

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044953**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.17

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201990718

(22) Дата подачи заявки
2017.09.18

(54) **ВЕКТОРЫ АДЕНОВИРУСА СОБАЧЬИХ**

(31) **62/397,139**

(56) US-B1-6193983

(32) **2016.09.20**

EP-A1-0979101

(33) **US**

EP-A1-1118670

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/US2017/051964**

(87) **WO 2018/057441 2018.03.29**

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

(72) Изобретатель:
**Галлай Андреас (DE), Коукунтла
Рамеш, Мэнделл Роберт Бэрри (US),
Мундт Элис, Ремет Кристина (DE),
Вон Эрик Мартин (US)**

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

(57) Изобретение относится к области векторных вакцин CAdV, в частности промоторов, пригодных для экспрессии антигенов-мишеней из таких векторных вакцин. Раскрываются и заявляются рекомбинантные аденовирусы собачьих, способы их получения, их применения (включая применение в иммунологических, иммуногенных, вакцинных или терапевтических композициях, или применение в качестве вектора для клонирования, репликации или экспрессии ДНК и способов применения композиций и векторов), продукты экспрессии из них и применение для продуктов экспрессии. Кроме того, раскрываются и заявляются усеченные промоторы EHV4, экспрессионные кассеты, содержащие промоторы, и рекомбинантные вирусы и плазмиды, содержащие промоторы или экспрессионные кассеты.

044953
B1

044953
B1

Перечень последовательностей

Изобретение содержит перечень последовательностей согласно Своду федеральных правил 37 C.F.R. 1.821-1.825. Перечень последовательностей, прилагаемый к настоящему изобретению, таким образом, включается путем ссылки в его полном объеме.

Уровень техники

А. Область изобретения

Настоящее изобретение касается области вакцин (векторных), в частности, рекомбинантного аденовируса собачьих 2-го типа, в частности, с улучшенными экспрессионными кассетами, пригодными для экспрессии антигенов-мишеней из таких векторных вакцин.

В. Описание существующего уровня техники

Аденовирусы широко исследовались как векторы для рекомбинантных вакцин (см. обзор Вт, Т., S. Salinas, and E.J. Kremer, An update on canine adenovirus type 2 and its vectors. *Viruses*, 2010. 2(9): p. 2134-53). Существует немало информации, накопленной об аденовирусах за последние пару десятилетий, в частности, в области генной терапии и разработки вакцин. Несколько особенностей аденовирусов делают их привлекательными в качестве средств переноса генов: (1) структура аденовирусного генома хорошо охарактеризована; (2) большие части вирусных ДНК могут быть замещены инородными последовательностями; (3) рекомбинантные варианты являются относительно стойкими, (4) рекомбинантный вирус может выращиваться с высоким титром; (5) с аденовирусом не связана злокачественность у человека; и (6) применение аттенуированного аденовируса дикого типа в качестве вакцины безопасно.

Известными из публикаций мишенями для эффективных вакцин на основе векторов CAV-2 являются бешенство кошек (Hu, R.L., et al., Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody response against rabies. *Vaccine*, 2007. 25(29): p. 5301 - 7), собак (Hu, R., et al., Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies virus glycoprotein. *Microbes Infect*, 2006. 8(4): p. 1090-7), мышей (Li, J., et al., A single immunization with a recombinant canine adenovirus expressing the rabies virus G protein confers protective immunity against rabies in mice. *Virology*. *Virology*, 2006. 356(1-2): p. 147-54), енотов (Henderson, H., et al., Oral immunization of raccoons and skunks with a canine adenovirus recombinant rabies vaccine. *Vaccine*, 2009. 27(51): p. 7194-7), овец (Bouet-Cararo, C., et al., Canine adenoviruses elicit both humoral and cell-mediated immune responses against rabies following immunization of sheep. *Vaccine*, 2011. 29(6): p. 1304 - 10), скунсов (Henderson, H., et al., Oral immunization of raccoons and skunks with a canine adenovirus recombinant rabies vaccine. *Vaccine*, 2009. 27(51): p. 7194 - 7) и свиней (Liu, Y., et al., Efficacy and safety of a live canine adenovirus-vectored rabies virus vaccine in swine. *Vaccine*, 2008. 26(42): p. 5368-72), собачья чума (Fischer, L., et al., Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge. *Vaccine*, 2002. 20(29-30): p. 3485-97) и панлейкопении кошачьих (Yang, S., et al., Complete protection of cats against feline panleukopenia virus challenge by a recombinant canine adenovirus type 2 expressing VP2 from FPV. *Vaccine*, 2008. 26(11): p. 1482-7). CAV-2 также имеет потенциал для применения в качестве пероральной вакцины, на что указывает эффективность при пероральной вакцинации собак (Zhang, S., et al., Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 345-50), енотов и скунсов от бешенства (Henderson, H., et al., 2009, Zhao et al. 2014. Experimental Oral Immunization of Ferret Badgers (*Melogale moschata*) with a Recombinant Canine Adenovirus Vaccine CAV-2-E3A-RGP and an Attenuated Rabies Virus SRV9. *J. Wildlife Diseases* 50(2): 374-377.). Интересно, что векторы на основе репликационно-компетентного аденовируса продемонстрировали свою эффективность, несмотря на пассивный иммунитет против вектора (Gallichan, W.S., et al., Mucosal immunization with a recombinant adenovirus vector induces local and systemic immunity and protection from herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol*, 1995. 371B: p. 1581-5; Lubeck, M.D., et al., Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration. *AIDS Res Hum Retroviruses*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994. 10(11): p. 1443 - 9; Wang, Y., et al., The use of an E1-deleted, replication-defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein for early vaccination of mice against rabies virus. *J Virol*, 1997. 71(5): p. 3677-8), указывая на то, что они могут преодолевать иммунитет, передающийся с материнской стороны (Papp, Z., L.A. Babiuk, and M.E. Baca-Estrada, The effect of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1. *Vaccine*, 1999. 17 (7-8): p. 933-43; Babiuk, L.A. and S.K. Tikoo, Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. *J Biotechnol*, 2000. 83 (1-2): p. 105-13). Это было подтверждено на примере собачьей чумы в публикации Fischer et al. (2002). Однако уже существующие антитела могут препятствовать применению перорального пути иммунизации (Wright, N., et al., High prevalence of antibodies against canine adenovirus (CAV) type 2 in domestic dog populations in South Africa precludes the use of CAV-based recombinant rabies vaccines. *Vaccine*, 2013. 31(38): p. 4177-82).

Аденовирус собачьих 2-го типа (CAV-2) обычно вызывает инфекцию дыхательных путей, от незаметной до умеренной, и считается одной из причин обычного распространенного инфекционного трахеобронхита (Buonavoglia, C. and V. Martella, Canine respiratory viruses. *Vet Res*, 2007. 38(2): p. 355-73;

Tham, K.M., G.W. Horner, and R. Hunter, Isolation and identification of canine adenovirus type-2 from the upper respiratory tract of a dog. *N Z Vet J*, 1998. 46(3): p. 102-5). CAV-2 также был связан со случаями энтерита (Hamelin, C, p. Jouvenne, and R. Assaf, Association of a type-2 canine adenovirus with an outbreak of diarrheal disease among a large dog congregation. *J Diarrhoeal Dis Res*, 1985. 3(2): p. 84-7; Macartney, L., H.M. Cavanagh, and N. Spibey, Isolation of canine adenovirus-2 from the feces of dogs with enteric disease and its unambiguous typing by restriction endonuclease mapping. *Res Vet Sci*, 1988. 44(1): p. 9-14) и был выявлен в головном мозге собак с неврологическими признаками (Benetka, V., et al., Canine adenovirus type 2 infection in four puppies with neurological signs. *Vet Rec*, 2006. 158(3): p. 91-4.). Несколько вакцин на основе CAV2 были разработаны и широко применялись во всем мире для вакцинации щенков и взрослых собак. Модифицированные живые вакцины CAV-2 оказались высокоэффективными в уменьшении циркуляции CAV-2 в популяции собак (Buonavoglia et al., 2007). У собак, вакцинированных CAV-2, вырабатывается иммунитет как к CAV-1, так и к CAV-2 (Appel, M., et al., Pathogenicity of low-virulence strains of two canine adenovirus types. *Am J Vet Res*, 1973. 34(4): p. 543-50; Appel, M., L.E. Carmichael, and D.S. Robson, Canine adenovirus type 2-induced immunity to two canine adenoviruses in pups with maternal antibody. *Am J Vet Res*, 1975. 36(08): p. 1199 - 202). Применение CAV-2 для иммунизации щенков против обоих типов аденовируса собачьих устраняло связанные с безопасностью побочные эффекты, которые случались при применении вакцин CAV-1 (Bittle, J.L., W.A. Grant, and F.W. Scott, Canine and feline immunization guidelines--1982. *J Am Vet Med Assoc*, 1982. 181(4): p. 332 - 5; Curtis, R. and K.C. Barnett, The 'blue eye' phenomenon. *Vet Rec*, 1983. 112(15): p. 347 - 53). Видимая безопасность CAV2 как вакцины была подтверждена отсутствием вызванных вакциной и связанных с вакциной осложнений у собак и других видов животных, включая человека, на протяжении 30 лет применения. Кроме того, результаты полевых серологических исследований показывают, что многие дикие животные (лисицы, еноты, скунсы и мангусты) бессимптомно подвергаются действию CAV2 или связанной с антигеном вирусной инфекции (Summer et al., 1988). Таким образом, вакцинный штамм аденовируса собачьих 2-го серотипа (CAV2) представляет уникальный пример безопасного способного к репликации, ограниченного хозяином вируса, который рассматривался с точки зрения получения эффективной вакцины-кандидата на основе вектора для вакцинации, в частности, собак.

Таким образом, аденовирус собачьих имеет много идеальных характеристик для разработки векторных вирусных вакцин. Кроме его безопасного и эффективного применения, как подробно описано выше, он обеспечивает важные особенности, включая: гуморальную и клеточную иммунные реакции на вакцину, которые могут требовать вирусные патогены-мишени для защиты; он имеет широкий диапазон потенциальных хозяев и тропизм к ткани; он лишен оболочки и, таким образом, может быть более стойким, чем вирусы в оболочке; он может возрастать до высоких титров, и существуют хорошо отработанные имеющиеся протоколы производства и анализа; он может применяться и как репликационно-компетентный, и как дефицитный вирус; и он может нести относительно большое количество гетерологических ДНК, в частности, в случае если CAdV является "выпотрошенным", может быть вставлено ~ 30 т. о. экзогенной ДНК, однако вирус должен быть спасен в присутствии желперного вируса.

Fisher et al. в Патенте США № 6,090,393 (включенном в это описание путем ссылки) описывали применение рекомбинантного CAd2, который имеет экзогенную ДНК, вставленную в несущественные участки или части в E1, E3 и/или правый конец генома между правым ITR и транскрипционной единицей E4. Участок E3 использовали для генерации рекомбинантного вектора, поскольку часть этого участка была распознана как не являющаяся незаменимой, как *in vitro*, так и *in vivo*, для образования инфекционного вируса (например, на основе данных, полученных от HAV и Ad3 крупного рогатого скота), а следовательно, определяли как объект для инсерции. Векторы аденовируса, в которых удален участок E1, не способны к репликации и имеют другие проблемы, а следовательно, являются нежелательными для применения.

Fisher et al. также раскрыли применение усеченных промоторов, полученных от мышинового цитомегаловируса или человеческого цитомегаловируса MCMV или HCMV, например, HCMV-IE или MCMV-IE. Промотор hCMV-IE был выбран Fisher et al. как относящийся к существующему уровню техники, и как перспективный выше расположенный регуляторный участок, из чего был сделан вывод, что он связан с самым высоким уровнем и самой длительной стойкостью экспрессии рекомбинантного белка в культуре тканей. Промотор hCMV-IE также считали четким преимуществом, поскольку было выявлено, что он функционирует почти в каждой испытываемой линии клеток. Стимулом к нацеленным делециям частей промотора, такого, как HCMV-IE, было уменьшение размера промотора, а следовательно, преодоление ограничений упаковки аденовирусов. Fisher et al. конкретно раскрывают активный фрагмент HCMV-IE, имеющий размер 91 п. о., или активный фрагмент MCMV-IE, имеющий размер 466 п. о., т.е. усеченный транскрипционно активный HCMV-IE с приблизительно 91 п. о. или усеченный транскрипционно активный MCMV-IE с приблизительно 466 п. о.

Хотя Fisher et al. описывают построение разных рекомбинантных векторов CAd2, например, экспрессионной кассеты, кодирующей полинуклеотид для гемоглобулина (HA) CDV или слитый (F) белок, функционально связанный с промотором вируса вакцины H6 (v6), Fisher et al. не продемонстрировали стойкой экспрессии антигена CDV из любого из построенных векторов CAd2. Вместо этого в патенте

Fisher '393 раскрываются общие ограничения размера нуклеотидов в местах инсерции E3 как сменные для стойкой экспрессии, и при этом не наблюдается и/или не рассматривается разнообразие возможностей в выборе промоторов как фактор, способствующий вирусному спасению или экспрессии гетерологических белков в инфицированных клетках. В дополнительном исследовании Fisher et al. 2002 ("Вакцинация щенков, рожденных устойчивыми к заболеванию самками, вакциной на основе аденовируса собачьих защищает от инфицирования вирусом собачьей чумы" *Vaccine* 20 (2002) 3485 - 3497), они сообщали о том, что впервые были построены и охарактеризованы два рекомбинантных вируса CAd2, в которых экспрессионные кассеты CDV HA и F были вставлены в участок E3 вектора, стимулированного фрагментом с 91 п. о. промотора hCMV IE. Они также заменили hCMV IE 5'UTR на hAd2 TPL для содействия экспрессии трансгенного гена после начала репликации CAV2. Вместе стратегия клонирования была сосредоточена на минимизации размера экспрессионных кассет для кДНК CDV HA и F. Кроме того, в исследовании были детально рассмотрены вопросы потенциального вирусного восстановления из-за специфического места инсерции, размера делеции, размера инсерции и ориентации инсерции. В этом исследовании они смогли восстановить стойкие клоны, демонстрирующие правильную инсерцию, и смогли осуществить анализ на вызывание иммунитета после иммунизации. После единственного интраназального введения смеси rCAd2, кодирующей целый CDV HA и vCA17, серонегативным щенкам, наблюдали очень высокие системные титры CDV SN ($>2,0 \log_{10}$) и почти полную защиту от инфицирования. Однако, поскольку щенки инфицировались смесью двух векторов, которые содержали антигены HA и F, авторы не смогли прийти к выводу, только один или оба вектора экспрессируют трансгены CDV у иммунизированных собак, а также не смогли убедительно продемонстрировать стойкую экспрессию трансгена в отдельных популяциях клеток.

Описанные авторами эксперименты демонстрируют, что стойкая экспрессия трансгена из кассет, вставленных в геномный локус E3, не наблюдалась в клетках, инфицированных способными к репликации стимулированными CMV5 rCAdV-2 кассетами экспрессии трансгена, согласно измерениям путем выявления белков (IFA, проточная цитометрия, дот-блот анализ). Фактически приведенные авторами эксперименты демонстрируют, что векторы rCAdV-2 с экспрессионными кассетами с CMV5 промотором не могут быть спасены, поэтому экспрессия белка не может быть измерена в инфицированных клетках. И это несмотря на то, что *in vitro* временные инфекции теми же трансферными плазмидами, которые содержат эти экспрессионные кассеты, продемонстрировали, что активность CMV5 промотора больше, чем активность CMVie промотора относительно уровня экспрессии белка. Таким образом, отсутствие стойкой, воспроизводимой экспрессии трансгена и/или вирусное спасение делает полезность стимулированных CMV экспрессионных кассет в векторе CAd2, в частности, в хозяевах, в которых репликация не происходит, очень сомнительной.

Итак, хотя чрезвычайно мощные и нетканеспецифичные IE промоторы-энхансеры HCMV и MCMV (цитомегаловирус мышей) могут быть пригодными для разных исследований и для ограниченной пригодности в видах-мишенях, в которых реплицируется CAd2, они не рассматривались как эффективные и/или надежные промоторы для построения векторных вакцин CAd2 для применения в других видах. Необходима была замена промоторов CMV на эффективные промоторы, которые способны стимулировать стойкую, надежную, воспроизводимую экспрессию нужных антигенных эпитопов в контексте рекомбинантного вируса CAd2 для производства вакцин для применения в разных видах.

Краткое описание изобретения

С целью избежания любых подобных препятствий настоящее изобретение обеспечивает новые регуляторные нуклеиновокислотные последовательности/промоторные последовательности для экспрессии трансгена, в частности, в контексте векторных вакцин, в частности, в контексте вектора CAdV-2.

Таким образом, решение вышеописанной технической проблемы достигается благодаря описанию и вариантам осуществления, охарактеризованным в формуле изобретения, и изобретение в его разных аспектах осуществляется согласно формуле изобретения.

Настоящее изобретение обеспечивает новые регуляторные нуклеиновокислотные последовательности/промоторные последовательности для экспрессии трансгена, иммуногенные композиции, вакцины и связанные с ними способы, позволяющие преодолевать недостатки существующего уровня техники.

Традиционные промоторные последовательности, широко применяющиеся для стимуляции высокого уровня экспрессии трансгена в разных векторных системах, включая герпесвирусы, являются промоторными последовательностями предранних генов HCMV (Boshart et al., 1985; Foecking and Hofstetter 1986) или цитомегаловирус мышей (MCMV; Dorsch-Häsler et al., 1985), или сильных промоторов онкогенных вирусов, таких, как обезьяний вирус 40 (SV40), например, промотор большого Т-Антигена SV40, и многие другие (например, Kim et al., 1990). Таким сильным промоторам специалистами в области клеток отдавалось предпочтение, поскольку они функционируют автономно в разных системах культур клеток. В контексте вирусной репликации инфицированная клетка трансформируется вирусными функциями в механизм репликации вирусов.

Однако для улучшения векторных вакцин ни один из описанных выше автономных сильных промоторов не рассматривается как подходящий выбор; в частности, производные от CMV промоторы не были эффективными, воспроизводимыми стимуляторами экспрессии трансгена у рекомбинантных векторных

вакцин СAd2.

Таким образом, существует потребность в обеспечении промоторов с высокой активностью в контексте вирусной репликации, таких, как промоторы β - и γ -генов, ЕHV-1. Настоящее изобретение обеспечивает новые альтернативные промоторные последовательности, производные от известной из публикации геномной последовательности ЕHV-4 (лошадиный герпесвирус 4, штамм NS80567, полный геном, номер доступа AF030027, версия AF030027.1 GL2605950, дата 21 мая 1998 г.). Идентичность последовательностей генов с генами ЕHV-1 составляет от 55 до 84%.

Настоящее изобретение обеспечивает два новых промотора: 4pg600 и 4pMCP600 и их производные меньшей длины, которые продемонстрировали свою функциональность после временной инфекции в культурах клеток или на фоне репликации rCAдV-ВАС в культурах клеток.

Настоящее изобретение обеспечивает два новых промотора: р430 и р455, которые продемонстрировали свою функциональность на фоне репликации rCAд2 в культурах клеток, а для р455 - также в организме животных (свиней). Уровень активности двух новых промоторов во время цикла вирусной репликации оказывается очень похожим, как можно сделать вывод из *in vitro* кинетических экспериментов промоторов.

Новые промоторные последовательности, которые обеспечиваются настоящим изобретением, демонстрируют свою эффективность на фоне вектора аденовируса собачьих (СAdV).

Как обсуждалось выше, спасение рекомбинантного СAdV не достигалось, когда промоторная последовательность CMV5 присутствовала в экспрессионных кассетах, расположенных в участке E3. В этом проявляется специфичность к последовательности, поскольку размер экспрессионных кассет не превышает наблюдаемых ограничений размера экспериментального генома. В отличие от этого, новые производные от ЕHV-4 промоторные последовательности согласно настоящему изобретению, такие как р430 и р455, не только способствуют экспрессии трансгена, но и не вмешиваются в ключевой этап вирусного спасения и, таким образом, имеют преимущества перед промоторными последовательностями существующего уровня техники.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение решает проблемы, характерные для существующего уровня техники, и обеспечивает явный прогресс в существующем уровне техники.

В целом настоящее изобретение обеспечивает вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAдV), включающий экспрессионную кассету, кодирующую по крайней мере одну гетерологическую ДНК, функционально связанную с промотором герпесвируса-4 (ЕHV4) непарнокопытных.

Настоящее изобретение также касается вектора rCAдV, в котором промотор герпесвируса-4 (ЕHV4) непарнокопытных включает 4pg600 (SEQ ID NO.: 29) или 4pMCP600 (SEQ ID NO.: 30) либо их комплементарные нуклеотидные последовательности, или их функциональный фрагмент, или функциональную производную, или комплементарные нуклеотидные последовательности, причем вышеупомянутая промоторная последовательность ведет к экспрессии гетерологического антигена.

В конкретном аспекте функциональный фрагмент или производная промоторной последовательности имеет по крайней мере 80, 85% идентичности последовательностей, в предпочтительном варианте - 90, 91, 92, 93, 94% идентичности последовательностей, в более предпочтительном варианте - 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% идентичности последовательностей.

В конкретном аспекте функциональный фрагмент является усечением 4pg600 (SEQ ID NO.: 29) или его комплементарной нуклеотидной последовательностью, в предпочтительном варианте идентичность последовательностей составляет по крайней мере 72% по всей длине.

В конкретном аспекте функциональный фрагмент является усечением 4pMCP600 (SEQ ID NO.: 30) или его комплементарной нуклеотидной последовательностью, в предпочтительном варианте идентичность последовательностей составляет по крайней мере 78% по всей длине (или больше).

В еще одном конкретном аспекте последовательность функционального фрагмента или производной промоторов 4pg600 (SEQ ID NO.: 29) или 4pMCP600 (SEQ ID NO.: 30) имеет длину 550 нуклеотидов, в предпочтительном варианте 500, 490, 480, 470, 460, 455, 450, 445, 440, 435, 434, 433, 432, 431, 430 нуклеотидов, в наиболее предпочтительном варианте - 455 или 430 нуклеотидов.

В еще одном конкретном аспекте вектор rCAдV включает промотор герпесвируса-4 (ЕHV4) непарнокопытных, включающий 4pg600 (SEQ ID NO.: 29).

В еще одном конкретном аспекте вектор rCAдV включает промотор герпесвируса-4 (ЕHV4) непарнокопытных, включающий 4pMCP600 (SEQ ID NO.: 30).

В еще одном конкретном аспекте вектор rCAдV включает промотор герпесвируса-4 (ЕHV4) непарнокопытных, включающий 4p430 (SEQ ID NO.: 31).

В еще одном конкретном аспекте вектор rCAдV включает промотор герпесвируса-4 (ЕHV4) непарнокопытных, включающий gMCP455 (SEQ ID NO.: 32).

В конкретном аспекте изобретения вектор rCAдV упакован как инфекционный СAdV.

В другом варианте осуществления изобретения вектор rCAдV включает гетерологическую ДНК, кодирующую полипептид, выбранный из группы, к которой относятся нужный эпитоп, модулятор биологического ответа, фактор роста, последовательность распознавания, терапевтический ген и слитый

белок.

В конкретном аспекте изобретения гетерологическая ДНК кодирует нужный антигенный эпитоп.

В другом варианте осуществления изобретения нужный антигенный эпитоп является антигеном патогена собачьих или кошачьих.

