

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041575**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.09

(21) Номер заявки
201890110

(22) Дата подачи заявки
2016.06.23

(51) Int. Cl. **C07K 14/08** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МИНОРНЫЕ БЕЛКИ PRRSV, И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/183,410**

(32) **2015.06.23**

(33) **US**

(43) **2018.05.31**

(86) **PCT/US2016/038964**

(87) **WO 2016/210094 2016.12.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРИАЛ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Мебатсон Тезом, Касса Эмро, Ким
Тэчун (US)**

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

(56) JIANG W. ET AL.: "Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus", VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 136, no. 1-2, September 2008 (2008-09), pages 50-57, XP022818917, ISSN: 0168-1702, DOI: 10.1016/J.VIRUSRES.2008.04.016 [retrieved on 2008-06-06], page 54-56; figures 1,7
WO-A1-2012108840

AMONSIN ALONGKORN ET AL.: "Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes)", VIROLOGY JOURNAL, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 16 September 2009 (2009-09-16), page 143, XP021059669, ISSN: 1743-422X, DOI: 10.1186/1743-422X-6-143, page 2

WO-A1-9939582

WO-A2-2007064742

WO-A2-0003030

NEDZAD MUSIC ET AL.: "The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis", ANIMAL HEALTH RESEARCH REVIEWS, vol. 11, no. 02, 14 April 2010 (2010-04-14), pages 135-163, XP055299831, GB ISSN: 1466-2523, DOI: 10.1017/S1466252310000034, page 147-148; table 1

(57) Изобретение относится к вакцинам или композициям рекомбинантного вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV). В частности, изобретение охватывает рекомбинантные аденовирусные векторы, кодирующие и экспрессирующие антигены, белки, эпитопы или иммуногены gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 и/или E из PRRSV. Такие вакцины или композиции могут использоваться для защиты животных от PRRSV.

B1**041575****041575 B1**

Перекрестная ссылка на связанные заявки

Эта заявка заявляет приоритет предварительной заявки USSN 62/183 410, поданной 23 июня 2015 г., полностью включенной в нее ссылкой.

Включение ссылкой

Любые вышеуказанные заявки и все документы, указанные в них или во время их рассмотрения ("цитируемые заявкой документы"), и все документы, цитируемые или упоминаемые в цитированных заявках, и все документы, цитируемые или упоминаемые в данном документе ("документы, цитируемые в данном документе"), и все цитированные документы или ссылки в цитированных документах, вместе с инструкциями изготовителя, описаниями, спецификациями продукта и технологическими картами для любых продуктов, упомянутых в данном документе или в любом документе, включенном в данный документ в качестве ссылки, настоящим включены сюда ссылкой и могут быть использованы при практическом осуществлении изобретения. Цитирование или идентификация любого такого документа в этой заявке не является признанием того, что такой документ доступен в качестве предшествующего уровня техники для настоящего изобретения и не отражает какого-либо представления о пригодности, патентоспособности и/или принудительной реализации упомянутых патентных документов. Все последовательности, на которые даются ссылки с помощью учетных номеров GenBank, включены в настоящее описание ссылкой во всей их полноте, и указанные последовательности приведены в GenBank по дате подачи настоящей заявки.

Заявление в отношении перечня последовательностей

Перечень последовательностей, связанных с этой заявкой представлен в текстовом формате вместо бумажной копии, и включен в данное описание в виде ссылки. Название текстового файла, содержащего список последовательностей, -MER_15_265_ST25. Текстовый файл-279 КБ был создан 13 июня 2016 г. и представляется в электронном виде через EFS-Web, одновременно с подачей описания.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение охватывает рекомбинантные вакцины PRRSV, на основе аденовирусного вектора, композиции и способы их применения.

Сущность изобретения

PRRSV представляет собой разрушительную вирусную инфекцию свиней с огромным экономическим значением (Derald J. Holtkamp, 2013). Имеет место большая изменчивость в антигенных характеристиках различных изолятов, и эффективные меры по предотвращению инфекций ограничены. Для PRRS доступны две основные группы вакцин, которые являются ослабленным модифицированным живым вирусом (MLV) или вакциной на основе убитого вируса. Вакцины MLV, хотя и эффективны при иммунизации против гомологов, не обеспечивают более широкой защиты среди многих циркулирующих вариантов и могут вернуться к дикому типу, что приводит к фульминантной инфекции. Кроме того, животные, вакцинированные вакцинами MLV, продолжают выделять вирус, и фермы, которые используют эти вакцины, не могут быть свободными от PRRSV. С другой стороны, убитые вирусные вакцины намного безопаснее, но менее эффективны, чем вакцины MLV. Таким образом, существующие варианты профилактики инфекции не являются ни безопасными, ни эффективными (Charerntantanakul, 2012) (Tjeerd G. Kimman, 2009). В течение большей части последних двух десятилетий были предприняты согласованные усилия по разработке рекомбинантных вакцин, которые могут устранить основные недостатки существующих вакцин (Zhang, 2012). Однако, несмотря на значительные усилия, на рынке нет единственной рекомбинантной вакцины, лицензированной для профилактики инфекции PRRSV. Большинство рекомбинантных вакцин, которые были оценены в прошлом, были основаны на одном или комбинации белков вирусной оболочки, которые, как считается, являются мишенями нейтрализующего антительного ответа. Однако отсутствие полного понимания функционального взаимодействия как между белками оболочки, так и с рецептором на клетках-мишенях затрудняло рациональное проектирование эффективных рекомбинантных вакцин.

Белки вирусной оболочки PRRSV обычно классифицируются на мажорные и минорные белки, основанные на обилии белков в вирионе (Dokland, 2010) (Dea S, 2000). Мажорными белками вирусной оболочки являются gp5 (ORF 5) и M (ORF 6), которые образуют димер. Минорными белками оболочки являются gp2 (ORF2), gp3 (ORF3), gp4 (ORF4) и E (ORF2b) и, вероятно, недавно идентифицированный вирусный белок gp5a (ORF 5 a). Считается, что минорные белки оболочки существуют как мультимеры, и они участвуют в прямом взаимодействии с рецептором CD163 и опосредуют вирусный вход (Phani B. Das, 2010).

Большинство предыдущих попыток разработать рекомбинантные вакцины были сосредоточены на мажорных белках, gp5, M или их комбинации (Dea, 1998). Вероятно, это связано с тем, что антитела к мажорным белкам легко обнаруживаются у инфицированных PRRSV животных и предполагается, что они могут презентировать нейтрализующие мишени для иммунной системы. Кроме того, существует большая степень изменчивости последовательности в gp5, указывающая на то, что эти белки находятся под давлением иммунного отбора. Однако исследование gp5-специфичных антител в нейтрализующих сыроворотках показало, что эти антитела в основном относятся к ненейтрализующей фракции сыровороток (Juan Li, 2012). Следовательно, это указывает на присутствие первичной нейтрализующей мишени на

белках вирусной оболочки, отличных от мажорных белков и, вероятно, на минорных белках. Несмотря на значительные усилия по разработке мажорных белков в качестве антигенов в рекомбинантных вакцинах, начиная от очищенных рекомбинантных белков до вакцин, доставляемых с использованием различных векторных платформ (Jazmina LG Cruza, 2010), ни один из них не вышел на рынок из-за неспособности обеспечить надежную защиту.

В последнее время основное внимание в разработке рекомбинантной вакцины PRRS сместилось на минорные белки (Jing-Qiang Ren, 2014) (Sakthivel Subramaniam, 2014) (ZS WANG, 2011). Этот сдвиг в основном был обусловлен тремя недавними находками. Во-первых, было показано, что двое из числа минорных белков gp2 и gp4 непосредственно связываются с рецептором CD163. Во-вторых, обмен минорными белками, но не мажорными белками с EAV (вирусом конского артериита), а также артеривирусом, изменяет тропизм вируса, указывая на важность минорных белков во взаимодействии с рецептором и направлении вируса к клеткам-мишеням (Lu Z1, 2012) (Tian D, 2012). Наконец, нокаутирующие мутанты CD163, который является основным рецептором для минорных белков, предотвращают вирусную инфекцию, тогда как аналогичный нокаут для CD169, рецептора мажорных белков, не влияет на вирусный вход (Randall S. Prather, 2013). Несмотря на растущие знания о роли минорных белков в проникновении вируса и в качестве релевантной мишени для нейтрализации ответа на антитела, ни одна из рекомбинантных вакцин, разработанных до сих пор на основе минорных белков, не привела к защите вакцинированного животного от инфекции PRRS.

В данном документе мы показываем, что включение другого минорного белка E в эту комбинацию минорных белков приводило в значительной степени отличному защитному ответу. Удивительно, но присутствие белка E вместе с gp2, gp3 и gp4 вызывало устойчивый иммунный ответ и уменьшало поражение легких из-за заражения PRRS. Это первый случай, когда белок E был показан как критический компонент белкового комплекса, который может индуцировать защитный иммунный ответ. Это было достигнуто не только путем идентификации белка E в качестве основного компонента комплекса минорных белков, но и путем экспрессии всех четырех белков с одной векторной платформы, что способствовало образованию белкового комплекса. Этот новый вывод будет не только способствовать более глубокому пониманию критических взаимодействий между вирусными белками и клеточным рецептором, но и прокладывает путь к получению универсальной рекомбинантной вакцины PRRS, которая фактически не содержит живого PRRSV.

В наших руках вакцинация животных с помощью объединенных плазмид, экспрессирующих gp2, gp3 и gp4, не способствовала созданию надежного иммунного ответа (неопубликованное наблюдение). Вывод из этого эксперимента на животных заключался в том, что эти белки, как предполагается, существуют как мультимеры, поэтому экспрессия всех белков одновременно в одной клетке для стимуляции мультимеризации требуется для образования правильной конформации, которая представляет нейтрализующий эпитоп для иммунной системы. Последующие биохимические анализы также показали это, и все белки были помещены в один вектор, чтобы обеспечить одновременную экспрессию. Удивительно, но в приведенном в данном документе исследовании на животных мы обнаружили, что этого также недостаточно для индукции защитного иммунного ответа. Скорее, решающим фактором для индукции защитного иммунного ответа этими антигенами была модификация, введенная для перенацеливания белков из внутриклеточных компартментов на поверхность клеток. Такая драматическая разница между модифицированными и немодифицированными белками была совершенно неожиданной и открыла новые возможности для решения аналогичных задач с различными вирусными мишенями. Также это было выявлено впервые, насколько нам известно; иммуногенность минорных белков оболочки PRRSV была повышена до такой степени, что она может обеспечить как защиту от поражения легкого, так и снижение риска виремии сыворотки путем одновременной экспрессии всех минорных белков из одного вектора и введения модификаций, которые улучшают экспрессию на поверхности клетки.

Список литературы

- Changhee Lee, D. Y. (2006). The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology*, 30–43.
- Charemtantanakul, W. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World Journal of Virology*, 23–30.
- Dea S, G. C. (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology*, 659–688.

- Dea, B. P. (1998). Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, 989-999.
- Derald J. Holtkamp, J. K. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on united States Pork producers. *Journal of Swine Health and production*, 72-84.
- Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus Reserach*, 86-97.
- F. A. Osorio, J. A. (2002). Passive Transfer of Virus-Specific Antibodies Confers Protection against Reproductive Failure Induced by a Virulent Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Establishes Sterilizing Immunity. *Virology*, 9-20.
- Jazmina L.G. Cruza, S. Z. (2010). Vectored vaccines to protect against PRRSV. *Virus Research*, 150-160.
- Jing-Qiang Ren, W.-C. S.-J.-B.-L.-X.-P.-W.-Y. (2014). Construction and immunogenicity of a DNA vaccine coexpressing GP3 and GP5 of genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *BMC Veterinary Research*, 1-11.
- Juan Li, M. P. (2012). Dissociation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralization from antibodies specific to major envelope protein surface epitopes. *Virology*, 367-376.
- Lu Z1, Z. J. (2012). Chimeric viruses containing the N-terminal ectodomains of GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus do not change the cellular tropism of equine arteritis virus. *Virology*, 99-109.
- Maorong Yua, X. L. (2010). Subcellular localization and topology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus E protein. *Virus Reserach*, 104-114.
- Meng, X. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology* 74 (2000) 309±329, 309-329.
- O. J. Lopez, M. F. (2007). Protection against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infection through Passive Transfer of PRRSV-Neutralizing Antibodies Is Dose Dependent. *linical and Vaccine Immunology*, 269-275.
- Phani B. Das, P. D. (2010). The Minor Envelope Glycoproteins GP2a and GP4 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interact with the Receptor CD163. *Journal of Virology*, 1731-1740.
- Randall S. Prather, R. R. (2013). An Intact Sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) Is Not Required for Attachment/Internalization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Virology*, 9538–9546.
- Sakthivel Subramaniam, P. P. (2014). In vivo targeting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen through porcine DC-SIGN to dendritic cells elicits antigen-specific CD4T cell immunity in pigs. *Vaccine*, 6768–6775.
- Tian D, W. Z.-D. (2012). Arterivirus minor envelope proteins are a major determinant of viral tropism in cell culture. *Journal of Virology*, 3701-3712.
- Tjeerd G. Kimman, L. A.-Z. (2009). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine*, 3704–3718.
- Yijun Du, F. A. (2010). Myristoylation of the small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus is non-essential for virus infectivity but promotes its growth. *Virus Research*, 294–299.
- Z.S. WANG, X. X. (2011). Immunogenicity of the envelope GP3 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus displayed on baculovirus. *Acta Virologica*, 139-146.
- Zhang, J. H. (2012). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vaccines: Current Status and Strategies to a Universal Vaccine. *Transboundary and Emerging Diseases*, 109-120.

Настоящее раскрытие содержит новые композиции вакцины PRRSV и способы их изготовления и применения.

Это раскрытие частично основано на удивительном и неожиданном обнаружении того, что включение еще одного минорного белка PRESV (E) в другие комбинации минорных белков приводило к значительно отличающемуся защитному ответу. В некоторых воплощениях достаточные части белка E, например, его трансмембранного (TM), аминоконцевого (NT) или его карбоксильного терминального (CT) домена, могут использоваться для вызова упомянутого защитного ответа.

Удивительно, но присутствие белка Е вместе с gp2, gp3 и gp4 вызывало устойчивый иммунный ответ и уменьшало поражение легких из-за заражения PRRS. Это первый случай, когда белок Е был показан как критический компонент белкового комплекса, который может индуцировать защитный иммунный ответ.

Таким образом, раскрытые вакцины были получены не просто путем идентификации белка Е в качестве основного компонента комплекса минорных белков, но также путем экспрессии всех четырех белков с одной векторной платформы, которая способствовала образованию белкового комплекса.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены рекомбинантные вирусные векторы, экспрессирующие химерные версии минорных белков PRRSV, которые содержат другие детерминанты клеточной локализации по сравнению с их соответствующими генами дикого типа. В частности, была добавлена часть гликопротеина (G) VSV и белка-активатора тканевого плазминогена (tPA), чтобы заставить полученные продукты химерных генов локализоваться на поверхности клетки. Эти рекомбинантные векторы вызывают безопасные и эффективные иммунные ответы у хозяина-животного против PRRSV. Таким образом, модификации, внесенные в минорные белки PRRSV для получения их поверхностной экспрессии, дали такой же эффект, как и коэкспрессия белка Е вместе с gp2, gp3 и gp4.

Соответственно, это раскрытие, таким образом, обеспечивает дорожную карту для получения универсальной рекомбинантной вакцины PRRS, которая на 100% не содержит живого PRRSV.

Настоящее изобретение, в частности, относится к вакцине или композиции PRRSV с вектором на основе аденовируса, которая включает один или несколько векторов с сконструированным рекомбинантным аденовирусом, которые содержат и экспрессируют определенные антигены PRRSV и, необязательно, фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант, эксципиент или носитель. PRRSV может быть любым штаммом, поскольку новые и оригинальные композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, универсально применимы ко всем известным и еще не обнаруженным штаммам PRRSV по причинам, более подробно описанным ниже.

Антиген PRRSV включает минорные белки PRRSV (например, gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или Е) в любой комбинации и необязательно включает дополнительные мажорные белки PRRSV (например, gp5 или М). Подобно другим минорным белкам gp5a относительно консервативен и, по мнению заявителей, является эффективным добавлением или заменой безопасных и эффективных рекомбинантных вирусных векторов моментального раскрытия.

Рекомбинантные векторы PRRSV могут содержать и экспрессировать в животном-хозяине, по меньшей мере, следующие комбинации (в любом порядке и управляемые любым промоторным элементом, РЕ, включая указанный, и включающий такие элементы, как IRES и 2А-пептиды) генов или компонентов (rtg = перенацеливание, CMV = промотор цитомегаловируса, SV40 = промотор вируса обезьян 40, IRES = внутренний сайт связывания рибосомы, саморасщепляющиеся 2А пептиды, полученные из вируса ящура, вируса конского ринита А, вируса *Thosea asigna* или свиного тесковируса-1):

- 1) (РЕ) gp2, (РЕ) gp3, (РЕ) gp4, (РЕ) Е; 2) (РЕ) *rtg* gp2, (РЕ) gp3 и (РЕ) gp4; 3) (РЕ) *rtg* gp2, (РЕ) *rtg* gp3 и (РЕ) *rtg* gp4; 4) (РЕ) *rtg* gp2, (РЕ) *rtg* gp3, (РЕ) *rtg* gp4 и (РЕ) Е; 5) (РЕ) *rtg* gp2, (РЕ) *rtg* gp3, (РЕ) *rtg* gp4 и (РЕ) *rtg* Е; 6) (РЕ) *rtg* gp2, (РЕ) *rtg* gp4 и (РЕ) *rtg* Е; 7) (РЕ) *rtg* gp2 и (РЕ) *rtg* gp4; 8) (М-(SV40)-(CMV)-gp5-(IRES)-gp5a; 9) gp2-(SV40)-(CMV)-Е; 10) *rtg* gp2-(SV40)-(CMV)-Е; 11) *rtg* gp2-(SV40)-(CMV)-*rtg* Е; 12) (CMV)-Е; 11) Е-(p2A)-gp2-(SV40)-(CMV)-gp4; 12) *rtg* Е-(p2A)-*rtg* gp2-(SV40)-(CMV)-*rtg* gp4; 13) (РЕ) gp2-(РЕ) gp4-(РЕ) Е; 14) (РЕ) gp2-(РЕ) Е; 15) (РЕ) gp2; 16) (РЕ) gp2-(РЕ) gp3; 16) (РЕ) gp2-(РЕ) gp4; 17) (РЕ) gp2-(РЕ) gp5a; 18) (РЕ) Е; 19) (РЕ) Е-(РЕ) gp3; 20) (РЕ) Е-(РЕ) gp4; 19) (РЕ) Е-(РЕ) gp5a; 20).

В предпочтительном воплощении вектор содержит и экспрессирует как минимум (РЕ) gp2, (РЕ) gp4 и (РЕ) Е, либо дикого типа, либо их "rtg" версии. Вектор также может преимущественно содержать gp2 плюс любой другой ген, кодирующий полипептид PRRSV.

Перенацеливание может быть выполнено путем замены существующих трансмембранных доменов (ТМ) и доменов цитоплазматических хвостов (СТ) gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или Е белков на соответственно домены ТМ и СТ из VSV. В одном воплощении белки gp5 и М также могут быть подвергнуты процедуре перенацеливания. Нативные последовательности белка PRRSV могут также или альтернативно быть заменены сигнальной последовательностью tPA и либо ТМ, либо СТ из VSV (или теми же элементами из другого подходящего поверхностно-экспрессированного полипептида). В ином случае, перенацеливание может быть выполнено путем замены существующих доменов СТ у gp2, gp3, gp4, gp5a, Е, gp5 или М белков доменами СТ из VSV (т.е. без изменения существующих доменов ТМ). Перенацеливание Е также может быть достигнуто путем замены его сигналов клеточной локализации на сигналы от мембранного белка типа II или VSV-G или их комбинаций или доменов ТМ/СТ других поверхностных гликопротеинов.

Заявители дополнительно предвидят множество альтернативных способов представления антигенов

PRRSV иммунной системе животного-хозяина. Например, антигены могут презентироваться на поверхности вирусоподобных частиц (VLP). В других воплощениях растворимые версии антигенов можно вводить животному-хозяину, при этом происходит олигомеризация (включая тримеризацию) белков друг с другом или, дополнительно, с компонентами VSV-G или другими вирусными белками или любая другая олигомеризация (включая мотивы тримеризации) (например, мотивы из бактериального GCN4 и тому подобное). Кроме того, предполагается, что ТМ/СТ-домены вирусных поверхностных гликопротеинов типа I достигают той же цели, что, и, следовательно, взаимозаменяемы с, соответствующие домены из VSV-G.

Соответственно в настоящее время, когда изобретение было раскрыто, специалист в данной области распознает множество альтернативных и функционально эквивалентных способов достижения практически одинаковой презентации минорных белков PRRSV, включая E, gp2, gp3, gp4, gp5a, мажорных белков, включая gp5 и M, или комбинации минорных и/или мажорных белков, иммунной системе животного-хозяина.

Изобретение также относится к способу вакцинации животного, включающему введение животному эффективного количества одной или нескольких вакцин или композиций, которые могут содержать эффективное количество вакцины, кодируемой аденовирусом PRRSV, и, необязательно, фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант, наполнитель или носитель. Введение может быть подкожным, интраназальным, внутримышечным, трансдермальным, внутрикожным, слизистым, включая пероральное или любое другое введение.

