		ACF4	0004	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		224177850		gb		ACG6	0005	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		224177880		gb		ACG6	0006	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		211907865		gb		ACJ1	0007	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		399145994		gb		AFP2	0008	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		260175548		gb		ACX3	0009	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		254771965		gb		ACT8	0010	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		187372768		gb		ACD0	0011	ADVVDIGRGAVMYVAG--G--KVS	WAPRGGNEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFP	PHHVVDMSRFTFMT
gi		331399		gb		AAA4627	0012	SSVYRWKKFVVFTDSSLN	GRSRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPVDLADWELTE
gi		51094058		gb		AAT95	0013	SSVYRWKKFVVFTDSSLN	GRSRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPVDLADWELTE
gi		302393818		sp		Q045	0014	SSVYRWKKFVVFTDSSLN	GRSRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPVDLADWELTE
gi		112821998		gb		ABI2	0015	SSVYRWKKFVVFTDSSPN	GRSRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPVDLADWELTE
gi		322518723		gb		ADX0	0016	SSVYRWKKFVVFTDSSPN	GRSRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPVDLADWELTE
gi		262358373		gb		ACY5	0017	SSVYRWKRFVVFTDSSPN	GRSRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPVNLADWELTE
gi		259017818		gb		ACV8	0018	SSVYRWKRFVVFTDSSPN	GRSRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPVNLADWELTE
gi		322518732		gb		ADX0	0019	SSVYRWKRFVVFTDSSPN	GRSRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPVNLADWELTE
gi		99082873		gb		ABF66	0020	SDVYRWKKFVIFTDSSPN	GRFRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPINLADWELTE
gi		40019009		gb		AAR37	0021	SDVYRWKKFVIFTDSSPN	GRFRMMWTPESDDSAALEVLPPELERQVEILIRSFP	AHHPINLADWELTE
				nsp1I		0022		SSVYRWKKFVVFTDSSPN	GRFRMMWTPESDDSALEALPELERQVEILIRSFP	AHHPVSLADWELAE
				nsp1BIEU		0023		SSIYRWEKFIEMDSSD	GRSRMMWTPESDDSALEALPELEHQVKVLR	SFPAHHLVDLADWELTE

	(1)	1	10	20	30	40	50	60
nsp1b-delALEV_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDGRSRMMWTPESDDST	----	LPPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES		
nsp1b-delEV_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDGRSRMMWTPESDDSTA	--	LLPPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES		
nsp1b-delLEV_L_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDGRSRMMWTPESDDST	----	APPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES		
nsp1b-delLE_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDGRSRMMWTPESDDSTA	--	VLPPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES		
nsp1b-delDD_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDGRSRMMWTP	---	SSTALEVLPPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES		
nsp1b-SDDS_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDGRSRMMWTP	----	ETALEVLPPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES		
nsp1b-delHH_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDGRSRMMWTPESDDSTA	LEVL	PPELEHQVKLVRSFPA	--	LVDLADWELTES
nsp1b-delGRSR_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSD	----	MMWTPESDDSTA	LEVL	PPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES
nsp1b-delRSR_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDG	---	MMWTPESDDSTA	LEVL	PPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES
nsp1b-delSDGRSR_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSS	-----	MMWTPESDDSTA	LEVL	PPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES
nsp1b_BIEU	(1)	SSI	YRWEKFVI	FMDSSSDGRSRMMWTPESDDSTA	LEVL	PPELEHQVKLVRSFPAHHLVDLADWELTES		