В конкретном аспекте изобретения нужный антигенный эпитоп является антигеном, производным от патогена предназначенного для получения пищевых продуктов сельскохозяйственного животного, конкретнее - патоген предназначенного для получения пищевых продуктов сельскохозяйственного животного взят из организма свиньи, крупного рогатого скота, лошади, домашней птицы и/или овцы; конкретнее, патоген предназначенного для получения пищевых продуктов сельскохозяйственного животного выбран из группы, к которой относятся: вирус диареи крупного рогатого скота (BVDV), вирус парагриппа-3 (PI-3), вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (IBR), респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (BRSV), герпесвирус крупного рогатого скота (BHV), ротавирус крупного рогатого скота (BRV), энтеровирус крупного рогатого скота (BEV), коронавирусы крупного рогатого скота (BCV), бешенство крупного рогатого скота (BR), парвовирус крупного рогатого скота (BP), аденовирус, астровирус, Mannheimia haemolytica (старое название Pasteurella haemolytica), Pasteurella multocida, Haemophilus somnus (Histophilus ovis и Haemophilus agni), актиномицет (Corynebacterium), пиогенный актиномицет, Chlamydia psittaci, Campylobacter fetus venerealis и Campylobacter fetus fetus (старое название C fetus intestinalis), Leptospira interrogans, Leptospira hardjo, Leptospira Pomona и Leptospira grippotyphosa, Leptospira canicola, Leptospira grippotyphosa, Leptospira hardjo (Leptospira hardjoprajitno и Leptospira hardjo-bovis), Brucella abortus, Brucella suis и Brucella melitensis, Listeria monocytogenes, Chlamydia psittaci, Clostridium chauvoei, Clostridium septicum, Clostridium haemolyticum, Clostridium novyi, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Moraxella bovis, виды Klebsiella, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium; Salmonella newport, Mycobacterium avium paratuberculosis, Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium hominis, Staphylococcus aureus, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, виды Mycoplasma, Mycoplasma dispar и виды Ureaplasma, Tritrichomonas foetus, Trichophyton verrucosum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton sarkisovii, Neospora caninum (старое название Toxoplasma gondii), Babesia bigemina и Babesia bovis, Dictyocaulus viviparus (легочная нематода) и их комбинации.

В конкретном аспекте изобретения нужный антигенный эпитоп является антигеном, производным от патогена предназначенного для получения пищевых продуктов сельскохозяйственного животного, конкретнее - патоген предназначенного для получения пищевых продуктов сельскохозяйственного животного взят из организма свиньи, крупного рогатого скота, лошади, домашней птицы и/или овец; еще конкретнее - патоген предназначенного для получения пищевых продуктов сельскохозяйственного животного выбран из группы, к которой относятся: виды Salmonella, в частности, S. typhimurium S. choleraesuis; астровирусы; ротавирус; вирус трансмиссивного гастроэнтерита; виды Brachyspira, в частности, B. hyodysenteriae, B. pilosicoli; виды Clostridium spp., в частности, C. difficile, C. perfringens типов А, В и С, C. novyi, C. septicum, C. tetani; кишечные пиконавирусы свиней; кишечные калицивирусы свиней; респираторные патогены, к которым относятся: Actinobacillus pleuropneumonia; Bordetella bronchiseptica; Erysipelothrix rhusiopathiae; Haemophilus parasuis, в частности, подтипов 1, 7 и 14; Pasteurella spp., в частности, p. multocida; виды Mycoplasma spp., в частности, M. hyopneumoniae, M. hyorhinis; вирус свиного гриппа А; вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRS); цирковир свиней; парвовирус свиней; вирус псевдобешенства; Eperythrozoonosis suis, виды Mycobacterium., в частности, M. avium, M. intracellulare, M. bovis; респираторный коронавирус свиней; коронавирус свиней, в частности, вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV), вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) и дельта-коронавирус; Arcanobacterium pyogenes; аденовирус свиней; классическая чума свиней; цитомегаловирус свиней; африканская чума свиней; или другие патогены, к которым относятся Escherichia coli, виды Streptococcus, в частности, S. suis, S. porcicus, S. dysgalactiae, в предпочтительном варианте подвид equisimilis; Brucella suis, в частности, биовары 1, 2 и 3; виды Leptospira, в частности, L. australis, L. canicola, L. grippotyphosa, L. pomona, L. icterohaemorrhagicae, L. interrogans, L. tarassovi, L. hardjo, L. sejeoe; вирус энцефаломиокардита; вирус гематглютинирующего энцефаломиелита; вирус японского энцефалита; вирус лихорадки Западного Нила; реовирус; рубулавир; вирус Менангле; вирус Нипах; вирус везикулярного стоматита; вирус везикулярной экзантемы свиней; поксвирус свиней; вирус герпеса свиней; и Staphylococcus hyicus, и их комбинации.

В еще одном варианте осуществления изобретения нужный антигенный эпитоп выбран из группы, к которой относятся антиген Morbillivirus, гликопротеин бешенства, белок оболочки вируса лейкоза кошачьих (FeLV), антиген вируса иммунодефицита, антиген парвовируса, антиген поксвируса.

Настоящее изобретение также касается иммуногенной или вакцинной композиции, включающей вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAV) согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления и приемлемый с фармацевтической или ветеринарной точки зрения носитель или разбавитель.

В другом аспекте иммуногенные или вакцинные композиции, включающие вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAV) согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, при-

годны для перорального, чрескожного, внутримышечного или интраназального применения.

Настоящее изобретение также касается способа изготовления иммуногенной композиции или вакцины, включающей вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAdV) согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, для снижения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с инфекцией или вызванных ею, который включает такие этапы: (а) введение в клетку-хозяина вектора рекомбинантного rCAdV, который включает вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAdV) согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления; (б) культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях; (в) сбор инфицированных клеток и/или компонентов вектора и/или вируса; (г) необязательный сбор собранных клеток из этапа (в); и (д) смешивание вышеупомянутых собранных клеток с фармацевтически приемлемым носителем.

Настоящее изобретение также касается способа уменьшения или избежания клинических признаков или болезни, вызванной инфицированием животных патогеном, или применения согласно способу лечения или профилактики инфицирования животных патогеном, который включает этап введения животным терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции вакцины, включающей вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAdV) согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления.

В конкретном аспекте согласно любому из способов вышеупомянутых вариантов осуществления иммуногенную композицию вводят однократно.

В конкретном аспекте согласно любому из способов вышеупомянутых вариантов осуществления иммуногенную композицию вводят двумя дозами.

В конкретном аспекте согласно любому из способов вышеупомянутых вариантов осуществления иммуногенную композицию вводят перорально, чрескожно, внутримышечно или интраназально.

В конкретном аспекте согласно любому из способов вышеупомянутых вариантов осуществления иммуногенная композиция защищает от гомологической и/или гетерологической вирусной провокации.

Настоящее изобретение также касается способа иммунизации животных против клинической болезни, вызванной патогеном у вышеупомянутого животного, который включает этап введения животным иммуногенной композиции, включающей вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAdV) согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, из-за чего иммуногенная композиция или вакцина не может вызвать клинические признаки инфекции, но способна вызвать иммунную реакцию, которая иммунизирует животных от патогенных форм вышеупомянутого патогена.

В конкретном аспекте изобретения согласно вышеупомянутому способу иммуногенную композицию вводят однократно или, в альтернативном варианте, двумя дозами.

В конкретном аспекте изобретения согласно вышеупомянутому способу иммуногенную композицию вводят перорально, чрескожно, внутримышечно или интраназально.

В конкретном аспекте изобретения согласно вышеупомянутому способу иммуногенная композиция защищает от гомологической и/или гетерологической вирусной провокации.

Настоящее изобретение также касается комплекта для вакцинации животных от болезни, связанной с одним или несколькими клиническими признаками, и/или уменьшением частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с патогеном или вызванных патогеном, у животного, включающий: (а) дозатор, способный вводить животным вакцину, включающую вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAdV) согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления; и (б) иммуногенную композицию или вакцину, включающую вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAdV) согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, и (в) необязательно лист-вкладыш с инструкцией.

Настоящее изобретение также касается линии эукариотных клеток-хозяев, которые экспрессируют рекомбинантный аденовирус собачьих 2-го типа (rCAd2) согласно вышеупомянутым вариантам осуществления.

В другом конкретном аспекте линия клеток-хозяев является линией клеток млекопитающих или линией клеток насекомых, выбранной из группы, к которой относятся линия клеток K/WRL, линия клеток RK13, линия клеток MDBK, линия клеток ST, линия клеток AI-ST, линия клеток VERO, линия клеток Sf9, линия клеток Sf21, Sf plus, линия клеток MDCK и/или их производные.

В еще одном конкретном аспекте линия клеток-хозяев является линией прокариотных клеток-хозяев, экспрессирующих рекомбинантный аденовирус собачьих 2-го типа (rCAd2) согласно вышеупомянутым вариантам осуществления.

Определения.

Если нет иного, определения, употребленные авторами технические и научные термины имеют значения в общепринятом на время подачи заявки понимании среди специалистов в области, к которой относится изобретение. Значение и объем терминов должны быть четкими; однако в случае любой скрытой неоднозначности предусмотренные авторами определения имеют преимущество над любыми словарными или общими определениями. Кроме того, если контекст не требует иного, термины в единственном числе также охватывают форму множественного числа, а термины во множественном числе охватывают форму единственного числа. В контексте данного описания употребление "или" означает "и/или", если

не указано иное. Кроме того, употребление термина "включая", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не является ограничивающим. Все упомянутые авторами патенты и публикации включены в настоящее описание путем ссылки.

В практике настоящего изобретения задействованы, если не указано иное, традиционные технологии вирусологии, молекулярной биологии, микробиологии, технология рекомбинантных ДНК, белковая химия и иммунология, которые относятся к сфере компетенции специалистов. Такие технологии полностью объясняются в литературе. См., например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II and III, Second Edition (1989);

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

Перед ознакомлением с детальным описанием настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными ДНК, полипептидными последовательностями или параметрами процесса, поскольку они, конечно, могут быть разными. Также следует понимать, что употребленная авторами терминология имеет целью только описание конкретных вариантов осуществления изобретения и не является ограничивающей. Следует отметить, что употребленные в данном описании и сопроводительной формуле изобретения формы единственного числа также охватывают форму множественного числа, если контекст четко не требует иного. Таким образом, например, ссылка на "антиген" включает смесь двух или большего количества антигенов, а ссылка на "вспомогательное вещество" включает смеси из двух или большего количества вспомогательных веществ и т.п.

Определения молекулярной биологии.

Термин "вектор", известный специалистам в данной области, означает полинуклеотидную последовательность, обычно плазмиду или бактериальную искусственную хромосому либо аттенуированные живые вирусные векторы, которые применяют для передачи генетического материала в клетку-хозяина. Векторами могут быть, например, бактерии, вирусы, фаги, бактериальные искусственные хромосомы, космиды или плазмиды. Вектор в контексте данного описания может состоять из ДНК или РНК или может содержать их. В некоторых вариантах осуществления вектор состоит из ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор является инфекционным вирусом. Такой вирусный вектор содержит вирусный геном, который был подвергнут манипуляции таким образом, что он включает чужеродный ген, который не выполняет функции в репликации вирусного вектора, ни в культуре клеток, ни в организме животного-хозяина. Согласно конкретным аспектам данного изобретения, вектор может применяться в разных аспектах, таких, как простой перенос генетического материала, для трансфекции клеток-хозяев или организмов, для применения в качестве вакцин, например, ДНК-вакцин, или с целью экспрессии генов. Экспрессия гена является термином, описывающим биосинтез белка в клетке, который направляется специфической полинуклеотидной последовательностью, называемой геном. В конкретном аспекте вектор может быть "экспрессионным вектором", являющийся вектором, способным направлять экспрессию белка, который кодируется одним или несколькими генами, которые несет этот вектор, когда он присутствует в соответствующей среде.

Векторы и способы получения и/или применения векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут быть аналогичными способам, которые раскрываются в патентах США №№ 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, публикациях PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update," PNAS USA 93: 11349 - 11353, October 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341 -11348, October 1996; Smith et al., Патенте США № 4,745,051 (рекомбинантный бакуловирус); Richardson, C. D. (Editor), *Methods in Molecular Biology* 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", *Molecular and Cellular Biology*, December, 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156 - 2165; Pennock et al., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector," *Molecular and Cellular Biology* March 1984, Vol. 4, No. 3, p. 406; ЕРАО 370 573; Заявке США № 920,197, поданной 16 октября 1986 г.; Патентной публикации EP № 265785; Патенте США № 4,769,331 (рекомбинантный герпесвирус); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93: 11307 - 11312, October 1996; Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313 - 11318, October 1996; Robertson et al., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334 -11340, October 1996; Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371 - 11377, October 1996; Kitson et al., *J. Virol.* 65, 3068-3075, 1991; патентах США №№ 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; акцептованных заявках США с серийными номерами

08/675,556, и 08/675,566, обе из которых поданы 3 июля 1996 г. (рекомбинантный аденовирус); Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," *Seminars in Virology* (Vol. 3) p. 237 - 52, 1993; Ballay et al. *EMBO Journal*, vol. 4, p. 3861 - 65, Graham, *Tibtech* 8, 85 - 87, April, 1990; Prevec et al., *J. Gen Virol.* 70, 42434; PCT WO 91/11525; Feigner et al. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550 - 2561, *Science*, 259: 1745 - 49, 1993; и McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", *PNAS USA* 93: 11414 - 11420, October 1996; и патентах США №№ 5,591,639, 5,589,466 и 5,580,859, а также WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; публикациях Tang et al., *Nature*, и Furth et al., *Analytical Biochemistry*, которые касаются векторов экспрессии ДНК, и др. См. также WO 98/33510; Ju et al., *Diabetologia*, 41: 736 - 739, 1998 (лентивирусная система экспрессии); Sanford et al., U.S. Pat. No. 4,945,050; Fischbach et al. (Intracel); WO 90/01543; Robinson et al., *Seminars in Immunology* vol. 9, pp. 271 - 283 (1997), (векторные системы ДНК); Szoka et al., патенте США № 4,394,448 (способ вставки ДНК в живые клетки); McCormick et al., патенте США № 5,677,178 (применение цитопатических вирусов); и патенте США № 5,928,913 (векторы для доставки генов); а также других приведенных авторами документах.

Термин "вирусный вектор" описывает генетически модифицированный вирус, который был подвергнут манипуляции с применением технологии рекомбинантных ДНК таким образом, что в результате его введения в клетку-хозяина обеспечивается специфическая биологическая активность, например, экспрессия трансгена, который переносится вектором. В конкретном аспекте трансгеном является антиген. Вирусный вектор может быть или не быть репликационно-компетентным в клетке-мишени, ткани или организме.

Генерацию вирусного вектора осуществляют, применяя любые подходящие технологии генной инженерии, известные специалистам в данной области, включая, кроме прочего, стандартные технологии расщепления рестрикционной эндонуклеазы, лигирования, трансформации, очищения плазмид, секвенирования ДНК, трансфекции в культурах клеток, например, как описано в публикациях Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)) или K. Maramorosch and H. Koprowski (*Methods in Virology Volume VIII*, Academic Press Inc. London, UK (2014)).

Вирусный вектор может включать последовательности из генома любого известного организма. Последовательности могут быть включены в их естественной форме или могут быть модифицированы любым способом для получения нужной активности. Например, последовательности могут включать вставки, делеции или замещения. Кроме того, последовательности могут быть "кодон-оптимизированными" для улучшения экспрессии белка в живом организме путем повышения трансляционной эффективности нужного гена. Например, нужный ген может быть мутирован (или синтезирован *de novo*) для изменения кодонов, применяющихся для кодирования конкретных аминокислот, без изменения аминокислотной последовательности самого белка. Редкие кодоны могут быть заменены кодонами, которые более многочисленны в организме-хозяине. Оптимизация кодонов в нужном гене может быть самым лучшим способом повышения функциональности и/или экспрессии гена в окружении клетки-хозяина.

Вирусный вектор может включать кодирующие участки для двух или большего количества нужных белков. Например, вирусный вектор может включать кодирующий участок для первого нужного белка и кодирующий участок второго нужного белка. Первый нужный белок и второй нужный белок могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может включать кодирующий(е) участок(и) для третьего или четвертого нужного белка. Третий и четвертый нужный белок может быть таким же или другим. Общая длина двух или большего количества нужных белков, кодирующихся одним вирусным вектором, может быть разной. Например, общая длина двух или большего количества белков может составлять по крайней мере приблизительно 200 аминокислот. По крайней мере приблизительно 250 аминокислот, по крайней мере приблизительно 300 аминокислот, по крайней мере приблизительно 350 аминокислот, по крайней мере приблизительно 400 аминокислот, по крайней мере приблизительно 450 аминокислот, по крайней мере приблизительно 500 аминокислот, по крайней мере приблизительно 550 аминокислот, по крайней мере приблизительно 600 аминокислот, по крайней мере приблизительно 650 аминокислот, по крайней мере приблизительно 700 аминокислот, по крайней мере приблизительно 750 аминокислот, по крайней мере приблизительно 800 аминокислот или больше.

Предпочтительными вирусными векторами являются аденовирусные векторы собачьих CAd2.

Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, термин "вирусный вектор" или "вирусная конструкция" означает рекомбинантную вирусную конструкцию, которая происходит от вируса, выбранного из семейства *Adenoviridae* (Ad), такого, как CAdV-1 и CAdV-2 (аденовирус собачьих), (см. van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. (2000). *Virus taxonomy*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego. 1162 pp).

Термины "вирусный вектор" и "вирусная конструкция" могут употребляться взаимозаменяемо.

Термин "конструкция" в контексте данного описания означает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, такую как плаزمид, ВАС, или рекомбинантный вирус, который был искусственно сгенерирован.

Термин "плазмида" касается цитоплазматической ДНК, реплицированной независимо от бактериальной хромосомы в бактериальной клетке-хозяине. В конкретном аспекте данного изобретения термин "плазмида" и/или "трансферная плазмида" и/или "трансферный фрагмент" касается элемента технологии рекомбинантной ДНК, которую применяют для построения, например, экспрессионной кассеты для вставки в вирусный вектор. В другом конкретном аспекте термин "плазмида" может употребляться для указания на плазмиду, которую применяют с целью ДНК-вакцинации.

В контексте данного описания термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" являются взаимозаменяемыми и касаются любой нуклеиновой кислоты.

Термин "нуклеиновая кислота", "нуклеиновокислотная последовательность", "нуклеотидная последовательность", "полинуклеотид", "полинуклеотидная последовательность", "последовательность РНК" или "последовательность ДНК" в контексте данного описания касается олигонуклеотида, нуклеотида или полинуклеотида и их фрагментов и частей, а также ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными и представлять смысловую или антисмысловую нить. Последовательность может быть некодирующей последовательностью, кодирующей последовательностью или их смесью. Нуклеиновокислотные последовательности согласно настоящему изобретению могут быть получены с применением стандартных технологий, общеизвестных среди специалистов в данной области.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" также конкретно охватывают нуклеиновые кислоты, состоящие из основ, отличных от пяти основ, которые встречаются в природе (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил).

Термины "регуляторная нуклеиновая кислота", "регуляторный элемент" и "элемент контроля экспрессии" употребляются взаимозаменяемо и касаются молекул нуклеиновых кислот, которые могут влиять на экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности, в частности, организма-хозяина. Эти термины широко применяются и охватывают все элементы, которые способствуют транскрипции или регулируют ее, включая промоторы, промоторные последовательности, ключевые элементы, требующиеся для фундаментального взаимодействия РНК-полимеразы и факторов транскрипции, активирующие элементы, энхансеры и элементы ответа. Типичными регуляторными элементами в прокариотах являются промоторы, операторные последовательности и участки связывания рибосом. Регуляторные элементы, применяющиеся в эукариотных клетках, могут включать, кроме прочих, транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности, такие, как промоторы, энхансеры, сигналы сплайсинга, сигналы полиаденилирования, терминаторы, сигналы разрушения белка, внутренние участки посадки рибосом (IRES), пикорнавиридные последовательности 2A и т.п., которые обеспечивают и/или регулируют экспрессию кодирующей последовательности и/или продуцирование кодированного полипептида в клетке-хозяине.

"Внутренний участок посадки рибосомы" или "IRES" описывает последовательность, которая функционально способствует инициации трансляции независимо от гена 5' от IRES и из единого транскрипта в животной клетке. IRES обеспечивает независимый участок посадки рибосомы для трансляции открытого участка считывания непосредственно после него. В отличие от бактериальной мРНК, которая может быть полицистронной, т.е., может кодировать несколько разных полипептидов, которые последовательно транслируются из мРНК, большинство мРНК животных клеток являются моноцистронными и кодируют синтез только одного полипептида. При полицистронном транскрипте в эукариотной клетке трансляция начинается от крайнего с 5' конца сайта инициации трансляции, заканчивается на первом стоп-кодоне, и транскрипт должен быть освобожден от рибосомы, что в результате ведет к трансляции только первого кодированного полипептида в мРНК. В эукариотной клетке полицистронный транскрипт, который имеет IRES, функционально связанный со вторым или следующим открытым участком считывания в транскрипте, обеспечивает возможность последовательной трансляции этого расположенного дальше открытого участка считывания для образования двух или большего количества полипептидов, которые кодируются одним транскриптом. IRES может иметь разную длину и может происходить из разных источников, например, вируса энцефаломиокардита (EMCV), пикорнавирусов (например, вируса ящура, FMDV или полиовируса (PV) или вируса гепатита С (HCV). Разные последовательности IRES и их применение в построении вектора были описаны и являются общеизвестными среди специалистов в данной области. Расположенная дальше кодирующая последовательность функционально связана с 3' концом IRES на любом расстоянии, которое не влияет отрицательно на расположенный дальше ген. Оптимальное или допустимое расстояние между IRES и началом расположенного дальше гена может быть легко определено путем изменения расстояния и измерения экспрессии в зависимости от расстояния.

Термин "2a" или "2a пептид" означает, что короткие олигопептидные последовательности, описанные как 2a и "2a-видные", служат как линкеры, которые способны опосредствовать котрансляционное расщепление между белками с применением процесса, который определяется как рибосомное перескакивание. Такие 2a и "2a-видные" последовательности (из Picornaviridae и других вирусов или клеточных последовательностей) могут применяться для соединения многих генных последовательностей в единый ген, обеспечивая их коэкспрессию в пределах одной клетки (см. Luke and Ryan, 2013).

В контексте данного описания термин "промотор" или "промоторная последовательность" означает

нуклеотидную последовательность, которая обеспечивает возможность связывания РНК-полимеразы и направляет транскрипцию гена. Как правило, промотор располагается в 5' некодирующем участке гена, приближенном к сайту начала транскрипции гена. Элементы последовательности в пределах промоторов, выполняющих функцию инициации транскрипции, часто характеризуются консенсусными нуклеотидными последовательностями. Примерами промоторов, кроме прочих, являются промоторы из бактерий, дрожжей, растений, вирусов и животных, таких, как млекопитающие (включая коней, свиней, крупный рогатый скот и людей), птицы или насекомые. Промотор может быть индуцибельным, репрессированным и/или конститутивным. Индуцибельные промоторы иницируют повышенный уровень транскрипции из ДНК под их контролем в ответ на определенное изменение в условиях культивирования, такое, как изменение температуры (Ptashne, 2014). Примерами промоторов, общеизвестных среди специалистов в данной области, являются, например, SV40 большой Т, HCMV и MCMV немедленно-ранний ген 1, промотор человеческого фактора элонгации альфа, промотор полиэдра бакуловируса.