Изобретение также относится к введению вакцины или композиции с использованием протокола "прайм-буст". Изобретение далее охватывает набор для осуществления способа вызова или индукции иммунного ответа, который может содержать любую из рекомбинантных Ad5 иммунных композиций или вакцин, или инактивированных иммунологических композиций или вакцин, и инструкций для осуществления способа.

Соответственно цель изобретения заключается не в охвате изобретения какого-либо ранее известного продукта, способа изготовления продукта или способа применения продукта, так что заявители оставляют за собой право и настоящим раскрывают отказ от любого ранее известного продукта, процесса или способа. Кроме того, следует отметить, что изобретение не намерено охватывать в рамках объема изобретения какой-либо продукт, способ или изготовление продукта или способ применения продукта, который не соответствует письменному описанию и требованиям к применению USPTO (35 USC §112, первый абзац) или ЕРО (статья 83 ЕРС), так что заявители оставляют за собой право и настоящим раскрывают отказ от любого ранее описанного продукта, процесса изготовления продукта или способа применения продукта.

Эти и другие воплощения изобретения раскрыты или очевидны из нижеследующего подробного описания или охватываются им.

Краткое описание чертежей

Нижеследующее подробное описание, приведенное в качестве примера, но не предназначенное для ограничения изобретения исключительно конкретными описанными воплощениями, может быть лучше всего понято в сочетании с прилагаемыми чертежами, на которых:

На фиг. 1 представлены карты вставок, используемых для получения четырех различных рекомбинантных вирусных векторов, экспрессирующих минорные белки вирусной оболочки вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV). vAD3042 экспрессирует оптимизированные по кодонам белки gp2 из PRRSV, gp3 и gp4 без E (A); vAD3038 экспрессирует оптимизированные по кодонам, перенацеленные ("rtg") rtg-gp2, rtg-gp3 и rtg-gp4 без E (B); vAD3041 экспрессирует оптимизированные по кодонам gp2, gp3, gp4 с E (C); vAD3067 экспрессирует оптимизированные по кодонам rtg-gp2, rtg-gp3, rtg-gp4 с E (D); vAD3046 экспрессирует оптимизированный по кодонам гемагглютинин вируса свиного гриппа (SIV-HA) (E); vAD3069 экспрессирует оптимизированный по кодонам нуклеопротеин (Np или N), M, gp5 и gp5a (F); и vAD3064 экспрессирует оптимизированный по кодонам rtg-M, rtg-gp5 и rtg-gp5a (G);

Фиг. 2 представляет собой схему, показывающую расположение "мажорных" и "минорных" белков PRRSV на поверхности вирусной мембраны;

Фиг. 3 представляет собой схему, показывающую расположение и взаимодействие "минорных" белков PRRSV, поскольку текущие и раскрытые данные свидетельствуют о том, что эти белки взаимодействуют с поверхностными рецепторами хозяина (например, CD163);

Фиг. 4 представляет собой изображение геля, демонстрирующее ПЦР-ампликон области минорного белка PRRSV, вставленного в vAD3041 пассаж 3 (A) и vAD3042 пассаж 3 (B);

На фиг. 5A представлена схема, используемая для перенацеливания белков оболочки PRRSV на поверхность клетки;

На фиг. 5B-5D представлены карты rtg-gp2, rtg-gp3 и rtg-gp4, где эндогенные домены ТМ и СТ были заменены трансмембранным доменом и доменом цитоплазматического хвоста (СТ) вируса везикулярного стоматита-G (VSV-G), сигнальная последовательность была заменена, добавлены метки эпитопа и вставлены линкерные последовательности;

На фиг. 6 представлены изображения иммунофлуоресцентного анализа (IFA) фиксированных клеток НЕК 293Т, которые были трансфицированы белками rtg-gr2, rtg-gr3 и rtg-gr4 с эпитопной меткой;

На фиг. 7 показан анти-VSVG-вестерн-блот (WB) коиммунопреципитированных (co-IP) лизатов из клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидами, кодирующими каждый из отдельных перенацеленных белков оболочки;

На фиг. 8 показаны несколько WB co-IP-лизатов из клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидами, кодирующими каждый из отдельных перенацеленных белков оболочки или свиной CD16. IP: α -VSV, Wb: α -VSV-HRP (A); IP: α -VSV, Wb: α -CD163 (B); IP: α -CD163, Wb: α -CD163-биотин (C);

На фиг. 9А-9С представлены изображения двойного иммунофлуоресцентного анализа (IFA) клеток НЕК 293, инфицированных vAD3038 (содержащего кодон-оптимизированный rtg-gr234); и окрашенных одновременно двумя антителами, специфичными для указанных белков и с различными флуорофорными метками.

Изображения были взяты из одного и того же оптического поля с использованием фильтров, специфичных для каждого флуорофора. Соответствующие изображения показаны стрелкой;

Фиг. 10 представляет собой диаграмму, в которой подробно изложены собранные образцы и время сбора в течение всего исследования;

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий распределение баллов поражения легкого среди разных групп. vAD3042 (Ad5, экспрессирующий кодон-оптимизированные gr2 дикого типа, gr3 дикого типа и gr4 дикого типа); vAD3041 (Ad5, экспрессирующий кодон-оптимизированные gr2 дикого типа, gr3 дикого типа, gr4 дикого типа и E дикого типа); vAD3038 (Ad5, экспрессирующий кодон-оптимизированные rtg-gr2, rtg-gr3 и rtg-gr4); и vAD3033 (Ad5, экспрессирующий кодон-оптимизированный ген гемагглютинаина (HA), вируса свиного гриппа (SIV), отрицательный контроль). Медиана (поперечная планка) и среднее (+) и прямоугольники представляют диапазон между 1-й и 3-й интерквартильной шириной. Серые круги указывают фактические баллы легкого для каждого отдельного животного в каждой группе;

Фиг. 12 перечисляет и описывает последовательности, присутствующие в списке последовательностей;

Фиг. 13 представляет собой выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей gr2, представленных в SEQ ID NO: 34-39;

Фиг. 14 представляет собой выравнивание ClustalW последовательностей полипептидов gr3, представленных в SEQ ID NO: 40-45;

Фиг. 15 представляет собой выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей gr4, представленных в SEQ ID NO: 46-51;

Фиг. 16 представляет собой выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей E, представленных в SEQ ID NO: 52-58;

Фиг. 17 представляет собой выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей gr5a, представленных в SEQ ID NO: 62-65;

Фиг. 18 представляет собой график, показывающий баллы поражения легких для свиней, которым вводили либо vAd3038 (Gr234-Rtg + Killed Vaccine), либо vAd3046 (SIV-HA);

Фиг. 19 представляет собой график, показывающий вирусную нагрузку в сыворотке для свиней, которым вводили либо vAd3038 (Gr234-Rtg + Killed Vaccine), либо vAd3046 (SIV-HA);

Фиг. 20 сравнивает иммунные ответы групп 1, 2, 4 и 5 до и после заражения. Вестерн-блоты были исследованы с помощью анти-V5 для визуализации уровней белка E (вверху слева); анти-Flag для обнаружения gr3 (справа) и анти-HA для визуализации уровней белка gr4 (внизу слева);

Фиг. 21 представляет собой график, показывающий баллы поражения легких для свиней, которым вводили vAD3067 (IM/IM), с последующим введением убитой вакцины, vAD3067 (IN/IM) с последующим введением убитой вакцины; vAD3067 + vAD3064 (IN/IM), с последующим введением убитой вакцины; или vAD3046, с последующим введением плацебо. Все убитые вакцины давались однократно IM;

Фиг. 22 представляет собой график вирусной нагрузки в сыворотке свиней, которым вводили vAD3067 (IM/IM), с последующим введением убитой вакцины, vAD3067 (IN/IM), с последующим введением убитой вакцины; vAD3067 + vAD3064 (IN/IM), с последующим введением убитой вакцины; или vAD3046 и плацебо. Все убитые вакцины давались сразу IM;

На фиг. 23 показаны результаты исследования иммунопреципитации, предназначенного для детального исследования возможного взаимодействия между E и перенацеленным gr4 (взаимодействие не наблюдалось). В конструкции метка Flag прикреплена к gr3; метка V5 прикреплена к E; метка HA прикреплена к gr4; а метка Мус прикреплена к gr2. WB (вестерн-блот), IP (иммунопреципитация), S (растворимый gr) и V (VSV-меченный gr);

На фиг. 24 показаны результаты исследования IP, предназначенного для детального исследования возможного взаимодействия между E и перенацеленным gr3 (взаимодействие не наблюдается).

Подробное описание

Следует отметить, что в данном описании и, в частности, в формуле изобретения и/или абзацах та-

кие термины, как "содержать", "содержит", "содержащий" и т.п., могут иметь значение, приписанное им в патентном законодательстве США; например они могут означать "включать", "включает", "включающий" и тому подобное; и что такие термины, как "состоящий в основном из" и "в основном состоит из" имеют значение, присвоенное им в патентном законодательстве США, например, они разрешены для элементов, явно не перечисленных, но исключают элементы, которые находятся в известном уровне техники или влияют на основные или новые свойства настоящего изобретения.

Если иное не указано, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит данное описание. В тексте на английском языке термины в единственном числе с артиклями "a", "an" и "the" включают множественное число, если контекст явно не указывает иное. Точно также слово "или" предназначено для включения "и", если контекст явно не указывает иное.

Используемый в данном документе термин "около" означает примерно, в области, приблизительно или вокруг. Когда термин "около" используется в сочетании с числовым диапазоном, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже установленных численных значений. В общем, термин "около" используется в данном документе для изменения численного значения выше и ниже заявленного значения на 10%. В одном аспекте термин "около" означает плюс или минус 20% от численного значения числа, с которым он используется. Следовательно, около 50% означает в диапазоне от 45 до 55%. Численные диапазоны, указанные в данном документе конечными точками, включают все числа и дроби, включенные в этот диапазон (например, от 1 до 5 включает 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4 и 5). Также следует понимать, что все числа и их дроби, как предполагается, модифицируются термином "около".

В настоящем изобретении аденовирус 5 (Ad5) или другой подходящий вектор используют для доставки и экспрессии *in vivo* в животном-хозяине выбранных белков оболочки PRRSV для того, чтобы вызвать у животного безопасный и эффективный иммунный ответ против экспериментального или естественного заражения с помощью вирулентного PRRSV.

Хотя Ad5 использовался для доставки белков PRRSV в актуальном раскрытии, можно использовать любой другой подходящий вектор. Например, бакуловirus, поксвирус, в том числе поксвирус домашней птицы и оспа канареек, могут быть использованы для доставки новых и оригинальных комбинаций генов, описанных в данном документе. В другом воплощении в качестве вектора может быть использован свиной цитомегаловирус (PCMV), который представляет собой герпесвирус, обнаруженный в тканях по всему телу, включая нос новорожденных поросят, где он вызывает воспаление (ринит).

Таким образом, настоящее изобретение относится к вакцине или иммунологической композиции, которая может содержать эффективное количество одного или нескольких модифицированных векторов Ad5 или других подходящих векторов и, необязательно, фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант, эксципиент или носитель.

Соответственно, настоящее изобретение охватывает сконструированный вектор Ad5 или другой подходящий вектор, экспрессирующий белок(и) оболочки PRRSV, полипептид(ы), антиген(ы), эпитоп(ы) или иммуноген(ы), которые вызывают иммуногенную реакцию у животного. Белок PRRSV, полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген включает по меньшей мере один минорный белок PRRSV, полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген, выбранный из числа gp2, gp3, gp4, gp5a и E из PRRSV.

Используемый в данном документе термин "минорный полипептид PRRSV, антиген, эпитоп или иммуноген" относится к любому минорному полипептиду, антигену, эпитопу или иммуногену вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней. В настоящее время минорные полипептиды или их компоненты включают белки gp2, gp3, gp4, gp5a и E, но могут быть и другие белки, связанные с известными в настоящее время минорными белками, которые также могут быть эффективно использованы при практическом осуществлении раскрытого изобретения. В общем, и используемый в данном документе термин "эктодомен" относится к домену или доменам мембранного белка, которые распространяются во внеклеточное пространство. Таким образом, любая ссылка на процентную идентичность с эктодоменом данного белка не включает сравнение с неэктодоменами, включая трансмембранные домены (TMD) и цитоплазматические домены (CTD), указанного белка.

Под "животным" подразумеваются млекопитающие, люди, птицы и тому подобное. Животное может быть выбрано из группы, состоящей из лошадиных (например, лошади), собачьих (например, собак, волков, лисиц, койотов, шакалов), кошачьих (например, львов, тигров, домашних кошек, диких кошек, других крупных кошек, в том числе гепардов и рысей), овец (например, домашняя овца), бычьих (например, крупный рогатый скот, коровы, буйволы), свиней (свинья), птичьих (например, курица, утка, гусь, индейка, перепелка, фазан, попугай, зяблики, ястреб, ворона, страус, эму и казуар), приматов (например, полуобезьяны, долгопяты, обезьяны, гиббоны, человекообразные обезьяны) и рыб. Термин "животное" также включает отдельное животное на всех стадиях развития, в том числе на стадиях новорожденного, эмбриона и плода.

В настоящем изобретении первостепенное значение имеет иммунологическая защита свиней от вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Однако раскрытые в данном документе концепции будут одинаково хорошо применимы к другим вирусам, у которых, как и в данном случае, относительно низкая или ограниченная экспрессия ключевых белков поверхности, "способствующих входу в

клетку", делает разработку вакцины особенно сложной. Соответственно, как раскрыто в данном документе, повторное нацеливание и/или сопровождение таких "минорных белков оболочки" на поверхность клетки имеет широкий охват применений для всех вирусов с оболочками.

В одном воплощении иммунологическая композиция или вакцина Ad5 содержит один или несколько векторов Ad5 с адъювантом, носителем или носителем, и необязательно фармацевтический или ветеринарный приемлемый эксципиент, адъювант, переносчик или носитель. Разработанный вектор Ad5 может содержать полинуклеотид, кодирующий минорный белок, полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген PRRSV. Белок, полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген PRRSV может представлять собой gp2, gp3, gp4, gp5a, E или любой их фрагмент.

Используемый в данном документе термин "антиген" или "иммуноген" означает вещество, которое индуцирует специфический иммунный ответ у животного-хозяина. Антиген может включать целый организм, убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку, экспрессирующую эпитоп, полипептид, пептид, белок или их фрагмент с иммуногенными свойствами; часть или фрагмент нуклеиновой кислоты, способных индуцировать иммунный ответ при представлении животному-хозяину; белок, полипептид, пептид, эпитоп, гаптен или любую их комбинацию. С другой стороны, иммуноген или антиген может включать токсин или антитоксин.

Используемый в данном документе термин "иммуногенный белок или пептид" также включает пептиды и полипептиды, которые являются иммунологически активными в том смысле, что будучи однажды введенными хозяину, способны вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против белка. Предпочтительно фрагмент белка таков, что он обладает практически той же иммунологической активностью, что и полный, неповрежденный нативный белок. Таким образом, фрагмент белка согласно изобретению содержит или состоит по существу или состоит по меньшей мере из одного эпитопа или антигенной детерминанты. Термин эпитоп, также известный как антигенная детерминанта, является частью макромолекулы, распознаваемой иммунной системой и способной индуцировать иммунный ответ гуморального типа (В-клеток) и/или клеточного типа (Т-клетки).

Термин "иммуногенный белок или пептид" дополнительно рассматривает делеции, добавления и замены последовательности, при условии, что полипептид функционирует для получения иммунологического ответа, как определено в данном документе. В связи с этим, в частности, предпочтительные замены, как правило, консервативны по своей природе, то есть, являются заменами внутри семейства аминокислот. Так, например, аминокислоты, как правило, делятся на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Разумно предположить, что отдельная замена лейцина изолейцином или валином или наоборот; аспартата глутаматом или наоборот; треонина серином или наоборот; или аналогичная консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту, не окажет существенного влияния на биологическую активность. Белки, имеющие по существу одну и ту же аминокислотную последовательность, в качестве исходной молекулы, но имеющие незначительные аминокислотные замены, которые не оказывают существенного влияния на иммуногенность белка, таким образом, находятся в пределах определения эталонного полипептида.

Термин "эпитоп" относится к части макромолекулы, распознаваемой иммунной системой и способной индуцировать иммунный ответ гуморального типа (В-клеток) и/или клеточного типа (Т-клетки). Этот термин также используется взаимозаменяемо с "антигенной детерминантой" или "сайтом антигенной детерминанты". Антитела, которые распознают тот же эпитоп, могут быть идентифицированы простым иммуноанализом, показывающим способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью.

"Иммунологический ответ" на композицию или вакцину представляет собой развитие в хозяине клеточного и/или антителоопосредованного иммунного ответа на представляющую интерес композицию или вакцину. Чаще всего "иммунологический ответ" включает (но не ограничивается) один или несколько из следующих эффектов: продуцирование антител, В-клеток, хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных конкретно на антиген или антигены, включенные в композицию или представляющую интерес вакцину. Предпочтительно, хозяин будет демонстрировать либо терапевтический, либо защитный иммунологический ответ, при котором повышается устойчивость к новой инфекции и/или уменьшается клиническая тяжесть заболевания. Такая защита будет продемонстрирована либо снижением, либо отсутствием симптомов, обычно демонстрируемых зараженным хозяином, более быстрым временем восстановления и/или пониженным титром вируса в зараженном хозяине.

Используемый в данном документе термин "иммуногенный" белок или полипептид также относится к аминокислотной последовательности, которая вызывает иммунологический ответ, как описано выше. "Иммуногенный" белок или полипептид, при использовании в данном документе, включает полную размерную последовательность белка, его аналоги, или их иммуногенные фрагменты. Под термином "иммуногенный фрагмент" понимается фрагмент белка, который включает один или несколько эпитопов, и, таким образом, вызывает иммунологический ответ, как описано выше. Такие фрагменты могут быть

идентифицированы с использованием любого числа методик картирования эпитопов, хорошо известных в данной области. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996).

Например, линейные эпитопы могут быть определены, например, параллельным синтезом большого числа пептидов на твердых подложках, пептидов, соответствующим частям белковой молекулы, и взаимодействию пептидов с антителами, при котором пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методы известны в данной области и описаны, например, в патенте США. No. 4708871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. Точно так же, конформационные эпитопы легко идентифицируются путем определения пространственной конформации аминокислот, например, путем рентгеновской кристаллографии и 2-мерного ядерного магнитного резонанса. См., например, *Epitope Mapping Protocols*, выше.

Синтетические антигены также включены в определение, например, полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие рекомбинантные или синтетически полученные антигены. Иммуногенные фрагменты в соответствии с настоящим изобретением обычно включают, по меньшей мере, около 3 аминокислот, около 5 аминокислот, около 10-15 аминокислот, около 15-25 аминокислот или более аминокислот молекулы. Не существует критического верхнего предела длины фрагмента, который может содержать почти полную длину белковой последовательности или даже слитый белок, содержащий, по меньшей мере, один эпитоп белка.

Соответственно, минимальная структура полинуклеотида, экспрессирующего эпитоп, является структурой, которая содержит или состоит в основном из или состоит из нуклеотидов для кодирования эпитопа или антигенной детерминанты белка или полипептида PRRSV. Полинуклеотид, кодирующий фрагмент общего белка или полипептида, содержит или состоит по существу или состоит из минимум 15 нуклеотидов, преимущественно около 30-45 нуклеотидов и предпочтительно около 45-75, по меньшей мере 57, 87 или 150 последовательных или смежных нуклеотидов последовательности, кодирующей полный белок или полипептид. Процедуры определения эпитопов, такие как получение перекрывающихся пептидных библиотек (Hemmer et al., 1998), Pepscan (Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1985; Van der Zee R. et al., 1989; Geysen, 1990 Multipin.RTM. Peptide Synthesis Kits de Chiron) и алгоритмы (De Groot et al., 1999) могут быть использованы при практическом осуществлении данного изобретения без проведения излишних экспериментов.

"Полинуклеотид" представляет собой полимерную форму нуклеотидов любой длины, которая содержит дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и аналоги в любой комбинации. Полинуклеотиды могут иметь трехмерную структуру и могут выполнять любую известную или неизвестную функцию. Термин "полинуклеотид" включает двух-, одно- и трехцепочечные спиральные молекулы. Если иное не указано или не требуется, любое воплощение изобретения, описанное в данном документе, которое представляет собой полинуклеотид, охватывает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух дополнительных форм, известных или спрогнозированных для того, чтобы составлять двухцепочечную форму либо ДНК, РНК, либо гибридной молекулы.