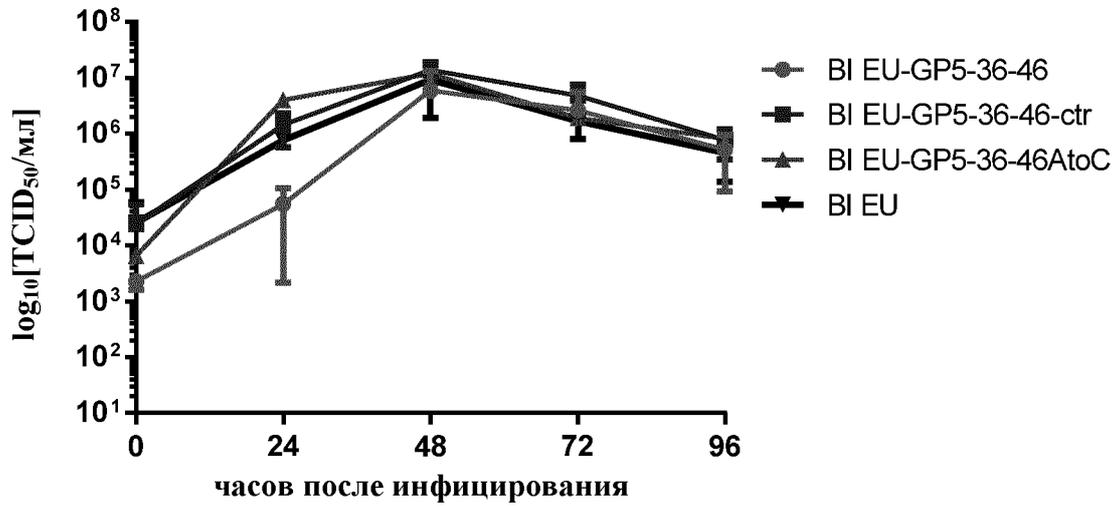
Фигура 5



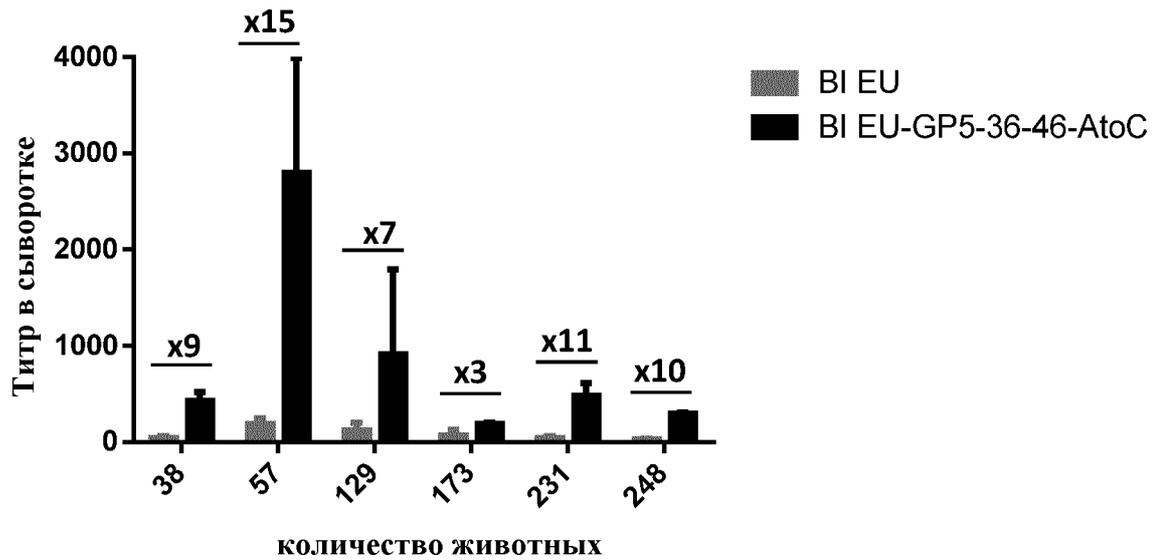


Фигура 6

Фигура 7



Фигура 8



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P01-2959/WO1	<b>FOR FURTHER ACTION</b>		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/EP2014/078929	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 19 December 2014 (19-12-2014)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 20 December 2013 (20-12-2013)	
Applicant  BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/078929

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2014/078929

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2014/078929

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. C12N7/00 C12N15/86  
 ADD.  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C12N  
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KVISGAARD L K ET AL: "Genetic and antigenic characterization of complete genomes of Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome viruses (PRRSV) isolated in Denmark over a period of 10 years", VIRUS RESEARCH, vol. 178, no. 2, 20 October 2013 (2013-10-20), pages 197-205, XP028782594, ISSN: 0168-1702, DOI: 10.1016/J.VIRUSRES.2013.10.009 figure S2	1,2,4,5, 7-10, 23-30, 75,76, 83,85-90
Y	-/-	1-41, 43-60, 62-70, 74-83, 85-90

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  16 April 2015	Date of mailing of the international search report  24/04/2015
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Sommer, Birgit
--	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/078929

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>-&amp; KVISGAARD L K ET AL: "Supplementary Figure S2, Genetic and antigenic characterization of complete genomes of Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome viruses (PRRSV) isolated in Denmark over a period of 10 years", Virus Research, 1 December 2013 (2013-12-01), page 1, XP055180373, DOI: 10.1016/j.virusres.2013.10.009 Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science?ob=MiamiCaptionURL&amp;method=retrieve&amp;eid=I-s2.0-S0168170213003560&amp;image=1-s2.0-S0168170213003560-mmc3.jpg&amp;cid=271060&amp;explode=defaultEXP_LIST&amp;idxType=defaultREF_WORK_INDEX_TYPE&amp;alpha=defaultALPHA&amp;ba=&amp;rdoc=1&amp;fmt=FULL&amp;_issn=01681702&amp;_pii=S0168170213003560&amp;m [retrieved on 2015-03-31]</p>	
X	<p>----- US 2012/213810 A1 (BURGARD KIM [DE] ET AL) 23 August 2012 (2012-08-23)</p>	31-35, 43-50
Y	claims; examples; sequence 1	1-41, 43-60, 62-70, 74-83, 85-90
X	<p>----- EP 1 018 557 A2 (PFIZER PROD INC [US]) 12 July 2000 (2000-07-12)</p>	11,13, 23, 25-30, 63,66, 74,83, 85-90
Y	example 5. 6	1-41, 43-60, 62-70, 74-83, 85-90
	<p>----- -/--</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/078929