В контексте настоящего изобретения термин "промотор", в частности, касается функционального фрагмента, например, усечения 4pgG600 (SEQ ID NO. 29), или его комплементарной нуклеотидной последовательности, причем в предпочтительном варианте идентичность последовательностей составляет (по крайней мере) 72% по всей длине (или больше). Кроме того, в контексте настоящего изобретения термин "промотор", в частности, касается функционального фрагмента, например, усечения 4pMCP600 (SEQ ID No. 30), или его комплементарной нуклеотидной последовательности, причем в предпочтительном варианте идентичность последовательностей составляет (по крайней мере) 78% по всей длине (или больше). В наиболее предпочтительном варианте "промотор" означает p430 (SEQ ID NO.: 31) или p455 (SEQ ID NO.: 32). Термины "p430", "gG 430" и "430" являются синонимичными и употребляются взаимозаменяемо по всему описанию, на фигурах, в перечне последовательностей и т.п. Термины "p455", "MCP 455" и "455" являются синонимичными и употребляются взаимозаменяемо по всему описанию, на фигурах, в перечне последовательностей и т.п.

Промоторы EHV-4 в предпочтительном варианте означают усеченный транскрипционно активный промотор, включающий участок, трансактивированный трансактивирующим белком, который обеспечивается вирусом и минимальным промоторным участком промотора полной длины, от которого происходит усеченный транскрипционно активный промотор. С точки зрения данного описания "промотор" состоит из ассоциации последовательностей ДНК, соответствующих минимальной промоторной и активирующей регуляторной последовательностям; "минимальный промотор" состоит из CAP-сайта плюс ТА-ТА-бокса (минимальные последовательности для базового уровня транскрипции; нерегулируемого уровня транскрипции); и "активирующие регуляторные последовательности" состоят из расположенного(ых) выше элемента(ов) и/или энхансерной(ых) последовательности (последовательностей). Кроме того, термин "усеченный" указывает на то, что промотор полной длины не полностью присутствует, т.е., определенная часть промотора полной длины удалена. Усеченные промоторы в предпочтительных вариантах осуществления происходят от герпесвируса-4 коней (геном EHV-4, который в этом описании указывается как 4pgG600 (SEQ ID NO.: 29), 4pMCP600 (SEQ ID NO.: 30), усеченными промоторами являются pgG430 (SEQ ID NO.: 31) или gMCP455 (SEQ ID NO.: 32), которые происходят от соответствующих последовательностей полной длины.

Промотор может быть усечен таким образом, чтобы обеспечивалось 5, 10, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 55, 60, 65, 70, 75, 80% и даже до 90% уменьшения размера относительно промотора полной длины по количеству пар основ; например, в лошадиных 4pgG600 (SEQ ID NO.: 29), 4pMCP600 (SEQ ID NO.: 30), соответственно. Действительно, усеченный промотор согласно изобретению может состоять по сути из любого участка в пределах усечения, трансактивируемого трансактивирующим белком, который обеспечивается вирусом или системой, в который вставляется усеченный промотор, и, таким образом, является минимальным промотором.

Усеченный "транскрипционно активный" или "компетентный" промотор согласно настоящему изобретению означает усеченные транскрипционно активные эукариотные промоторы герпесвируса, происходящие от генома лошадиного герпесвируса 4: промоторы EHV-4 gG430 (SEQ ID NO.: 31) и gMCP455 (SEQ ID NO.: 32). "Активный" (или "компетентный") усеченный транскрипционно активный промотор должен демонстрировать по крайней мере 80%, в предпочтительном варианте по крайней мере 85%, в более предпочтительном варианте - по крайней мере 90%, и в наиболее предпочтительном варианте - по крайней мере 95% транскрипционной активности промотора полной длины. Делеция нуклеотидов или частей или участков промотора полной длины может осуществляться на основе представленных в данном описании идей, без лишних экспериментов, для генерации активных фрагментов дополнительно к приведенным в примерах.

Таким образом, промотор, который применяют для практического осуществления изобретения, может включать производные и/или субфрагменты промотора полной длины, которые сохраняют достаточную активность промотора, а следовательно, функционируют как промотор, и их преимущество состоит в том, что они имеют промоторную активность, которая по существу похожа на активность действующего промотора или промотора полной длины, от которого происходят производная или субфрагмент. В контексте данного описания термин "производная" или "субфрагмент" означают нуклеиновокислотную

последовательность, имеющую модификации, такие, как усечения и/или замещения/делеции, таким образом, чтобы промоторная последовательность выполняла по существу эквивалентную функцию по сравнению с промотором дикого типа. Эти производные или субфрагменты включают нуклеиновокислотные последовательности, имеющие незначительные модификации, которые могут быть намеренными, как при сайт-специфическом мутагенезе, или спонтанными. Термин "производные" также предусматривает делеции, добавления и замещения в последовательности, при условии, что промотор остается "транскрипционно активным" или "компетентным" для запуска экспрессии функционально связанного полипептида, кодирующего, например, нужный антиген.

Термин "энхансер" означает полинуклеотидную последовательность, которая в *cis*-позиции влияет на активность промотора и, таким образом, стимулирует транскрипцию гена или кодирующей последовательности, которая функционально соединена с этим промотором. В отличие от промоторов, влияние энхансеров не зависит от позиции и ориентации, и они, таким образом, могут быть расположены перед транскрипционной единицей или за ней, в пределах интрона или даже в пределах кодирующего участка. Энхансер может быть расположен как в непосредственной близости к транскрипционной единице, так и на значительном расстоянии от промотора. Также возможно физическое и функциональное частичное перекрытие с промотором. Специалистам в данной области известно много энхансеров из разных источников (которые депонируются в банках данных, таких, как GenBank, например, энхансеры SV40, энхансеры CMV, энхансер полиомы, энхансеры аденовируса), имеющиеся как независимые элементы или элементы, клонированные в пределах полинуклеотидных последовательностей (например, депонированных в ATCC, или из коммерческих и частных источников). Много промоторных последовательностей также содержат энхансерные последовательности, такие, как часто применяемый промотор CMV. Энхансер CMV человека является одним из самых сильных до сих пор идентифицированных энхансеров. Одним из примеров индуцибельного энхансера является энхансер металлотioneина, который может быть стимулирован глюкокортикоидами или тяжелыми металлами.

Термин "комплементарные нуклеотидные последовательности" описывает одну нить из двух спаренных нитей полинуклеотидов, таких, как ДНК или РНК. Нуклеотидная последовательность комплементарной нити является зеркальным отражением нуклеотидной последовательности ее спаренной нити, таким образом, что для каждого аденозина она содержит тимин (или урацил для РНК), для каждого гуанина - цитозин, и наоборот. Комплементарной нуклеотидной последовательностью, например, 5'-GCATAC-3' является 3'-CGTATG-5' или для РНК 3'-CGU AUG-5'.

Термины "ген", "нужный ген" в контексте данного описания имеют одинаковое значение и касаются полинуклеотидной последовательности любой длины, кодирующей нужный продукт. Ген может включать регуляторные последовательности до (5' некодирующие или нетранслированные последовательности) и после (3' некодирующие или нетранслированные последовательности) кодирующей последовательности. Выбранная последовательность может быть последовательностью полной длины или усеченной, слитым или меченым геном и может представлять собой кДНК, геномную ДНК или фрагмент ДНК. В целом считается, что геномная ДНК, кодирующая полипептид или РНК, может включать некодирующие участки (т.е. интроны), которые сплайсированы из естественной матричной РНК (мРНК), а следовательно, не присутствуют в кДНК, которая кодирует такой же полипептид или РНК. Она может быть нативной последовательностью, т.е. естественной(ыми) формой(ами), или может быть мутированной, или может включать последовательности, взятые из разных источников или иным образом модифицированные в случае необходимости. Эти модификации включают оптимизацию кодонов для оптимизации использования кодонов в выбранной клетке-хозяине или мечение. Кроме того, они могут включать удаление или добавление действующих в *cis*-позиции сайтов, таких, как сайт (криптический) донора сплайсинга, акцептора сплайсинга, и точки ветвления, сигналы полиаденилирования, ТАТА-боксы, *chi*-сайты, сайты посадки рибосом, последовательности повторов, вторичные структуры (например, структуры "петля-на-стебле"), сайты связывания для факторов транскрипции или других регуляторных факторов, сайты рестрикционных ферментов и т.п., которые являются всего несколькими неограничительными примерами. Выбранная последовательность может кодировать секретированный, цитоплазматический, ядерный, мембраносвязанный полипептид или полипептид клеточной поверхности.

По определению, "эпитоп" является антигенной детерминантой, которая иммунологически активна в том смысле, что после введения в организм хозяина она способна вызвать иммунную реакцию гуморального (В-клетки) и/или клеточного типа (Т-клетки). Они являются конкретными химическими группами или пептидными последовательностями на молекуле, которые антигенны. Антитело специфически связывается с конкретным антигенным эпитопом на полипептиде. Конкретными неограничительными примерами эпитопа являются тетра- - пентапептидная последовательность в полипептиде, трипентаглицозидная последовательность в полисахариде. У животных большинство антигенов представляют несколько или даже много антигенных детерминант одновременно. Такой полипептид также может быть квалифицирован как иммуногенный полипептид, и эпитоп может быть идентифицирован, как описывается дальше.

"Нужный эпитоп" может быть антигеном ветеринарного патогена или токсина либо может быть производным от антигена ветеринарного патогена или токсина, или другим антигеном или токсином,

который вызывает реакцию относительно патогена, или производным от другого антигена или токсина, который вызывает реакцию относительно патогена, и его неограниченными примерами могут быть: антиген парамиксовируса, например, антиген вируса собачьей чумы (CDV), например, HA или F, антиген респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота (BRSV), вирус 3 парагриппа крупного рогатого скота (bPIV3); гликопротеин бешенства, например, гликопротеин бешенства G; антиген птичьего гриппа, например, HA гриппа индюков, антиген гриппа Chicken/Pennsylvania/1/83, такой, как нуклеопротеин (NP); антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота, например, оболочка gp51,30; антиген вируса псевдочумы птиц (NDV), например, HN или F; антиген вируса лейкоза кошачьих (FeLV), например, белок оболочки FeLV; гликопротеин герпесвируса, например, гликопротеин герпесвируса кошачьих, герпесвируса коней, герпесвируса крупного рогатого скота, вируса псевдобешенства или герпесвируса собачьих (гликопротеин герпесвируса собачьих gB, gC или gD); антиген флавивируса, например, антиген вируса лихорадки Западного Нила или антиген вируса клещевого энцефалита; антиген вируса иммунодефицита, например, антиген вируса иммунодефицита кошачьих (FIV); антиген парвовируса, например, антиген парвовируса VP2 собачьих; антиген лошадиного гриппа; антиген болезни Марекка; антиген поксвируса, например, антиген вируса оспы птиц; антиген вируса инфекционного бурсита, например, VP2, VP3, VP4; антиген коронавируса, например, из коронавируса свиней (TGEV, вируса эпидемической диареи свиней (PEDV) и SPIKE Ag дельта-коронавируса), собачьих и/или кошачьих, домашней птицы (например, вируса инфекционного бронхита (IBV)); или антигена пестивируса например, антигена вируса диареи крупного рогатого скота.

Термин "нужная нуклеотидная последовательность" или "нужная последовательность" в контексте данного описания является более общим термином, чем "нужный ген", поскольку она не обязательно включает ген, а может включать элементы или части гена либо другую генетическую информацию, например, *ori* (точку начала репликации). Нужная нуклеотидная последовательность может быть любой последовательностью ДНК или РНК, независимо от того, включает ли она кодирующую последовательность.

"Открытый участок считывания" или "ORF" касается длины нуклеиновокислотной последовательности, ДНК или РНК, которая включает сигнал запуска трансляции или иницирующий кодон, такой, как ATG или AUG, и терминирующий кодон, и потенциально может быть транслирована в полипептидную последовательность.

Термин "транскрипция" описывает биосинтез мРНК в клетке.

Термин "экспрессия" в контексте данного описания означает транскрипцию и/или трансляцию нуклеиновокислотной последовательности в клетке-хозяине. Согласно конкретным аспектам данного изобретения, термин "экспрессия" касается транскрипции и/или трансляции гетерологической и/или экзогенной нуклеиновокислотной последовательности в клетке-хозяине. Уровень экспрессии нужного продукта в клетке-хозяине может определяться на основе количества соответствующей РНК или мРНК, присутствующей в клетке, или количества нужного полипептида, который кодируется выбранной последовательностью. Например, количество мРНК, транскрибированной из выбранной последовательности, определяют путем гибридизации с применением нозерн-блоттинга, защиты РНК рибонуклеазы, *in situ* гибридизации с клеточной РНК или путем RTqPCR (обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР). Белки, экспрессированные из выбранной последовательности, подсчитывают разными способами, например, путем ELISA, вестерн-блоттинга, путем радиоиммунных анализов, путем иммунопреципитации, путем анализа на биологическую активность белка или путем иммунной окраски белка с последующим FACS анализом.

Термин "экспрессионная кассета" либо "транскрипционная единица" или "экспрессионная единица" определяет участок в векторе, конструкте или полинуклеотидной последовательности, который содержит один или несколько генов, подлежащих транскрипции, причем нуклеотидные последовательности, кодирующие транскрибированный(е) ген(ы), а также полинуклеотидные последовательности, которые содержат регуляторные элементы, содержащиеся в экспрессионной кассете, являются функционально связанными друг с другом. Они транскрибируются из промотора, и транскрипция прерывается по крайней мере одним сигналом полиаденилирования. В одном конкретном аспекте они транскрибируются из одного единственного промотора. В результате разные гены являются по крайней мере транскрипционно связанными. Из каждой транскрипционной единицы (мультицистронной транскрипционной единицы) могут быть транскрибированы и экспрессированы несколько белков или продуктов. Каждая транскрипционная единица должна включать регуляторные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции любой из выбранных последовательностей, которые содержатся в единице. И каждая транскрипционная единица может содержать одинаковые или разные регуляторные элементы. Например, каждая транскрипционная единица может содержать такой же терминатор, элемент IRES или интроны могут использоваться для функционального связывания генов в пределах транскрипционной единицы. Векторная или полинуклеотидная последовательность может содержать больше одной транскрипционной единицы.

Под термином "повышенная экспрессия", "повышенный титр или производительность" либо "улучшенная экспрессия или производительность" следует понимать повышение экспрессии, синтеза или секреции гетерологической и/или экзогенной последовательности, введенной в клетку-хозяина, напри-

мер, гена, кодирующего терапевтический белок, путем сравнения с подходящим контролем, например, белком, кодируемым кДНК по сравнению с белком, кодируемым геном, содержащим интрон. Существует повышенный титр или производительность, если клетку согласно изобретению культивируют с применением описанного авторами способа согласно изобретению, и если эта клетка имеет по крайней мере 1,2-кратное, 1,5-кратное, двукратное, трехкратное, четырехкратное или пятикратное увеличение удельной производительности или титра. Также существует повышенный титр или производительность, если клетку согласно изобретению культивируют с применением описанного авторами способа согласно изобретению, и если эта клетка имеет по крайней мере 1,2-кратное или по крайней мере 1,5-кратное или по крайней мере двукратное или по крайней мере трехкратное увеличение удельной производительности или титра. Также, в частности, существует повышенный титр или производительность, если клетку согласно изобретению культивируют с применением описанного авторами способа согласно изобретению, и если эта клетка имеет по крайней мере от 1,2-кратного до пятикратного, в предпочтительном варианте - от 1,5-кратного до пятикратного, в более предпочтительном варианте - от двукратного до пятикратного, в наиболее предпочтительном варианте - от трехкратного до пятикратного увеличения удельной производительности или титра. "Повышенная экспрессия" также может означать, что большее количество клеток фактически экспрессирует нужный ген / последовательность. Например, экспрессия может означать, что новые промоторы согласно данному изобретению обеспечивают повышенную экспрессию относительно экспрессии, которая осуществляется другим промотором, относительно количества полученных клеток, которые экспрессируют или имеют поддающуюся обнаружению экспрессию трансгена. Повышенная экспрессия также может означать повышение уровня мРНК и/или белка, который обнаруживается на клеточной основе.

Повышенной экспрессии, титра или производительности достигают путем применения гетерологического вектора согласно изобретению. Этот способ может объединяться с другими подходами, такими, как осуществляемый с помощью FACS отбор рекомбинантных клеток-хозяев, которые содержат, как дополнительный селектированный маркер, один или несколько флуоресцентных белков (например, GFP) или маркер поверхности клеток. Также могут применяться другие способы достижения повышенной экспрессии и комбинация разных способов, которые основываются, например, на применении *cis*-активных элементов для манипулирования структурой хроматина (например, LCR, UCOE, EASE, изоляторы, элементы S/MAR, STAR), на применении (искусственных) факторов транскрипции, обработки клеток естественными или синтетическими средствами повышающей регуляции экспрессии эндогенного или гетерологического и/или экзогенного гена, улучшении стойкости (периода полужизни) мРНК или белка, улучшении инициации трансляции мРНК, повышении дозы гена путем применения эписомных плазмид (на основе применения вирусных последовательностей как источников репликации, например, SV40, полиомы, аденовируса, EBV или BPV), применении способствующих амплификации последовательностей или систем *in vitro* амплификации на основе конкатемеров ДНК.

Анализ для измерения "повышенной экспрессии" представляет собой измерение белков на основе LC-MS/MS, например, мониторинг множественных реакций (MRM); способы выявления на основе антител, такие, как вестерн-блоттинг, дот-блот-анализ или иммунодиффузия, проточная цитометрия; и косвенную иммунофлуоресценцию (IFA), и измерение биологической активности путем реакции гематглютинации.

"Промоторную активность" измеряют косвенно путем количественного определения мРНК, транскрибированной под контролем соответствующего промотора. мРНК подсчитывают с помощью RTqPCR относительно эндогенного стандарта.

Термин "титр вируса" является мерой инфекционных единиц на единицу объема вирусного препарата. Титр вируса является конечной точкой биологической процедуры и определяется как разбавление, при котором определенная пропорция испытаний, осуществляющихся параллельно, демонстрируют эффект (Рида и Менча, 1938). В частности, инфекционная доза тканевой культуры пятьдесят на миллилитр (TCID₅₀/мл) дает разбавление вирусного препарата, при котором 50% количества культур клеток, инокулированных параллельно с этим разбавлением, являются инфицированными.

"Регулирующие транскрипцию элементы" обычно включают промотор перед последовательностью гена, которая подлежит экспрессии, сайты инициации и терминации транскрипции, а также сигнал полиаденилирования.

Термин "сайт инициации транскрипции" касается нуклеиновой кислоты в последовательности, которая соответствует первой нуклеиновой кислоте, включенной в первичный транскрипт, т.е., прекурсор мРНК. Сайт инициации транскрипции может частично накладываться на промоторные последовательности.

"Сигнал терминации" или "терминатор" либо "сигнал полиаденилирования" или "polyA", или "сайт терминации транскрипции", или "элемент терминации транскрипции" является сигнальной последовательностью, которая вызывает расщепление в конкретном сайте на 3' конце эукариотной мРНК и посттранскрипционную инкорпорацию последовательности с приблизительно 100-200 адениновых нуклеотидов (хвост polyA) на расщепленном 3' конце и, таким образом, вызывает терминацию транскрипции РНК-полимеразой. Сигнал полиаденилирования включает последовательность AATAAA с прибли-

тельно 10-30 нуклеотидов перед сайтом расщепления и последовательность, расположенную после него. Известны разные элементы полиаденилирования, такие, как tk polyA, SV40 поздний и ранний polyA, BGH polyA (описанные, например, в патенте США № 5,122,458) или polyA гормона роста хомяка (публикация WO 2010010107).

"Элементы регуляции трансляции" включают сайт инициации трансляции (AUG), стоп-кодон и сигнал polyA для каждого отдельного полипептида, который должен быть экспрессирован. Внутренний участок посадки рибосомы (IRES) может быть включен в некоторые последовательности. С целью оптимизации экспрессии могут быть целесообразными удаление, добавление и или изменение 5'- и/или 3'-нетранслированных участков нуклеиновокислотной последовательности, которая должна быть экспрессирована, для удаления любых потенциально нежелательных дополнительных альтернативных кодонов инициации трансляции или других последовательностей, которые могут влиять на экспрессию или снижать ее, на уровне транскрипции или трансляции. Консенсусные участки связывания рибосом (последовательность Козак) могут быть вставлены непосредственно перед старт-кодоном для усиления трансляции, а следовательно, экспрессии. Повышенное содержание A/U вокруг этого сайта связывания рибосом способствует более эффективному связыванию рибосом.

По определению, каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, вставленный в клетку-хозяина, и соответствующий белок или РНК, которые таким образом кодируются, указываются как "экзогенная", "экзогенная последовательность", "экзогенный ген", "экзогенная кодирующая последовательность" относительно клетки-хозяина, если они происходят из других (вирусных) видов. Соответственно, промоторы на основе ENV-4 согласно данному изобретению являются экзогенными с учетом вектора CA₂V. Таким образом, любые взятые не из организма собаки последовательность или нужный ген, например, взятый не из организма собаки антиген, являются экзогенными последовательностью или нужным геном или антигеном согласно конкретному аспекту настоящего изобретения.

По определению, каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, вставленный в клетку-хозяина, и соответствующий белок или РНК, кодируемые таким образом, указываются как "гетерологическая", "гетерологическая последовательность", "гетерологический ген", "гетерологическая кодирующая последовательность", "трансген" или "гетерологический белок" относительно клетки-хозяина. Это касается даже случаев, когда последовательность, которая должна быть вставлена, или ген, который должен быть вставлен, являются идентичными эндогенной последовательности или эндогенному гену клетки-хозяина. В контексте данного описания относительно последовательности или нужного гена, такого, как антиген, термин "гетерологический" означает, что вышеупомянутая последовательность или нужный ген, в частности, вышеупомянутый антиген, экспрессируются из среды их естественного вида.

Термин "неестественная" означает любую последовательность или нужный ген, такой, как антиген, который не встречается в этой среде в природе, например, гибридную последовательность или последовательность либо нужный ген, такой, как антиген, из других видов, или последовательность или нужный ген, такой, как антиген, которые не являются естественным продуктом из-за искусственной мутации, вставки, делеции и т.п.

Термин "рекомбинантный" употребляется взаимозаменяемо с терминами "неестественный", "гетерологический" и "экзогенный" по всему тексту описания настоящего изобретения. Таким образом, "рекомбинантный" белок является белком, который экспрессируется из гетерологической или экзогенной полинуклеотидной последовательности. Термин "рекомбинантный", употребленный в контексте вируса, означает вирус, полученный путем искусственной манипуляции с вирусным геномом. Вирус, включающий гетерологическую или экзогенную последовательность, такую, как экзогенная кодирующая антиген последовательность, является рекомбинантным вирусом. Термин "рекомбинантный вирус" и термин "неестественный вирус" употребляются взаимозаменяемо.

Таким образом, термин "гетерологический вектор" означает вектор, включающий гетерологическую или экзогенную полинуклеотидную последовательность. Термин "рекомбинантный вектор" означает вектор, включающий гетерологическую или рекомбинантную полинуклеотидную последовательность.