Термин "оптимизация кодонов" относится к процессу оптимальной конфигурации последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, полипептид, антиген, эпитоп, домен или фрагмент для экспрессии/трансляции в выбранном хозяине. В общем, уровни экспрессии генов зависят от многих факторов, таких как промоторные последовательности и регуляторные элементы. Одним из наиболее важных факторов является адаптация использования кодонов в транскрипте гена по отношению к типичному использованию кодонов в хозяине (Lithwich, G. and Margalit, H., *Genome Res.*, 13, 2665-2673, 2003). Следовательно, высоко экспрессируемые гены в прокариотических геномах при трансляционном отборе имеют выраженное смещение использования кодонов. Это происходит из-за того, что они используют малый набор кодонов, которые распознаются наиболее распространенными видами тРНК (Ikemura, T., *J. Mol. Biol.* 151, 389-409, 1981). Сила, которая модулирует это адаптацию кодонов, называется трансляционным отбором и его сила является важной в быстро растущих бактериях (Rocha, EP, *Genome Res.* 14, 2279-2286, 2004; Sharp, PM et al., *Nucleic Acids Res.*, 33, 1141-1153). Если ген содержит кодоны, которые редко используются хозяином, то его уровень экспрессии не будет максимальным. Это может являться одним из ограничений экспрессии гетерологичных белков (Gustafsson C. et al., *Trends Biotechnol.* 22, 346-353, 2004) и разработки ДНК-вакцин (Ivory, C. and Chadee, K., *Genet. Vaccines Ther.* 2, 17, 2004). Большое количество синтетических генов было переконструировано для увеличения их уровня экспрессии. База данных синтетических генов (SGDB) (Wu G. et al., *Nucleic Acids Res.*, 35, D76-D79, 2007) содержит информацию из более чем 200 опубликованных экспериментов по синтетическим генам. В процессе проектирования последовательности нуклеиновой кислоты, которая будет вставлена в нового хозяина для экспрессии определенного белка в оптимальных количествах, оптимизация использования кодонов обычно является одной из первых стадий (Gustafsson C., *Trends Biotechnol.* 22, 346-353, 2004). Оптимизация использования кодонов в основном включает в себя изменение редких кодонов в гене-мишени так что они более точно отражали использование кодонов хозяина без изменения аминокислотной последовательности кодируемого белка (Gustafsson C., *Trends Biotechnol.* 22, 346-353, 2004). Информация, обычно используемая для процесса оптимизации, представляет собой, следовательно, последовательность ДНК или белка, подлежащую оптимизации, и таблицу использования кодонов (эталонный набор) хозяина.

Существует несколько общедоступных веб-серверов и автономных приложений, которые позволяют проводить некоторую оптимизацию кодонов любому специалисту в данной области техники. 'GeneDesign' (Richardson, S.M. et al, *Genome Res.* 16, 550-556, 2006), 'Synthetic Gene Designer' (Wu, G. et al., *Protein Expr. Purif.* 47, 441-445, 2006) и 'Gene Designer' (Villalobos, A. et al., *BMC Bioinformatics* 7, 285, 2006) представляют собой пакеты, которые обеспечивают платформу для синтеза синтетических генов, включая стадию оптимизации кодонов. С учётом способов оптимизации использования кодонов доступных на каждом сервере или в программе первые разработанные программы использовали только подход "одна аминокислота-один кодон". Более поздние программы и серверы теперь включают дополнительные способы для создания некоторой вариативности использования кодонов. Эта вариативность отражает вариативность использования кодонов природных генов с высоким уровнем экспрессии и позволяет вводить дополнительные критерии (например, избегание сайтов рестрикции) в процессе оптимизации. Большинство приложений и веб-серверов, описанных в данном документе, обеспечивают три способа оптимизации кодонов: полная оптимизация всех кодонов, оптимизация на основе относительных частот использования кодонов эталонного набора, которая использует подход Монте-Карло и новые подходы, предназначенные для максимизации оптимизации с минимальными изменениями между запросом и оптимизированными последовательностями.

В одном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный минорный белок, антиген, пептид, полипептид, фрагмент, домен или эпитоп PRRSV, является кодон-оптимизированной для экспрессии в животных. В другом воплощении кодон-оптимизированные последовательности, кодируют минорные белки оболочки, антигены, пептиды полипептиды, фрагменты, домены или эпитопы свиного PRRSV для экспрессии животных. В еще одном воплощении кодон-оптимизированные последовательности, кодируют белки gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E, антигены, пептиды, полипептиды, фрагменты, домены или эпитопы из PRRSV для экспрессии в животных.

Ниже приведены не ограничивающие примеры полинуклеотидов: ген, или фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги, урацил, другие сахара и связывающие группы, таких как фторрибоза и тиолат и нуклеотидные ветви. Нуклеотидная последовательность может быть дополнительно модифицирована после полимеризации, например, путем конъюгации с метящим компонентом. Другие типы модификаций, которые включены в данное определение, являются кэпы, замена одного или нескольких естественных нуклеотидов на аналог, введение средств для прикрепления полинуклеотида к белкам, металлические ионы, метящие компоненты, другие полинуклеотиды или твердая подложка. Полинуклеотиды могут быть получены путем химического синтеза или получены из микроорганизма.

Термин "ген" используется в широком смысле для обозначения любого сегмента полинуклеотида, связанного с биологической функцией. Таким образом, гены включают интроны и экзоны, как в геномной последовательности, или только кодирующие последовательности, как в кДНК и/или регуляторных последовательностях, требуемых для их экспрессии. Например, ген также относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который экспрессирует мРНК или функциональную РНК, или кодирует специфический белок, и который включает регуляторные последовательности.

Изобретение далее включает комплементарную цепь полинуклеотида, кодирующего минорный белок оболочки, антиген, эпитоп или иммуноген из PRRSV. Дополнительная цепь может быть полимерной и любой длины и может содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и аналоги в любой их комбинации.

Термины "белок", "пептид", "полипептид" и "полипептидный фрагмент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислотных остатков любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот и может быть прерван химическими остатками, отличными от аминокислот. Термины также включают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например образование дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация с меченым или биоактивным компонентом.

"Выделенный" полинуклеотид или полипептид представляет собой полинуклеотид или полипептид, который "по существу свободен" от материалов, с которыми он связан в его природной среде. Под "по существу свободным" подразумевается, что полинуклеотид или полипептид составляет по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% свободен от этих материалов. Если "выделенный" полинуклеотид или полипептид обозначают как "почти полностью свободный от примесей", то подразумевается, что выделенный полинуклеотид или полипептид по меньшей мере на 98% не содержит этих материалов.

Изобретение далее охватывает полинуклеотиды, кодирующие функционально эквивалентные варианты и производные полипептидов PRRSV и их функционально эквивалентные фрагменты, которые мо-

гут усиливать, уменьшать или не влиять на природные свойства кодируемых ими полипептидов. Эти функционально эквивалентные варианты, производные и фрагменты демонстрируют способность сохранять активность. Например, изменения в последовательности ДНК, которые не изменяют закодированную аминокислотную последовательность, а также те, которые приводят к консервативным заменам аминокислотных остатков, одной или несколькими делециями или добавлениями аминокислотных остатков и заменой аминокислотных остатков на аминокислотные аналоги являются те, которые не будут существенно влиять на свойства кодируемого полипептида. В одном воплощении варианты имеют по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии или идентичности с представляющим интерес полинуклеотидом или полипептидом PRRSV.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам PRRSV, в частности к минорным полипептидам оболочки PRRSV. В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139 или его вариантам или фрагментам.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV по изобретению, в частности к полипептиду, имеющему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фрагментам и вариантам полипептидов gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV, указанных выше (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139), которые могут быть легко получены любым специалистом данной области техники с использованием известных методов молекулярной биологии. Вариантами являются гомологичные полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере около 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную антигенным полипептидам по изобретению, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139.

Иммуногенный фрагмент полипептида gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV включает по меньшей мере 8, 10, 15 или 20 последовательных аминокислот, по меньшей мере 21 аминокислоту, по меньшей мере 23 аминокислоты, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот полипептида gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139 или ее вариантах. В другом воплощении фрагмент полипептида gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV включает специфический антигенный эпитоп, обнаруженный на полноразмерном полипептиде gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV, такой как полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, который имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139 или консервативный вариант, аллельный вариант, гомолог или иммуногенный фрагмент, содержащий по меньшей мере восемь или по меньшей мере десять последовательных аминокислот одного из этих полипептидов или комбинации этих полипептидов. Полинуклеотид, кодирующий полипептид gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV, может быть кодоноптоптимизированным для экспрессии в конкретном виде животных.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, имеющему нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78 или ее варианте. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, имеющему по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полинуклеотидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78 или ее варианте.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам PRRSV, в частности полипептиду E из PRRSV. В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139, а также ее варианте или фрагмен-

те.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полипептидом Е из PRRSV по изобретению, в частности с полипептидами, имеющими последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фрагментам и вариантам полипептидов Е из PRRSV, указанных выше (SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139), которые могут быть легко получены специалистом в данной области, с помощью известных методов молекулярной биологии.

Вариантами являются гомологичные полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность, по меньшей мере, идентичную на около 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% антигенным полипептидам по изобретению, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139.

Иммуногенный фрагмент полипептида Е из PRRSV включает по меньшей мере 8, 10, 15 или 20 последовательных аминокислот, по меньшей мере 21 аминокислоту, по меньшей мере 23 аминокислоты, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот полипептида Е из PRRSV, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139, или ее вариантах. В другом воплощении фрагмент полипептида Е из PRRSV включает специфический антигенный эпитоп, обнаруженный на полноразмерном полипептиде Е из PRRSV.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид Е из PRRSV, такой как полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139, или консервативный вариант, аллельный вариант, гомолог или иммуногенный фрагмент содержащий, по меньшей мере, восемь или, по меньшей мере, десять последовательных аминокислот одного из этих полипептидов или комбинацию этих полипептидов. Полинуклеотид, кодирующий полипептид Е из PRRSV, может быть кодоноптоимизированным для экспрессии в конкретном виде животных.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам PRRSV, в частности полипептиду gr2 из PRRSV. В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89, а также его варианту или фрагменту.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% последовательности с полипептидом gr2 из PRRSV по изобретению, в частности, с полипептидами, имеющими последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фрагментам и вариантам полипептидов gr2 из PRRSV, указанных выше (SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89), которые могут быть легко получены специалистом в данной области, используя известные методы молекулярной биологии.

Вариантами являются гомологичные полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере около 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную антигенным полипептидам по изобретению, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89.

Иммуногенный фрагмент полипептида gr2 из PRRSV включает по меньшей мере 8, 10, 15 или 20 последовательных аминокислот, по меньшей мере 21 аминокислоту, по меньшей мере 23 аминокислоты, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот полипептида gr2 из PRRSV, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89, или их вариантах. В другом воплощении фрагмент полипептида gr2 из PRRSV включает специфический антигенный эпитоп, обнаруженный на полноразмерном полипептиде gr2 из PRRSV.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид gr2 из PRRSV, такой как полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89, или консервативный вариант, аллельный вариант, гомолог или иммуногенный фрагмент содержащий, по меньшей мере, восемь или, по меньшей мере, десять последовательных аминокислот одного из этих полипептидов или комбинацию этих полипептидов. Полинуклеотид, кодирующий полипептид gr2 из PRRSV, может быть кодон-оптимизированным для экспрессии в

конкретном виде животных.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам PRRSV, в частности полипептиду gr3 из PRRSV. В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 16 или 40-45, и его вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности с полипептидом gr3 из PRRSV по изобретению, в частности, с полипептидами, имеющими последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 16 или 40-45.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фрагментам и вариантам полипептидов gr3 из PRRSV, указанных выше (SEQ ID NO: 3, 16 или 40-45), которые могут быть легко получены специалистом в данной области с использованием хорошо известных методов молекулярных биологий.

Вариантами являются гомологичные полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную антигенным полипептидам по изобретению, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 16 или 40-45.

Иммуногенный фрагмент полипептида gr3 из PRRSV включает по меньшей мере 8, 10, 15 или 20 последовательных аминокислот, по меньшей мере 21 аминокислоту, по меньшей мере 23 аминокислоты, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот полипептида gr3 из PRRSV, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 16 или 40-45, или ее варианты. В другом воплощении фрагмент полипептида gr3 из PRRSV включает специфический антигенный эпитоп, обнаруженный в полноразмерном полипептиде gr3 из PRRSV.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид gr3 из PRRSV, такой как полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 16 или 40-45. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 16 или 40-45, или консервативный вариант, аллельный вариант, гомолог или иммуногенный фрагмент, содержащий, по меньшей мере, восемь или, по меньшей мере, десять последовательных аминокислот одного из этих полипептидов, или комбинация этих полипептидов. Полинуклеотид, кодирующий полипептид gr3 из PRRSV, может быть кодоноптоимизированным для экспрессии в конкретном виде животных.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам PRRSV, в частности к полипептиду gr4 из PRRSV. В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 18 или 46-51, и его варианту или фрагменту.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полипептидом gr4 из PRRSV по изобретению, в частности с полипептидами, имеющими последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, 18 или 46-51.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фрагментам и вариантам полипептидов gr4 из PRRSV, указанных выше (SEQ ID NO: 5, 18 или 46-51), которые могут быть легко получены специалистом в данной области с использованием хорошо известных методов молекулярных биологий.

Вариантами являются гомологичные полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную антигенным полипептидам по изобретению, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 18 или 46-51.

Иммуногенный фрагмент полипептида gr4 из PRRSV включает по меньшей мере 8, 10, 15 или 20 последовательных аминокислот, по меньшей мере 21 аминокислоту, по меньшей мере 23 аминокислоты, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот gr4 из PRRSV, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 18 или 46-51, или их вариантах. В другом воплощении фрагмент полипептида gr4 из PRRSV включает специфический антигенный эпитоп, обнаруженный на полноразмерном полипептиде gr4 из PRRSV.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид gr4 из PRRSV, такому как полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 18 или 46-51. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 18 или 46-51, или консервативный вариант, аллельный вариант, гомолог или иммуногенный фрагмент, содержащий, по меньшей мере, восемь или, по меньшей мере, десять последовательных аминокислот одного из этих полипептидов, или комбинация этих полипептидов. Полинуклеотид, кодирующий полипептид gr4 из PRRSV, может быть кодоноптоимизированным для экспрессии в кон-

кретном виде животных.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам PRRSV, в частности к полипептиду gp5a из PRRSV. В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 или 62-65, и его варианту или фрагменту.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полипептидом gp5a из PRRSV по изобретению, в частности с полипептидами, имеющими последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31 или 62-65.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фрагментам и вариантам полипептидов gp5a из PRRSV, указанных выше (SEQ ID NO: 31 или 62-65), которые могут быть легко получены специалистом в данной области с использованием хорошо известных методов молекулярной биологии.

Вариантами являются гомологичные полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную антигенным полипептидам по изобретению, аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31 или 62-65.

Иммуногенный фрагмент полипептида gp5a из PRRSV включает по меньшей мере 8, 10, 15 или 20 последовательных аминокислот, по меньшей мере 21 аминокислоту, по меньшей мере 23 аминокислоты, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот полипептида gp5a из PRRSV, имеющего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31 или 62-65, или его варианты. В другом воплощении фрагмент полипептида gp5a из PRRSV включает специфический антигенный эпитоп, обнаруженный в полноразмерном полипептиде gp5a из PRRSV.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид gp5a из PRRSV, такой как полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 или 62-65. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31 или 62-65, или консервативный вариант, аллельный вариант, гомолог или иммуногенный фрагмент, содержащий, по меньшей мере, восемь или, по меньшей мере, десять последовательных аминокислот одного из этих полипептидов или комбинацию этих полипептидов. Полинуклеотид, кодирующий полипептид gp5a из PRRSV, может быть кодоноптоимизированным для экспрессии в конкретном виде животных.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, имеющему нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78 или их вариант. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, имеющему по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с полинуклеотидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78 или их вариант.

В некоторых воплощениях изобретение обеспечивает безопасную и эффективную иммунологическую или вакцинную композицию, включающую один или несколько рекомбинантных вирусных векторов, содержащий один или несколько гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих один или несколько из числа антигена, полипептида, эктодомена gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E или их варианта из вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV); и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель. "Его вариант" предназначен для охвата иммунологически эквивалентных вариантов антигенов, полипептидов и эктодоменов, включая, например, перенацеленные варианты белков, как описано в данном документе. "Иммунологически эквивалентный" означает, что "его вариант" способен вызывать, по существу, аналогичный иммунный ответ, по сравнению с исходным антигеном-компаратором, полипептидом или эктодоменом, включая защитный иммунный ответ.

В некоторых воплощениях композиции один или несколько векторов содержат рекомбинантный вектор из аденовируса 5 и PRRSV (Ad5-PRRSV), рекомбинантный вектор из бакуловируса и PRRSV, рекомбинантный вектор из свиного цитомегаловируса и PRRSV или рекомбинантный вектор из поксвируса и PRRSV.

В некоторых воплощениях один или более векторов включают либо нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, полипептид, эктодомен E из PRRSV или их вариант; или нуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный антиген, полипептид, эктодомен gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или M из PRRSV или их вариант, где существующая последовательность клеточной локализации gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или M была заменена на последовательность, определяющую экспрессию на клеточную поверхность из гетерологичного гена. В некоторых воплощениях один или более векторов содержат смесь двух векторов, где первый вектор, экспрессирует перенацеленные минорные белки PRRSV, а второй вектор, экспрессирует перенацеленные мажорные белки PRRSV.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор (векторы) содержат полинуклеотид, кодирую-

щий антиген, полипептид или эктодомен, имеющий: по меньшей мере 90% идентичность последовательности с любым одним или более из числа SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139; или по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменной последовательностью, указанной в подпоследовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV содержит полинуклеотид, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78; или по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменной последовательностью, кодируемой подпоследовательностью SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78.

В некоторых воплощениях композиция или вакцина содержит один или два вектора Ad5-PRRSV. В некоторых воплощениях Ad5-PRRSV может экспрессировать gp2 и E; gp2, gp4 и E; gp2, gp3, gp4 и E; rtg-gp2, rtg-gp3 и rtg-gp4; rtg-gp2 и E; rtg-gp2, rtg-gp4 и E; rtg-gp3 и E; rtg-gp4 и E; E отдельно; rtg-E отдельно; rtg-gp5, rtg-M.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, полипептид или эктодомен, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139; или включает полинуклеотид, кодирующий эктодомен, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменом, указанным в подпоследовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV содержит полинуклеотид, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78; или включает полинуклеотид, имеющий по меньшей мере 90% идентичность с эктодоменной последовательностью, кодируемой подпоследовательностью SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих один или несколько из числа антигена, полипептида, эктодомена gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E из PRRSV или их вариантов или их комбинацию.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих один или несколько антигенов, полипептидов или эктодоменов, имеющих: (а) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139; или (b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменом(ами), охватываемым последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 14, 16, 18, 20, 31, 34-39, 40-45, 46-51, 52-58, 59-61, 62-66, 68, 71, 73, 75, 77 или 79-139. Под "эктодоменом(ами), охватываемым", подразумевается, что только часть внеклеточной части (т.е. нетрансмембранная или цитоплазматическая часть) данного SEQ ID NO должна быть подвергнута процентному ограничению идентичности последовательности. Например, если полипептид, состоящий из 200 аминокислот, имеет эктодомен, охватывающий аминокислоты № 20-100, то полипептид-компаратор должен быть только на 90% идентичным (т.е. в случае 90% языка идентичности последовательностей) по аминокислотам № 20 до 100. Теперь, когда изобретение было раскрыто, заявители предполагают, что специалист в данной области может регулярно выбирать из широкого спектра TMD и CTD, чтобы объединить с эктодоменами раскрытого элемента и комбинациями защитных полипептидов PRRSV.

В некоторых воплощениях один или несколько полинуклеотидов имеют по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78; или полинуклеотиды имеют по меньшей мере 90% идентичность последовательности по длине эктодомена, кодируемого последовательностью, указанной в подпоследовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21-24, 30, 67, 69, 70, 72, 74, 76 или 78. Специалист в данной области, используя обычные методы, может понять или выяснить, какие полинуклеотидные последовательности кодируют эктодомены.

В некоторых воплощениях вектор Ad5-PRRSV содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид gp2 из PRRSV, имеющий: (а) по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89 (белок gp2); или (b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменной последовательностью, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89.

В некоторых воплощениях вектор Ad5-PRRSV содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид E из PRRSV, имеющий: (а) по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139 (белок E); или (b) по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с эктодоменной последовательностью, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139.

В некоторых воплощениях вектор Ad5-PRRSV содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид gp3 из PRRSV, имеющий: (а) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последователь-

ностью, представленной в SEQ ID NO: 5, 18, 40-45 или 90-99 (белок gp3); или (b) по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с эктодоменной последовательностью, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 5, 18, 40-45 или 90-99.

В некоторых воплощениях вектор Ad5-PRRSV содержит два полинуклеотида, кодирующих полипептиды gp2 и E из PRRSV, имеющие: (a) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с одной из последовательностей, представленной в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39, или 80-89 (белок gp2) и одной из последовательностей, представленной в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139 (белок E); или (b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменной последовательностью, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89 (белок gp2) и эктодоменной последовательности, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139 (белок E).

В некоторых воплощениях вектор Ad5-PRRSV содержит полинуклеотиды, кодирующие полипептиды gp2, E и gp4 из PRRSV, имеющие: (a) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39, или 80-89 (белок gp2), одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139 (белок E), и одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 5, 18, 40-45, 90-99 (белок gp3); или (b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменом, охватываемым одной из последовательностей, представленной в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89 (белок gp2), эктодоменом, охватываемым одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139 (Е-белок), и эктодоменом, охватываемым одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 5, 18, 40-45, 90-99 (белок gp3).

В другом аспекте раскрытие представляет способ вызова защитного иммунного ответа против PRRSV у нуждающегося в нем животного, включающий введение животному рекомбинантного вектора Ad5-PRRSV, экспрессирующего, по меньшей мере, один из числа gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E PRRSV антиген и, фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант, эксципиент или носитель.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения вектор Ad5-PRRSV содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих один или несколько полипептидов, имеющих: (a) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39 или 80-89 (белок gp2) и SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139 (белок E); или (b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменом(ами) белка gp2 или белка E, охватываемым соответствующими предшествующими SEQ ID NO.