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PRIETO C ET AL: "Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred", VETERINARY JOURNAL, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB, vol. 175, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 356-363, XP022516400, ISSN: 1090-0233, DOI: 10.1016/J.TVJL.2007.01.021</p>	<p>75,76, 80,81, 83,85-90</p>
Y	<p>abstract; materials and methods;</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-41, 43-60, 62-70, 74-83, 85-90</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/078929

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012213810	A1	23-08-2012	
		AR 085272 A1	18-09-2013
		AU 2012217169 A1	18-07-2013
		CA 2826341 A1	23-08-2012
		CN 103370078 A	23-10-2013
		CO 6791570 A2	14-11-2013
		EA 201300915 A1	28-02-2014
		EP 2675475 A2	25-12-2013
		JP 2014507151 A	27-03-2014
		KR 20140006040 A	15-01-2014
		SG 192820 A1	30-09-2013
		TW 201300538 A	01-01-2013
		US 2012213810 A1	23-08-2012
		US 2014255442 A1	11-09-2014
		WO 2012110489 A2	23-08-2012
-----			
EP 1018557	A2	12-07-2000	
		AR 025146 A1	13-11-2002
		AR 058249 A2	30-01-2008
		AT 309364 T	15-11-2005
		AU 769841 B2	05-02-2004
		BR 9905902 A	12-12-2000
		CA 2290220 A1	22-06-2000
		CA 2440933 A1	22-06-2000
		CN 1263945 A	23-08-2000
		CY 1105680 T1	02-07-2014
		DE 69928209 D1	15-12-2005
		DE 69928209 T2	08-06-2006
		DK 1018557 T3	05-12-2005
		DK 1627919 T3	10-03-2014
		EP 1018557 A2	12-07-2000
		EP 1627919 A1	22-02-2006
		ES 2251162 T3	16-04-2006
		ES 2459568 T3	09-05-2014
		HK 1029140 A1	01-04-2005
		JP 4113642 B2	09-07-2008
		JP 4130729 B2	06-08-2008
		JP 4159242 B2	01-10-2008
		JP 4335287 B2	30-09-2009
		JP 2000189178 A	11-07-2000
		JP 2001218591 A	14-08-2001
		JP 2001224384 A	21-08-2001
		JP 2004081218 A	18-03-2004
		JP 2008113670 A	22-05-2008
		JP 2008131957 A	12-06-2008
		JP 2008289485 A	04-12-2008
		MX PA03009354 A	02-03-2004
		NZ 501264 A	28-09-2001
		NZ 513289 A	29-04-2003
		PT 1627919 E	02-05-2014
		US 6500662 B1	31-12-2002
		US 2002172690 A1	21-11-2002
		ZA 9907289 A	24-05-2001
-----			

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-90

an isolated PRRS virus comprising an ORF4 protein having a mutation as well as subject-matter related thereto;

1.1. claims: 1-30, 36-83, 85-90(all partially)

an isolated PRRS virus comprising an ORF4 protein which comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 1-12 as well as subject-matter related thereto;

1.2. claims: 1-30, 36-83, 85-90(all partially)

an isolated PRRS virus comprising an ORF4 protein having a deletion of 9, 10, 11 or more amino acid residues in the region between the first two predicted N-terminal b-sheets as compared to the ORF4 protein of a wild type genotype I PRRS virus as well as subject-matter related thereto;

1.3. claims: 1-6, 9-23, 25-30, 36-40, 43-46, 50, 56, 57, 63-74, 80-83, 85-90(all partially)

an isolated genotype II PRRS virus comprising an ORF4 protein having a deletion of 5, 6, 7 or more amino acid residues in the region between the first two predicted N-terminal b-sheets as compared to a wild type genotype II PRRS virus as well as subject-matter related thereto;

1.4. claims: 11-23, 25-30, 63-74, 80-83, 85-90(all partially)

a PRRS virus genetically modified to contain therein exogenous RNA, wherein the exogenous RNA is inserted into the orf4 gene of said virus as well as subject-matter related thereto;

1.5. claims: 31-35, 84(completely); 36-83, 85-90(partially)

a nucleic acid molecule which encodes a genotype I PRRS virus according to claim 31 as well as subject-matter related thereto;

1.6. claims: 75, 76, 79-83, 85-90(all partially)

a genotype I virus comprising an ORF4 protein having a proline residue at amino acid position 56, wherein the numbering of the amino acid position refers to the amino acid sequence of ORF4 protein of the Lelystad virus as well as subject-matter related thereto;

1.7. claims: 77-83, 85-90(all partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

a genotype I virus comprising an ORF4 protein having a glutamine residue at amino acid position 66, wherein the numbering of the amino acid position refers to the amino acid sequence of ORF4 protein of the Lelystad virus as well as subject-matter related thereto;

---