В контексте данного описания термин "функционально связанный" употребляется для описания связи между регуляторными элементами и геном или его кодирующим участком. Как правило, экспрессия гена находится под контролем одного или нескольких регуляторных элементов, включая, кроме прочих, конститутивные или индуцибельные промоторы, тканеспецифические регуляторные элементы и энхансеры. Ген или кодирующий участок считаются "функционально связанными" или "функционально соединенными" либо "функционально ассоциированными" с регуляторными элементами в том смысле, что ген или кодирующий участок находятся под контролем или влиянием регуляторного элемента. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор выполняет транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности.

Кроме того, в контексте данного описания термины "функциональное связывание", "функционально связанный" или "функционально соединенный" означают, что две или больше нуклеиновокислотных последовательностей или элементов последовательности располагаются таким образом, что это позволяет им функционировать предусмотренным способом. Например, промотор / энхансер или терминатор является функционально связанным с кодирующей генной последовательностью, если он может контро-

лизовать или модулировать транскрипцию связанной генной последовательности в *cis*-позиции. Обычно, но не обязательно, последовательности ДНК, которые являются функционально связанными, являются смежными и, если необходимо соединить два кодирующих участка полипептида или в случае сигнального пептида секрета, смежными и находятся в рамке считывания. Однако хотя функционально связанный промотор в целом располагается перед кодирующей последовательностью, а функционально связанный терминатор обычно располагается после нее, он не обязательно должен быть смежным с ней. Эхансеры не обязательно должны быть смежными, если они повышают транскрипцию кодирующей последовательности. Для этого они могут быть расположены перед кодирующей последовательностью или после нее и даже на определенном расстоянии. Сайт полиаденилирования является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он располагается на 3' конце кодирующей последовательности, таким образом, что транскрипция происходит через кодирующую последовательность в сигнал полиаденилирования. Связывание осуществляется рекомбинантными способами, известными специалистам в данной области, например, путем лигирования в подходящих сайтах рестрикции или тупых концах или путем применения методологии ПЦР. Могут применяться синтетические олигонуклеотидные линкеры или адаптеры согласно традиционной практике, если подходящие сайты рестрикции отсутствуют.

Соответственно, термин "функциональный фрагмент или производная" промоторной последовательности означает, что фрагмент или производная сохраняет свою промоторную активность. Функциональные анализы способов оценки промоторной активности хорошо известны специалистам в данной области (Bustin, S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25(2): 169-193; Nolan, T. Rebecca E Hands, R.E., and Bustin S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR *Nature Protocols* 1: 1559-1582). Типичный вариант осуществления такого функционального анализа включает, например, кинетический эксперимент с промотором. Клетки, инфицированные векторными вирусами, которые несут экспрессионные кассеты, в которых промотор или его фрагмент направляет транскрипцию репортерного трансгена, инкубируют в течение разного времени. Полную РНК приготавливают из образцов, собранных в разное время после инфицирования. После разрушения загрязняющей ДНК путем расщепления ДНКазой I РНК подвергается обратной транскрипции. Одну копию образца обрабатывают с добавлением обратной транскриптазы (RT), вторую копию обрабатывают без добавления RT с целью демонстрации успешного удаления загрязняющей ДНК из препарата РНК. Полученную в результате кДНК очищают и применяют как матрицу при традиционной ПЦР. Только образцы, обработанные с добавлением RT, производят продукт ПЦР. Эти кДНК потом могут применяться для кПЛР с праймерами для репортерного трансгена и параллельно с праймерами для неизменного гена вирусного вектора (внутреннего стандартного гена), транскрипция которого обеспечивает внутренний стандарт для эффективности инфекции и репликации. Значения кПЛР репортера нормализуются между разными конструкциями и временами после инфицирования с использованием значений кПЛР внутреннего стандартного гена. Это обеспечивает возможность интерпретации промоторной активности разных промоторов и их фрагментов.

"Гомология последовательностей" в контексте данного описания означает способ определения родственности двух последовательностей. Для определения гомологии последовательностей две или больше последовательностей оптимально выравнивают и в случае необходимости вводят гэпы. Однако, в отличие от "идентичности последовательностей", консервативные аминокислотные замещения учитываются как соответствие при определении гомологии последовательностей. Иными словами, для получения полипептида или полинуклеотида, имеющего 95% гомологии последовательностей с контрольной последовательностью, 85%, в предпочтительном варианте 90, 91, 92, 93, 94%, в более предпочтительном варианте – 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% аминокислотных остатков или нуклеотидов в эталонной последовательности должны совпадать или включать консервативное замещение другой аминокислотой или нуклеотидом, или определенное количество аминокислот или нуклеотидов до 15%, в предпочтительном варианте до 10, 9, 8, 7, 6%, в более предпочтительном варианте - до 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% от общего количества аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые не включают консервативные замещения, в контрольной последовательности могут быть вставлены в контрольную последовательность. В предпочтительном варианте гомологическая последовательность включает по крайней мере фрагмент из 50, в еще более предпочтительном варианте - из 100, в еще более предпочтительном варианте - из 250, в еще более предпочтительном варианте - из 500 нуклеотидов.

"Идентичность последовательностей" в принятом в данной области понимании касается связи между двумя или больше полипептидными последовательностями либо двумя или больше полинуклеотидными последовательностями, т.е., контрольной последовательностью и данной последовательностью, которая должна сравниваться с контрольной последовательностью. Идентичность последовательностей определяют путем сравнения данной последовательности с контрольной последовательностью после оптимального выравнивания последовательностей для достижения высшей степени сходства последовательностей, которая определяется по совпадению между нитями таких последовательностей. После такого выравнивания идентичность последовательностей подтверждается на основе сопоставления позиций, например, последовательности являются "идентичными" в конкретной позиции, если в этой позиции

нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. Общее количество таких идентичных позиций после этого делят на общее количество нуклеотидов или остатков в контрольной последовательности для получения процента идентичности последовательностей. Идентичность последовательностей может быть легко рассчитана известными способами, включая, кроме прочих, описанные в публикациях Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Bio-computing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), содержание которых включено в данное описание путем ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательности разработаны для получения самого большого совпадения между испытанными последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей систематизированы в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичность последовательностей между данными последовательностями. Примерами таких программ являются, кроме прочих, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215: 403 - 410 (1990)). Программа BLASTX является общедоступной от NCBI и из других источников (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215: 403 - 410 (1990), содержание которых включено в данное описание путем ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности, используя штрафы за делецию по умолчанию с целью обеспечения высочайшего уровня идентичности последовательностей между данной и контрольной последовательностями. Для иллюстрации, для полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая имеет, например, по крайней мере 85%, в предпочтительном варианте 90, 91, 92, 93, 94%, в еще более предпочтительном варианте - 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% "идентичности последовательностей" с контрольной нуклеотидной последовательностью, предусматривается, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида идентична контрольной последовательности, за исключением того, что данная полинуклеотидная последовательность может включать до 15, в предпочтительном варианте - до 10, в еще более предпочтительном варианте - до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов контрольной нуклеотидной последовательности. Иными словами, в полинуклеотиде, имеющем нуклеотидную последовательность, которая имеет по крайней мере 85%, в предпочтительном варианте 90, 91, 92, 93, 94%, в еще более предпочтительном варианте - 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% идентичности относительно контрольной нуклеотидной последовательности, до 15%, в предпочтительном варианте 10, 9, 8, 7, 6%, в еще более предпочтительном варианте - 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% нуклеотидов в контрольной последовательности могут быть делетированы или замещены другим нуклеотидом, или определенное количество нуклеотидов до 15%, в предпочтительном варианте 10, 9, 8, 7, 6, в еще более предпочтительном варианте - 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% от общего количества нуклеотидов в контрольной последовательности может быть вставлено в контрольную последовательность. Эти мутации контрольной последовательности могут встречаться в 5' или 3' конечных позициях контрольной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими конечными позициями, вставке или отдельно среди нуклеотидов в контрольной последовательности, или в одной или нескольких смежных группах в пределах контрольной последовательности. Аналогичным образом для полипептида, имеющего данную аминокислотную последовательность, которая имеет по крайней мере, например, 85%, в предпочтительном варианте 90, 91, 92, 93, 94%, в еще более предпочтительном варианте - 95, 96, 97, 98, 99% идентичности последовательностей с контрольной аминокислотной последовательностью, предусматривается, что данная аминокислотная последовательность полипептида идентична контрольной последовательности, за исключением того, что данная полипептидная последовательность может включать до 15, в предпочтительном варианте до 10, 9, 8, 7, 6, в еще более предпочтительном варианте - до 5, 4, 3, 2, 1 аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот контрольной аминокислотной последовательности. Иными словами, для получения данной полипептидной последовательности, которая имеет по крайней мере 85%, в предпочтительном варианте 90, 91, 92, 93, 94%, в еще более предпочтительном варианте - 95, 96, 97, 98, 99% идентичности последовательностей с контрольной аминокислотной последовательностью, до 15%, в предпочтительном варианте до 10, 9, 8, 7%, в еще более предпочтительном варианте - до 5, 4, 3, 2, 1% аминокислотных остатков в контрольной последовательности могут быть делетированы или замещены другой аминокислотой, или определенное количество аминокислот до 15%, в предпочтительном варианте до 10, 9, 8, 7%, в еще более предпочтительном варианте - до 5, 4, 3, 2, 1% от общего количества аминокислотных остатков в контрольной последовательности может быть вставлено в контрольную последовательность. Эти изменения контрольной последовательности могут происходить в амино- или карбокси-конечных позициях контрольной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими конечными позициями, вставке или отдельно среди остатков в контрольной последовательности, или в одной или нескольких смежных группах в пределах контрольной последовательности. В предпочтительном варианте позиции остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными замещениями. Однако консервативные замещения не включаются как совпадение при определении идентично-

сти последовательностей.

Термины "идентичность последовательностей" или "процент идентичности" употребляются в данном описании взаимозаменяемо. С точки зрения настоящего изобретения предусмотрено, что с целью определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислотных последовательностей последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в последовательность первой аминокислоты или нуклеиновой кислоты для оптимального сопоставления со второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностью). Потом сравнивают аминокислотные или нуклеотидные остатки в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных позициях. Когда позиция в первой последовательности занимает такую же аминокислотой или нуклеотидным остатком, как в соответствующей позиции во второй последовательности, молекулы в этой позиции считаются идентичными. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных позиций, являющихся общими между последовательностями (т.е. % идентичности = количество идентичных позиций / общее количество позиций (т.е., позиции, которые частично перекрываются) × 100). В предпочтительном варианте две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей осуществляют по всей длине двух сравниваемых последовательностей или по фрагменту двух последовательностей. Обычно сравнение осуществляют по полной длине двух сравниваемых последовательностей. Однако идентичность последовательностей может осуществляться на участке, который включает, например, двадцать, пятьдесят, сто или больше смежных аминокислотных остатков.

Специалистам в данной области техники известно, что существует несколько разных компьютерных программ для определения гомологии между двумя последовательностями. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может осуществляться с применением математического алгоритма. В предпочтительном варианте осуществления процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеиновокислотными последовательностями определяют, применяя алгоритм Нидлмана-Вунша (*J. Mol. Biol.* (48): 444 - 453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения Accelrys GCG (<http://www.accelrys.com/products/gcg/>), с использованием матрицы Blosum 62 или матрицы PAM250 и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Специалисту в данной области техники станет понятно, что все эти разные параметры дают несколько отличные результаты, но общий процент идентичности двух последовательностей не подвергается значительным изменениям при применении разных алгоритмов.

Белковые последовательности или нуклеиновокислотные последовательности согласно настоящему изобретению также могут применяться как "искомые последовательности" для осуществления поиска в открытых базах данных, например, для распознавания представителей семейства или родственных последовательностей. Такие поиски осуществляют, применяя программы BLASTN и BLASTP (версия 2.0) согласно Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 10. Поиск белков BLAST осуществляют с помощью программы BLASTP, счет = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологических молекулам белков согласно изобретению. Для получения выравнивания с пробелами с целью сравнения применяют программу Gapped BLAST, как описано в публикации Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389 - 3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTP и BLASTN). См. стартовую страницу Национального центра биотехнологической информации <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

EHV-1, EHV-4, & CAAdV / определение технологии рекомбинантного вектора.

Термин "непарнокопитные" или "лошадиный" означает принадлежность к семейству Equidae, которое включает коней, ослов и зебр, в предпочтительном варианте коней. Кроме того, термин "непарнокопитные" или "лошадиный" также охватывает гибриды семейства Equidae (например, мулов, лошаков и т.п.).

"Вирус герпеса" или "вектор вируса герпеса" касается видов семейства Herpesviridae ряда Herpesvirales.

Термин "вектор вируса герпеса непарнокопитных" или "вирус герпеса непарнокопитных" означает представителя семейства Herpesviridae, поражающего коней. На данное время идентифицировано восемь разных видов герпесвирусов непарнокопитных, пять из которых относятся к подсемейству alphaherpesvirinae и три к gammaherpesvirinae.

(<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30).

Термин "EHV-1" означает герпесвирус 1 непарнокопитных, который относится к подроду Varicellovirus рода Alphaherpesvirinae семейства Herpesviridae. Неограничительным примером контрольной последовательности для EHV-1 может быть, например, штамм дикого типа EHV-1 ab4 (номер доступа в Genbank AY665713.1) или RacH (Hubert, p. H., Birkenmaier, S., Rziha, H.-J. and Osterrieder, N. (1996), Alterations in the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain RacH During Attenuation. *Journal of Veterinary*

Medicine, Series B, 43: 1 - 14.).

Термин EHV-4 означает герпесвирус 4 непарнокопитных, который относится к подроду *Varicellovirus* рода *Alphaherpesvirinae* семейства *Herpesviridae*.

Термин "CAAdV", "CAV", "CAV-1" или "CAV-2" означает аденовирус собачьих 1-го типа или 2-го типа, соответственно, который относится к роду *Mastadenovirus* семейства *Adenoviridae*. Однако, согласно более новой таксономии (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30), термин "аденовирус собачьих" (CAAdV) теперь охватывает оба вида CAV-2 и CAV-1.

"Рекомбинантный вектор CAAdV" или "rCAAdV" и/или "вектор rCAAdV" либо "rCAAdV" или "rCAAd2V" касается аденовируса собачьих, который включает по крайней мере одну экзогенную экспрессионную кассету (т.е. включает кодирующие последовательности в функциональном соединении с промоторами, энхансерами и другими подходящими регуляторными элементами), например, кодирующую маркер экспрессии трансгена (такой, как зеленый флуоресцентный белок), и в предпочтительных вариантах осуществления по крайней мере один "нужный ген" и/или "нужный эпитоп".

Вектор rCAAdV может быть получен стандартными способами, известными специалистам в области вирусологии и молекулярной биологии. Однако для способствования манипуляции с геномом CAAdV и изготовлению вектора изобретение также обеспечивает бактериальный "челночный" вектор, в одном неограничительном примере плазмиду *therBR322*, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую геном CAAdV. Кроме того, бактериальная искусственная хромосома ("BAC") также может способствовать манипуляции CAAdV в бактериальной системе.

Определение вакцин.

"Иммуногенная или иммунологическая композиция" означает композицию вещества, включающую по крайней мере один антиген или его иммуногенную часть, которая обеспечивает иммунологическую реакцию в организме хозяина клеточной или опосредуемой антителом иммунной реакции на композицию.

Употребленный авторами термин "антиген" хорошо понятен специалистам в данной области техники и включает вещества, являющиеся иммуногенными, т.е., являющиеся иммуногенами, а также вещества, вызывающие иммунологическую невосприимчивость или анергию, т.е., отсутствие реакций со стороны защитных механизмов организма на посторонние вещества. В контексте данного описания термин "антиген" означает белки полной длины, а также их пептидные фрагменты, которые содержат или включают эпитоп.

"Иммуногенная композиция" в контексте данного описания может означать полипептид или белок, такой, как, например, поверхностный белок вируса, который обеспечивает иммунологическую реакцию, как описывается авторами. Термин "иммуногенный фрагмент" или "иммуногенная часть" означает фрагмент или усеченную и/или замещенную форму белка или полипептида, которая включает один или несколько эпитопов и, таким образом, обеспечивает описанную авторами иммунологическую реакцию. В целом такие усеченные и/или замещенные формы или фрагменты включают по крайней мере шесть смежных аминокислот из белка полной длины. Такие фрагменты могут быть идентифицированы с применением любых из многочисленных технологий картирования эпитопа, которые общеизвестны среди специалистов в данной области. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут определяться путем одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых основах, пептидов, соответствующих частям молекулы белка, и реакции пептидов с антителами, пока пептиды остаются прикрепленными к основам. Такие технологии известны в данной области техники и описываются, например, в Патенте США № 4,708,871; публикациях Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998 -4002; и Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23: 709-15. Подобным образом конформационные эпитопы могут быть легко идентифицированы путем определения пространственной конформации аминокислоты, например, путем рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См. *Epitope Mapping Protocols* выше. Синтетические антигены также охватываются данным определением, например, полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие рекомбинантные или синтетически полученные антигены. См., например, Bergmann et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23: 2777 - 2781; Bergmann et al. (1996), *J. Immunol.* 157: 3242 - 3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. and Cell Biol.* 75: 402 - 408; и Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998 (идеи и содержание всех этих источников включены в данное описание путем ссылки).

Изобретение также обеспечивает "иммуногенную композицию" или "композицию вакцины", содержащую рекомбинантный вирус CAAdV или вектор и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный вирус CAAdV или вектор (или продукт его экспрессии), обеспечивает иммунологический ответ - местный или системный. Ответ может, но не обязательно, быть защитным. Композиция вакцины обеспечивает местный или системный защитный ответ. Соответствующим образом, термин "иммуногенная композиция" включает "композицию вакцины" (поскольку два предыдущие термина могут означать защитные композиции).

Термин "вакцина" в контексте данного описания касается фармацевтической композиции, вклю-

чающей по крайней мере один иммунологически активный компонент, который вызывает иммунологический ответ у животных, и, возможно, хотя и не обязательно, один или несколько дополнительных компонентов, которые повышают иммунологическую активность действующего компонента. Кроме того, вакцина также может включать другие компоненты, типичные для фармацевтических композиций. Для различения, иммунологически активный компонент вакцины может включать полные вирусные частицы, или в их первоначальной форме, или как аттенуированные частицы в так называемой ослабленной живой вакцине (MLV), или частицы, инактивированные соответствующими способами в так называемой убитой вакцине (KV). В другой форме иммунологически активный компонент вакцины может включать соответствующие элементы организмов (субъединичные вакцины), причем эти элементы генерируются или путем разрушения целой частицы, или культур роста, содержащих такие частицы, с необязательными этапами последующей очистки, которые обеспечивают на выходе нужную(и) структуру(и), или с помощью синтетических процессов, включающих соответствующую манипуляцию путем применения подходящей системы, например, на основе бактерий, насекомых, млекопитающих или других видов, плюс, необязательно, последующие процедуры изоляции и очистки, или путем вызывания синтетических процессов в организме животного, нуждающегося в вакцине, путем прямого включения генетического материала с применением подходящих фармацевтических композиций (вакцинация полинуклеотидом). Вакцина может включать один или одновременно несколько описанных выше элементов. Употребленный в конкретных аспектах настоящего изобретения термин "вакцина" касается живой вакцины или живого вируса, которые также называются рекомбинантной вакциной. В другом конкретном аспекте настоящего изобретения "вакцина" означает инактивированный или убитый вирус, включая вирусоподобные частицы (VLP). Таким образом, вакцина может быть субъединичной вакциной или убитой (KV) или инактивированной вакциной.

Под "животным" следует понимать млекопитающих, человека, птиц и т.п. Животное может быть выбрано из группы, к которой относятся лошадиные (например, конь, зебра, осел), собачьи (например, собаки, волки, лисицы, койоты, шакалы), кошачьи (например, львы, тигры, домашние коты, дикие коты, другие большие коты и другие кошачьи, включая гепарда и рысь), овечьи (например, овцы), крупный рогатый скот (например, коровы, буйволы), свиньи (свиньи), птицы (например, куры, утки, гуси, индюки, перепелки, фазаны, попугаи, зяблики, ястребы, вороны, страусы, эму и казуары), приматы (например, полуобезьяны, долгопяты, макаки, гиббоны, человекоподобные обезьяны) и рыбы. Термин "животное" также включает отдельное животное на всех стадиях развития, включая эмбриональную и фетальную стадии. Термин "предназначенное для получения пищевых продуктов сельскохозяйственное животное" означает несобачьих животных, которых используют для человеческого потребления, таких, как крупный рогатый скот, свиньи, кони, домашняя птица, овцы, рыба и т.п., в предпочтительном варианте предназначено для получения пищевых продуктов сельскохозяйственное животное означает свинью и скот, в наиболее предпочтительном варианте - свинью.

Примеры домашних животных включают виды кошачьих.

С точки зрения введения несобачьим животным рекомбинантный CadV обеспечивает преимущество экспрессии без продуктивной репликации. Репликация аденовируса собачьих ограничивается видами собачьих, и в литературе нет сообщений о CAdV2, вызывающем продуктивную инфекцию в любых отличных от собачьих видах, включая человека. Это ограничение со стороны хозяина обеспечивает внутренний защитный барьер для передачи вируса к другим видам и делает применение вакцинных векторов на основе CAdV2 в межвидовой ветеринарии привлекательным предложением. Таким образом, изобретение охватывает способы амплификации или экспрессии белка путем введения или инокуляции хозяина рекомбинантным вирусом CAdV2 или вектором, причем хозяином не является представитель собачьих или не является естественный хозяин рекомбинантного вируса или вектора, и/или существует экспрессия без продуктивной репликации и/или с ограниченным репликативным циклом.

Для введения животным семейства собачьих, поскольку CAdV, в частности, CAdV2, применяют в качестве вакцинных штаммов для собак, настоящее изобретение обеспечивает средство введения дополнительного(ых) нужного(ых) эпитопа(ов), например, антигена(ов) патогена(ов) или токсина(ов) собачьих. Экспрессия дополнительного(ых) нужного(ых) эпитопа(ов), кодирующихся в векторе rCAdV2, таким образом, обеспечивает средство вызывания *in vivo* ответов на этот (эти) нужный(ые) эпитоп(ы), а также аденовирус собачьих путем инокуляции собаки или щенка вакцинным рекомбинантным CAdV2. Дополнительный(е) нужный(ые) эпитоп(ы) могут быть антигеном патогена собачьих (кроме аденовируса), из антигена патогена собачьих (кроме аденовируса), другим антигеном, который вызывает ответ у собак или щенков на патоген собачьих (кроме аденовируса), или из другого антигена, который вызывает ответ у собак или щенков на патоген собачьих (кроме аденовируса).

Соответствующим образом, данное изобретение предусматривает, что рекомбинантный CAdV2 может содержать гетерологическую ДНК, кодирующую нужный эпитоп из любого антигена патогена собачьих, например: бешенства, герпесвируса собачьих, вируса собачьей чумы, парвовируса собачьих и т.п. Варианты осуществления изобретения включают рекомбинанты CadV, содержащие экзогенную ДНК, которая кодирует больше одного белка, например, кодирует два или больше эпитопов, например, антигены патогенов собачьих. Изобретение также предусматривает композиции, содержащие рекомби-

нанты СAdV в комбинации с другими антигенами.