Способ по п.24, в котором вектор Ad5-PRRSV содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих один или несколько полипептидов, имеющих по меньшей мере 90% идентичности последовательности, с одной из последовательностей, представленной в SEQ ID NO: 1, 14, 34-39, или 80-89 (белок gp2), одной из последовательностей, представленной в SEQ ID NO: 7, 20, 52-58 или 130-139 (белок E), и одной из последовательностей, представленной в SEQ ID NO: 5, 18, 40-45, 90-99 (белок gp3); или (b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменами gp2, E и gp3, охватываемыми соответствующими предшествующими SEQ ID NO.

В некоторых воплощениях введение осуществляют путем перорального, спрея, питьевой воды, внутримышечного или подкожного, внутрикожного, трансдермального введения. В некоторых воплощениях введение осуществляется в режиме "прайм-буст". В некоторых воплощениях первая вакцинация представляет собой смесь двух Ad5-векторов, первый из которых экспрессирует перенацеленные минорные белки PRRSV, а второй экспрессирует мажорные белки PRRSV; и буст включает или состоит в основном из обоих векторов первой вакцинации или только одного вектора. В некоторых воплощениях животное, нуждающееся в защите, является свиньей.

В общем, сравнение аминокислотных последовательностей осуществляют путем выравнивания аминокислотной последовательности полипептида известной структуры с аминокислотной последовательностью полипептида неизвестной структуры. Затем сравнивают аминокислоты в последовательностях и группируют группы гомологичных аминокислот. Этот способ обнаруживает консервативные области полипептидов и учитывает аминокислотные вставки и делеции. Гомологию между аминокислотными последовательностями можно определить, используя коммерчески доступные алгоритмы (см. также описание гомологии выше). В дополнение к упомянутому в данном документе упоминаются программы BLAST, BLAST, BLASTN, BLASTP и PSI-BLAST, предоставленные Национальным центром биотехнологической информации. Эти программы широко используются в данной области для этой цели и могут выстраивать гомологичные области из двух аминокислотных последовательностей.

Альтернативно или дополнительно термин "гомология" или "идентичность", например, в отношении нуклеотидной или аминокислотной последовательности, может указывать количественную меру гомологии между двумя последовательностями. Процентная идентичность последовательности может быть рассчитана как $(N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}}) \cdot 100 / N_{\text{ref}}$, где N_{dif} - общее количество неидентичных остатков в двух последовательностях при выравнивании, а N_{ref} - количество остатков в одной из последовательностей. Следовательно, последовательность ДНК AGTCAGTC будет иметь 75% идентичность последовательности с последовательностью AATCAATC ($N_{\text{ref}} = 8$; $N_{\text{dif}} = 2$).

Альтернативно или дополнительно "гомология" или "идентичность" в отношении последовательностей может относиться к числу позиций с идентичными нуклеотидами или аминокислотами, деленными на количество нуклеотидов или аминокислот в более короткой из двух последовательностей, где выравнивание двух последовательностей могут быть определены в соответствии с алгоритмом Уилбура и Липмана (Wilbur et al, 1983), например, используя размер окна 20 нуклеотидов, длину слова 4 нуклеотида и штраф за разрыв 4, а компьютерный анализ и интерпретация данных последовательности, включая выравнивание, могут быть удобно выполнены с использованием коммерчески доступных программ (например, Vector NTI Software™, Invitrogen Inc. Калифорния, США). Когда говорят, что последовательности РНК являются сходными или имеют степень идентичности последовательности или гомологию с последовательностями ДНК, тимидин (Т) в последовательности ДНК считается равным урацилу (У) в последовательности РНК. Таким образом, последовательности РНК входят в объем изобретения и могут быть получены из последовательностей ДНК, причем тимидин (Т) в последовательностях ДНК считается равным урацилу (У) в последовательностях РНК. Без проведения излишних экспериментов квалифицированный специалист может проконсультироваться со многими другими программами или источниками для определения процентной гомологии.

Изобретение далее охватывает полинуклеотиды PRRSV, содержащиеся в векторной молекуле или экспрессирующем векторе и функционально связанные с промоторным элементом и, необязательно, с энхансером.

"Вектор" относится к рекомбинантной ДНК или РНК-плазмиде, бактериофагу или вирусу, который содержит гетерологичный полинуклеотид, который должен быть доставлен в клетку-мишень либо *in vitro*, либо *in vivo*. Гетерологичный полинуклеотид может содержать последовательность, представляющую интерес для целей профилактики или терапии, и необязательно может быть представлен в виде экспрессирующей кассеты. При использовании в данном документе, вектор не должен быть способен к репликации в конечной целевой клетке или объекте. Термин "вектор" включает векторы для клонирования, а также вирусные векторы.

Термин "сконструированный" или "рекомбинантный" означает полинуклеотид полусинтетического или синтетического происхождения, который либо не встречается в природе, либо связан с другим полинуклеотидом в комбинации, не обнаруженной в природе.

"Гетерологичный" означает полученный из генетически отличной сущности от остальной части сущности, с которой она сравнивается. Например, полинуклеотид может быть помещен с помощью методов генной инженерии в плазмиду или вектор, полученный из другого источника, и представляет собой гетерологичный полинуклеотид. Промотор, удаленный из нативной кодирующей последовательности и функционально связанный с кодирующей последовательностью, отличной от нативной последовательности, является гетерологичным промотором.

Полинуклеотиды по изобретению могут содержать дополнительные последовательности, такие как дополнительные кодирующие последовательности в пределах одной транскрипционной единицы, контролирующие элементы, таких как промоторы, сайты связывания рибосом, 5'-UTR, 3'-UTR, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования, дополнительные единицы транскрипции под контролем того же или другого промотора, последовательности, которые позволяют осуществить клонирование, экспрессию, гомологичную рекомбинацию, а также трансформацию клетки-хозяина, и любая такая конструкция, которая может быть необходима для обеспечения воплощения данного изобретения.

Элементы для экспрессии полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена PRRSV предпочтительно присутствуют в векторе изобретения. Минимальным образом он включает, по существу состоит из или состоит из кодона инициации (ATG), стоп-кодона и промотора и необязательно также последовательности полиаденилирования для некоторых векторов, таких как плазида и некоторые вирусные векторы. Когда полинуклеотид кодирует полипептидный фрагмент, например PRRSV-пептид, преимущественно в векторе, ATG помещают в 5' относительно рамки считывания, а стоп-кодон помещают в 3'. Могут присутствовать другие элементы для управления экспрессией, такие как последовательности энхансера, стабилизирующие последовательности, такие как интронные и/или нетранслированные 5'-или 3'-последовательности и сигнальные последовательности, позволяющие секрецию белка.

Способы получения и/или введения вектора или рекомбинантов или плазмиды для экспрессии генных продуктов по изобретению либо *in vivo*, либо *in vitro* могут быть любым желаемым способом, например способом, который является или аналогичен способам, описанным в документах, процитированных в: Пат. США №№ 4603112; 4769330; 4394448; 4722848; 4745051; 4769331; 4945050; 5494807; 5514375; 5744140; 5744141; 5756103; 5762938; 5766599; 5990091; 5174993; 5505941; 5338683; 5494807; 5591639; 5589466; 5677178; 5591439; 5552143; 5580859; 6130066; 6004777; 6130066; 6497883; 6464984; 6451770; 6391314; 6387376; 6376473; 6368603; 6348196; 6306400; 6228846; 6221362; 6217883; 6207166; 6207165; 6159477; 6153199; 6090393; 6074649; 6045803; 6033670; 6485729; 6103526; 6224882; 6312682; 6348450; 6312,683 и 6596279; пат. заявках США № 12/753,597; WO 90/01543; WO 91/11525; WO 94/16716; WO 96/39491; WO 98/33510; EP 265785; EP 0370573.

Настоящее изобретение также относится к композиции или вакцине, содержащей векторы, такие как экспрессирующие векторы. Композиция или вакцина могут содержать, состоять по существу, или

состоять из одного или нескольких векторов, например, экспрессирующих векторов, таких как *in vivo* экспрессирующие векторы, содержащие, состоящие по существу или состоящие (или экспрессирующие) один или несколько полипептидов, антигенов, эпитопов или иммуногенов PRRSV. Вектор содержит и экспрессирует полинуклеотид, который включает, по существу состоит, состоит из полинуклеотида, кодирующего (или экспрессирующего) антиген, эпитоп или иммуноген PRRSV в фармацевтически или ветеринарно приемлемом носителе, адъюванте, эксципиенте или носителе.

Согласно другому воплощению вектор или векторы в композиции или вакцине включают, по существу состоят из или состоят из полинуклеотида(ов), кодирующего один или несколько белков или их фрагментов полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена PRRSV. Композиция по изобретению или вакцина включает, по существу состоит из или состоит из одного или нескольких векторов, включающих, по существу состоящих из, и состоящих из и преимущественно экспрессирующих *in vivo* в подходящих условиях или соответствующих условиях или в подходящей клетке-хозяине, полинуклеотиды из различных изолятов PRRSV, кодирующих одни и те же белки и/или разные белки.

Термин "плазмида" охватывает любую единицу транскрипции ДНК, содержащую полинуклеотид согласно изобретению, и элементы, необходимые для его экспрессии *in vivo* в клетке или клетках желаемого хозяина или мишени; и в этой связи следует отметить, что сверхспиральная плазмида и все ее топологики, открытая кольцевая плазмида, а также линейные формы плазмиды предназначены для охвата изобретением.

Каждая плазмида включает или содержит или состоит в основном из гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, антиген, эпитоп или иммуноген, необязательно слитый с полинуклеотидом, кодирующим гетерологичную пептидную последовательность, вариант, аналог или фрагмент, функционально связанный с промотором или под контролем промотора или зависимый от промотора. В общем, выгодно использовать сильный промотор, который функционирует в эукариотических клетках. Предпочтительным сильным промотором является предранний промотор цитомегаловируса (CMV-IE) человеческого или мышинного происхождения или необязательно имеющий другое происхождение, такое как крыса или морская свинка. Промотор CMV-IE может содержать фактический сегмент промотора, который может быть связан или не связан с сегментом энхансера. Ссылка может быть сделана на EP-A-260 148, EP-A-323 597, Пат. США №№ 5168062, 5385839 и 4968615, а также заявку PCT № WO 87/03905. Промотором CMV-IE предпочтительно является человеческий CMV-IE (Boshart et al., 1985) или мышинный CMV-IE.

В более общих терминах промотор является либо вирусным, либо клеточным. Сильным вирусным промотором, отличным от CMV-IE, который может быть с пользой использован при практическом осуществлении данного изобретения, является ранний/поздний промотор вируса SV40 или промотор LTR вируса саркомы Рауса. Сильным клеточным промотором, который может быть с пользой применен при практическом осуществлении данного изобретения, является промотор гена цитоскелета, такой как, например, промотор десмина (Kwissa et al., 2000) или промотор актина (Miyazaki et al., 1989).

Функциональные субфрагменты этих промоторов, то есть части этих промоторов, которые поддерживают адекватную промотирующую активность, включены в настоящее изобретение, например усеченные промоторы CMV-IE в соответствии с заявкой PCT WO 98/00166 или патентом США № 6156567. Промотор при практическом осуществлении данного изобретения, следовательно, включает производные и субфрагменты полноразмерного промотора, которые поддерживают адекватную промотирующую активность и, следовательно, действуют как промотор, предпочтительно способствуя активности, по существу, сходной с активностью настоящего или полноразмерного промотора, из которого получены производное или субфрагмент, например, по типу активности усеченных промоторов CMV-IE в патенте США № 6156567 и активности полноразмерных промоторов CMV-IE. Таким образом, промотор CMV-IE при практическом осуществлении данного изобретения может включать или состоять по существу или состоять из промоторной части полноразмерного промотора и/или энхансерной части полноразмерного промотора, а также производных и субфрагментов.

Предпочтительно, плазмиды включают или состоят по существу из других элементов контроля экспрессии. Особенно выгодно включать стабилизирующую последовательность(и), например, последовательность интрона(ов), предпочтительно первый интрон из HCMV-IE (PCT заявке № WO 89/01036), интрон II гена кроличьего β -глобина (van Ooyen et al., 1979).

Что касается сигнала полиаденилирования (polyA) для плазмид и вирусных векторов, отличных от поксвирусов, то можно использовать больше поли (A) сигнала гена бычьего гормона роста (bGH) (см. патент США № 5122458) или поли (A) сигнал гена кроличьего β -глобина или сигнал поли (A) вируса SV40.

Согласно другому воплощению изобретения экспрессирующие векторы представляют собой экспрессирующие векторы, используемые для экспрессии белков *in vitro* в соответствующей клеточной системе. Экспрессируемые белки, которые можно собирать в или из надосадочной жидкости культуры после или не после секреции (если нет секреции, обычно происходит или выполняется лизис клеток), необязательно концентрируют с помощью способов концентрирования, таких как ультрафильтрация и/или

очищают с помощью средств очистки, таких как хроматография с аффинностью, ионообменная хроматография или гель-фильтрация.

"Клетка-хозяин" обозначает прокариотическую или эукариотическую клетку, которая была генетически изменена или способна генетически изменяться путем введения экзогенного полинуклеотида, такого как рекомбинантная плазмида или вектор. Когда речь идет о генетически измененных клетках, термин относится как к первоначально измененной клетке, так и к ее потомству. Клетки-хозяева включают, без ограничения указанным, клетки почки хомячка (ВНК), клетки карциномы толстой кишки (Caco-2), клетки COS7, клетки НЕК 293, клетки MCF-7, клетки MCF-10A, клетки собачьей почки Madin-Darby (MDCK), клетки легкого норки (Mv1Lu), клетки MRC-5, клетки U937, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки обезьяны Vero (клеточная линия, происходящая из почки африканской зеленой обезьяны), перепела (клеточная линия из мышцы перепела QM7), куриная клеточная линия DF1 и клетки VERO. Полинуклеотиды, содержащие желаемую последовательность, могут быть вставлены в подходящий клонирующий или экспрессирующий вектор, и вектор, в свою очередь, может быть введен в подходящую клетку-хозяина для репликации и амплификации. Полинуклеотиды могут быть введены в клетки-хозяева любыми способами, известными в данной области. Векторы, содержащие интересующие полинуклеотиды, могут быть введены в клетки-хозяева любым из ряда подходящих средств, включая прямое поглощение, эндоцитоз, трансфекцию, f-спаривание, электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию; и инфекцию (где вектор является инфекционным, например ретровирусным вектором). Выбор вводимых векторов или полинуклеотидов будет часто зависеть от особенностей клетки-хозяина.

В одном воплощении настоящего изобретения вектор представляет собой вектор Ad5, как описано в US 2010/0255029 (включенном в данный документ ссылкой в полном объеме).

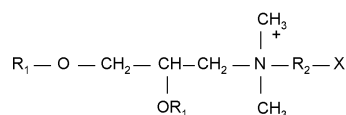
Преимущества вакцин PRRSV на основе Ad5-вектора включают, без ограничения указанным: (1) индукцию широкого иммунитета, включая гуморальные, клеточные и слизистые реакции (2), отсутствие экспрессии всех белков PRRSV и поэтому совместимость с DIVA (дифференциация инфицированных и вакцинированных животных), (3) индукцию быстрого начала иммунитета и (4) производство снижает риск для окружающей среды, по сравнению с инактивированными вакцинами в случае случайного высвобождения.

Один аспект изобретения относится к сконструированным или рекомбинантным Ad5-векторам, экспрессирующим PRRSV-антигены. Антиген может представлять собой минорные белки оболочки PRRSV, такие как gp2, gp3, gp4, gp5a или белок E, упомянутые выше. Сконструированный вектор Ad5 может содержать один или несколько полинуклеотидов, кодирующих один или несколько антигенов PRRSV. В другом аспекте сконструированный вектор Ad5 содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих антиген или вариант gp2 из PRRSV, его антиген или вариант PRRSV E, антиген PRSPV gp3 или его вариант, антиген PRRSV или его вариант, антиген gp4 или его вариант, или их комбинацию.

В одном воплощении изобретение предусматривает введение терапевтически эффективного количества композиции для доставки и экспрессии белка, антигена, эпитопа или иммуногена в клетке-мишени. Определение профилактически или терапевтически эффективного количества представляет собой проведение рутинных экспериментов обычным специалистом в данной области. В другом воплощении композиция содержит экспрессирующий вектор, включающий полинуклеотид, который экспрессирует минорный антиген, эпитоп или иммуноген оболочки PRRSV и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, несущую среду, адъювант или эксципиент. В другом воплощении фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, носитель, адъювант или эксципиент облегчает трансфекцию и/или улучшает сохранение вектора или белка.

Фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители или несущие среды или адъюванты или эксципиенты хорошо известны специалисту в данной области. Например, фармацевтически или ветеринарно приемлемые несущая среда или носитель или адъювант или эксципиент могут представлять собой стерильную воду, 0,9% раствор NaCl (например, физиологический раствор) или фосфатный буфер. Другие фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или несущая среда или наполнитель, которые могут быть использованы в способах данного изобретения, включают, без ограничения указанным, поли (L-глутамат) или поливинилпирролидон. Фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или несущая среда или адъювант или эксципиенты могут представлять собой любое соединение или комбинацию соединений, способствующих введению вектора (или белка, экспрессированного из вектора изобретения *in vitro*) преимущественно носитель, несущая среда или адъювант или эксципиент могут способствовать трансфекции и/или улучшать сохранение вектора (или белка). Дозы и дозовые объемы в данном документе обсуждаются в общем описании, и могут также быть определены специалистами в данной области из этого описания в сочетании с информацией в данной области, без проведения излишних экспериментов.

Катионные липиды, содержащие четвертичную аммониевую соль, которые являются, но не исключительно, пригодными для плазмид, являются те, которые имеют следующую формулу:



в которой R1 представляет собой насыщенный или ненасыщенный алифатический радикал с прямой цепью, содержащий от 12 до 18 атомов углерода, R2 представляет собой другой алифатический радикал, содержащий 2 или 3 атома углерода, и X представляет собой амин или гидроксильную группу, например DMRIE. В другом воплощении катионный липид может быть связан с нейтральным липидом, например DOPE.

Среди этих катионных липидов предпочтение отдается DMRIE (N-(2-гидроксиэтил)-N,N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)-1-пропанаммоний, WO 96/34109), преимущественно связанному с нейтральным липидом, предпочтительно DOPE (диолеил-фосфатидилэтаноламин, Behr, 1994), с образованием DMRIE-DOPE.

Плазмидную смесь с адьювантом формируют для немедленного применения и/или одновременно с введением препарата или незадолго до введения препарата; например, незадолго перед или до введения, получают смесь плазмид-адьювант, преимущественно, чтобы дать достаточно времени до введения смеси для образования комплекса, например, между около 10 и около 60 мин перед введением, например, за около 30 мин до введения.

Когда присутствует DOPE, молярное соотношение DMRIE: DOPE может составлять от около 95: около 5 до около 5: около 95 или около 1: около 1, например, 1:1. Массовое соотношение адьюванта DMRIE или DMRIE-DOPE: плазмиды может составлять от около 50: около 1 до около 1: около 10, например от около 10: около 1 и около от 1: около 5 и предпочтительно около 1: около 1 и около 1: около 2, например 1: 1 и 1: 2.

В другом воплощении фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адьювант, эксципиент или несущая среда может представлять собой эмульсию вода-в-масле. Примеры подходящих эмульсий типа вода-в-масле включают масло-в-воде вакцинные эмульсии на основе масла, которые являются стабильными и текучими при 4°C, содержащими от 6 до 50 об.% антигенсодержащей водной фазы, предпочтительно от 12 до 25 об./об.%, от 50 до 94 об.% масляной фазы, содержащей в общем или частично неметаболизируемое масло (например, минеральное масло, такое как парафиновое масло) и/или метаболизируемое масло (например, растительное масло, или жирные кислоты, полиольные или спиртовые эфиры) от 0,2 до 20 p/v % поверхностно-активных веществ, предпочтительно от 3 до 8 p/v %, причем последние находятся полностью или частично или в смеси либо с полиглицериновыми эфирами, где указанные полиглицериновые эфиры предпочтительно представляют собой полиглицерин (поли)рицинолеаты, либо масла полиоксиэтиленрицина или еще масла гидрированного полиоксиэтиленрицина. Примеры поверхностно-активных веществ, которые могут быть использованы в эмульсии вода-в-масле, включают этоксилированные сложные эфиры сорбитана (например, полноксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат (TWEEN 80®), доступный от AppliChem, Inc., Чешир, Коннектикут) и сорбитановые эфиры (например, сорбитанмоноолеат (SPAN 80®), доступный от Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Кроме того, что касается эмульсии вода-в-масле, см. также патент США № 6919084. В некоторых воплощениях антигенсодержащая водная фаза содержит солевой раствор, содержащий один или несколько буферных агентов. Примером подходящего буферного раствора является фосфатно-буферный солевой раствор. В одном варианте эмульсия вода-в-масле может быть тройной эмульсией вода/масло/вода (W/O/W) (см., например, патент США № 6358500). Примеры других подходящих эмульсий описаны в патенте США № 7371395.

Иммунологические композиции и вакцины в соответствии с изобретением могут включать или состоять по существу из одного или нескольких адьювантов. Подходящими адьювантами для практического применения настоящего изобретения являются (1) полимеры акриловой или метакриловой кислоты, малеинового ангидрида и алкенильных производных полимеров, (2) иммуностимулирующие последовательности (ISS), такие как олигодезоксирибонуклеотидные последовательности, имеющие один или несколько неметилованных CpG (Klinman et al, 1996; WO 98/16247), (3) эмульсия масло в воде, такая как эмульсия SPT, описанная на стр. 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", опубликованная M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, и эмульсия MF59, описанная на стр. 183 той же работы, (4) катионные липиды, содержащие четвертичную аммониевую соль, например DDA (5) цитокины, (6) гидроксид алюминия или фосфат алюминия, (7) сапонин или (8) другие адьюванты, обсуждаемые в любом документе, приведенном и включенном в качестве ссылки в настоящую заявку, или (9) любые комбинации или их смеси.

Эмульсия масло в воде (3), которая особенно подходит для вирусных векторов, может быть основана на легком жидком парафиновом масле (европейский тип фармакопей), изопреноидном масле, таком как сквалан, сквален, масле, полученном в результате олигомеризации алкенов, например изобутен или децен, сложных эфиров кислот или спиртов, имеющих алкильную группу с прямой цепью, такую как растительные масла, этилолеат, пропиленгликоль, ди (каприлат/капрат), глицеринтри (каприлат/капрат) и диолеат пропиленгликоль или сложные эфиры разветвленных жирных спиртов или кислот, особенно

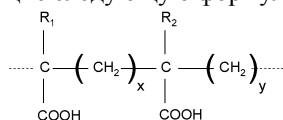
сложные эфиры изостеариновой кислоты.

Масло используют в сочетании с эмульгаторами для образования эмульсии. Эмульгаторы могут быть неионогенными поверхностно-активными веществами, такими как сложные эфиры, с одной стороны, из сорбитана, маннида (например, олеата ангидроманнитола), глицерина, полиглицерина или пропилглицоля и, с другой стороны, олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислот, причем указанные сложные эфиры необязательно этоксилированы, или полиоксипропилен-полиоксиэтиленовые блоки, такие как плуроник, например L121.

Среди адъювантных полимеров типа (1) предпочтительны полимеры сшитой акриловой или метакриловой кислоты, особенно сшитые полиалкенильными эфирами Сахаров или полиспиртов. Эти соединения известны под названием карбомер (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). Специалист в данной области может также сослаться на патент США № 2990962, который обеспечивает такие акриловые полимеры, сшитые полигидроксильным соединением, имеющим, по меньшей мере, три гидроксильные группы, предпочтительно не более восьми таких групп, атомы водорода, по меньшей мере, трех гидроксильных групп заменяются ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими, по меньшей мере, два атома углерода. Предпочтительными радикалами являются те, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например винилы, аллиллы и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы могут также содержать другие заместители, такие как метил. Особенно подходят продукты, продаваемые под названием Карбопол (BF Goodrich, Огайо, США). Они перекрестно связаны аллилсахарозой или аллилпентаэритритом. Среди них следует упомянуть Карбополы 974Р, 934Р и 971Р.

Что касается сополимеров малеинового ангидрида-алкенильного производного, предпочтение отдается ЕМА (Monsanto), которые представляют собой неразветвленные или сшитые сополимеры этилен-малеинового ангидрида, и они, например, сшиваются с помощью дивинилового эфира. См. Также J. Fields et al., 1960.

Что касается структуры, то полимеры акриловой или метакриловой кислоты и ЕМА предпочтительно образуют основные единицы, имеющие следующую формулу:



в которой

R1 и R2, которые могут быть одинаковыми или различными, представляют собой H или CH₃

x = 0 или 1, предпочтительно x = 1

y = 1 или 2, с x + y = 2.

Для ЕМА x = 0 и y = 2 и для карбомеров x = y = 1.

Эти полимеры растворимы в воде или физиологическом солевом растворе (20 г/л NaCl), и их pH можно довести до 7,3-7,4, например, гидроксидом натрия (NaOH), для получения адъювантного раствора, в который вектор(ы) экспрессии могут быть включены. Концентрация полимера в конечной иммунологической или вакцинной композиции может составлять от 0,01 до 1,5% мас./об., от 0,05 до 1% мас./об. или от 0,1 до 0,4% мас./об.

Цитокин или цитокины (5) могут быть в белковой форме в иммунологической или вакцинной композиции или могут быть совместно экспрессированы в хозяине с иммуногеном или иммуногенами или их эпитопом (эпитопами). Предпочтение отдается совместной экспрессии цитокина или цитокинов либо в одном и том же векторе, что и экспрессирующий иммуноген, или иммуногены, или его эпитоп(ы), или в отдельном векторе для них.

Изобретение охватывает получение таких комбинированных композиций; например, путем смешивания активных компонентов, преимущественно вместе с адъювантом, носителем, цитокином и/или разбавителем.

Цитокины, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, без ограничения указанным, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарный/макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон α (IFNα), интерферон β (IFNβ), интерферон γ, (IFNγ), интерлейкин-1α (IL-1α), интерлейкин-1β (IL-1β), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-5 (IL-5), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-11 (IL-11), интерлейкин-12 (IL-12), фактор некроза опухоли α (TNFα), фактор некроза опухоли (TNFβ) и трансформирующий фактор роста β (TGFβ). Понятно, что цитокины можно вводить совместно и/или вводить последовательно с помощью иммунологической или вакцинной композиции по настоящему изобретению. Так, например, вакцина по настоящему изобретению может также содержать молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует in vivo подходящий цитокин, например цитокин, соответствующий хозяину, который должен быть вакцинирован, или в котором должен быть получен иммунологический ответ (например, кошачий цитокин для составов, которые нужно вводить кошке).

В другом воплощении композиция по настоящему изобретению может быть получена с использо-

ванием химической или физической процедуры, как описано Stauffer et al. (Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 1, 291-296, 2006). Некоторые из методов инактивации приведены в таблице ниже.

Таблица 1. Методы инактивации

Химический	Физический	Комбинированный
Аскорбиновая кислота		Аскорбиновая кислота + УФ
б-пропиолактон	Высокая температура	Бета-пропиолактон + УФ
б-аминофенилкетон	Давление	Формалин + нагревание
диэтилпиروкарбонат	УФ	Формалин + УФ
Этиленамин	Неионные детергенты	Нагревание + низкое давление
Формалин/Формальдегид		Давление + нагревание или охлаждение
Фенол		Псорален + УФ

Иммунологическая композиция и/или вакцина согласно изобретению содержат или состоят по существу из или состоят из эффективного количества одного или нескольких экспрессирующих векторов и/или полипептидов, для того, чтобы вызывать защитный или терапевтический ответ, как обсуждалось в данном документе; и из этого раскрытия, включая документы, включенные в настоящее описание, и информацию в данной области, может быть определено эффективное количество без проведения излишних экспериментов.

Композиции или вакцины по настоящему изобретению можно вводить животному через питьевую воду, ороназально, спреи, аэрозоли, интраназальную инстилляцию, трансдермальную, подкожную или внутримышечную инъекцию. Преимущественно вакцины вводят трансдермально, ороназально, подкожно, внутримышечно, спреем или через питьевую воду.

Настоящее изобретение предусматривает, по меньшей мере, одно введение животному эффективного количества терапевтической композиции, приготовленной в соответствии с изобретением. Терапевтическую композицию согласно изобретению можно вводить безыгольным устройством (например, с помощью устройств Pigjet, Dermojet, Biojector, Vetjet или Vitajet (Bioject, Орегон, США)).

В одном воплощении изобретения может быть применен режим "прайм-буст", который состоит по меньшей мере из одного первичного введения и по меньшей мере одного бустерного введения с использованием по меньшей мере одного общего белка, полепептида, антигена, эпитопа или иммуногена. Как правило, иммунологическая композиция или вакцина, используемая в первичном введении, отличается по своему характеру от тех, которые используются в качестве бустера. Однако следует отметить, что один и тот же состав можно использовать в качестве первичного введения и бустерного введения. Этот протокол введения называется "прайм-буст".

В другом аспекте протокола первичной стимуляции по изобретению вводят композицию, содержащую модифицированную вакцину или композицию Ad5 PRRSV, с последующим введением вакцины или композиции, содержащей рекомбинантный вирусный вектор, который содержит и экспрессирует антиген PRRSV *in vivo*, или инактивированную вирусную вакцину или композицию, содержащую антиген PRRSV, или вакцину или композицию, содержащую субъединицу (белок) PRRSV, или ДНК-плазмидную вакцину или композицию, которая содержит или экспрессирует антиген PRRSV. Аналогично, протокол прайм-буст может включать введение вакцины или композиции, содержащей рекомбинантный вирусный вектор, который содержит и экспрессирует антиген PRRSV *in vivo*, или инактивированную вирусную вакцину или композицию, содержащую антиген PRRSV, или вакцину или композицию, содержащую PRRSV субъединицу (белок) или ДНК-плазмидную вакцину или композицию, которая содержит или экспрессирует антиген PRRSV с последующим введением композиции, содержащей сконструированную вакцину или композицию Ad5 PRRSV. Следует отметить, что как первичное, так и вторичное введение может включать композицию, содержащую модифицированную вакцину или композицию Ad5 PRRSV. Кроме того, отмечено, что как первичное, так и вторичное введение может включать одну или несколько композиций, содержащих сконструированные векторы по настоящему изобретению.

Протокол простого повышения включает, по меньшей мере, одно прайм-введение и, по меньшей мере, одно буст-введение, используя, по меньшей мере, один общий антиген. Вакцина или композиция, используемые при прайм-введении, могут отличаться по своей природе от тех, которые использовались в качестве более поздней бустерной вакцины или композиции. Прайм-введение может включать одно или несколько введений.

Аналогичным образом, буст-введение может включать одно или несколько введений.

Различные введения предпочтительно проводят друг от друга от около 1 до около 6 недель или от около 2 до около 4 недель. Также предполагается повторный бустер каждые 2-6 недель или ежегодный бустер. Возраст животных предпочтительно, по меньшей мере, составляет один день в момент первого введения.

Иммунологический состав и/или вакцина содержат на дозу от около 10^4 до около 10^{11} , преимущественно от около 10^5 до около 10^{10} и более предпочтительно от около 10^6 до около 10^9 вирусных частиц рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего антиген, эпитоп или иммуноген PRRSV. В случае им-

мунологической композиции и/или вакцины на основе поксвируса доза может составлять от около 10^2 БОЕ до около 10^9 БОЕ. Иммунологическая композиция и/или вакцина содержат на дозу от около 10^2 до около 10^7 , преимущественно от около 10^3 до около 10^5 БОЕ поксвируса или рекомбинантного герпесвируса, экспрессирующего антиген, эпитоп или иммуноген PRRSV.

Вирусный вектор может быть аттенуированным экспрессирующим вектором на основе вируса птичьей оспы. В одном воплощении экспрессирующий вектор на основе вируса птичьей оспы может быть вектором на основе вируса оспы кур, например TROVAC®. В другом воплощении экспрессирующим вектором на основе вируса птичьей оспы может быть вектор на основе вируса оспы канареек, например ALVAC®. В еще одном воплощении может использоваться бакуловирусовая платформа экспрессии. Например, антигены могут быть получены в бакуловирусной экспрессирующей системе с использованием культур клеток насекомых в качестве хозяина, и полученные рекомбинантные полипептиды могут вводиться животным. В ином случае, весь рекомбинантный бакуловироз можно вводить в виде вакцины. В общем, антиген, эпитоп или иммуноген PRRSV может представлять собой минорный белок оболочки PRRSV, такой как gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E. Другие вирусы, которые могут быть использованы в способах по изобретению, включают, без ограничения указанным, вирусы коровьей оспы, такие как ослабленный вирус коровьей оспы, например NYVAC, аденовирусы и герпесвирусы, включая свиной CMV.

Эффективность вакцин может быть протестирована через около 2-4 недели после последней иммунизации, путем заражения животных вирулентным штаммом PRRSV. Как гомологичные, так и гетерологичные штаммы могут быть использованы для заражения для проверки эффективности вакцины. Животное может быть заражено спреем, интраназально, в.м., интритрахеально и/или перорально. Вирусное заражение может включать от 10^3 до 10^9 вирионов или инфекционных единиц на дозу в объеме, зависящем от пути введения. Например, если введение осуществляют спреем, то суспензия вируса подвергается аэролизации для получения капель размером от 1 до 200 мкм, если введение является интраназальным, интритрахеальным или пероральным, объем заражающего вируса составляет от около 0,05 до около 5 мл. Животные могут наблюдаться ежедневно в течение 14 дней после заражения на предмет клинических признаков и смертности. Кроме того, группы животных могут быть подвергнуты эвтаназии и оценены на предмет патологических находок. Орофарингеальные, трахеальные или клоачные мазки могут быть собраны у всех животных после заражения вирусом. Присутствие или отсутствие вирусных антигенов в тканях можно оценивать с помощью иммуногистохимии, вирусной изоляции или титрования или определения нуклеиновой кислоты, такого как полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (RT-PCR). Образцы крови могут быть собраны после заражения и могут быть проанализированы на наличие вирус-специфичного антитела против gp2, gp3, gp4, gp5a, E из PRRSV. В ином случае, когда сконструированные векторы содержат эпитопные метки, эпитоп-специфичные антитела могут использоваться для обнаружения присутствия и расположения рекомбинантных вакцинных полипептидов.

Специалистом в этой области, должно быть понятно, что раскрытие в данном документе предоставляется для примера, и настоящее изобретение не ограничивается им. Из данного описания и информации в данной области, специалист может определить количество введений, пути введения, и дозы, которые будут использоваться для каждого протокола инъекции без проведения излишних экспериментов.

Другим воплощением изобретения является набор для осуществления способа индуцирования иммунологического или защитного ответа против PRRSV у животного, содержащий рекомбинантную иммунную композицию Ad5 или вакцину или инактивированную иммунологическую композицию PRRSV или вакцину и инструкции для выполнения способа доставки эффективного количества для выявления иммунного ответа у животного.

Если специально не указано иное, конструирование нуклеотидных вставок, плазмид и рекомбинантных вирусных векторов проводили с использованием стандартных методов молекулярной биологии, известных в данной области, например, описанных J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

В частности, что касается приемлемости объекта изобретения, описанного в данном документе, векторы не приводят к экспрессии в вакцинированном животном естественных уровней PRRSV-белков. Экспрессия каждого гена обусловлена неприродными гетерологичными промоторными элементами, и поэтому конечное количество каждого сходного экспрессированного белка не будет эквивалентно тому, которое было получено во время естественной инфекции PRRSV. Кроме того, одной из важных целей раскрытой системы экспрессии является получение относительно высоких уровней минорных белков оболочки PRRSV (нативных, модифицированных или сконструированных) и надлежащим образом представлять минорные белки иммунной системе животного-хозяина, чтобы вызвать у животных безопасный и защитный иммунный ответ. Уровни и презентация минорных белков оболочки PRRSV типичных для природной инфекции PRRSV не вызывают безопасный и эффективный иммунный ответ против минорных белков PRRSV. Соответственно, как раскрытые вакцинные композиции, так и их окончательное расположение у вакцинированного животного значительно отличаются по структуре и функции по сравнению с их ближайшими встречающимися в природе аналогами.

Изобретение далее иллюстрируется следующими неограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1. Конструирование и тестирование плазмид, экспрессирующих гены PRRSV

Чтобы увеличить видимость для иммунной системы, белки оболочки PRRSV были перенацелены на клеточную поверхность из внутриклеточных компартментов путем введения множественных изменений, сохраняющих при этом внеклеточный домен (предполагаемый сайт связывания антител). Первоначальная попытка перенацеливания генов белков оболочки была предпринята путем удаления цитоплазматических и трансмембранных доменов нативного белка, который является вероятным сайтом для сигнала удержания, и замены их подобными доменами из гликопротеина вируса везикулярного стоматита (VSV-G), другого вирусного белка, известного экспрессией на клеточной поверхности. Сигнальная последовательность генов нативной оболочки также была заменена сигнальной последовательностью из тканевого активатора пламиногена (tPA), хорошо охарактеризованного секреторного белка для того, чтобы способствовать проникновению модифицированных белков в секреторный путь и возможной экспрессии на поверхности клетки. Конкретные метки эпитопа были также вставлены в каждый из перенацеленных белков, чтобы отслеживать экспрессию и транслокацию белков в клетке. Эпитопные метки Мус, Flag и HA, фланкированные с помощью линкерных последовательностей, были вставлены соответственно в gr2, gr3 и gr4 (фиг. 5A-5D).

Поверхностная экспрессия перенацеленных белков. Каждый из перенацеленных генов был синтезирован целиком и клонирован в экспрессирующую плазмиду с промотором CMV. Плазмиды трансфицировали в клетки HEK 293T и экспрессию детектировали в фиксированных клетках с помощью иммуофлуоресцентного анализа (IFA) (фиг. 6). Поверхность клеток и общая экспрессия белка были легко обнаружены в клетках, трансфицированных как gr3-Flag-VSV, так и gr4-HA-VSV. Однако экспрессия в gr2-Мус-VSV-трансфицированных клетках была обнаружена только после пермеабиллизации клеток, что указывает на то, что модификации, введенные в gr2, были недостаточными для перенацеливания белка на поверхность клеток. Более того, после пермеабиллизации окрашивание по gr2-Мус-VSV было заметно отличным от окрашивания модифицированных белков gr3 или gr4 (перенацеленных). В случае GP2-Мус-VSV, окрашивание было более интенсивным и фокусным, в то время как в GP3-Flag-VSV и gr4-HA-VSV диффундировали по всей клетке. Это указывало на то, что белок gr2-VSV-Мус был экспрессирован, но мог неправильно свернуться, попадая в какой-то субклеточный компартмент. Могут быть несколько причин неспособности модифицированного gr2 правильно сворачиваться. Во-первых, это может быть потребность в других частях белка для правильного сворачивания, таких как сигнальная последовательность, трансмембранный или цитоплазматический хвост, которые были удалены в процессе модификации для поверхностной экспрессии. Во-вторых, это также может быть связано с неполным удалением доменов из gr2, который все еще содержит сигнал удержания. В-третьих, неправильное сворачивание могло быть вызвано из-за наличия тус-метки, которой нет ни в модифицированном gr3, ни в gr4. В-четвертых, было показано, что отсутствие экспрессии одного из минорных белков отменяет включение всех минорных белков в вирион; поэтому gr2 может потребовать наличия gr3 и gr4 для достижения правильного свертывания.

Повторно нацеленные белки взаимодействуют с образованием олигомеров. Взаимодействие между минорными белками связано с функциональным анализом и непосредственно демонстрируется биохимическим анализом. Плазмиды, кодирующие каждый из перенацеленных белков, были совместно трансфицированы в клетки HEK-293T, а взаимодействие между минорными белками было проверено методом коиммунопреципитации (Co-IP). Как показано на фиг. 7, анти-HA антитело осаждает специфически gr4-HA-VSV (дорожка 3), но не gr3-flag-VSV (дорожка 2) или gr2-мус-VSV (дорожка 1). Однако, когда все модифицированные белки были совместно трансфицированы, одно и то же анти-HA-антитело осаждало дополнительную белковую полосу, отличную от gr4-HA-VSV (дорожка 4, красная точка), что указывает на то, что дополнительный белок имеет прямое взаимодействие с gr4-HA-VSV, но не с анти-HA-антителом. Размер этой полосы похож на gr2-Мус-VSV (дорожка 6) или gr3-Flag-VSV (дорожка 7), что указывает на то, что этот белок, взаимодействующий с gr4, может быть gr2, gr3 или тем, и другим. Последующий зонд дополнительной полосы в co-IP (дорожка 4) с анти-Flag или анти-Мус-антителом оказался положительным по обоим (не показано), что указывает на то, что эта полоса содержит как gr2-, так и gr3-белки. Поэтому вывод из этого и дополнительных экспериментов заключается в том, что модификации, введенные для поверхностной экспрессии белков gr, не изменяли их четвертичную структуру.

Перенацеленные белки поддерживают взаимодействие с рецептором CD163 после модификации. Следующий шаг в обеспечении правильного свертывания перенацеленного белка заключался в демонстрации того, что они все еще сохраняют свою способность взаимодействовать с рецептором, свиным CD163. Каждая из плазмид, экспрессирующих повторно нацеленные белки, была котрансфицирована плазмидой, экспрессирующей CD163 (домены 4-9), ранее показанной достаточной для опосредования проникновения вируса в клетки-мишени. Одна часть клеточного лизата была иммунопреципитирована антителом против VSV (специфичным для белков оболочки), а другая часть была иммунопреципитирована анти-CD163-антителом. Лизат, осажденный анти-CD163-антителом, исследовали антителом против

CD 163, конъюгированным с биотином, для контроля входа CD163 в каждую реакцию со-IP (фиг. 8C). Лизат, иммунопреципитированный анти-VSV, прогоняли в двух повторах и одну мембрану зондировали анти-VSV-HRP (фиг. 8A) для измерения количества модифицированного gr, а другую мембрану исследовали с помощью анти-CD 163 (фиг. 8B) для измерения количества CD163, коиммунопреципитированного модифицированными гликопротеинами оболочки.

Все модифицированные минорные гликопротеины оболочки взаимодействуют с CD163, тогда как модифицированный gr5, мажорный гликопротеин, используемый в качестве отрицательного контроля, имел значительно более слабое или неопределяемое взаимодействие с CD163.

Пример 2. Вакцинация животных с помощью объединенных плазмид, экспрессирующих гены оболочки PRRSV

Тридцать две 3-х недельные свиньи были разделены на 4 группы по 8 животных (табл. 2).