Для введения животным, не относящимся к собачьим, настоящее изобретение обеспечивает средство введения нужного эпитопа, причем нужный антигенный эпитоп является антигеном, производным от патогена предназначенного для получения пищевых продуктов сельскохозяйственного животного, например, выбранного из группы патогенов крупного рогатого скота: вируса диареи крупного рогатого скота (BVDV), вируса парагриппа-3 (PI-3), вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (IBR), респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота (BRSV), герпесвируса крупного рогатого скота (BHV), ротавируса крупного рогатого скота (BRV), энтеровируса крупного рогатого скота (BEV), коронавируса крупного рогатого скота (BCV), бешенства крупного рогатого скота (BR), парвовируса крупного рогатого скота (BP), аденовируса, астровируса, Mannheimia haemolytica (старое название Pasteurella haemolytica), Pasteurella multocida, Haemophilus somnus (Histophilus ovis и Haemophilus agni), актиномицета (Corynebacterium), Actinomyces pyogenes, Chlamydia psittaci, Campylobacter fetus venerealis и Campylobacter fetus fetus (старое название C fetus intestinalis), Leptospira interrogans, Leptospira hardjo, Leptospira pomona и Leptospira grippotyphosa, Leptospira canicola, Leptospira grippotyphosa, Leptospira hardjo (Leptospira hardjoprajitno и Leptospira hardjo-bovis), Brucella abortus, Brucella suis и Brucella melitensis, Listeria monocytogenes, Chlamydia psittaci, Clostridium chauvoei, Clostridium septicum, Clostridium haemolyticum, Clostridium novyi, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Moraxella bovis, видов Klebsiella, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium; Salmonella newport, видов Mycobacterium avium paratuberculosis, Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium hominis, Staphylococcus aureus, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, видов Mycoplasma, Mycoplasma dispar и видов Ureaplasma, Tritrichomonas foetus, Trichophyton verrucosum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton sarkisovii, Neospora caninum (старое название Toxoplasma gondii), Babesia bigemina и Babesia bovis, Dictyocaulus viviparus (легочная нематода), и их комбинаций. Для введения животным, не относящимся к собачьим, настоящее изобретение обеспечивает средство введения нужного эпитопа, причем нужный антигенный эпитоп является антигеном, производным от патогена предназначенного для получения пищевых продуктов сельскохозяйственного животного, например, выбранного из группы патогенов свиней: видов Salmonella, в частности, S. typhimurium S. choleraesuis; астровирусов; ротавируса; вируса трансмиссивного гастроэнтерита; видов Brachyspira, в частности, B. hyodysenteriae, B. pilosicoli; видов Clostridium, в частности, C. difficile, C. perfringens типов А, В и С, C. novyi, C. septicum, C. tetani; кишечных пикорнавирусов свиней; кишечных калицивирусов свиней; респираторных патогенов, к которым относятся: Actinobacillus pleuropneumonia; Bordetella bronchiseptica; Erysipelothrix rhusiopathiae; Haemophilus parasuis, в частности, подтипов 1, 7 и 14; виды Pasteurella, в частности, p. multocida; виды Mycoplasma, в частности, M. hyorhynchiae, M. hyorhinis; вирус свиного гриппа А; вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRS); цирковир свиней; парвовирус свиней; вирус псевдобешенства; Eperythrozoonosis suis, виды Mycobacterium, в частности, M. avium, M. intracellulare, M. bovis; респираторный коронавирус свиней; коронавирус свиней, в частности, вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV), вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) и дельта-коронавирус; Arcanobacterium ruogenes; аденовирус свиней; классическая чума свиней; цитомегаловирус свиней; африканская чума свиней; или другие патогены, к которым относятся Escherichia coli, виды Streptococcus, в частности, S. suis, S. porcicus, S. dysgalactiae, в предпочтительном варианте подвид equisimilis; Brucella suis, в частности, биофармы 1, 2 и 3; виды Leptospira, в частности, L. australis, L. canicola, L. grippotyphosa, L. pomona, L. icterohaemorrhagiae, L. interrogans, L. tarassovi, L. hardjo, L. sejroe; вирус энцефаломиокардита; вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита; вирус японского энцефалита; вирус лихорадки Западного Нила; реовирус; рубулавир; вирус Менангле; вирус Нипах; вирус везикулярного стоматита; вирус везикулярной экзантемы свиней; поксвирус свиней; вирус герпеса свиней; и Staphylococcus hyicus, и их комбинаций.

Термин "ДНК-вакцинация" или "вакцинация полинуклеотидом" означает прямую инокуляцию генетического материала с применением подходящих фармацевтических композиций.

Специалистам в данной области техники известны разные физические и химические способы инактивации. Термин "инактивированный" касается ранее вирулентных или неvirulentных вируса или бактерии, которые были подвергнуты облучению (ультрафиолетовыми лучами (UV), рентгеновскими лучами, электронным пучком или гамма-лучами), нагреванию или химической обработке для инактивации или уничтожения таких вируса или бактерии при сохранении их иммуногенности. Подходящими инактивирующими агентами являются бета-пропиолактон, бинарный или бета- либо ацетил-этиленмин, глутаральдегид, озон и формалин (формальдегид).

Для инактивации формалином или формальдегидом формальдегид обычно смешивают с водой и метиловым спиртом для образования формалина. Добавление метилового спирта предотвращает распад или перекрестную реакцию во время процесса активации. В одном варианте осуществления применяют приблизительно от 0,1 до 1% 37% раствора формальдегида для инактивации вируса или бактерии. Критически важным является регулирование количества формалина, достаточного для обеспечения инактивации материала, но не настолько большого для того, чтобы возникали побочные эффекты из-за высокой дозы.

Конкретнее, термин "инактивированный" в контексте вируса означает, что вирус не способен к репликации *in vivo* или *in vitro* и, соответственно, термин "инактивированный" в контексте бактерии означает, что бактерия не способна к воспроизводству *in vivo* или *in vitro*. Например, термин "инактивированный" может касаться вируса, который был размножен *in vitro*, и был инактивирован с применением химических или физических средств, таким образом, чтобы он утратил способность к репликации. В другом примере термин "инактивированный" может касаться бактерии, которая была размножена, а потом инактивирована с применением химических или физических средств с образованием в результате суспензии бактерии, фрагментов или компонентов бактерии, например, с образованием бактериина, который может применяться как компонент вакцины.

В контексте данного описания термины "инактивированный", "убитый" или "KV" употребляются взаимозаменяемо.

Термин "живая вакцина" касается вакцины, которая включает либо живой организм, либо репликационно-компетентный вирус или вирусный вектор.

"Фармацевтическая композиция" по существу состоит из одного или нескольких ингредиентов, способных модифицировать физиологические, например, иммунологические функции организма, в который ее вводят, или организмов, которые живут в/на этом организме. Термин включает, кроме прочего, антибиотики или противопаразитарные средства, а также другие составляющие, которые обычно применяют для достижения определенных других целей, к которым, кроме прочих, относятся технологические характеристики, стерильность, стойкость, возможность введения композиции энтеральным или парентеральным путями, например, перорально, интраназально, внутривенно, внутримышечно, подкожно, чрескожно или другим подходящим путем, переносимость после введения или свойства контролируемого высвобождения. Неограничительный пример такой фармацевтической композиции, представленной исключительно с целью демонстрации, может быть приготовленный таким образом: супернатант культуры клеток инфицированной культуры клеток смешивают со стабилизатором (например, спермидином и/или альбумином сыворотки крупного рогатого скота (BSA) и смесь после этого лиофилизируют или дегидратируют другими способами. Перед вакцинацией смесь регидратируют в водных растворах (например, солевом, фосфатно-буферном растворе (PBS) или неводных растворах (например, масляной эмульсии, адьюванте на алюминиевой основе).

Для рекомбинантных вирусных вакцин на основе вектора предпочтительными путями введения являются подкожный (SC), внутримышечный (IM), чрескожный (TD) или внутрикожный (ID). Это введение осуществляют с помощью шприца с иглой или устройства без иглы. Варианты осуществления изобретения могут вводиться орально, интраназально, анально, вагинально, перорально, внутрижелудочно, парентерально, подкожно, чрескожно, внутримышечно или внутривенно. Примерами композиций согласно изобретению могут быть жидкие препараты для отверстий, например, для орального, назального, анального, вагинального, перорального, внутрижелудочного и др. введения, такие, как суспензии, сиропы или эликсиры; и препараты для парентерального, подкожного, чрескожного, внутримышечного или внутривенного введения (например, инъекционного введения), такие, как стерильные суспензии или эмульсии. В таких композициях рекомбинантный CAdV2 и/или антигены могут находиться в смеси с подходящим носителем, разбавителем или вспомогательным веществом, таким, как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза и т.п. Композиции также могут быть лиофилизованы. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие, как увлажняющие агенты или эмульгаторы, буферные средства для поддержания уровня pH, адьюванты, гелеобразующие вещества или примеси, повышающие вязкость, консерванты, ароматизаторы, красители и т.п., в зависимости от пути введения и нужного препарата.

В одном аспекте настоящее изобретение касается вакцинной стратегии, которая основывается на режиме введения "прайм-буст", причем для прайм-введения и буст-введения применяют композицию, включающую фармацевтически или ветеринарно приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель, адьювант или основу и рекомбинантный CAdV согласно настоящему изобретению.

Режим прайм-буст включает по крайней мере одно прайм-введение и по крайней мере одно буст-введение с применением по крайней мере одного гетерологического антигена и/или его вариантов или фрагментов. Вакцина, которую применяют для прайм-введения, может по природе отличаться от вакцин, применяемых впоследствии в качестве бустерной вакцины. Также следует отметить, что и прайм-введение, и буст-введение могут включать рекомбинантный CAdV согласно настоящему изобретению. Прайм-введение может включать одно или несколько введений. Подобным образом и буст-введение может включать одно или несколько введений.

Другой аспект настоящего изобретения касается комплекта для прайм-буст-вакцинации согласно настоящему изобретению. Комплект может включать по крайней мере два флакона: первый флакон, содержащий вакцину для прайм-вакцинации согласно настоящему изобретению, и второй флакон, содержащий вакцину для буст-вакцинации согласно данному изобретению. Комплект в предпочтительном варианте может содержать дополнительные первый или второй флаконы для дополнительных прайм-вакцинаций или дополнительных буст-вакцинаций.

В одном варианте осуществления комплект может включать два флакона, один из которых содер-

жит вакцину на основе плазмиды для прайм-вакцинации согласно настоящему изобретению, а другой флакон содержит вакцину на основе рекомбинантного вирусного вектора для буст-вакцинации согласно настоящему изобретению.

В контексте данного описания "фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, адьюванты, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические агенты, агенты, задерживающие адсорбцию, и т.п. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, в частности, в тех, которые включают лиофилизированные иммуногенные композиции, стабилизаторы для применения согласно настоящему изобретению включают стабилизаторы для лиофилизации или сушки замораживанием.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит адьювант. "Адьюванты" в контексте данного описания могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа "вода в масле", эмульсию типа "масло в воде", эмульсию типа "вода в масле в воде". Эмульсия, в частности, может быть на основе легкого жидкого вазелинового масла (по стандартам Европейской фармакопеи); изопреноидного масла, такого, как сквалан или сквален; масла, образованного в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; эстеров кислот или спиртов, которые содержат линейную алкильную группу, конкретнее - растительные масла, этилолеат, пропиленгликольди-(каприлат/капрат), глицерилтри-(каприлат/капрат) или пропиленгликольдиолеат; эстеры разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, эстеры изостеариновой кислоты. Масло применяют в комбинации с эмульгаторами для образования эмульсии. Эмульгаторами в предпочтительном варианте являются неионные поверхностно-активные вещества, в частности, эстеры сорбита, маннита (например, ангидроманнитолеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые являются необязательно этоксилированными, и блок-сополимеров полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности, продуктов Pluronic, в частности, L121. См. Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pp 51 - 94 (1995), и Todd et al., *Vaccine* 15: 564 - 570 (1997). Типичными адьювантами являются эмульсия SPT, описанная на странице 147 публикации "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под редакцией M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на странице 183 той же публикации.

Еще одним примером адьюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила. Предпочтительными адьювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые сшиты, в частности, с полиалкенильными эстерами Сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны под термином "карбомер" (*Pharmeuropa* Vol. 8, No. 2, June 1996). Специалисты в данной области техники также могут обратиться к Патенту США № 2,909,462, в котором описываются такие акриловые полимеры, сшитые с полигидроксилированным соединением, имеющим по крайней мере 3 гидроксильные группы, в предпочтительном варианте - не больше, чем 8, атомы водорода с по крайней мере тремя гидроксильными, замененными на ненасыщенные алифатические радикалы, имеющие по крайней мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллиллы и другие этилен-ненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие, как метил. Продукты, продающиеся под названием CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, США), являются особенно подходящими. Они сшиты с аллилсахарозой или с аллилпентаэритритом. Среди них можно упомянуть Carbopol 974P, 934P и 971P. Наибольшее предпочтение отдают применению CARBOPOL® 971P. К сополимерам малеинового ангидрида и производным алкенила относятся сополимеры EMA (Monsanto), являющиеся сополимерами малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде ведет к образованию раствора кислоты, который должен быть нейтрализован, в предпочтительном варианте до физиологического уровня pH, для получения раствора адьюванта, в который включают такую иммуногенную, иммунологическую или вакцинную композицию.

Другими подходящими адьювантами являются, кроме прочих, адьювантная система RIBI (Ribi Inc.), блок-сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил-липид A, липидаминный адьювант Avridine, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), токсин холеры, IMS 1314 или мурамилдипептид, или естественные или рекомбинантные цитокины либо их аналоги или стимуляторы высвобождения эндогенного цитокина, среди многих других.

Можно ожидать, что адьювант может добавляться в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, в предпочтительном варианте в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, в еще более предпочтительном варианте - в количестве от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, в еще более предпочтительном варианте - в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу, и в наиболее предпочтительном варианте - в количестве от приблизительно 1 мг на дозу. В альтернативном варианте адьювант может быть в концен-

трации приблизительно от 0,01 до 50%, в предпочтительном варианте в концентрации приблизительно от 2 до 30%, в еще более предпочтительном варианте - в концентрации приблизительно от 5 до 25%, в еще более предпочтительном варианте - в концентрации приблизительно от 7 до 22%, и в наиболее предпочтительном варианте - в концентрации от 10 до 20% по объему конечного продукта.

"Разбавители" включают воду, солевой раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Изотонические агенты могут включать, кроме прочих, хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают, кроме прочих, альбумин и щелочные соли этилендиаминтетрауксусной кислоты.

"Изолированный" означает измененный "человеческой рукой" из естественного состояния, т.е. если он встречается в природе, то он был изменен или удален из первоначальной среды, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, присутствующий в природе в живом организме, не является "изолированным", но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от сосуществующих материалов его естественного состояния, является "изолированным" в смысле употребленного в этом описании термина.

"Аттенуация" означает снижение вирулентности патогена. Согласно данному изобретению, "аттенуация" является синонимом "лишения вирулентности". Согласно данному изобретению, аттенуированным вирусом является тот, в котором вирулентность была снижена таким образом, чтобы он не вызывал клинических признаков инфекции, но был способен вызывать иммунную реакцию у животного, являющегося объектом, но этот термин также может означать, что уменьшается частота и тяжесть клинических признаков у животных, инфицированных аттенуированным вирусом, в частности, заявленным вирусным вектором CAdV, по сравнению с "контрольной группой" животных, инфицированных неаттенуированным вирусом или патогеном и не получающих аттенуированного вируса. В этом контексте термин "снижать / сниженный" означает снижение по крайней мере на 10%, в предпочтительном варианте на 25%, в еще более предпочтительном варианте - на 50%, в еще более предпочтительном варианте - на 60%, в еще более предпочтительном варианте - на 70%, в еще более предпочтительном варианте - на 80%, в еще более предпочтительном варианте - на 90% и в наиболее предпочтительном варианте - на 100% по сравнению с контрольной группой, как определено выше. Таким образом, аттенуированный, лишенный вирулентности патоген, такой, как, например, заявленный аттенуированный вирусный вектор, в частности, заявленный вирусный вектор CAdV, является пригодным для создания ослабленной живой вакцины (MLV) или модифицированной живой иммуногенной композиции.

В данном описании "эффективная доза" означает, кроме прочего, количество антигена, вызывающее или способное вызвать иммунную реакцию, которая обеспечивает снижение клинических симптомов у животного, которому вводится антиген.

В данном описании термин "эффективное количество" означает, в контексте композиции, количество иммуногенной композиции, способной вызвать иммунную реакцию, которая уменьшает частоту или снижает тяжесть инфекции или случаев болезни у животных. В частности, эффективное количество касается количества колониеобразующих единиц (CFU) на дозу. В альтернативном варианте в контексте терапии термин "эффективное количество" касается количества терапии, которое достаточно для снижения или ослабления тяжести или продолжительности болезни или нарушения, или одного или нескольких их симптомов, предотвращения прогрессирования болезни или нарушения, вызывания регрессии болезни или нарушения, профилактики рецидива, развития, начала или прогрессирования одного или нескольких симптомов, связанных с болезнью или нарушением, или усиления или улучшения профилактики или лечения при применении другой терапии или другого терапевтического средства.

"Иммунная реакция" или "иммунологическая реакция" означает, кроме прочего, развитие клеточной и/или опосредуемой антителом иммунной реакции на (иммуногенную) композицию нужной вакцины. Обычно иммунная или иммунологическая реакция включает, кроме прочего, один или несколько таких эффектов: продуцирование или активацию антител, В-клеток, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, специфически направленных на антиген или антигены, включенные в нужную композицию или вакцину. В предпочтительном варианте хозяин демонстрирует терапевтический или защитный иммунологический (вторичный) ответ, таким образом, чтобы резистентность к новой инфекции повышалась, и/или клиническая тяжесть болезни снижалась. Такая защита демонстрируется путем уменьшения количества симптомов, тяжести симптомов или отсутствия одного или нескольких симптомов, связанных с инфекцией патогена, задержки начала вирусемии, снижения вирусной персистенции, снижения общей вирусной нагрузки и/или снижения вирусной экскреции. Таким образом, изобретение также обеспечивает способ "вызывания иммунологической реакции" у хозяина, относящегося к позвоночным, который включает введение хозяину иммуногенной или вакцинной композиции, включающей рекомбинантный вирус CadV или вектор и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

"Защита от болезни", "защитный иммунитет", "функциональный иммунитет", "снижение клинических симптомов", "вызывание иммунологической реакции", "индуцирование/продуцирование нейтрализующих антител и/или преобразование сыворотки" и другие подобные фразы означают продуцирование антител против антигена и/или вызывание в результате частичной или полной реакции против болезни или состояния, которая генерируется путем введения одной или нескольких терапевтических компози-

ций согласно изобретению, или их комбинацию, что в результате обеспечивает уменьшение вредных последствий, которые бы ожидалось у неиммунизированного субъекта, испытавшего действие болезни или инфекции. То есть, тяжесть вредных последствий инфекции у вакцинированного субъекта уменьшается. Инфекция вакцинированного субъекта может быть снижена, замедленная или полностью смещенная. В этом описании в случае, если имеется в виду полное предотвращение инфекции, это специально указывается. Если о полном предотвращении не сказано, термин включает частичное предотвращение.

В контексте данного описания "снижение частоты и/или тяжести клинических признаков" или "снижение клинических симптомов" означает, кроме прочего, уменьшение количества инфицированных субъектов в группе, уменьшение или устранение количества субъектов, демонстрирующих клинические признаки инфекции, или снижение тяжести любых клинических признаков, наличествующих у одного или нескольких субъектов, по сравнению с инфекцией дикого типа. Например, этот термин должен касаться любого снижения патогенной нагрузки, выделения патогена, снижения передачи патогена или снижения любого клинического признака, который является симптомом малярии. В предпочтительном варианте эти клинические признаки снижаются у одного или нескольких субъектов, получающих терапевтическую композицию согласно настоящему изобретению, по крайней мере на 10% по сравнению с субъектами, которые не получают композицию и становятся инфицированными. В еще более предпочтительном варианте клинические признаки снижаются у субъектов, получающих композицию согласно настоящему изобретению, по крайней мере на 20%, в предпочтительном варианте по крайней мере на 30%, в еще более предпочтительном варианте - по крайней мере на 40%, и в еще более предпочтительном варианте - по крайней мере на 50%.

Термин "увеличенная защита" в контексте данного описания означает, кроме прочего, статистически значимое снижение одного или нескольких клинических симптомов, связанных с инфицированием инфекционным агентом, в вакцинированной группе субъектов по сравнению с невакцинированной контрольной группой субъектов. Термин "статистически значимое снижение клинических симптомов" означает, кроме прочего, что частота случаев по крайней мере одного клинического симптома в вакцинированной группе субъектов по крайней мере на 10%, в предпочтительном варианте на 20%, в еще более предпочтительном варианте - на 30%, в еще более предпочтительном варианте - на 50%, и в еще более предпочтительном варианте - на 70% ниже, чем в невакцинированной контрольной группе после иммунизации инфекционным агентом.

"Длительная защита" означает "улучшенную эффективность", которая сохраняется на протяжении по крайней мере 3 недель, но в еще более предпочтительном варианте - по крайней мере 3 месяца, в еще лучшем варианте - по крайней мере 6 месяцев. В случае скота наиболее желательна длительная защита, которая продолжается до достижения среднего возраста, в котором животных сдают на мясо.

Термин "снижение виремии", вызванной вирусом, означает, кроме прочего, уменьшение вирусов, поступающих в кровоток животного, причем уровень виремии, т.е. количество копий вирусных ДНК или РНК на мл сыворотки крови или количество бляшкообразующих колоний на децилитр сыворотки крови снижается в сыворотке крови животных, получающих композицию согласно настоящему изобретению, по крайней мере на 50% по сравнению с животными, которые не получают композицию и могут быть инфицированными. В еще более предпочтительном варианте уровень виремии снижается у животных, получающих композицию согласно настоящему изобретению, по крайней мере на 90%, в предпочтительном варианте по крайней мере на 99,9%, в еще более предпочтительном варианте - по крайней мере на 99,99%, и в еще более предпочтительном варианте - по крайней мере на 99,999%.

В контексте данного описания термин "виремия", в частности, следует понимать как состояние, при котором частицы вируса воспроизводятся и циркулируют в кровотоке животного, в частности, млекопитающего, птицы или насекомого.

"Безопасность" означает отсутствие неблагоприятных последствий у вакцинированного животного после вакцинации, включая, кроме прочего: потенциальное возвращение вакцины на основе бактерий к вирулентности, клинически значимые побочные эффекты, такие, как стойкая, системная болезнь или неприемлемое воспаление в месте введения вакцины.

Термины "вакцинация" или "вакцинирование" или их варианты в контексте данного описания означают, кроме прочего, процесс, включающий введение иммуногенной композиции согласно изобретению, которая при введении животному вызывает или способна вызывать - прямо или косвенно - иммунную реакцию у вышеупомянутого животного.

"Смертность" в контексте данного изобретения означает смерть, вызванную инфекцией, и включает ситуацию, в которой инфекция настолько тяжелая, что животное подвергают эвтаназии для предотвращения страданий и обеспечения гуманного лишения его жизни.

Рецептирование.

Субъект, которому вводят композицию, в предпочтительном варианте является животным, включая, кроме прочих, крупный рогатый скот, коней, овец, свиней, птицу (например, кур), коз, котов, собак, хомяков, мышей и крыс, причем в наиболее предпочтительном варианте млекопитающее является свиньей.