Таблица 2. Подробности исследования

Группа	кол-во животных	Группа	Иммунизация (Дни)					Убитая/ДНК	Заражение
				0	14	28	42		
1	8	PRRSV Gr дикого типа	1A	X	X	X	X	ДНК (3)	X
			1B	X	X	X	X	Убитая (5)	X
2	8	Рекомбинантные PRRSV Gr	2A	X	X	X	X	ДНК (3)	X
			2B	X	X	X	X	Убитая (5)	X
3	8	иммунизация имитирующей ДНК (G вируса бешенства)	3A	X	X	X	X	ДНК (3)	X
			3B	X	X	X	X	Убитая (3)	X
4	8	невакцинированные							X

Группа дикого типа получала пул из 3 плазмид, экспрессирующих ненацеленные gr, рекомбинантная группа получала пул из трех плазмид, экспрессирующих перенацеленные gr (то есть фиг. 5B до 5D), группа иммунизации имитирующей ДНК получала плазмиду, кодирующую гликопротеин бешенства, в то время как невакцинированная группа получала только буфер Tris-EDTA. Каждая плазмида находилась в концентрации около 1 мкг/мкл, и около 400 мкг каждой плазмиды вводили по 200 мкл на каждую долю уха. После 4 иммунизации каждая группа была дополнительно разделена и получала буст либо с помощью убитой вакцины, в адъюванте TS6 (US 3737952 B2, в Merial, и в данном документе включена в ссылкой во всей своей полноте), либо была подвергнута 5-му раунду иммунизации ДНК.

Несмотря на то, что, как представляется, существует тенденция к усилению защиты от поражений легкого у животных, вакцинированных одной из объединенных плазмид, по сравнению с группами G вируса бешенства или невакцинированными, среднее среди всех групп не было статистически различным. Также не было существенной разницы между группами, получавшими нацеленные плазмиды относительно перенацеленных плазмид.

Таким образом, заявители далее планировали поместить все гены в один вектор для того, чтобы обеспечить одновременную экспрессию в пределах одной клетки с тем, чтобы облегчить взаимодействие/олигомеризацию белков оболочки PRRSV.

Пример 3. Конструирование и тестирование вирусных векторов, экспрессирующих гены PRRSV

Клетки и среды. Клетки HEK 293 (ATCC) содержали в MEM (Gibco # 11095) с 10% фетальной бычьей сывороткой (партия Морегата № 81827101) при 37°C в 5% CO₂. Эти клетки использовали для выделения рекомбинантного аденовируса (vAD3041, vAD3042, vAD3038, vAD3033 и vAD3067) и создания вирусных стоков.

Конструирование вирусных векторов и иммуногенов. Минорные белки оболочки PRRSV включают gr2 (ORF2), gr3 (ORF3), gr4 (ORF4) и E (ORF2b). Последовательность ДНК каждого из этих белков была получена из GenBank Accession # U87392 (VR2332, PRRSV Type II). VR2332 (североамериканский штамм) представляет собой один из двух известных крупных серотипов PRRSV (Done et al., 1996). Другой, прототип Lelystad, является представителем, по крайней мере, большинства штаммов, которые были выделены в Западной Европе. Оптимизированные по кодону последовательности каждого белка, когда они сконструированы с соответствующим промотором для экспрессии всех белков с одного вирусного вектора (фиг. 1). В каждом случае промоторы SV40 (Simian virus 40) и CMV (Cytomegalovirus) управляют экспрессией gr2 и gr4 соответственно, в противоположных направлениях, как показано стрелками. Предполагается, что эти промоторы можно поменять местами, так что SV40 может управлять экспрессией gr4, а CMV может управлять экспрессией gr2. Такие изменения будут очевидны для квалифицированного специалиста. Важно отметить, что из-за раскрытой критической роли, которую играют минорные белки PRRSV в вызове безопасного и защитного иммунного ответа, заявители полностью ожидают, что следующие подходы будут одинаково хорошо применяться ко всем штаммам PRRSV. Соответственно, оптимизированные по кодону варианты минорных белков Lelystad могут быть получены обычными

способами, а полученные последовательности клонированы в рекомбинантные векторы текущего раскрытия.

Во всех конструкциях Ad5 PRRSV, экспрессия минорного гликопротеина оболочки GP3 промотируется с участка внутренней посадки рибосомы (IRES). Экспрессия минорного гликопротеина Е оболочки в vAD3041 и vAD3067 (фиг. 1C & 1D) активируется присутствием саморасщепляющегося пептида (p2A), расположенного в конструктах Ad5 сразу после кодирующей области gp2.

Кроме того, период полужизни транскриптов с промоторов SV40 и CMV усиливается добавлением поли-А-хвостов (pA) из SV40 или тимидинкиназы (TK). Сайты attL1 и attL2 (крайне слева и справа от каждой вставки, показанной на фиг. 1) были использованы для того, чтобы вставить целые синтетические фрагменты в аденовирусный геном с помощью LR-рекомбинации, Gateway Technology (Invitrogen) (с получением vAD3042, vAD3038, vAD3041 и vAD3067. Вставки по фиг. 1 были химически синтезированы (Genscript) так, чтобы содержать подходящие сайты рестрикции для клонирования в экспрессирующий клон для получения рекомбинантного Ad5 (технология Gateway, Invitrogen). Стоит еще раз отметить, что предусматриваются варианты, у которых разные элементы способствуют экспрессии конкретного гена PRRSV, и это находятся в пределах досягаемости квалифицированного специалиста, читающего данное раскрытие.

Соответственно, множественные комбинации минорных белков были собраны для рекомбинации в вектор Ad5: одна, содержащая только три из минорных белков без Е (vAD3042) (фиг. 1A; SEQ ID NO: 2); одна, содержащая rtg-gp2, rtg-gp3, rtg-gp4 белки без Е (vAD3038) (фиг. 1B; SEQ ID NO: 3); одна, содержащая все четыре минорных белка gp2, gp3, gp4 и Е (vAD3041) (фиг. 1C, SEQ ID NO: 3); и одна, содержащая все четыре минорных белка, оптимизированных по кодонам, rtg-gp2, rtg-gp3, rtg-gp4 и Е (vAD3067) (фиг. 1D; SEQ ID NO: 4).

Таблица 3. Расположение характерных элементов внутри конструктов

Конструкт	Элемент	Расположение
Vad3041 вставка (4662 п.о.)	attL1	1-96
	SV40 poly A	97-314 (комплементарно)
	E ORF	341-562 (комплементарно)
	P2A	568-633 (комплементарно)
	gp2 ORF	642-1412 (комплементарно)
	Промотор SV40	1418-1785 (комплементарно)
	CMV-промотор	1806-2393
	gp4 ORF	2406-2942
	IRES	2949-3511
	gp3 ORF	3518-4282
	TK poly A	4295-4566
vAD3042 вставка (4662 п.о.)	attL1	1-96
	SV40 poly A	97-314 (комплементарно)
	gp2 ORF	341-1111 (комплементарно)
	Промотор SV40	1117-1484 (комплементарно)
	CMV-промотор	1505-2092
	gp4 ORF	2105-2641
	IRES	2648-3210
	gp3 ORF	3217-3981
	TK poly A	3994-4265
	attL2	4266-4361
вставка vAD3038 (перенацеленный вектор)	attL1	1-96
	SV40 poly A	97-314 (комплементарно)
	gp2-Myc-VSV ORF	333-1151 (комплементарно)
	Промотор SV40	1163-1530 (комплементарно)
	CMV-промотор	1551-2138
	gp4-HA-VSV ORF	2148-2864
	IRES	2865-3427
	gp3-Flag-VSV ORF	3431-4192
	TK poly A	4199-4470
	attL2	4471-4566
вставка VAD3067 (фиг. 1D)	attL1	1-96
	SV40 поли A	97-314 (комплементарно)
	E ORF	341-562 (комплементарно)
	P2A	568-633 (комплементарно)
	gp2-Myc-VSV ORF	642-1460 (комплементарно)

	Промотор SV40	1472-1839 (комплементарно)
	CMV-промотор	1860-2447
	gp4-HA-VSV ORF	2457-3173
	IRES	3174-3736
	gp3-Flag-VSV ORF	3740-4501
	TK поли А	4508-4779
	attL2	4480-4575
PAD/PL DEST (Над вставками трансгенной кассеты помещали между участками attR1 и attR2 pAD/PL-DEST)	последовательности аденовируса человека 5	(дикий тип 1-458, включает 5'LTR и упаковочный сигнал): 1-458
	Сайт attR1	512-636
	Сайт attR2	2092-2216
	последовательности аденовируса человека 5	(дикий тип 3513-35935, область E3 удалена, включает 3'R-ITR): 2234-32782
	Сайт рестрикции PacI	32788 и 34862
	Область плазмидного каркаса	32959-34705, включая точку начала репликации из pUC, ген устойчивости к ампициллину

Выработка вируса.

Экспрессирующие клоны были получены с помощью LR-рекомбинации входящего вектора с вектором-приемником с использованием технологии Gateway (Invitrogen). Рекомбинантный аденовирус vAD3041, vAD3042 и vAD3038 получали путем трансфекции линейаризованных экспрессионных клонов в клетках HEK 293 с помощью трансфекционного реагента. После высвобождения каждый вирус собирали путем цикла замораживания-оттаивания и очищали от клеточного дебриса путем центрифугирования. Для пассажа каждый вирус инокулировали в монослой клеток HEK 293 и через около 3-4 дня после заражения, вирус собирали циклом замораживания-оттаивания и очищали центрифугированием. Три пассажа были проведены для того, чтобы сделать вирусный сток, который хранился при -80°C. В качестве отрицательного контроля кодон-оптимизированный ген генагглютинаина (HA) вируса свиного гриппа (SIV) собирали аналогично в вирусных векторах Ad5 (vAD3033).

Вирусный титр.

Клетки HEK 293 высевали при плотности 7×10^5 клеток на планшет в трех 96-луночных планшетах со средой MEM (Gibco # 11095), содержащей 2% FBS (Moregate партия № 81827101), незаменимую аминокислоту (Gibco # 11140), антибиотики-антимикотики (Gibco # 15240). В день заражения каждый планшет был инфицирован 100 мкл на лунку разведенного вируса от 10^{-3} до 10^{-10} . Титры вируса были считаны на 10-й день после заражения, и для расчета титра использовалось среднее значение трех планшетов. Стоковый титр пассажа 3 vAD3041 P.3 составлял $10^{9.03}$ TCID₅₀ на мл, а у vAD3042 P.3- $10^{8.90}$ TCID₅₀ на мл. Титр пассажа 3 для vAD3038 P.3 составлял $10^{9.93}$ TCID₅₀ на мл, а у другой партии vAD3042 P.3- $10^{9.97}$ TCID₅₀ на мл.

Вирусную ДНК экстрагировали из каждого вирусного стока и амплифицировали с помощью праймеров pAd Forward (5'-GAC TTT GAC CGT TTA CGT GGA GAC-3 ') (SEQ ID NO: 26) и pAd Reverse (5'-CCT TAA GCC ACG CCC ACA CAT TTC-3 ') (SEQ ID NO: 27) с использованием смеси platinum PCR supermix High Fidelity (Invitrogen # 12532), как указано. ПЦР-ампликоны были такого же размера, как ожидалось: например, 4709 п.о. для vAD3041; 4408 п.о. для vAD3042 (фиг. 4). Нуклеотидные последовательности ПЦР-ампликонов из каждого рекомбинантного аденовируса были идентичны, тем, что были сконструированы во входящих векторах (описанных на фиг. 1), и не было изменений в нуклеотидной последовательности трансгенных кассет (гены PRRSV, промотор и полиА-хвосты).

Экспрессия перенацеленных минорных белков оболочки из рекомбинантного аденовируса. Одновременную экспрессию каждого из модифицированных белков оболочки из рекомбинантного аденовируса в одной клетке подтверждали с помощью анализа с двойной иммунофлуоресценцией. Рекомбинантный vAD3038 использовали для инфицирования конфлюэнтного монослоя HEK293 при высоком МОИ и клетки фиксировали через 48 ч и визуализировали IFA для экспрессии рекомбинантных антигенов. Было показано, что все белки хорошо экспрессируются, в том числе на поверхности клеток (фиг. 9A и 9B).

Важно отметить, что экспрессия gp2, которая была дефектной, когда белок экспрессировался в одиночку, показанная ранее как интенсивная фокальная внутриклеточная экспрессия без обнаруживаемой поверхностной экспрессии, улучшилась с диффузной внутриклеточной экспрессией и явной экспрессией на поверхности клеток (фиг. 9C). Это указывает на то, что правильное сворачивание и транспорт модифицированного gp2 может зависеть от коэкспрессии gp3 и/или gp4. Этот результат предполагает, что образование нейтрализующего эпитопа требует формирования структуры более высокого порядка путем взаимодействия между минорными белками.

Пример 4. Клиническое испытание.

Безопасность и эффективность вакцин Ad5 PRRSV

Шестьдесят (60) свиней были случайным образом разделены на 4 группы, каждая из которых содержала по 15 животных (табл. 3). Группа 1 получила vAD3038, который экспрессирует только gp2, gp3 и gp3, тогда как группа 2 получила vAD3041, который дополнительно экспрессирует E. Группа 3 полу-

чила vAD3042, который экспрессирует перенацеленные gp2, gp3 и gp4, а группа 4-vAD3033, который экспрессирует SIV HA (отрицательный контроль). Группы, которые получали аденовирусные вакцины, праймировали путем введения 1 мл препарата в каждую ноздрю, всего по 2 мл, примерно в концентрации 10^{8-9} TCID₅₀/мл. Эти группы были бустированы через 21 день тем же составом, который вводили внутримышечно. Через 42 дня после начала эксперимента всех животных заражали интраназально штаммом PRRSV NADC20. Всех животных умерщвляли через 2 недели после заражения и исследовали на предмет повреждений в легких, и собирали образцы для анализа титра вируса в тканях и сыворотке, как показано на фиг. 9.

Таблица 3. Схема вакцинации

Группа #	#/группу	Прайм	Буст	Заражение
		День 0	День 21	День 42
1	15	vAD3038	vAD3038	NADC20
2	15	vAD3041	vAD3041	NADC20
3	15	vAD3042	vAD3042	NADC20
4	15	vAD3033	vAD3033	NADC20

В общем, данные показывают, что, хотя вакцинация одним вектором, кодирующим минорные белки оболочки gp2, gp3 и gp4 (vAD3042) не дает каких-либо значительных преимуществ по сравнению с отрицательным контролем, добавление минорного белка E (vAD3041) дает значительную разницу в защите от поражения легких от заражения PRRSV. Более того, перенацеливание минорных белков (vAD3038) также дает существенное различие (фиг. 11).

Соответственно данные и результаты, раскрытые в настоящем документе, поддерживают общепринятую модель, в которой защита против заражения PRRSV обеспечивается антителами, направленными против любого из поверхностных белков (например, gp2), или олигомерной структуры поверхности, сформированной и представленной третичной/четвертичной структурой/расположением белков. Как таковые, эти защитные антитела функционируют, по меньшей мере частично, путем блокирования инфекции PRRSV, препятствуя связыванию вирусных белков с клеточным рецептором (рецепторами).

До этого раскрытия было обнаружено, что взаимодействие белка E с остальными минорными белками или другими белками в вирусе является предпосылкой для получения защитного иммунитета. Таким образом, текущее исследование вакцинации показало удивительную и неожиданную роль небольшого белка E, либо отдельно, либо в сочетании с одним или несколькими из числа gp2, gp3 и gp4, в вызове у свиней значительно более высокой защиты от вирулентного заражения PRRSV.

Например, заявители предположили, что нейтрализующий эпитоп может быть, например, расположен непосредственно на белке E или он может индуцироваться любым одним или комбинацией минорных белков в присутствии белка E. В свете источников предшествующего уровня техники этот вывод является неожиданным и удивительным. Соответственно, это убедительное открытие не только определило композицию антиретровирусного антигена PRRSV, которая служит основой для разработки вакцины без живого PRRSV, но также открывает новые области исследований PRRSV для выяснения взаимодействий белок-белок/вирус-клеточный рецептор.

В свете данных и результатов заявители предполагают, что другие комбинации E + минорный белок (например, E + gp2; E + gp2 + gp3; E + gp2 + gp4 и т.п.) аналогичным образом преодолеют проблему презентации "нейтрализующего эпитопа" (определенного в данном документе как эпитоп, который способен вызывать у животного защитный иммунный ответ, в том числе продуцирование нейтрализующих вирус антител) к иммунной системе животного. Более того, результаты показывают, что перенацеливание минорных белков PRRSV вызывает аналогичный удивительный безопасный и защитный иммунитет.

Таким образом, заявители выявили два основных, но взаимосвязанных подхода к преодолению неспособности отдельно экспрессируемых gp2, gp3 и gp4 презентировать нейтрализующий вирус эпитоп иммунной системе животного-хозяина и вызывать защитный иммунный ответ против заражения вирулентным PRRSV.

Кроме того, в этой заявке впервые раскрывается, что иммуногенность минорных белков оболочки PRRSV может быть усилена в достаточной степени для того, чтобы получить защитные иммунные ответы. Предполагается, что эти оригинальные подходы имеют широкую применимость к другим вирусам, особенно в тех случаях, когда локализация клеток играет роль в предотвращении передачи нейтрализующих вирус эпитопов иммунной системе хозяина.

Пример 4. Клиническое испытание. Безопасность и эффективность вакцин Ad5 PRRSV

Другое исследование проводили с использованием способов, описанных в примере 3, а в табл. 4 приведен обзор. Аденовирусные векторы имели вставки в соответствии со следующим: vAD3038 (Gp234-Rtrg); vAD3067 (Gp234-Rtrg + E-opt); vAD3064 (M-gp5-gp5a-Rtrg); vAD3041 (Gp234E); vAD3069 (Np-M-gp5-gp5a); vAD3046 (SIV-HA).

Таблица 4. Схема вакцинации (IM = внутримышечная, IN = интраназальная)

Группа #	# на группу	Прайм	Буст	Убитая вакцина
		День 0	День 14	День 28
1	12	vAD3038 (IN)	vAD3038 (IM)	да
2	8	vAD3067 (IM)	vAD3067 (IM)	да
3	12	vAD3067 (IN)	vAD3067 (IM)	да
4	12	(vAD3067 + vAD3064) (IN)	(vAD3067 + vAD3064) (IM)	да
5	12	(vAD3041 + vAD3069) (IN)	(vAD3041 + vAD3069) (IM)	да
6	12	vAD3038 (IN)	vAD3038 (IM)	нет
7	12	vAD3046 (IN)	vAD3046 (IM)	нет

Сущность изобретения

Данные продемонстрировали, что вектор-экспрессированные, перенацеленные минорные белки оболочки PRRSV, бустированные с помощью убитой вакцины, снижают вирусную нагрузку в сыворотке у свиней и вызывают значительную защиту от поражения легких (фиг. 18 и 19). Эти данные не могли быть предсказаны до начала этого исследования, даже с учетом данных, представленных в примере 3. Теперь, когда это исследование было проведено, заявители предполагают, что удивительная защита от поражения легких и снижение вирусной нагрузки в сыворотке может быть объяснена сильным праймирующим эффектом перенацеленных минорных белков оболочки (фиг. 20). Также непредсказуемым было обнаружение того, что добавление E к перенацеленным минорным белкам оболочки не показало значительной защиты от поражения легких (фиг. 21 и 22), в отличие от противоположного результата, описанного в примере 3 (т.е. введение аденоконструкта, содержащего E + минорные белки оболочки значительно уменьшает поражение легких). В свете данных взаимодействия, изображенных на фиг. 23 и 24, заявители предполагают, что эта потеря защиты от поражения легких может быть вызвана отрицательным взаимодействием дикого типа с перенацеленными минорными белками оболочки (т.е. из-за измененных доменов TM и CT, присутствующих в перенацеленных белках).

* * *

Имея, таким образом, подробно описанные предпочтительные воплощения настоящего изобретения, следует понимать, что изобретение, определенное указанными выше абзацами, не должно быть ограничено конкретными деталями, изложенными в приведенном выше описании, поскольку множество явных вариаций его возможны без ухода от духа и объема настоящего изобретения.

Все документы, упомянутые или упомянутые в цитированной заявке, и все документы, приведенные в настоящем документе или упомянутые в данном документе ("настоящие цитируемые документы"), и все документы, цитируемые или упоминаемые в цитированных документах, вместе с инструкциями, описаниями, характеристиками продукта и технологическими картами для любых продуктов, упомянутых в данном документе или в любом документе, включенном в данный документ в качестве ссылки, настоящим включены в настоящее описание посредством ссылки и могут быть использованы при практическом осуществлении данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Безопасная и эффективная иммунологическая композиция для вызова защитного ответа против PRRSV у нуждающегося в этом животного, включающая:

а) один или несколько рекомбинантных вирусных векторов, содержащий один или несколько гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих один или несколько из числа перенацеленных антигена, полипептида или эктодомена белков gp2, gp3, gp4, вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV), имеющих по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14, 16 или 18, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью эктодомена, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 14, 16 или 18,

б) в которой, когда перенацеленный gp2 кодируется по меньшей мере один из перенацеленного gp3 или перенацеленного gp4 также кодируется,

с) в которой экспрессия полипептида перенацеливается на клеточную поверхность заменой существующей последовательности клеточной локализации полипептида соответствующей последовательностью, определяющей экспрессию на клеточной поверхности, из гетерологичного гена, и

д) фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель.

2. Композиция по п.1, в которой один или несколько векторов содержат рекомбинантный вектор на основе аденовируса 5 с PRRSV (Ad5-PRRSV), рекомбинантный вектор на основе баруловируса с PRRSV, рекомбинантный вектор на основе свиного цитомегаловируса с PRRSV или рекомбинантный вектор на основе поксвируса с PRRSV.

3. Композиция по п.1 или 2, в которой один или несколько векторов дополнительно содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один из антигена, полипептида или эк-

тодомена gp2, gp3 или gp4 из PRRSV.

4. Композиция по пп.1-3, которая включает первый вектор, экспрессирующий перенацеленные минорные белки PRRSV, и второй вектор, экспрессирующий перенацеленные мажорные белки PRRSV.

5. Композиция по пп.1-4, в которой рекомбинантный вектор PRRSV представляет собой вектор Ad5-PRRSV, который включает полинуклеотид, имеющий:

a) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13, 15 или 17, или

b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с эктодоменом, кодируемым последовательностью, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 13, 15 или 17.

6. Композиция по пп.1-5, которая содержит один или два рекомбинантных вектора Ad5-PRRSV.

7. Композиция по пп.1-6, в которой рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV экспрессирует одно из следующих индивидуально или в комбинации, из одного или нескольких из числа антигена, полипептида или эктодомена PRRSV:

a) rtg-gp2 и rtg-gp3,

b) rtg-gp2 и rtg-gp4,

c) rtg-gp4,

d) rtg-gp2, rtg-gp3 и rtg-gp4,

e) rtg-gp3 и

f) rtg-gp4 и rtg-gp3.

8. Композиция по пп.1-7, в которой рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV содержит полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один перенацеленный антиген, полипептид или эктодомен, или

рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV содержит по меньшей мере один перенацеленный полинуклеотид.

9. Рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV для вызова защитного ответа против PRRSV у нуждающегося в этом животного, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих перенацеленные антиген(ы), полипептид(ы), эктодомен(ы) gp2, gp3 или gp4 из PRRSV, имеющие по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14, 16, или 18, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью эктодомена, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 14, 16, или 18.

10. Рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV по п.9, который содержит полинуклеотид, кодирующий перенацеленные антигены, полипептиды или эктодомены gp2 и gp3 из PRRSV, имеющие:

a) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14 и 16, или

b) по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с последовательностью эктодомена, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 14 и 16.

11. Рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV по п.10, который содержит полинуклеотид, кодирующий перенацеленный антиген, полипептид или эктодомен gp3 из PRRSV, имеющий:

a) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, указанной в любом из SEQ ID NO: 16 (перенацеленный белок gp3), или

b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью эктодомена, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 16.

12. Рекомбинантный вектор Ad5-PRRSV по п.10, который содержит полинуклеотиды, кодирующие антигены, полипептиды или эктодомены gp2 и gp4 из PRRSV, имеющие:

a) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14 (перенацеленный белок gp2), и последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18, (перенацеленный белок gp4), или

b) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью эктодомена, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 14 (перенацеленный белок gp2), и последовательности эктодомена, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 18 (перенацеленный белок gp4).

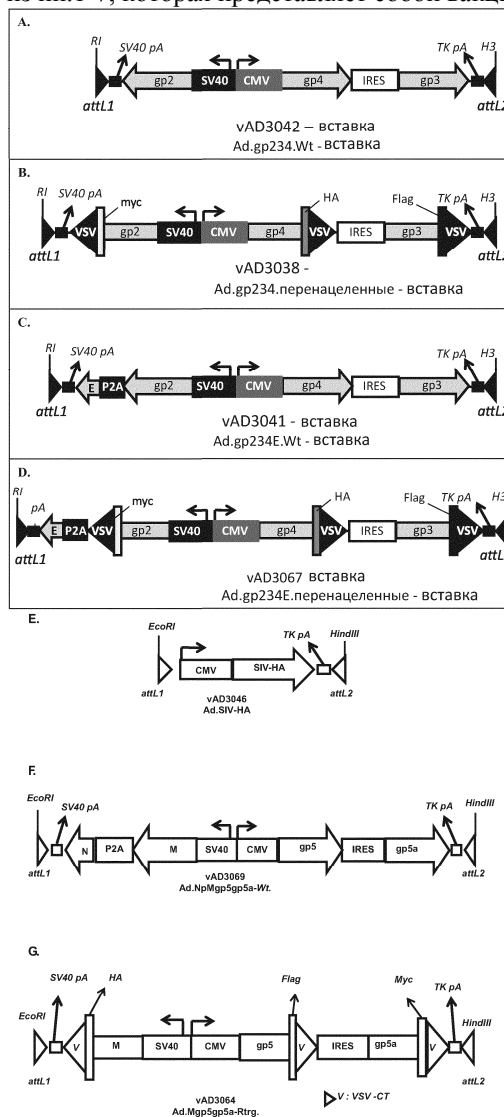
13. Применение композиции по любому из пп.1-8 для приготовления лекарственного средства для вызова защитного ответа против PRRSV у нуждающегося в этом животного, где лекарственное средство подходит для ороназального введения, введения спреем, введения в составе питьевой воды, внутримышечного введения, подкожного введения, внутрикожного введения, трансдермального введения или "прайм-буст" введения и где животное представляет собой свинью.

14. Композиция по п.1, в которой вектор Ad5-PRRSV включает один или несколько полинуклеотидов, кодирующих три антигена, полипептида или эктодомена PRRSV, имеющие:

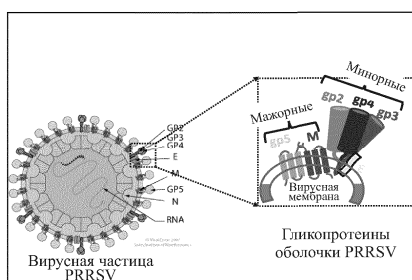
a) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с одной из последовательностей, представленной в SEQ ID NO: 14 (перенацеленный белок gp2), 16 (перенацеленный белок gp3) и 18 (перенацеленный белок gp4), или

б) по меньшей мере 90% идентичность последовательности с одной из последовательностей экто-домена, представленной в подпоследовательности SEQ ID NO: 14 (перенацеленный белок gp2), 16 (перенацеленный белок gp3) и 18 (перенацеленный белок gp4).

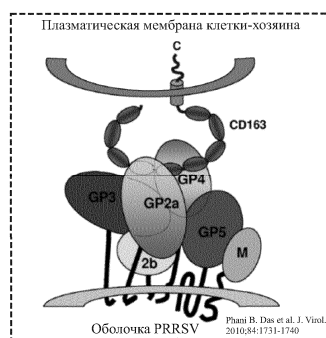
15. Композиция по любому из пп.1-7, которая представляет собой вакцину.



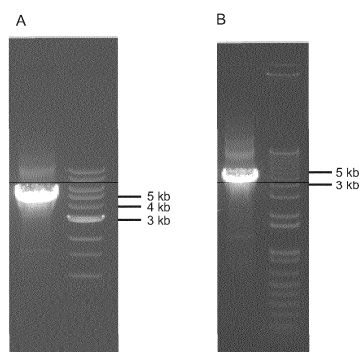
Фиг. 1



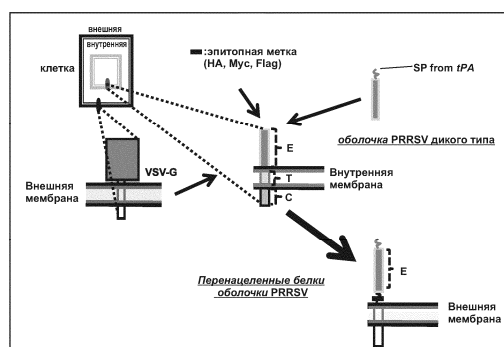
Фиг. 2



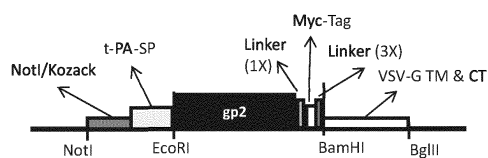
Фиг. 3



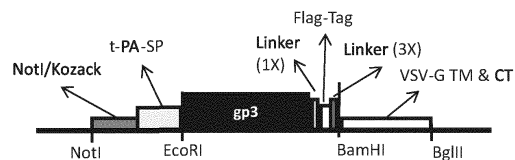
Фиг. 4



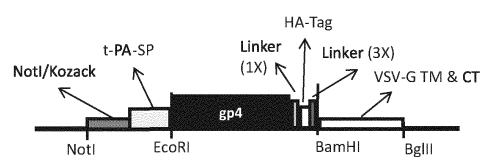
Фиг. 5A



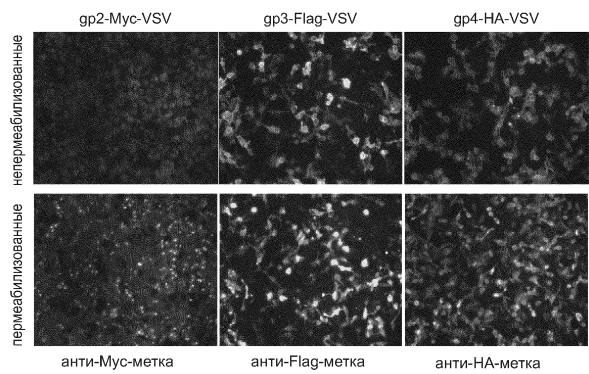
Фиг. 5B



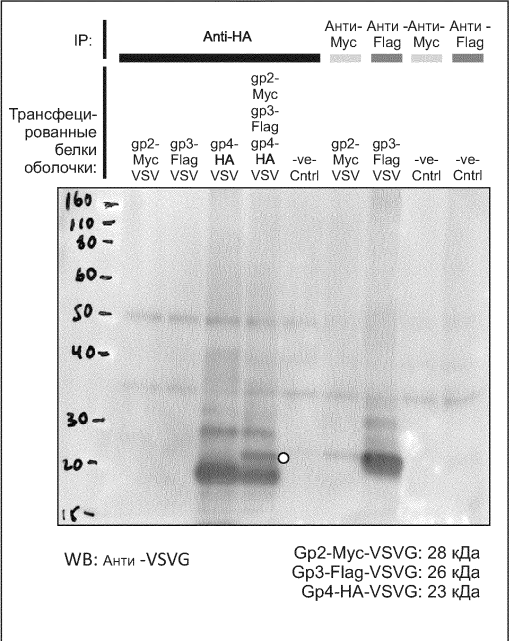
Фиг. 5C



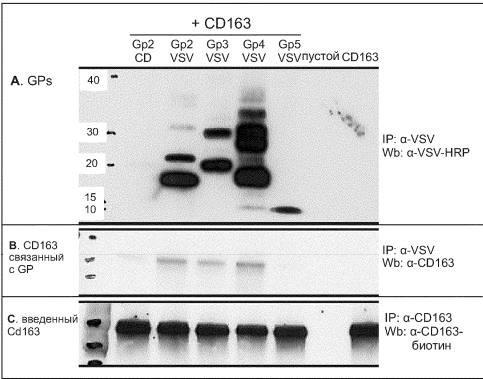
Фиг. 5D



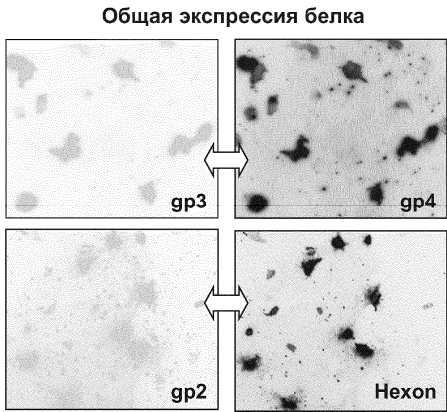
Фиг. 6



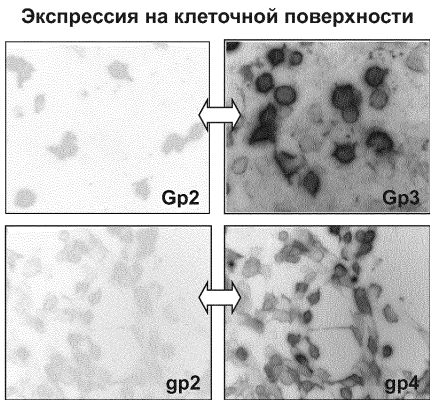
Фиг. 7



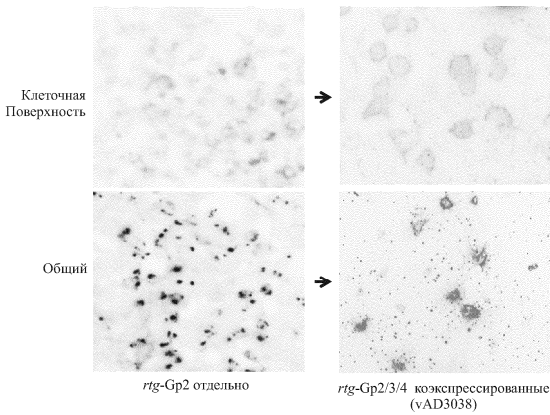
Фиг. 8



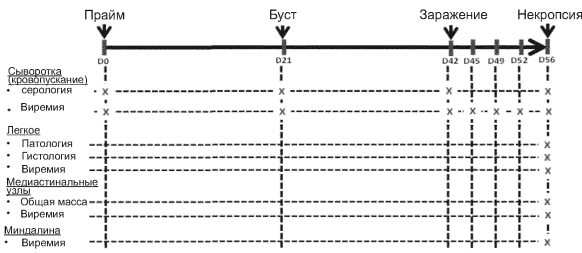
Фиг. 9А



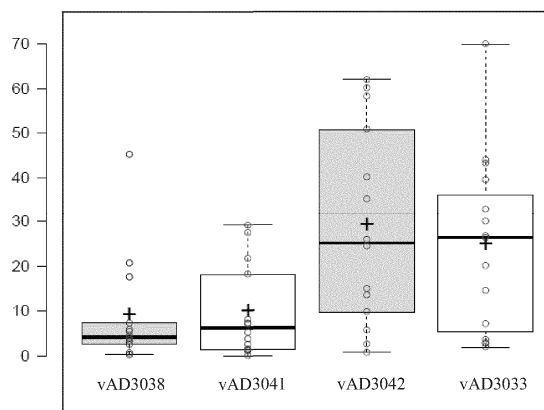
Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 10



Фиг. 11

SEQ ID #	Тип	Описания
1	Полипептид	Полипептид gp2 из PRRSV, из VR2332, PRRSV тип II (полная вирусная последовательность представлена по учетному номеру #:U87392.3, включенному ссылкой полностью)
2	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV gp2 (12073..12843 of VR2332)
3	Полипептид	VR2332 PRRSV gp3 полипептид
4	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV gp3 (12696..13460 of VR2332)
5	Полипептид	VR2332 PRRSV gp4 полипептид
6	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV gp4 (13241..13777 of VR2332)
7	Полипептид	VR2332 PRRSV E полипептид
8	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV E (12078..12299 of VR2332)
9	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV gp2 (кодон-оптимизированный)
10	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV gp3 (кодон-оптимизированный)
11	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV gp4 (кодон-оптимизированный)
12	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV E (кодон-оптимизированный)
13	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV <i>ng</i> -gp2 DNA (кодон-оптимизированный, перенацеленный)
14	Полипептид	VR2332 PRRSV <i>ng</i> -gp2 полипептид (gp2-мус-VSV)
15	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV <i>ng</i> -gp3 DNA (кодон-оптимизированный, перенацеленный)
16	Полипептид	VR2332 PRRSV <i>ng</i> -gp3 полипептид (gp3-Flag-VSV)
17	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV <i>ng</i> -gp4 DNA (кодон-оптимизированный, перенацеленный)
18	Полипептид	VR2332 PRRSV <i>ng</i> -gp4 полипептид (gp4-HA-VSV)
19	ДНК/РНК	VR2332 PRRSV <i>ng</i> -E (кодон-оптимизированный, перенацеленный)
20	Полипептид	VR2332 PRRSV <i>ng</i> -E полипептид
21	ДНК/РНК	vAD3038 предрекомбинантная вставка
22	ДНК/РНК	vAD3041 предрекомбинантная вставка
23	ДНК/РНК	vAD3042 предрекомбинантная вставка
24	ДНК/РНК	vAD- <i>ng</i> -gp234-E предрекомбинантная вставка
25	ДНК/РНК	vAD3033 предрекомбинантная вставка
26	ДНК/РНК	pAd5 прямой праймер
27	ДНК/РНК	pAd5 обратный праймер
28	ДНК/РНК	Полный VR2332, последовательность PRRSV Типа II
29	ДНК/РНК	Полная последовательность Lelystad PRRSV (GenBank: A26843.1)
30	ДНК/РНК	Вектор pAd/PL-DEST; attR1 сайт: 512-636; attR2 сайт: 2092-2216
31	Полипептид	PRRSV gp5a
32	Полипептид	VR2332 PRRSV M (матричный белок)

34	Полипептид	ABO40192.1 PRRSV gp2
35	Полипептид	ACF93748.1 PRRSV gp2
36	Полипептид	AHA83141.1 PRRSV gp2
37	Полипептид	CAA01838.1 PRRSV gp2
38	Полипептид	AAE74522.1 PRRSV gp2
39	Полипептид	AAB54503.1 PRRSV gp2
40	Полипептид	AAE68461.1 PRRSV gp3
41	Полипептид	AAQ51784.1 PRRSV gp3
42	Полипептид	AAE74530.1 PRRSV gp3
43	Полипептид	CAA01839.1 PRRSV gp3
44	Полипептид	ABH73414.1 PRRSV gp3
45	Полипептид	AAE74526.1 PRRSV gp3
46	Полипептид	AAE74537.1 PRRSV gp4
47	Полипептид	AAE74538.1 PRRSV gp4
48	Полипептид	AAE74533.1 PRRSV gp4
49	Полипептид	CAA01840.1 PRRSV gp4
50	Полипептид	ABH73415.1 PRRSV gp4
51	Полипептид	AAE68462.1 PRRSV gp4
52	Полипептид	AGX46781.1 PRRSV E
53	Полипептид	AED17147.1 PRRSV E
54	Полипептид	AED17148.1 PRRSV E
55	Полипептид	AGX46783.1 PRRSV E
56	Полипептид	AED17156.1 PRRSV E
57	Полипептид	AIS76359.1 PRRSV E
58	Полипептид	ABU49670.1 PRRSV E
59	Полипептид	VR2332 PRRSV gp5
60	Полипептид	CAA01841.1 PRRSV gp5
61	Полипептид	ADA15222.1 PRRSV gp5
62	Полипептид	AFS30909.1 PRRSV gp5a
63	Полипептид	AGK45334.1 PRRSV gp5a
64	Полипептид	AFU75332.1 PRRSV gp5a
65	Полипептид	AGW23843.1 PRRSV gp5a
66	Полипептид	<i>rtg</i> -gp5 из VR2332 PRRSV
67	ДНК/РНК	<i>rtg</i> -gp5 из VR2332 PRRSV
68	Полипептид	<i>rtg</i> -M из VR2332 PRRSV
69	ДНК/РНК	<i>rtg</i> -M из VR2332 PRRSV
70	ДНК/РНК	Gp2 из PRRSV; штамм Lelystad (часть из GenBank M96262.2)
71	Полипептид	Gp2 из PRRSV; штамм из Lelystad
72	ДНК/РНК	Gp3 из PRRSV; штамм Lelystad (часть из GenBank M96262.2)
73	Полипептид	Gp3 из PRRSV; штамм Lelystad
74	ДНК/РНК	Gp4 из PRRSV; штамм Lelystad (часть из GenBank M96262.2)
75	Полипептид	Gp4 из PRRSV; штамм Lelystad
76	ДНК/РНК	Gp4 из PRRSV; штамм Lelystad (часть из GenBank M96262.2)
77	Полипептид	Gp4 из PRRSV; штамм Lelystad
78	ДНК/РНК	M из PRRSV; штамм Lelystad (часть из GenBank M96262.2)
79	Полипептид	M из PRRSV; штамм Lelystad
80	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
81	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
82	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
83	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
84	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
85	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
86	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
87	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
88	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
89	Полипептид	Gp2 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
90	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
91	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
92	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
93	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
94	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
95	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
96	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
97	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
98	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
99	Полипептид	Gp3 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
100	Полипептид	Gp4 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
101	Полипептид	Gp4 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
102	Полипептид	Gp4 из PRRSV, родственный штамму Lelystad
103	Полипептид	Gp4 из PRRSV, родственный штамму Lelystad

104	Полипептид	Gp4 of PRRSV родственный штамму Lelystad
105	Полипептид	Gp4 of PRRSV родственный штамму Lelystad
106	Полипептид	Gp4 of PRRSV родственный штамму Lelystad
107	Полипептид	Gp4 of PRRSV родственный штамму Lelystad
108	Полипептид	Gp4 of PRRSV родственный штамму Lelystad
109	Полипептид	Gp4 of PRRSV родственный штамму Lelystad
110	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
111	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
112	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
113	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
114	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
115	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
116	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
117	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
118	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
119	Полипептид	Gp5 of PRRSV родственный штамму Lelystad
120	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
121	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
122	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
123	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
124	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
125	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
126	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
127	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
128	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
129	Полипептид	M of PRRSV родственный штамму Lelystad
130	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
131	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
132	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
133	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
134	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
135	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
136	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
137	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
138	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad
139	Полипептид	E of PRRSV родственный штамму Lelystad