Композиции согласно изобретению включают эффективное иммунизирующее количество одной

или нескольких иммуногенных композиций и физиологически приемлемой основы. Вакцины включают эффективное иммунизирующее количество одной или нескольких иммуногенных композиций и физиологически приемлемую основу. Композиция должна соответствовать режиму введения.

Иммуногенная композиция в случае необходимости также может содержать незначительное количество увлажняющих средств либо эмульгаторов или буферных средств для поддержания уровня pH. Иммуногенная композиция может быть жидким раствором, суспензией, эмульсией, таблеткой, пилюлей, капсулой, композицией с замедленным высвобождением или порошком. Композиция для перорального введения может включать стандартные носители, такие, как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, натриевая соль сахарина, целлюлоза, карбонат магния фармацевтического качества и т.п.

Предпочтительные пути введения включают, кроме прочих, интраназальный, пероральный, чрескожный и внутримышечный. Желательно введение в питьевой воде, в наиболее предпочтительном варианте - единой дозой. Специалистам в данной области станет понятно, что композиции согласно изобретению также могут вводиться одной, двумя или большим количеством доз, а также другими путями введения. Например, к таким другим путям относятся подкожный, внутрикожный, внутривенный, и, в зависимости от нужной продолжительности и эффективности лечения, композиции согласно изобретению могут вводиться один или несколько раз, а также периодически, например, ежедневно в течение нескольких дней, недель или месяцев, и в разных дозах, например, приблизительно от 10^3 до 10^8 TCID₅₀ (см. титр вируса выше). В конкретном аспекте настоящего изобретения доза составляет приблизительно от 10^3 до 10^8 TCID₅₀, особенно для живого вируса / живой вакцины.

Композиции в случае необходимости могут быть представлены в упаковке или дозирочном устройстве, которое может содержать одну или несколько форм дозированных единиц, содержащих активный ингредиент. Упаковка может включать, например, металлическую фольгу или пластиковую пленку, например, блистерную упаковку. Упаковка или дозирочное устройство могут сопровождаться инструкциями для введения, в предпочтительном варианте - для введения млекопитающему, в частности, свинье. К такой упаковке может прилагаться записка в форме, определенной правительственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, причем эта записка должна отображать утверждение со стороны правительственного органа производства, применения или продажи для введения человеку.

Краткое описание фигур

Представленные далее фигуры составляют часть данного описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов данного изобретения. Изобретение лучше объясняется со ссылкой на одну или несколько из этих фигур в комбинации с подробным описанием представленных авторами конкретных вариантов осуществления.

Фиг. 1. Схематическое изображение генерации инфекционного клона CAdV2. (A) Синтезированный фрагмент ДНК, кодирующий 5' и 3' концы вирусного генома с промежуточным уникальным сайтом рестрикции и клонированный в челночный вектор pBR322 E. coli. Сайты рестрикционной эндонуклеазы PmeI (стрелки) были вставлены путем инженерии в последовательность на 5' и 3' концах ITR для облегчения эксцизии генома CAdV-2 из остова вектора pBR322. (B) Клонирование генома CAdV-2 в ДНК в вектор через гомологическую рекомбинацию в BJ5183 REC⁺ E. coli. (C) Успешный HR-рекомбинантный rCAdV-2 инфекционный клон. ITR = инвертированный конечный повтор.

Фиг. 2. Схема организации E3 участка CAdV-2.

Фиг. 3. Схематическое изображение гомологической рекомбинации между линейаризованным инфекционным клоном ДНК и E3-направленным трансферным фрагментом CAdV-2.

Фиг. 4. Схема BIVI-генерированной E3-делеции (Δ E3A и Δ E3B) трансферного(ых) фрагмента(ов) в остова CAdV-2.

Фиг. 5. Схема BIVI-генерированных E3-делеций. A. Схема E3 ORF с общими комбинированными размерами остающихся ORF1 и 2 ДНК и количеством каждого. B. Схема генома CAdV-2, показывающая общее количество E3 ORF1 и ORF2 ДНК, остающихся в Δ E3A и Δ E3B конфигурациях. В делеции "A" (Δ E3A) все, кроме первых 186 нуклеотидов E3 ORF1 и последних 301 нуклеотидов ORF2, были делетированы, тогда как для делеции "B" E3 (Δ E3B) 186 нуклеотидов E3 ORF1 и 83 нуклеотидов ORF2 остаются.

Фиг. 6. E3 делеция и вставка экспрессионных кассет.

Фиг. 7. Выполняли анализ прочности промотора путем количественного определения экспрессии CPV VP2 путем временной экспрессии из экспрессионных последовательностей, как выявлено путем IFA в трансфицированных клетках MDCK. Панель A: показано CPV IFA клеток MDCK, трансфицированных экспрессионными плазмидами CPV VP2 под управлением промоторов CMVie или CMV5. Панель B: гистограмма CPV VP2 ELISA клеток MDCK, трансфицированных экспрессионными плазмидами CPV VP2 под управлением промоторов CMVie, CAG или CMV5, как указано. Панель C: гистограмма осуществленного с помощью Molecular Devices ImageXpress MicroXL количественного определения CPV VP2-положительных клеток MDCK, трансфицированных экспрессионными плазмидами CPV VP2 под управлением промоторов CMVie или CMV5, как указано.

Фиг. 8. Схема экспрессионной кассеты CMVie EGFP SV40 polyA в остове CAV-2 MCS-1-5. Вставка осуществлена в Δ E3B ORF2, где все, кроме первых 186 нуклеотидов E3 ORF1 и последних 82 нуклеотидов, делетированы. После гена EGFP находится сигнал polyA SV40. ITR = инвертированный конечный повтор.

Фиг. 9. Схема CMVie CPV VP2 (n) SV40 polyA экспрессионной кассеты в остове CAV-2. Вставка осуществлена в Δ E3B ORF2, где все, кроме первых 186 нуклеотидов E3 ORF1 и последних 82 нуклеотидов, делетированы. После гена VP2 (n) находится сигнал polyA SV40.

Фиг. 10: ПЦР-анализ гCAV-2 ДНК, очищенной от инфицированных клеток и супернатантов. ПЦР осуществляли для проверки присутствия CMVie CPV VP2 (n) трансгенной экспрессионной кассеты в гCAV2 Δ E3B/CMVie CPV VP2 из изолированных вирусных ДНК. Панель А, рCAV-2 контрольный вирус; панель В, клон #1; панель С, клон #2. Панель D, контрольные реакции с CMVie CPV VP2 (n) трансферная плазмида. М является 1 т. о. + маркер длины ДНК. Панель E. Ожидаемые результаты специфических к трансгенной экспрессионной кассете ПЦР-реакций. Реакции 1 и 2 используют праймеры, специфические к CAV-2 Н-А Р VIII, U-экзон и СVP VP2; реакции 3, 4 и 5 используют праймеры, специфические к CPV VP2 (см. панель E). Реакция 7 (положительная реакция для CAdV-2) использует CAV-2-специфические праймеры Н-А Р VIII и праймеры U-экзона.

Фиг. 11. Проточный цитометрический анализ инфицированных гCAV-2 клеток MDCK. Панели А - F являются гистограммами сигнала, отсутствующего в отдельных клетках. Суспензию клеток MDCK инфицировали контрольным вирусом гCAV-2, несущим BRSV F (co) (панели В и E), или инфицировали гCAV-2, несущим экспрессионные кассеты CPV VP2 (co) (панели С и F), и окрашивали через 72 ч после инфицирования FITC-конъюгированным антителом против CPV VP2 (панели А, В и С) или FITC-конъюгированным антителом против CAV2 (панели D, E и F). Панель G представляет сводку и подсчет результатов, показанных в панели А-F.

Фиг. 12. Схема CMVie BRSV F (co) BGH polyA экспрессионной кассеты в остове CAdV-2. После гена BRSV F (co) располагается сигнал BGH polyA.

Фиг. 13. Схема CMVie RabGP BGH polyA экспрессионной кассеты в остове CAdV-2. После гена RabGP располагается сигнал BGH polyA.

Фиг. 14. CAdV-2-специфическая IFA инфицированных вирусом гCAV-2 RabGP P2 клеток E1 B-MDCK. CAdV-2 IFA инфицированных клеток E1 B-MDCK выполняли через 60 ч после инфицирования клеток с применением антител против CAdV-2, прямо конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и моноклонального антитела мыши против RabG и FITC-конъюгированного антитела козы против мыши.

Фиг. 15. Проточный цитометрический анализ CAdV2 CMVie CPV VP 2-инфицированных клеток AI-ST 2015: через 72 ч после инфицирования.

Фиг. 16. гCAdV-2 с новыми промоторами EHV-4: проточный цитометрический анализ инфицированных клеток AI-ST 2015: через 48 ч после инфицирования.

Фиг. 17. гCAdV-2 с новыми промоторами EHV-4: дот-блот анализ экспрессии белка CPV VP2 в инфицированных клетках MDCK. 1° = 1/50 а-CPV-FITC mAb (VMRD); 2° = 1/1,000 Ig-пероксидазы козы против мыши (JIR). (А) Первоначальные данные дот-блот анализа. (В) Полуколичественные данные, полученные от дот-блот анализа: Для подсчета дот-блот анализа анализируют с помощью программы ImageJ (Burger, W., Burge, M.J. (Eds.), 2008. Digital Image Processing: An algorithmic introduction using Java. Springer-Verlag, New York). Цвета изображений инвертируют для вычитания фона и записывают интегральную плотность каждой точки. Значениям присваивают знаки + и - таким образом: "++++" = >800000, "+++" = от 500000 до 800000, "++" = от 300000 до 499999, "+" = от 120000 до 299999, "+/-" = от 80000 до 119999 и "-" = <80000. Фиг. 18: выявление RabG в клетках, инфицированных гCAdV-2 p455 RabG: экспрессия выявляется в < 1% клеток, инфицированных первоначальным гCAdV-2 CMVie RabG.

Фиг. 18. Сводка проточного цитометрического анализа белков RabG, экспрессированных клетками AI-ST 2015, инфицированными инфекционными клонами гCAdV-2.

Фиг. 19А. Выявление CPV VP2 в клетках, инфицированных гCAdV-2 p430 и p455 (обозначенных как g430 и MCP455, соответственно) RabG.

Фиг. 19В. Выявление RabG в клетках, инфицированных гCAdV-2 p455 (обозначенных как MCP455) RabG.

Фиг. 19С. Выявление CAdV-2 и RabG в клетках, инфицированных гCAdV-2 p455 (обозначенных как MCP455) RabG.

Обзор последовательностей.

Представленные ниже последовательности детально представлены и, таким образом, раскрываются в настоящем изобретении.

Таблица 1

| ОБОЗНАЧЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ | НАЗВАНИЕ | ДНК / РНК / БЕЛОК |
|--------------------------------|--|-------------------|
| SEQ ID NO: 1 | участок CAdV2 ΔE3A-E3 | ДНК |
| SEQ ID NO: 2 | участок CAdV2 ΔE3B-E3 | ДНК |
| SEQ ID NO: 3 | промотор huCMVie | ДНК |
| SEQ ID NO: 4 | промотор huCMV 5 | ДНК |
| SEQ ID NO: 5 | праймер huCMVie 5' F | Искусственный |
| SEQ ID NO: 6 | праймер huCMVie 3' R | Искусственный |
| SEQ ID NO: 7 | экспрессионная кассета huCMVie EGFP | ДНК |
| SEQ ID NO: 8 | прямой EGFP (ПЦР скрин-праймер) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 9 | обратный EGFP (ПЦР скрин-праймер) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 10 | экспрессионная кассета huCMVie CPV VP2 (n) | ДНК |
| SEQ ID NO: 11 | Набор 1 H-AP VIII F-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 12 | Набор 1 VP2 R-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 13 | Набор 2 VP2 F-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 14 | Набор 2U Exon R-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 15 | Набор 3 VP2 F-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 16 | Набор 3 VP2 R-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 17 | Набор 4 VP2F-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 18 | Набор 4 VP2 R-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 19 | Набор 5VP2F-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 20 | Набор 5VP2R-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 21 | Набор 6H-AP VIII F-праймер (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 22 | Набор 6U обратный праймер экзона (ФИГ. 10E) | Искусственный |
| SEQ ID NO: 23 | Экспрессионная кассета huCMVie CPV VP2 (co) | ДНК |
| SEQ ID NO: 24 | Белок парвовируса собачьих VP2 | Белок |
| SEQ ID NO: 25 | Экспрессионная кассета huCMVie RabGP | ДНК |
| SEQ ID NO: 26 | гликопротеин бешенства Пастера G (n) | Белок |
| SEQ ID NO: 27 | Экспрессионная кассета huCMVie BRSV F (co) | ДНК |
| SEQ ID NO: 28 | Полипептид BRSV F (co) | Белок |
| SEQ ID NO: 29 | Промотор EHV-4 600 п. о. (4pgG600) | ДНК |
| SEQ ID NO: 30 | Промотор EHV-4 600 п. о. (4pMCP600) | ДНК |
| SEQ ID NO: 31 | Промотор EHV-4 430 п. о. (pG430) | ДНК |
| SEQ ID NO: 32 | Промотор EHV-4 MCP455 п. о. (p455) | ДНК |
| SEQ ID NO: 33 | Праймер gG430 F | Искусственный |
| SEQ ID NO: 34 | Праймер gG430 R | Искусственный |
| SEQ ID NO: 35 | Праймер MCP455 F | Искусственный |
| SEQ ID NO: 36 | Праймер MCP455 R | Искусственный |
| SEQ ID NO: 37 | CPV VP2 десплейсированный ORF с сайтами рестрикционной эндонуклеазы BamHI и Sall | ДНК |
| SEQ ID NO: 38 | CPV VP2 Gen0.95 ORF с сайтами рестрикционной эндонуклеазы BamHI и Sall | ДНК |
| SEQ ID NO: 39 | Экспрессионная кассета p430 CPV VP2 (десплейсированная) | ДНК |
| SEQ ID NO: 40 | Экспрессионная кассета p430 CPV VP2 (Gen 0.95) | ДНК |
| SEQ ID NO: 41 | Экспрессионная кассета p455 CPV VP2 (Gen 0.95) | ДНК |
| SEQ ID NO: 42 | Экспрессионная кассета p430 RabG (n) | ДНК |
| SEQ ID NO: 43 | Экспрессионная кассета p455 RabG (n) | ДНК |
| SEQ ID NO: 44 | Десплейсированный прямой праймер | Искусственный |
| SEQ ID NO: 45 | Десплейсированный обратный праймер | Искусственный |
| SEQ ID NO: 46 | Прямой праймер Gen0.95 | Искусственный |
| SEQ ID NO: 47 | Обратный праймер Gen0.95 | Искусственный |

Примеры.

Представленные ниже примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области станет понятно, что технологии, описанные ниже в примерах, представляют технологии, определенные авторами изобретения как хорошо функционирующие при практическом осуществлении изобретения и, таким образом, они считаются относящимися к предпочтительным режимам его практического осуществления. Однако специалистам в данной области техники после ознакомления с данным описанием станет понятно, что существует возможность многочисленных изменений в конкретных описанных вариантах осуществления с получением такого же самого или подобного результата без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 1.

Изоляция вируса CAdV.

Вирус CAdV2 первоначально был выделен из мазка из ротоглотки собаки с ларинготрахеитом и был получен как первый пассаж в линии клеток MDCK CCL-34 Американской коллекции типовых культур (ATCC). Вирус пропускали 8 раз после приобретения, и 8-й пассаж разделяли на аликвоты и определяли как исходный вакцинный вирус. Посевной исходный вакцинный вирус CAdV-2 производили в Вое-

hringer Ingelheim Vetmedica, Inc. на основе CAdV-2, MSV Lot # 001-dil, F: 11-24-98. Главный посевной материал CAdV-2 является близко родственным с торонтским штаммом (номер доступа в Genbank U77082.1). CAdV-2 серийно производится компанией Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. как собачья вакцина.

Инфекционный клон ДНК является полным геномом CAdV-2, клонированным в pBR322 низкокопийный челночный вектор *E. coli*. Способ гомологической рекомбинации (Kremer, E.J., et al., Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol*, 2000. 74(1): p. 505 - 12.) применяли для построения ДНК инфекционных клонов. CAdV-2 ДНК очищали от посевного CAdV-2 MLV) и рекомбинировали в BJ5183 *E. coli* с вектором на основе pBR322, который содержит ДНК, гомологичную инвертированным конечным повторам CAdV-2.

CAdV-2 спасали из клеток почек собак Madine Darby (MDCK), трансфицированных линейаризованным инфекционным клоном ДНК с фиг. 1 для представления полного инфекционного клона ДНК.

Пример 2.

Генерация клонов CAdV с делецией E3 и вставкой.

CAdV-2 успешно использовали как векторную вирусную вакцину для животных. Известно, что домен E3 CAdV-2 не является незаменимым (ни одна из открытых рамок считывания E3 (ORF) не требуется для вирусной репликации в культуре ткани (Fisher et al. 2002) и представляет логическую мишень для вставки гетерологических ДНК.

Примерами эффективных вакцин на основе CAdV-2, в которых трансгены локализованы к домену E3, могут быть вирус собачьей чумы (Fisher et al. 2002), вирус панлейкопении кошачьих (Yang et al. 2008) и бешенства кошек (Hu et al., 2007), собак (Hu et al., 2006), мышей (Li et al., 2006), енотов, свиней (Lui et al., 2008), скунсов (Henderson et al., 2009) и овец (Bouet-Cararo et al., 2011).

Фиг. 2 является схемой организации участка E3 CAdV-2. Фрагмент рестрикционной эндонуклеазы NruI с 4146 п. о. (п. о. 23932)/SalI (п. о. 28078) иллюстрируется с открытыми рамками считывания (ORF), показанными как белок H-A VIII, ORF1, ORF2 и U-экзон. Для этого фрагмента ДНК показаны позиции выбранных сайтов рестрикционной эндонуклеазы (NruI, DraIII, SspI и SalI), и нумерация указывается относительно близкородственного торонтского штамма (номер доступа в Genbank U77082.1) CAdV-2.

Как указано в публикации Fischer et al. (2002), геномная организация E3 участков лишь приблизительно сохранена между разными аденовирусами (Linne, T., Differences in the E3 regions of the canine adenovirus type 1 and type 2. *Virus Res*, 1992. 23 (1-2): p. 119 - 33), поэтому точные границы несущественных локусов E3 участка CAdV2 не могут быть транспонированы из сайтов E3 вставки в другие вирусы. В первой последовательности весь сегмент ДНК ORF1 и ORF2 из E3 был делетирован для максимизации размера трансгенных вставок, однако инфекционные клоны ДНК не способствовали спасению гCAdV-2. Было обнаружено, что эта стратегия случайно приводит к удалению последних пяти кодонов (включая стоп-кодон) гена гексон-ассоциированного белка VIII (H-A-PVIII), который распространяется на E3 ORF1 (другая рамка считывания) в 5' E3 фланкирующей ДНК, с образованием в результате гена H-A PVIII с существенным удлинением 3' (результатом может быть H-A PVIII с делецией 5 аминокислот с последующим существенным с-конечным добавлением).

Таким образом, трансферные плазмиды были реконструированы таким образом, что 5' и 3' E3 фланкирующие ДНК содержали первые 183 п. о. E3 ORF1 и последние 47 п. о. ORF2, которые оказались достаточными для спасения гCAdV-2.

Пример 3.

Гомологическая рекомбинация для генерации инфекционных клонов днк CADV-2.

Гомологическую рекомбинацию в Rec⁺ BJ5183 *E. coli* между линейаризованными инфекционными клонами ДНК CAdV-2 и E3-направленными трансферными плазмидами / фрагментами CAdV-2 на основе способов, описанных в публикациях Chartier et al. (1996) и Kremer et al. (2000), применяли для генерации гCAdV-2 с кассетами экспрессии трансгена, локализованными к E3 домену. Как объясняется на фиг. 3, инфекционный клон, содержащий уникальный сайт рестрикции в E3 домене, рекомбинируется с трансферным фрагментом, содержащим ~500 п. о. CAdV-2 фланкирующую ДНК 5' и 3' к кассетам экспрессии трансгена для а) направления кассеты экспрессии трансгена на E3 участок и б) эффективного удаления выбранных частей E3.

ДНК была изолирована из расширенных клонов BJ5183, идентифицированных с применением трансген-специфического ПЦР-скрининга, и эти ДНК расщеплялись путем электрофореза на агарозном геле для подтверждения их миграции в >23,1 т. о. (успешный HR в результате обеспечивает разновидность ДНК ~ 35 т. о., которая, как суперскрученная ДНК, мигрирует похоже на 23,1 т. о. маркер на 0,7% агарозном геле). Данные ДНК после этого трансформировали и расширяли в Stbl2 или XL-10 Gold *E. coli* для очистки в большем масштабе и применения для генерации гCAdV-2 в клетках млекопитающих.

Фиг. 3 является схематическим изображением гомологической рекомбинации между NruI/SalI-линейаризованным инфекционным клоном ДНК (нативная последовательность CAdV-2) и E3-направляющим CAdV-2 трансферным фрагментом, который включает вышеупомянутую делецию E3 и уникальный(е) сайт(ы) рестрикции (определенный как MCS для сайта множественного клонирования), расположенный(е) между остальными частями E3. Инфекционный клон ДНК ограничивается левым и

правым инвертированными конечными повторами, LITR и RITR, соответственно.

Пример 4.

Генерация инфекционных клонов ДНК ΔE3 rCAdV-2.

Е3-делетированные rCAdV-2: ΔE3A и ΔE3B.

ПЦР с перекрытием праймеров применяли для генерации CAdV-2 E3-направляющих трансферных фрагментов, кодирующих выбранные E3 делеции и ~500 основ 5' и 3' фланкирующей последовательности для обеспечения направленной гомологической рекомбинации (HR) в BJ5183 E. coli. (см. Схемы на фиг. 4 и 5). Как показано на фиг. 5A и B, в "A" делеции (ΔE3A), все, кроме первых 186 нуклеотидов E3 ORF1 и последних 301 нуклеотида ORF2, были делетированы, тогда как для E3 "B" делеции (ΔE3B) 186 нуклеотидов E3 ORF1 и 83 нуклеотидов ORF2 остаются (см. SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 для 5' и 3' флангов).

Оба инфекционных клон, содержащие делеции ΔE3A и ΔE3B, были успешно спасены из трансфицированных клеток MDCK и E1 B-MDCK, что указывает на то, что специфические делеции E3 поддерживают вирусное спасение. Поскольку конфигурация ΔE3B охватывает большую E3-делецию, она становится оптимальной конструкцией для генерации rCAdV-2, несущей кассету экспрессии трансгена, двигающуюся вперед. Эта большая делеция указывает, что практически весь E3 участок, например, приблизительно 82% E3 участка, может быть делетирован без отрицательного влияния на вирусное спасение.

Пример 5.

Построение экспрессионных кассет с E3 делецией/вставкой с CMV промоторами.

Генерация промоторов HCMV-IE и CMV5.