Фиг. 12

Выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей gp2 из PRRSV

```

34 MKWGLCKAFSTKLANFLWMLSRNFWCPLLISSYFWPFCLASQSQVGGWSSVSDWFAPRYS 60
36 MKWGPYKAFPLTKLANFLWMLSRSSWCPLLIISLYFWPFCLASPSVGGWSSFASDWFAPRYS 60
35 MKWGLCKASLTKLANFLWMLSRNFWCPLLISSYFWPFCLASPSVGGWSSFASDWFAPRYS 60
38 MQWGPCKAFLTRSVNFWMLSRSSWCPLLISSYFWPFCLASPLPAGWSSFASDWFAPRYS 60
37 MQWGHCG---VKSASCSWTPLSLLVWLILPFLSLPYCLGPSQDGYWSSFFSEWFAPRFS 57
39 MQWGHCG---VKSASCSWTPLSLLVWLILPFLSLPYCLGPSQDGYWSSFFSEWFAPRFS 57
***      .:..* * .      * * : * * * *      * * * * : * * * * :
34 VRALPFTLSNRYRSYEAFLSQCQVDIPTWGTKHPGLGMFWHKKVSTLIDEMVSRRMRYIME 120
36 VRALPFTLSNRYRSYEAFLSQCQVDIPTWGTKHPGLGMFWHKKVSTLIDEMVSRRMRYIME 120
35 VRALPFTLSNRYRSYEAFLSQCQVDIPTWGTKHPGLGMFWHKKVSTLIDEMVSRRMRYIME 120
38 VRALPFTLSNRYRSYEAFLSQCQVDIPAWGTRHPGLGMFWHKKVSTLIDEMVSRRMRYIME 120
37 VRALPFTLPNRYRSYEGLLPNCRPDPVQFAVKHPLGMFWHMRVSHLIDEMVSRRIYQIME 117
39 VRALPFTLPNRYRSYEGLLPNCRPDPVQFAVKHPLGMFWHMRVSHLIDEMVSRRIYQIME 117
*****.*****.:*.*: *.*.: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*:
34 KAGQAANKQVVSEATLSRISSLDVVAHFQHLAAIEAETCKYLASRLPMLHNLMTGNSVT 180
36 KAGQAANKQVVSEATLSRISSLDVVAHFQHLAAIEAETCKYLASRLPMLHNLMTGNSVT 180
35 KAGQAANKQVVSEATLSRISSLDVVAHFQHLAAIEAETCKYLASRLPMLHNLMTGNSVT 180
38 KAGQAANKQVVSEATLSRISSLDVVAHFQHLAAIEAETCKYLASRLPMLHNLMTGNSVT 180
37 HSGQAANKQVVSEATLTKLSGLDIVTHFQHLAAVEADSCRFSSRLVMLKNLAVG--NVS 175
39 HSGQAANKQVVSEATLTKLSGLDIVTHFQHLAAVEADSCRFSSRLVMLKNLAVG--NVS 175
.:*****.*****.:*.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*:
34 IVYNSTLEQVVAIFPTPGSRPKLHDFQQWLIIVHSSIFSSVAASCTLFVVLWLRIPMLRT 240
36 IVYNSTLSQVFAIFPTPGSRPKLHDFQQWLIIVHSSIFSSVAASCTLFVVLWLRIPMLRT 240
35 IVYNSTLSQVFAIFPTPGSRPKLHDFQQWLIIVHSSIFSSVAASCTLFVVLWLRIPMLRS 240
38 IVHNTSLDRVELIFPTPGTRPKLTDQWLIIVHSSIFSSVASSVTLFIVLWLRIPALRY 235
39 LQYNTTLDRELIFPTPGTRPKLTDQWLIIVHSSIFSSVASSVTLFIVLWLRIPALRY 235
.:*.*.:*.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*: *.*:
34 VFGFWLGAIFLSNSQ 256
36 VFGFWLGAIFLSNSQ 256
35 VFGFWLGAIFLLNSR 256
38 VFGFWLGAIFPSSW 256
37 VFGFWPTATHHSS-- 249
39 VFGFWPTATHHSS-- 249
****.* * . .
(34:36) балл выравнивания: 92.97
(34:35) балл выравнивания: 93.75
(34:38) балл выравнивания: 61.85
(34:37) балл выравнивания: 88.67
(34:39) балл выравнивания: 61.04
(36:35) балл выравнивания: 92.58
(36:38) балл выравнивания: 61.45
(36:37) балл выравнивания: 90.23
(36:39) балл выравнивания: 60.64
(35:38) балл выравнивания: 59.84
(35:37) балл выравнивания: 91.02
(35:39) балл выравнивания: 59.44
(38:37) балл выравнивания: 61.85
(38:39) балл выравнивания: 98.80
(37:39) балл выравнивания: 61.04

```

Фиг. 13

Выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей gp3 из PRRSV

```

40 MVNSTFLHIFLCCSFYSLCCAVVAGSNNTTYCFWFPLVRGNFSFELTVNYTVCPCLTR 60
45 MANSCTFLYIFLCCSFYSFCCAVVAGSNATYCFWFPLVRGNFSFELTVNYTVCPCLTR 60
41 MANSCTFLYIFLCCSFYSFCCAVVAGSNATYCFWFPLVRGNFSFELTVNYTVCPCLTR 60
42 MANSCTFLHIFLCCSFYSFCCVVTVDANATFCWFPLVRGNFSFELMVNYTVCPCLTR 60
43 MAHQCARFHFFLCGFICYLVHSALASNSSSTLCFWFPLAHGNTSFELTINYTICMPCSTS 60
44 MAHQCARFHFFLCGFICYLVHSALASNSSSTLCFWFPLAHGNTSFELTINYTICMPCSTS 60
  *.:.*: ::::* : * . . . . . : * * * * * : * * * * : * * * *
40 QAAAEAYEPGRSLWCRIGYDRCGEDDDHDELGFVVPGLSSEGLTSTVYAWLAFLSFSYTA 120
45 QAATEAYEPGRSLWCRIGYDRCGEDDDHDELGFVVPGLSSEGLTSTVYAWLAFLSFSYTA 120
41 QAAAEAYEPGRSLWCRIGHDRCGEDDDHDELGFVVPGLSSEGLTSTVYAWLAFLSFSYTA 120
42 QAAAQIYEPNRSWCRIGNDRCGEDDDHDELGFTVPPGLSKEVHLTSTVYAWLAFLSFSYTA 120
43 QAARQRLEPGRNMWCKIGHDRCEERDDELMSIPSGYG-QLKLEGYYAWLAFLSFSYAA 119
44 QAALQRLEPGRNMWCKIGHDRCEERDQDELLMSIPSGYD-NLKLEGYYAWLAFLSFSYAA 119
  *** : **.*: **:* * * * * * : * * * : * * . * * * * * : *
40 QFHPEIFGIGNVSRVYVDIEHQLICAHDGQNTTLPRHDNISAVFQTTYQHVDGGNWFH 180
45 QFHPEIFGIGNVSRVYVDIRHQFICAVHDGQNTTLPRHDNISAVFQTTYQHVDGGNWFH 180
41 QFHPEIFGIGNVSRVYVDIKHQFICAVHDGQNTTLPHHDNISAVLQTTYQHVDGGNWFH 180
42 QFHPEIFGIGNVSRVYVDINHQLICAVHDGQNTTLPRHDNISAVFQTTYQHVDGGNWFH 180
43 QFHPEIFGIGNVSRVYVDKRHQFICAEHDGHNSTVSTGHNISALYAAYYHHQIDGGNWFH 179
44 QFHPEIFGIGNVSRVYVDKWHQFICAEHDGHNSTVSTGHNISALYAAYYHHQIDGGNWFH 179
  *****:*****:*** **:* * * * * * : * * . . ***** : **:*:*****
40 LEWLRPFSSWLVLNVSWFLRRSPANHVSRVLTQLRPTPPQRQALLSSKTSVALGIATR 240
45 LEWLRPFSSWLVLNVSWFLRRSPASHVSRVLTQLRPTPPQRQALLSSKTSVALGIATR 240
41 LEWVRPFSSWLVLNVSWFLRRSPASHVSRVLTQLRPTPPQRQALLSSKTSVALGIATR 240
42 LEWLRPFSSWLVLNVSWFLRRSPASHVSRVLTQLRPTPPQRQALLSSKTSVALGMATR 240
43 LEWLRPFSSWLVLNVSWFLRRSPVSPVSRRIYQILRPTPRPLPVSWSFRTSIVSDLTGS 239
44 LEWLRPFSSWLVLNVSWFLRRSPVSPVSRRIYQILRPTPRPLPVSWSFRTSIVSDLMRS 239
  ***.*:*****:*****. . ** *: * * * * * . * : ** . . :
40 PLRR--FAKS-----LSAVRR 254
45 PLRR--FAKS-----LSVVR 254
41 PLRR--FAKS-----LSAARR 254
42 PLRR--FAKS-----LSAARR 254
43 QQRKKKFPSESRPNVVKPSVLPSTSR 265
44 QQRKKKFPSESRPNVVKPSALPNISR 265
  *: *.. * . *

Последовательности (1:2) Балл выравнивания: 92.91
Последовательности (1:3) Балл выравнивания: 87.40
Последовательности (1:4) Балл выравнивания: 56.30
Последовательности (1:5) Балл выравнивания: 57.09
Последовательности (1:6) Балл выравнивания: 94.88
Последовательности (2:3) Балл выравнивания: 87.80
Последовательности (2:4) Балл выравнивания: 55.91
Последовательности (2:5) Балл выравнивания: 56.69
Последовательности (2:6) Балл выравнивания: 94.49
Последовательности (3:4) Балл выравнивания: 55.12
Последовательности (3:5) Балл выравнивания: 55.12
Последовательности (3:6) Балл выравнивания: 87.40
Последовательности (4:5) Балл выравнивания: 92.83
Последовательности (4:6) Балл выравнивания: 56.69

```

Фиг. 14

Последовательности (5:6) балл выравнивания: 57.09

Выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей gr4 из PRRSV

```

47 MAASLLFLMVGFKCLLVSQAFACKPCFSSSLADIKTNTTAAASFAVLQDISCLR-HRNSA 59
51 MAASLLFLMVGFKCLLVSQAFACKPCFSSSLADIKTNTTAAASFAVLQDISCLR-HRNSA 59
46 MASSLLFLMVGFKCLLVSQAFACKPCFSSSLADIKTNTTAAASFAVLQDIGCLR-HRDSA 59
48 MGASLLFLLVGFKCLLVSQAFACKPCFSSSLSDIKTNTTAAAGFAVLQDISCLR-HRNSA 59
49 MAAAILFFLAGAQHIMVSEAFACKPCFSTHLSDIETNTTAAAGFMVLQDINCFRPHGVSA 60
50 MAAAILFLLAGAQHIMVSEAFACKPCFSTHLSDIKNTNTTAAAGFMVLQDINCFRPHGVSA 60
   *: : *: : *: : :*:*****: *:*:*****: * *****: * * *
   *: : *: : *: : :*:*****: *:*:*****: * *****: * * *

47 SE---AIRKIPQCRTAIGTPMYITITANVTDENYLHSSDLLMLSSCLFYASEMSEKGFV 116
51 SE---AIRKIPQCRTAIGTPVYITTTANVTDENYLHSSDLLMLSSCLFYASEMSEKGFV 116
46 SE---AIRKIPQCRTAIGTPVYITITANVTDENYLHSSDLLMLSSCLFYASEMSEKGFV 116
48 SE---AIRKVPQCRTAIGTPVYITVTANVTDENYLHSSDLLMLSSCLFYASEMSEKGFV 116
49 AQEKISFGKSSQCREAVGTPQYITITANVTDESYLYNADLLMLSACLFYASEMSEKGFV 120
50 TQREIPFRKSSQCREAVGTPQYITITANVTDESYLYNADLLMLSACLFYASEMSEKGFV 120
   : :   : * .*** *:*** ** *****:*.:.*****:*****:*.
   : :   : * .*** *:*** ** *****:*.:.*****:*****:*.

47 VFGNVSGIVAVCVNFTSYVQHVREFTQR-SLMVDHVRLLHFMTPETMRWATVLACLF 175
51 VFGNVSGIVAVCVNFTSYVQHVREFTQR-SLMVDHVRLLHFMTPETMRWATVLACLF 175
46 VFGNVSGIVAVCVNFTSYVQHVREFTQR-SLVVDHVRLLHFMTPETMRWATVLACLF 175
48 VFGNVSGIVAVCVNFTSYVQHVKEFTQR-SLVVDHVRLLHFMTPETMRWATVLACLF 175
49 IFGNVSGVVSACVNFTDYVAHVQTQHTQQHHLVIDHIRLLHFLLTPSAMRWATTIACLF 180
50 IFGNVSGVVSACVNFTDYVAHVQTQHTQQHHLVIDHIRLLHFLLTPSAMRWATTIACLF 180
   :*****:*.:.*****: * * :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :.
   :*****:*.:.*****: * * :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :.

47 LAI 178
51 LAI 178
46 LAI 178
48 LAI 178
49 LAI 183
50 LAI 183
***

```

Последовательности (1:2) балл выравнивания: 96.63
 Последовательности (1:3) балл выравнивания: 93.82
 Последовательности (1:4) балл выравнивания: 67.42
 Последовательности (1:5) балл выравнивания: 69.66
 Последовательности (1:6) балл выравнивания: 97.19
 Последовательности (2:3) балл выравнивания: 93.82
 Последовательности (2:4) балл выравнивания: 66.85
 Последовательности (2:5) балл выравнивания: 69.10
 Последовательности (2:6) балл выравнивания: 98.31
 Последовательности (3:4) балл выравнивания: 67.98
 Последовательности (3:5) балл выравнивания: 70.22
 Последовательности (3:6) балл выравнивания: 94.94
 Последовательности (4:5) балл выравнивания: 94.54
 Последовательности (4:6) балл выравнивания: 66.85
 Последовательности (5:6) балл выравнивания: 69.10

Фиг. 15

Выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей E из PRRSV

```

53 MGSIQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGWLTVVFCIRLVCSAVFRA 60
54 MGSIQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGWLTVVFCIRLVCSAVFRA 60
52 MGSQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGWLTVVFCIRLVCSAILRT 60
55 MGSQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGWLTVVFCIRLVCSAILRRP 60
57 MGSQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTVAGWLLVFCIRLVFSAVLRA 60
56 MG---SLWSKISQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTVAGWLLVFLRVVCSALLRS 57
58 MG---SLWSKISQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTVAGWLLVFLRVVCSAILRS 57
   **   *: :*.*****:*** *****: * *: * *: * *: *
   *: :*.*****:*** *****: * *: * *: * *: *

53 RPAIHPEQLQKIL 73
54 RPAIHPEQLQKIL 73
52 RPAIHPEQLQKIL 73
55 ---AH-EQLQKIL 69
57 RSTVHPEQLQKIL 73
56 RSAIHSPELSKVL 70
58 RSAIHSPELSKIL 70
   * :*.*: *

```

Последовательности (1:2) балл выравнивания: 94.52
 Последовательности (1:3) балл выравнивания: 93.15
 Последовательности (1:4) балл выравнивания: 82.61
 Последовательности (1:5) балл выравнивания: 72.86
 Последовательности (1:6) балл выравнивания: 90.41
 Последовательности (1:7) балл выравнивания: 74.29
 Последовательности (2:3) балл выравнивания: 98.63
 Последовательности (2:4) балл выравнивания: 81.16
 Последовательности (2:5) балл выравнивания: 70.00
 Последовательности (2:6) балл выравнивания: 90.41
 Последовательности (2:7) балл выравнивания: 70.00
 Последовательности (3:4) балл выравнивания: 79.71
 Последовательности (3:5) балл выравнивания: 68.57
 Последовательности (3:6) балл выравнивания: 90.41
 Последовательности (3:7) балл выравнивания: 68.57
 Последовательности (4:5) балл выравнивания: 63.77
 Последовательности (4:6) балл выравнивания: 89.86
 Последовательности (4:7) балл выравнивания: 60.87
 Последовательности (5:6) балл выравнивания: 71.43
 Последовательности (5:7) балл выравнивания: 92.86
 Последовательности (6:7) балл выравнивания: 71.43

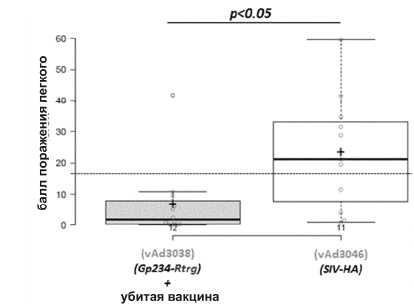
Фиг. 16

Выравнивание ClustalW полипептидных последовательностей gp5a из PRRSV

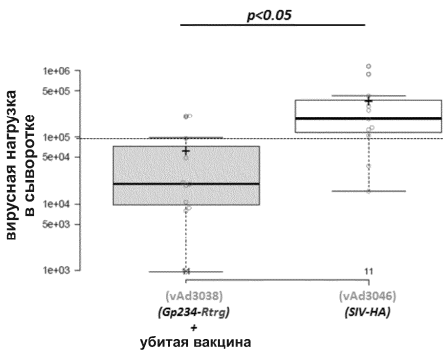
```
63 MFKYVGELLDRGLLLAIAFFVVYRAVLFYCARQRQRKQQLLPVDLQLDAM 51
64 MFKYVGEMLDRLGLLLAIAFFVVYRAVLFHCARRRQRQQQLSSAIDLQLDAM 51
62 MFKYVGEVLDRLVLLAIAFFVVYRAVLSCCARQRQQQQLSYSVDL----- 46
65 MFKYVGEMLDRLGLLTIAFFVVYRAVLVCCARQSRKRQQLPLTVDI----- 46
*****.*.*** **:*:*****.***: :*:*** :.*:
```

Последовательности (1:2) балл выравнивания: 80.43
Последовательности (1:3) балл выравнивания: 80.43
Последовательности (1:4) балл выравнивания: 73.91
Последовательности (2:3) балл выравнивания: 84.31
Последовательности (2:4) балл выравнивания: 76.09
Последовательности (3:4) балл выравнивания: 71.74

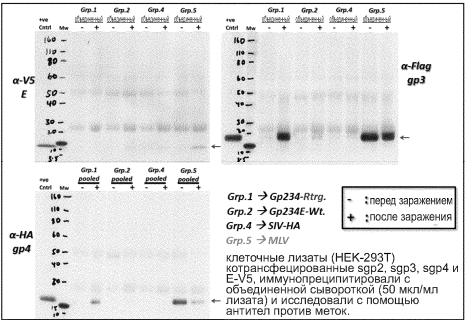
Фиг. 17



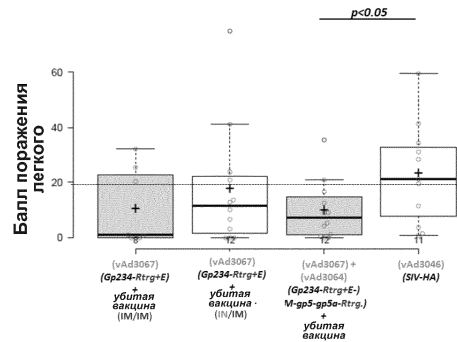
Фиг. 18



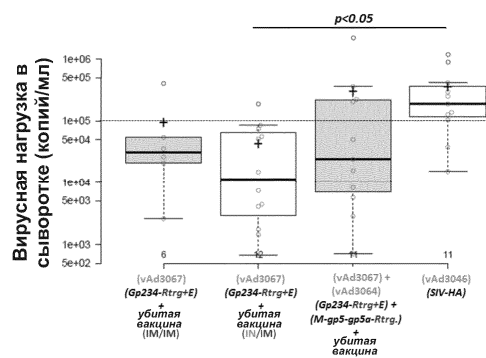
Фиг. 19



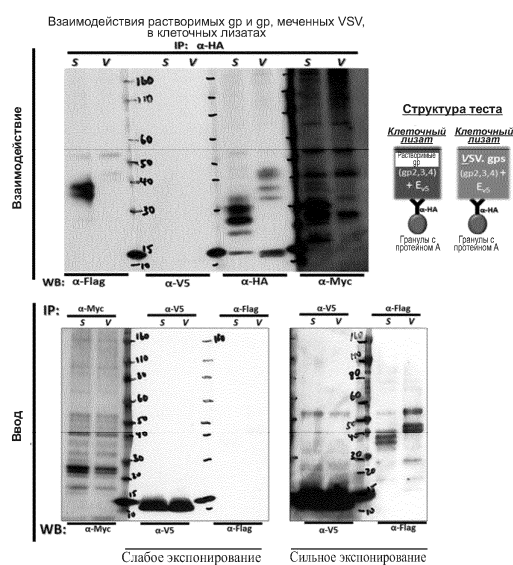
Фиг. 20



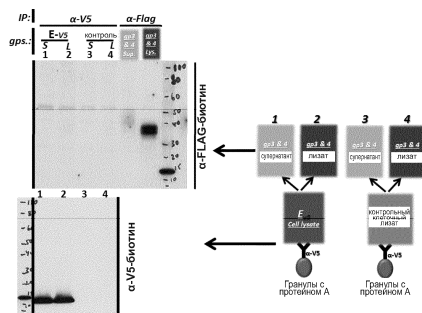
Фиг. 21



ФИГ. 22



ФИГ. 23



Фиг. 24