Аmplификацию 3' конца непосредственного раннего промотора человеческого цитомегаловируса (hCMV-IE) (SEQ ID NO: 3) выполняли с применением ПЦР, как описано выше, с применениями пары праймеров hCMV-IE 5'F (SEQ. ID NO: 5) (5'- TTATTAATAGTAATCAATTACGGGG -3')/ hCMV-IE 3' R (SEQ. ID NO: 6) (5'- GCCACCGTACACGCCTACCGCCC -3') и ВАС ДНК EHV-gG (10 нг) как матрицы. Полученный в результате фрагмент ДНК впоследствии клонировали в вектор pCR™BluntII TOPO® (ThermoFisher Scientific) и вырезали путем расщепления рестрикционными ферментами Kpn-1 и BamH-1 и дальше клонировали в плазмидный челночный вектор на основе pUC18 для дальнейшей манипуляции и построения трансферных плазмид CAdV. Человеческий промотор CMV5 (SEQ ID NO: 4) синтезировали с применением GENSCRIPT® продуктов генного синтеза с 5'- 3' сайтами рестрикции Spe-1 и BamH-1, соответственно, и клонировали в челночный вектор pUC57 E. coli для дальнейшей манипуляции и построения трансферных плазмид CAdV.

Сравнение промоторной активности CMVIE и CMV5.

Сообщения в литературе продемонстрировали более надежную экспрессию белка из кассет экспрессии трансгена млекопитающих под управлением промотора CMV5 по сравнению с промотором CMVie. Промотор CMV5 отличается от промотора CMVie тем, что он содержит, после сайта начала транскрипции CMVie, ~560 п. о. ДНК, которая кодирует тройную лидерную последовательность аденовируса человеческого аденовируса типа 5 (HuAd5) с главным поздним энхансером аденовируса, окруженным сайтами донора и акцептора сплайсинга (Massie et al., 1995, Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. Nature Biotechnology 13: 602-608). Было продемонстрировано, что применение промотора CMV5 существенно усиливает экспрессию белка в 293 клетках (Massie et al., 1998, Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. Journal of Virology 72 (3): 2289 - 2296).

Согласно этим сообщениям, прямые сравнения экспрессии белка из кассет под управлением CMVie или CMV5 путем временной инфекции экспрессионных плазмид, содержащих CPV VP2, демонстрируют более надежную экспрессию белка из кассет экспрессии трансгена млекопитающих под управлением промотора CMV5 по сравнению с промотором CMVie. Как показано на фиг. 7, выполняли анализ силы промотора путем количественного определения экспрессии CPV VP2 путем временной экспрессии из экспрессионных последовательностей, как выявляется с помощью IFA в трансфицированных клетках MDCK. Панель А: показано CPV IFA клеток MDCK, трансфицированных экспрессионными плазмидами CPV VP2 под управлением промоторов CMVie или CMV5. Панель В: гистограмма CPV VP2 ELISA клеток MDCK, трансфицированных экспрессионными плазмидами CPV VP2 под управлением промоторов CMVie или CMV5. Панель С: гистограмма осуществляемого с применением Molecular Devices ImageXpress MicroXL количественного определения CPV VP2-положительных клеток MDCK, трансфицированных экспрессионными плазмидами CPV VP2 под управлением промоторов CMVie или CMV5, как указано. Результаты указывают, что промотор CMV5 может направлять надежную экспрессию трансгена, и экспрессия из CMV5 больше с точки зрения как оптической плотности IFA, так и относительного количества FITC-положительных клеток MDCK, чем в случае промотора CMVie. Таким образом, промотор CMV5 был выбран для управления транскрипцией экспрессионных кассет CAdV-2. Однако ни один из инфекционных клонов rCAdV-2, содержащих промотор CMV5, не обеспечивал спасения rCAdV-2.

Как показано в табл. 2, хотя CMV5 руководит надежной временной экспрессией трансгена VP2, ни один из инфекционных клонов rCAdV-2, содержащий промотор CMV5, не обеспечивал спасения rCAdV-

2.

Для прямой оценки возможности вмешательства промоторной последовательности CMV5 в спасение rCAV-2 фрагмент ДНК, содержащий промотор CMV5, сайт множественного клонирования (MCS) и последовательность полиаденилирования (polyA) обезьяньего вируса 40 (SV40) включали в E3 участок генома CAAdV-2. Все из компонентов ДНК, клонированных в ΔE3B, за исключением ~560 п. о. ДНК, что отличает CMV5 от CMVie (и MCS), являются частью ранее спасенных вирусов rCAV-2. Попытки спасения были неудачными, что явным образом указывает на то, что промотор CMV5 препятствует спасению rCAV-2. Для подтверждения этого вывода был разработан обратный эксперимент, согласно которому применяли гомологическую рекомбинацию для замены CMV5 MCS SV40 polyA участка в этом инфекционном клоне на "подходящую для спасения" экспрессионную кассету на основе CMVie.

Генерация CAAdV-2ΔE3B/CMVie EGFP, содержащая экспрессионную кассету CMV-IE-EGF, вставленную в участок ΔE3B генома CAAdV2.

RCAdV-2, содержащий экспрессионную кассету усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP, Clontech) (2,6 т. о. (SEQ ID NO.: 7, CMVie EGFP) был генерирован для способствования оценке вирусного спасения и тропизма в выбранных линиях клеток и видах *in vivo*. В общих чертах, CAAdV-2 ΔE3 B-направляющий CMVie EGFP трансферный фрагмент (EGFP ORF под управлением CMVie с последующей последовательностью полиаденилирования SV40 с фланкирующей ~500 п. о. CAAdV-2 ДНК, заканчивающейся в позиции 183 ORF1 (5') и начинающейся в позиции 82 CAAdV-2 E3 ORF2 (3')), применяли для гомологической рекомбинации для генерации rCAAdV-2ΔE3B/CMVie EGFP. Успешные HR события оценивали путем выявления видов ДНК с ~35 т. о. ПЦР-скрининг колоний выполняли для идентификации клонов, которые содержали кассету экспрессии трансгена (прямая P SEQ ID NO.: 8; обратная P SEQ ID NO.: 9). Положительные клоны визуализировали путем электрофореза на агарозном геле, причем положительный клон имел ~0,7 т. о. продукт ПЦР, который соответствовал трансгенной кассете EFG. Кроме того, надлежащую вставку трансгена и последовательность подтверждали путем анализа последовательности с применением секвенатора ILLUMINA® MiSeq, способов приготовления библиотек NextEr_XT и программы NexGene (Softgenetic; версия 2.3), и программы SEQUENCER® (Genecodes; версия 5.1).

Успешное Pme-1 расщепление rCAAdV-2GFP обеспечило на выходе два вида: ~32,7 т. о. (геном rCAAdV-2) и ~2,7 т. о. (фрагмент PBR322). Трансфекция клеток MDCK и E1 B-MDCK была достигнута с применением трансфекционного реагента LIPOFECTAMINE® 2000 (ThermoFisher Scientific). Инфекционные клоны rCAAdV-2ΔE3B/CMVie EGFP были успешно спасены из трансфицированных клеток MDCK и E1 B-MDCK, как указывал сигнал GFP через флуоресценцию в трансфицированных клетках. Вирусы собирали из супернатантов/лизатов трансфицированных клеток и подвергали трем последовательным циклам замораживания-размораживания (-70°C/37°C), стерилизовали путем фильтрации, а потом пропускали на MDCK и E1 B-MDCK. Инфицированные клетки затем наблюдали на зависимый от инфекции сигнал EGFP через флуоресцентную микроскопию (данные не показаны).

Кассету экспрессии трансгена CMVIE EGFP SV40 polyA успешно клонировали в ΔE3B домен CAAdV2. Рекомбинантный вирус был успешно спасен, и EGFP можно было выявить путем флуоресцентного микроскопического анализа после инфицирования.

Генерация и спасение rCAAdV-2 ΔE3B с экспрессионной кассетой усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) из rCAAdV-2 ΔE3B инфекционного клона, несущего не поддающийся спасению промотор CMV5.

Для подтверждения вывода о том, что промотор CMV5 ингибирует спасение rCAAdV-2 (см. выше раздел "Применение промотора CMV5 для экспрессии трансгена"), был проведен обратный эксперимент, в котором применяли гомологическую рекомбинацию для замены polyA участка CMV5 MCS SV40 в инфекционном клоне MCS-1 на экспрессионную кассету на основе CMVie, которая подвергалась "спасению". В общих чертах, указанный CAAdV-2 E3-направляющий трансгенный трансферный фрагмент CMVie EGFP применяли для гомологической рекомбинации для генерации ΔE3B rCAAdV-2 из инфекционного клона MCS-1-5 (MCS-1-5 содержит промотор CMV5, малый сайт множественного клонирования (MCS) и последовательность полиаденилирования SV40). Очищенный ~2,6 т. о. трансферный фрагмент EGFP и линейаризованный инфекционный клон ДНК rCAV-2, производный от MCS-1-5, совместно трансформировали через электропорацию в клетки BJ5183 E. coli, которые потом отбирали на планшетах с LB-агаром с 50 мкг/мл карбенициллина. ПЦР-скрининг колоний выполняли для идентификации клонов, которые содержали кассету экспрессии трансгена. Успешная гомологическая рекомбинация в результате дает вид ДНК с ~35 т. о., который, как суперскрученная ДНК, проходит вместе или несколько быстрее, чем 23,1 т. о. вид маркерной ДНК на 0,7% агарозном геле. Положительные клоны визуализировали путем электрофореза на агарозном геле (фиг. 4). Схема polyA экспрессионной кассеты CMVie EGFP SV40 в острове CAV-2 MCS-1-5 инфекционного клона ДНК объясняется на фиг. 8.

Расщепленный PmeI вирус rCAV-2 MCS-1-5 EGFP трансфицировали в клетки MDCK и клетки E1 B-MDCK с применением LIPOFECTAMINE® 2000 CD и 3000. Инфекционные клоны rCAAdV-2ΔE3B/CMVie EGFP, производные от инфекционного клона ДНК rCAAdV-2 MCS-1-5, успешно способст-

вовали спасению rCAV-2 из трансфицированных клеток E1 B-MDCK, как указывает сигнал GFP через флуоресценцию в трансфицированных клетках (данные не показаны). В Приложении VI (фон) высказывается предположение, что спасение rCAV-2, несущего EGFP экспрессионную кассету, производную от остова CAdV-2 MCS-1, дополнительно подтверждает вывод о том, что ингибирование спасения rCAV-2 зависит от CMV5 и локализовано к 560 п. о. последовательности ДНК huAd5 в CMV5.

Генерация rCAV-2ΔE3B/CMVie CPV VP2 (нативного), содержащего экспрессионную кассету CMV-IE-VP2, вставленную в ΔE3B участок генома CAd2.

Генерировали VP2 ген rCAV-2, который содержал парвовирус собачьих (CPV). В общих чертах, аналогично вышеупомянутому, CAdV-2 ΔE3-направляющий трансферный фрагмент, содержащий CPV VP2 ORF (SEQ ID NO.: 10) под управлением CMVie, применяли для гомологической рекомбинации для генерации ΔE3B rCAV-2, содержащего экспрессионную кассету VP2 (см. фиг. 9). Клоны, которые содержали успешную интеграцию трансгена, были выявлены путем ПЦР-скрининга, при котором 1,7 т. о. продукт ПЦР был визуализирован путем электрофореза на агарозном геле. Надлежащую вставку трансгена и последовательность подтверждали путем анализа последовательности с применением секвенатора ILLUMINA® MiSeq, способов приготовления библиотек NextEr_XT и программы NexGene (Softgenetic; версия 2.3) и программы SEQUENCER® (Genecodes; версия 5.1).

Успешное PmeI-1 расщепление rCAV-2GFP давало на выходе два вида: ~32,7 т. о. (геном rCAV-2) и ~2,7 т. о. (PBR322 фрагмент). Инфекционные клоны rCAV-2ΔE3B/CMVie CPV VP2 были успешно спасены из трансфицированных клеток MDCK и E1 B-MDCK, как выявляли с помощью CAdV-2 IFAs (данные не показаны). Хотя экспрессия белка CPV VP2 в инфицированных клетках была неудачной, как было выявлено из-за отсутствия иммунофлуоресцентной окраски антителом против белка VP2, присутствие кассеты экспрессии трансгена было выявлено в очищенных вирусных геномах путем ПЦР.

ПЦР-анализ rCAV-2 ДНК, очищенной от инфицированных клеток и супернатантов, осуществляли для проверки присутствия кассеты экспрессии трансгена CMVie CPV VP2 (n) в клонах rCAV-2ΔE3B/CMVie CPV VP2 (фиг. 10). Панель A: rCAV-2 контрольный вирус; панель B: клон #1; панель C: клон #2. Панель D: контрольные реакции с CMVie CPV VP2 (n) трансферная плазмида. M является 1 т. о. + маркером длины ДНК. Панель E: ожидаемые результаты специфических к трансгенной экспрессионной кассете ПЦР-реакций. В реакциях 1 и 2 использовали праймеры, специфические к CAV-2 H-A P VIII, U-экзон (SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12) и CVP VP2 (SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14); в реакциях 3, 4 и 5 использовали праймеры, специфические к CPV VP2 (см. панель E) (SEQ ID NO.: 15 - 20). В реакции 7 (положительная реакция для CAdV-2) используют CAV-2-специфический праймер H-A P VIII и праймер U-экзона (SEQ ID NO.: 21, SEQ ID NO.: 22).

Таким образом, хотя кассета экспрессии трансгена CMVIE CPV VP2 (n) SV40 polyA была успешно клонирована в домен ΔE3B CAdV2, рекомбинантный вирус успешно спасен, и присутствие последовательности VP2 было подтверждено, экспрессия белка VP2 не выявлялась.

Генерация rCAV-2ΔE3B/CMVie CPV VP2 (кодон-оптимизированного), содержащего экспрессионную кассету CMV-IE-VP2, вставленную в ΔE3B участок генома CAd2:

CAdV-2 E3-направляющий CMVie CPV VP2 кодон-оптимизированный (co) фрагмент передачи трансгена (CPV VP2 ORF (co) под управлением CMVie со следующей последовательностью полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (BGH) с фланкирующей ~500 п. о. CAdV-2 ДНК, которая заканчивается в позиции 183 ORF1 (5') и начинается в позиции 82 CAdV-2 E3 ORF2 (3')) (SEQ ID NO.: 23), генерировали путем ПЦР с перекрытием праймеров и клонировали в вектор ТОРО для архивации и амплификации. Последовательность применяли для гомологической рекомбинации для генерации ΔE3B rCAV-2.

Клоны, содержащие успешную интеграцию трансгена, выявляли путем ПЦР-скрининга, причем 2,3 т. о. продукт ПЦР визуализировали путем электрофореза на агарозном геле. Надлежащая вставка трансгена и последовательность были подтверждены анализом последовательности с применением секвенатора ILLUMINA® MiSeq, способов приготовления библиотек NextEr_XT и программы NexGene (Softgenetic; версия 2.3) и программы SEQUENCER® (Genecodes; версия 5.1).

Инфекционные клоны rCAV-2ΔE3B/CMVie CPV VP2 (co) были успешно спасены из трансфицированных клеток MDCK и E1 B-MDCK, что было продемонстрировано через CAdV-2 IFA, которую выполняли на P1-инфицированных клетках с применением антител против CAdV-2, прямо конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (данные не показаны). Для подтверждения того, что спасенный вирус кодирует кассету экспрессии трансгена CMVie CPV VP2 (co), очищали геномы rCAV-2 и P5 CAdV-2 вируса P2. ПЦР-анализ экстрагированных ДНК с применением праймеров, специфических к участкам генома CAdV-2 (гексон-ассоциированный белок VIII (H-A P VIII) и U-экзон), применяли промотор CMVie и CPV VP2 (данные не показаны). ПЦР-анализ выявил продукты ПЦР надлежащего размера, указывая на то, что очищенные P2 вирусные геномы кодируют кассету экспрессии трансгена CMVie CPV VP2 (co).

Проточный цитометрический анализ CMVie CPV VP2 (co) rCAV-2 инфицированных клеток с применением антител против CAdV2 и CPV VP2 применяли для подтверждения экспрессии инфицирован-

ных клеток MDCK. В общих чертах, суспензию клеток MDCK инфицировали rCAV-2 и контрольным rCAV-2 в 12-луночковом формате и культивировали в течение 72 ч (37°C, 5,0% CO₂ при 125 об/мин в увлажненном инкубаторе). После этого клетки собирали, промывали PBS, а потом, применяя CYTOFIX/CYTOPERM™ набор для фиксации/пермеабиллизации (BD Biosciences, Cat. #554714), обрабатывали фиксирующим раствором CYTOFIX™ с последующими двумя промываниями раствором для пермеабиллизации CYTOPERM™. После этого клетки инкубировали с FITC-конъюгированным антителом против CAdV-2 или антителом против CPV VP2 (антитело против CAV2: VMRD, Кат. # F-CAV-50X и антитело против CPV VP2: VMRD, Кат. # CJ-F-CPV 50X, соответственно), дважды промывали CYTOPERM™ и анализировали путем проточной цитометрии с применением системы проточной цитометрии BD Biosciences FACSCANTO™.

Фиг. 11 показывает результаты проточного цитометрического анализа инфицированных CMVie CPV VP2 (co) rCAV клеток MDCK. Панели A-F являются гистограммами сигнала, присутствующего в отдельных клетках. Суспензию клеток MDCK инфицировали контрольным вирусом rCAV-2, несущим BRSV F (co) (панели B и E) или инфицировали rCAV-2, несущим экспрессионные кассеты CPV VP2 (co) (панели C и F) и окрашивали через 72 ч после инфицирования FITC-конъюгированным антителом против CPV VP2 (панели A, B и C) или FITC-конъюгированным антителом против CAV2 (панели D, E и F). Панель G представляет сводку и подсчет результатов, показанных на фиг. 11. Результаты окраски антителом против CAV-2 показывают, что большинство rCAV2-BRSV F (co)- или rCAV2-CPV VP2 (co)-инфицированных (фиг. 1, панели E и F, соответственно) клеток MDCK экспрессируют белки CAdV2, тогда как неинфицированные клетки (фиг. 1, панель D) являются эффективно отрицательными для CAdV-2. Окраска антителами против CPV VP2 (фиг. 1, панели A, B и C) показывает, что только инфицированные rCAV2-CPV VP2 клетки MDCK (панель C) экспрессируют белки CPV VP2, хотя определенный фоновый сигнал наблюдается в неинфицированных и rCAV2-BRSV F-инфицированных клетках с антителами против CPV VP2 (панели A и B, соответственно).

Таким образом, CMVie CPV VP2 кодон-оптимизированная (co) кассета экспрессии трансгена была успешно клонирована в домен ΔE3B CAdV2. Рекомбинантный вирус был спасен из трансфицированных клеток MDCK, и кассета экспрессии трансгена была выявлена в очищенных вирусных геномах. CPV VP2 мРНК была выявлена в инфицированных клетках (данные не показаны), и экспрессия белка CPV VP2 в инфицированных клетках была подтверждена путем проточного цитометрического анализа, в отличие от нативной экспрессионной кассеты VP2.

Генерация rCAV-2 ΔE3B с экспрессионной кассетой слитого белка кодон-оптимизированного респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота, вставленной в ΔE3B участок генома CAdV2.

В общих чертах, CAdV-2 E3-направляющий трансферный фрагмент, содержащий слитый (F) белок CPV респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота (BRSV) ORF под управлением CMVie, со следующей BGH последовательностью полиаденилирования с фланкирующей ~500 п. о.

CAV-2 ДНК, которая заканчивается в позиции 183 ORF1 (5') и начинается в позиции 82 CAdV-2 E3 ORF2 (3'), применяли для гомологической рекомбинации для генерации ΔE3B rCAV-2. (SEQ ID NO.: 27). И нативную (n), и кодон-оптимизированную (co) версии гена BRSV F клонировали в среду вектора CAdV-2 и вирусы, несущие обе версии трансгена, были успешно спасены. Однако дальше применяли только ген BRSV F (co).

Инфекционные клоны rCAV-2ΔE3B/CMVie BRSV F (CO) были успешно спасены из клеток MDCK, на что указывает CPE клеток, инфицированных вирусными супернатантами/лизатами клеток. Присутствие кассеты экспрессии трансгена было выявлено в очищенных вирусных геномах. ДНК была экстрагирована из P3 rCAV2-BRSV F (co) вируса и использована как матрица для ПЦР-анализа для выявления присутствия гена BRSV F (co) в геноме вируса. Трансген секвенировали для подтверждения последовательности гена.

Экспрессия BRSV F инфицированными клетками была подтверждена путем проточного цитометрического анализа (см. фиг. 11).

Генерация rCAV-2 ΔE3B экспрессионной кассетой гликопротеина бешенства (n), вставленной в ΔE3B участок генома CAdV2.

В общих чертах, CAdV-2 E3-направляющий трансферный фрагмент, содержащий Гликопротеин пастеровского штамма бешенства (RabGP) ORF под управлением CMVie, со следующей последовательностью полиаденилирования BGH с фланкирующей ~500 п. о. CAdV-2 ДНК, которая заканчивается в позиции 183 ORF1 (5') и начинается в позиции 82 CAdV-2 E3 ORF2 (3'), применяли для гомологической рекомбинации для генерации ΔE3B rCAV-2. (SEQ ID NO.: 25) (см. фиг. 13). Нативный G ген пастеровского штамма бешенства подвергли ПЦР-амплификации из вакцины бешенства на основе оспы енота (вакцина rRCNV-бешенства G2), Lot #D 015-054-). Ожидаемый размер амплифицированной RabGP ДНК составляет ~1,6 т. о.

Фрагмент RabGP после этого лигировали в pUC 18-B-Bf1 b-CO фрагмент и трансформировали в TOP10 E. coli. ПЦР-скрининг колонии на RabGP ДНК выполняли, применяя RabGP-специфические праймеры (данные не показаны).

ДНК расщепляли PmeI для высвобождения трансферных фрагментов (~3,45 т. о.) и SeaI для разрезания остова вектора для способствования идентификации трансферных фрагментов. Очищенные ~3,45 т. о. PmeI CMVie RabGP (n) трансгенные (экспрессионная кассета) трансферные фрагменты и линейаризованные rCAV-2 инфекционные клоны ДНК совместно трансформировали через электропорацию в клетки BJ5183 E. coli, которые потом отбирали на планшетах с LB-агаром с 50 мкг/мл ампициллина. ПЦР-скрининг колоний выполняли для идентификации клонов, содержащих кассету экспрессии трансгена, и визуализировали путем электрофореза на агарозном геле (данные не показаны).

Расщепленные PmeI HR клоны ДНК трансфицировали в клетки E1 B-MDCK, применяя LIPOFECTAMINE® 2000 CD. Инфекционные клоны rCAV-2ΔE3B/CMVie RabGP были успешно спасены из трансфицированных клеток E1 B-MDCK, как указывается через CAdV-2 IFA, как показано на фиг. 14, CAdV-2 IFA инфицированных вирусом rCAV-2 RabGP P2 клеток E1B-MDCK с применением антител против CAdV-2, прямо конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), подтверждает спасение rCAV-2 как через антитело против RabG, так и иммунофлуоресценцию CAdV-2 (панели В и С, 48 ч и 72 ч после инфицирования).

Как указывается через флуоресцентные клетки (CAV-2+ и Rab+) на фиг. 14, панели В и С, клетки E1 B-MDCK, инфицированы вирусами rCAV-2 RabGP E2 и E3 для экспрессии бешенства G. Однако количество клеток Rab+ оказывается значительно меньше по сравнению с клетками CAdV-2+.

Таблица 2

Сводка ВИИ-генерированных инфекционных клонов rCAV-2

| | Трансген | Промотор | PolyA | Спасение | Экспрессия белка в инфицир. клетках | Трансферная последовательность |
|----|------------------|----------|-------|----------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | Нет: ΔE3A и B | N/A | N/A | Да | NT | SEQ ID NO.: 1, 2 |
| 2 | EGFP | CMVie | SV40 | Да | Да | SEQ ID NO.: 7 |
| 3 | CPV VP2 (n) | CMVie | SV40 | Да | NT | SEQ ID NO.: 10 |
| 4 | CPV VP2 (n) | CMV5 | SV40 | Нет | NT | N/A |
| 5 | CPV VP2 (co) | CMVie | BGH | Да | Да | SEQ ID NO: 23 |
| 6 | CPV VP2 (co) | CMV5 | SV40 | Нет | NT | SEQ ID NO.: 7NA |
| 7 | BRSV F | CMVie | BGH | Да | Да | SEQ ID NO: 27 |
| 8 | EGFP в MCS1 | CMVie | SV40 | Да | Да | N/A |
| 11 | Бешенство G (n) | CMVie | BGH | Да | Да | SEQ ID NO: 25 |
| 12 | Бешенство G (co) | CMVie | SV40 | Нет | NT | Данные не показаны |
| 13 | Бешенство G (co) | CMV5 | SV40 | Нет | NT | N/A |

N/A = не применяется;

NT = не испытали;

* = экспрессия, наблюдающаяся только с трансфекцией.

Как сведено в табл. 2, было генерировано много инфекционных клонов на основе ΔE3B, которые не способствовали спасению rCAV-2 из трансфицированных клеток MDCK или E1 B-MDCK. К ним относятся CPV VP2 и бешенство G, содержащие кассеты экспрессии трансгена под управлением промотора CMV5, клоны, содержащие гликопротеин бешенства G, причем нуклеотидная последовательность была кодон-оптимизированной (76% идентичности со штаммом SAD P5/88), и клоны, содержащие hMGFP (зеленый) (Promega) и MCherry (красный) (Clontech) репортерные последовательности флуоресцентного белка (данные не показаны).

Эта изменчивость, при сравнении между вставками сравнимого размера, является не просто отображением оптимизации кодонов, поскольку нативные и кодон-оптимизированные последовательности способствовали спасению rCAV-2, несущего BRSV F и CPV VP2 (см. выше табл. 2). Действительно, инфекционные клоны rCAV-2, несущие нативный hMGFP и MCherry ORF, также не способствовали спасению rCAV-2 (данные не показаны). Взятые вместе, эти данные указывали на то, что применение промоторов CMV в контексте векторной платформы CAdV-2 является непрогнозируемым, и выбор промотора является значительным фактором в построении экспрессионной кассеты, поскольку он может в значительной мере влиять на спасение клонов rCAV-2.

Пример 6.

Экспрессионные кассеты с промоторами EHV4.

Идентификация и построение новых промоторов лошадиного происхождения.

Были идентифицированы и изолированы новые гетерологические лошадиные промоторы из лошадиного герпесвируса типа 4 (EHV4). Интерес представляли два промотора; (1) 600 п. о. EHV-4 gG промотор (4pgG600) (SEQ ID NO.: 29) в ORF70, кодирующий гликопротеин G (gG); и (2) 600 п. о. EHV-4 MCP промотор (4pMCP600) (SEQ ID NO.: 30) в ORF42, кодирующий основной капсидный белок (MCP). Ген гликопротеина G (orf70) является активным на протяжении раннего и позднего времени цикла репликации (Colle et al. 1995, Drummer et al. 1998). Основной капсидный белок является одной из наиболее многочисленных составных вириона и требуется для составления капсид в ядре клетки, если недавно синте-

зированная вирусная ДНК готова к упаковке. Таким образом, можно ожидать, что его промотор должен быть активным на протяжении раннего и позднего времени в цикле вирусной репликации. Чувствительные к ограничению размера остова CAdV, обе промоторные последовательности EHV-4 были усечены до приблизительно 75% их первоначальной длины. В частности, 600 п. о. 4pgG600 промотор был усечен до 430 п. о. для генерации промоторного фрагмента p430 (SEQ ID NO.: 31), и 600 п. о. 4pMCP600 промотор был усечен до 455 п. о. для генерации промоторного фрагмента p455 (SEQ ID NO.: 32).

Генерация вирусоподобных частиц (VLP) инфицированными вирусом вакцины rCAdV-2 клетками может быть ключевым фактором для эффективности вакцины аденовируса собачьих (CAdV-2). Хотя rCAdV-2, содержащий экспрессионную кассету CPV VP2 под управлением CMVie, может быть спасен, как было детально указано выше, существенная экспрессия VP2 (для генерации VLP) в rCAdV-2 CMVie CPV VP2 инфицированных клетках не может быть достигнута с применением традиционного промотора CMVie. Кроме того, rCAdV-2 VP2 вирус, содержащий промотор CMV5, не может быть спасен. Таким образом, существовала заинтересованность в применении новых промоторов с вышеупомянутыми характеристиками, способных руководить надежной, устойчивой, воспроизводимой экспрессией нужных антигенов.

Генерация BamHI CAdV-2 трансферных плазмид, содержащих EHV-4 P CPV VP2 (co): генерация KpnI/EHV-4 P ДНК.

Фрагменты gG430 и MCP455 промоторов EHV-4 были амплифицированы с помощью градиентной ПЦР с применением следующих пар олигонуклеотидов: gG430 F: TTAAAGGTACCTCTATTTGAG-GACCCGCCGAGTACC (SEQ ID NO.: 33);

gG430 R: AAATTTGGATCCAACCTGCAGCTTATCACAGCTTTACAGGTGG (SEQ ID NO.: 34)

MCP455 F:

TTAAAGGTACCACCTGGTGGTAGCATATACTACCTTTATTTATACGC (SEQ ID NO.: 35);

MCP455 R: AAATTTGGATCCGATCCTATGGTAGCGGTAACACCG, (SEQ ID NO.: 36), соответственно.

Ожидаемые размеры амплифицированных gG430 и MCP455 ДНК составляют 454 и 479 п. о., соответственно.

Предварительно приготовленные трансфертные плазмиды CAdV-2, которые применяли для успешной интеграции в ΔE3B и спасение rCAV-2 (как было подробно указано выше), применяли как основу промотора EHV-4, который содержал трансферную плазмиду CPV VP2, путем обмена на основе BamHI/KpnI промотора CMVie на промоторы EHV-4.

Две разные кодон-оптимизированные последовательности CPV VP2, обозначенные как "десплейсированные" (SEQ ID NO.: 37) и "Gen0.95" (SEQ ID NO.: 38), применяли для приготовления трансферных плазмид CAdV-2, которые содержали экспрессионные кассеты под управлением CMVie. Gen0.95 является кодон-оптимизированной последовательностью CPV VP2, полученной от Genscript с Codon Adaptation Index (CAI) 0.95. Анализ Gen0.95 с применением алгоритма поиска сайтов сплайсинга (2013/2014 © Human Splicing Finder -Designed by Ghadi Raï; Inserm UMRS910 - Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05) указывал на присутствии 43 потенциальных донорных сайтов сплайсинга. 89 нуклеотидных изменений (5,07% изменения последовательности относительно Gen0.95) было осуществлено для удаления 40 донорных сайтов сплайсинга, которые не изменяли аминокислотную последовательность и не генерировали наименее благоприятные кодоны на основе видов собачьих.

Очищенные ~3,5 т. о. PmeI EHV-4 P CPV VP2 (co) трансферные фрагменты, содержащие две вышеупомянутые VP2 последовательности, и линейризованный rCAV-2 инфекционный клон ДНК совместно трансформировали через электропорацию в клетки BJ5183 E. coli для гомологической рекомбинации. Интактные клоны отбирали на планшетах с LB-агаром с 50 мкг/мл ампициллина. Клоны с надлежащим размером и ориентацией интеграции идентифицировали путем ПЦР-скрининга, отбирали и расширяли.

Успешное PmeI-расщепление инфекционных клонов rCAV-2 дает на выходе виды ДНК ~33,5 (геном rCAV-2) и ~2,7 (фрагмент pBR322) т. о. PmeI-расщепленные инфекционные клоны трансфицировали в E1 B-MDCK и клетки MDCK с помощью LIPOFECTAMINE® 3000. Вирусы пассажей с 1-го (P1) по 7-й (P7), обозначенные как rCAV2ΔE3B/pgG430-VP2 (десплейсированные) (SEQ ID NO.: 39), rCAV2ΔE3B/gG430-VP2 (Gen 0.95) (SEQ ID NO.: 40) или rCAV2ΔE3B/p455 -VP2 (Gen0.95) (SEQ ID NO.: 41), были собраны из трансфицированных клеток супернатантов/лизатов, подвергнутых трем последовательным циклам замораживания-размораживания (-70°C/37°C), стерилизовали путем фильтрации, а потом пропускали на клетках E1 B-MDCK.

AI-ST-клетки инфицировали отобранным rCAdV-2 для иммунофлуоресцентных анализов (IFA) на экспрессию белка CAdV-2 и CPV VP2. Через 72 ч после инфицирования клетки фиксировали с применением набора для фиксации/пермеабиллизации CYTOFIX/CYTOPERM™ (BD Biosciences, Cat. #554714), обрабатывали фиксирующим раствором CYTOFIX™ с последующими двумя промываниями раствором для пермеабиллизации CYTOPERM™. После этого клетки инкубировали с FITC-конъюгированным антителом против CAdV-2 или антителом против CPV VP2 (антитело против CAdV2 (mAb): VMRD, кат. # F-CAV-50X и антителом против CPV VP2: VMRD, кат. # CJ-F-CPV 50X, соответственно), дважды промыва-

вали CYTOPERM™ и анализировали путем проточной цитометрии с применением системы проточной цитометрии BD Biosciences FACSCANTO™.

Белки CAAdV-2 и CPV VP2 легко визуализируются с помощью IFA и выявляются путем FC в значительной части клеток AI-ST 2015, инфицированных rCAAdV-2, который несет два разных нуклеотидных варианта CPV VP2 (Despl и Gen0.95, через 48 и через 72 ч после инфицирования). Значительное количество белка CPV VP2 было идентифицировано в культуре ткани супернатантов/ лизатов (после замораживания/размораживания) путем дот-блот анализа (и это весьма вероятно отображает присутствие составных VLP).

Результаты с фиг. 19 показывают, что белки CAV-2 и CPV VP2 легко визуализируются путем IFA инфицированных AI-ST-клеток (но не в клетках, инфицированных rCAAdV-2, который кодирует нерелевантный трансген BRSV), указывая на надежную экспрессию CPV VP2 из десплейсированного и Gen0.95 CPV VP2 (co) вариантов последовательности под управлением промоторов gG430 и MCP455 EHV-4 (см. фиг. 19A). Экспрессию CPV VP2 выявляли в менее чем 3% клеток, инфицированных первоначальным rCAAdV-2 CMVie CPV VP2 (см. фиг. 15), что указывает на то, что rCAAdV-2, несущий экспрессионные каскады CPV VP2 под управлением новых производных от EHV4 промоторов p430 и p455, может быть успешно спасен. Неожиданно было выявлено, что экспрессия CPV VP2 под управлением промоторов gG430 и MCP455 EHV-4 была выявлена в 14-36% инфицированных клеток (см. фиг. 16) по сравнению с векторами CAAdV, в которых промоторные последовательности CMV5 использовали в месте ΔE3B, и в этом случае вирусное спасение было неудачным.

Дот-блот анализ выполняли для того, чтобы проанализировать экспрессию трансгена в инфицированных клетках. В общих чертах, осветленную (6000 × г, 5 мин) культуру ткани супернатантов/лизатов (замораживание/размораживание) из инфицированных клеток AI ST (для rEHV-1) и E1B MDCK (для rCAAdV-2) подвергали серийным разбавлениям PBS перед добавлением в устройство и адсорбировали в PVDF путем отсасывания. Следующими этапами являются 30-минутное подвергание действию 5,0% BioRad Blotting Grade Blocker в TBST, 1,0-часовое подвергание действию 1° антител, три промывания TBST и 1,0-часовое подвергание действию конъюгированных с пероксидазой 2° антител (против мыши и против свиньи, Jackson ImmunoResearch) и визуализация через TMB. Для количественного определения дот-блоты анализировали с помощью программы Image (Burger, W., Burge, M.J. (Eds.), 2008. Digital Image Processing: An algorithmic introduction using Java. Springer-Verlag, New York). Цвета изображений инвертируют для вычитания фона и записывают интегральную плотность каждой точки. Значениям присваивают знаки + и - таким способом: "++++" = >800000, "+++" = от 500000 до 800000, "++" = от 300000 до 499999, "+" = от 120000 до 299999, "+/" = от 80000 до 119999, и "-" = <80000.

Как видно на фиг. 17, сильный сигнал белка CPV VP2 наблюдали в культуре ткани супернатантов / лизатов из клеток, инфицированных rCAAdV-2, который кодирует экспрессионные каскады для CPV VP2 под управлением промотора EHV-4, тогда как не выявлялся сигнал в образцах из клеток, инфицированных rCAAdV-2, который кодирует нерелевантную экспрессионную каскаду. Эти результаты показывают, что значительное количество белка CPV VP2 было распознано в супернатантах культуры ткани. Эти результаты с большой вероятностью отображают присутствие составных CPV VP2 VLP. В этом состоит отличие от первоначальных rCAAdV-2 CMVie CPV VP2, в которых дот-блот анализ показал, что сигнал CPV VP2 под управлением CMVie был на таком же уровне или ниже фонового уровня - и на сравнимом уровне с супернатантами/лизатами из отрицательных контрольных образцов (CAAdV-2, rCAAdV-2 CMVie BRSV F-инфицированные клетки и супернатанты/лизаты культуры клеток из неинфицированных клеток).

Как показано на фиг. 17, белок VP2 может быть распознан в супернатанте и, таким образом, можно ожидать, что он должен быть в конформации, которая должна быть иммуногенной. Важно то, как обсуждалось выше, что спасение рекомбинантного CAAdV-2 не достигалось в клоонах, в которых трансген находился под управлением промоторных последовательностей CMV5. Таким образом, новые производные от EHV-4 промоторные последовательности согласно настоящему изобретению, такие, как pG430 и p455, не только способствуют экспрессии трансгена, но и поддерживают ключевой этап вирусного спасения.

Генерация трансферных плазмид CAAdV-2, содержащих EHV-4 промоторы CPV RabG (n).

Вторую последовательность CAAdV-2 генерировали, применяя новый производный от EHV-4 промотор p455 согласно настоящему изобретению. RAdV-2 RabG (n) был выбран, поскольку экспрессия инфицированными клетками не наблюдалась при применении традиционного промотора CMVie.

Целью данного эксперимента было подтверждение активности нового промотора EHV-4 в контексте rCAAdV-2 со вторым трансгеном, RabG (мембранным белком) путем измерения осуществляемой под управлением промотора EHV-4 экспрессии белка RabG инфицированными rCAAdV-2 p455 RabG (n) клетками AI-ST 2015.

Последовательность RabG (n) изолировали из спасенного rCAAdV-2 CMVie RabG (n) (SEQ ID NO.: 25), как обсуждалось выше. 1596 п. о. RabG (n) последовательность, включая последовательность Козак непосредственно 5' от ATG START-кодона, вырезали рестрикционными эндонуклеазами BamHI и SalI (5' и 3', соответственно) и лигировали в вырезанные BamHI/SalI трансферные фрагменты rCAAdV с промото-

ром gG430 и промоторами MCP455, которые потом трансформировали в TOP10 *E. coli*.

Очищенные ~3,3 т. о. трансферные фрагменты PmeI EHV-4 P RabG (n) и линейаризованный rCAV-2 инфекционный клон ДНК совместно трансформировали через электропорацию в клетки BJ5183 *E. coli* для гомологической рекомбинации. Интактные клоны отбирали на планшетах с LB-агаром с 50 мкг/мл карбенициллина. ПЦР-скрининг колоний выполняли для идентификации клонов EHV-4 pG430/RabG (n) (SEQ ID NO.: 42) и EHV-4 p455/RabG (n) (SEQ ID NO.: 43). Клоны отсеивали с помощью праймеров, специфических к RabG ДНК, и визуализировали путем электрофореза на агарозном геле. Ожидаемые ДНК имеют размер 1501 п. о.

Расщепленные PmeI инфекционные клоны трансфицировали в клетки E1 B-MDCK и MDCK с помощью LIPOFECTAMINE® 3000. Вирусы пассажей 1-7 (P 1-P7), обозначенные как pCAV2ΔEB3/gG430 или MCP455 RabG (n), собирали из трансфицированных клеток супернатантов/лизатов, подвергнутых трем последовательным циклам замораживания-размораживания (-70°C/37°C), стерилизовали путем фильтрации, а потом пропускали на клетках E1 B-MDCK.

IFA и проточную цитометрию применяли для оценки осуществляемой под управлением промотора EHV-4 экспрессии RabG в инфицированных rCAV-2 клетках AI-ST 2015. Экспрессию белка CAdV-2 зондировали анти-CAdV-2 FITC-конъюгированными свинными поликлональными антителами (VMRD). Экспрессию белка RabG зондировали мышинными моноклональными антителами (Novus). Белки CAdV-2 и RabG легко визуализируются с помощью IFA и выявляются путем FC в клетках AI-ST 2015, инфицированных rCAV-2, несущих RabG (n) (через 72 ч после инфицирования).

Результаты на фиг. 18 указывают, что белки CAV-2 и RabG легко выявляются в клетках AI-ST 2015, инфицированных выбранными rCAV-2 и rEHV-1, путем проточного цитометрического анализа. Эти результаты демонстрируют существенную экспрессию RabG под управлением промотора MCP455 EHV-4. В отличие от этого, хотя RabG легко выявляется в клетках, инфицированных rCAV-2 p455 RabG (см. фиг. 19B и C), экспрессия выявляется у < 2,0% клеток, инфицированных первоначальным rCAV-2 CMVie RabG (см. фиг. 18).

Следовательно, polyA кассеты экспрессии трансгена gG430 и MCP455 RabG (n) SV40 были успешно клонированы в домен ΔE3B CAdV-2. Рекомбинантный вирус был спасен из трансфицированных клеток E1 B-MDCK, как указывается через CPE в инфицированных вирусом клетках. Осуществляемая под управлением промотора MCP455 экспрессия трансгена RabG с применением rCAV-2 в инфицированных клетках AI-ST 2015 и BIVI 2011 MDCK была подтверждена с помощью IFA и проточной цитометрии.

Пример 7.

Приготовление фармацевтических композиций (вакцин), включающих rCAV-CMV/CPV VP2.

Парвовирус собачьих (CPV) является высокоинфекционным вирусом, который может вызывать высокую заболеваемость и смертность, в зависимости от вирулентности, хозяина и факторов среды. Применение эффективной программы вакцинации для собак с применением MLV и убитых вирусных вакцин на протяжении последних 30 лет значительно снизило показатели смертности. CPV представляет собой лишенный оболочки однониточный ДНК-вирус с двумя структурными белками (VP1 и VP2), которые образуют капсиду. Известно, что VP2 участвует в вирусной патогенности и иммунной реакции хозяина и, таким образом, является оптимальным выбором для включения и экспрессии в рекомбинантной системе CAdV2.

Цель данного исследования состояла в выполнении предварительной оценки эффективности экспериментальной вакцины rCAV2-CPV VP2 по сравнению с комбинированной вакциной MLV. Комбинация MLV содержала аденовирус собачьих 2-го типа (CAV2), вирус собачьей чумы (CDV) и парвовирус собачьих (CPV), смешанные на уровне между установленной минимальной иммунизирующей дозой и дозой высвобождения каждой фракции, как установлено в текущих продуктах для каждого конкретного антигена.

В этом исследовании rCAV2-CPV VP2 вводили в двухдозовом режиме с трехнедельным интервалом щенкам 7-недельного возраста или старшим для того, чтобы определить, обеспечивает ли векторная вакцина CAdV-CPV VP2 защиту от провокации CPV. На данное время, поскольку MLV вакцины являются общепринятым стандартом для защиты от CPV и ICH, испытанную группу сравнивали с группой щенков 7-недельного возраста, которым в двухдозовом режиме с трехнедельным интервалом вводили комбинацию MLV вакцины, которая включала CPV, CDV и CAdV2. Эта группа считалась положительной контрольной группой. Третьей группе в двухдозовом режиме с трехнедельным интервалом вводили PBS как провоцирующий контроль. Собакам вводили провоцирующую дозу CPV-2b приблизительно через три недели после второй вакцинации с целью оценки эффективности.

Испытательные вакцины вводили двенадцати (12) здоровым, CAV2- и CPV-серонегативным собакам возрастом от 6 недель 2 дней до 7 недель 2 дней как 1 мл подкожную дозу, которую вводили в двухдозовом режиме с трехнедельным интервалом. Двенадцать (12) животных разбивали на 2 испытываемые группы таким образом: группа 1 - rCAV2-CPV VP2 @ 8,0 logs/мл; группа 2 - комбинация MLV (CAV2, CDV, CPV).

Фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) вводили группе из шести (6) здоровых, CAV2- и CPV-серонегативных собак возрастом от 6 недель 2 дней до 7 недель 2 дней как 1 мл подкожную дозу в двух-дозовом режиме с трехнедельным интервалом. Эту группу считали группой 3, и она служила в качестве провокационного контроля для исследования. Всем животным в группах 1-3 ороназально вводили провоцирующую дозу вирулентного CPV-2b на 22 DPV2. Данные клинического случая после провокации (клинические признаки, пирексия, лимфопения, лейкопения и выявление CPV в фекалиях) анализировали.

Рецептирование вакцины.

Посевной материал культуры тканей rCAV2-CPV VP2 разбавляли 0,01M PBS до целевой дозы, как указано ниже. Адьюванты не применяли. MLV-положительный контроль рецептировали и лиофилизировали с SGGK стабилизатором, причем каждый из антигенов в комбинации имел выше чем минимальную иммунизирующую дозу для линии продукта SOLOJEC®. Целевые дозы для вакцин были следующими:

Таблица 3

| Группа | Вакцина | Целевая доза (Log ₁₀ FAID ₅₀ /мл) |
|--------|----------------------|---|
| 1 | rCAV2-CPV VP2 | ~8,0 |
| 2 | MLV (CAV2, CDV, CPV) | CAV2 - ~3,8-5,0 CDV - ~1,6-3,0 CPV - ~3,6-4,8 |
| 3 | PBS или MEM | NA |

Провоцирующий материал.

В день введения провоцирующей дозы три флакона замороженного провоцирующего материала CPV-2b подвергали быстрому размораживанию путем ручного перемешивания флакона(ов) в водной ванне 36±2°C. Материал после этого разбавляли 1:10 в среде для культивирования клеток до нужной концентрации. Провоцирующий инокулят оставался на льду все время в течение периода приготовления и провокации.

Титрование вакцинного антигена: CAV 2-CPV VP2.

В общих чертах, осуществляли десятикратное серийное разбавление вакцины. Каждое разбавление добавляли в каждую из 5 лунок в количестве 100 микролитров на лунку в 96-луночные планшеты с посевом клеток Мадин-Дарби почек собак (MDCK) в количестве 2,0×10⁵ клеток/мл. Для каждой вакцины выполняли пять реплик. Планшеты инкубировали в количестве 36±1°C и 5±0,5% CO₂ в течение 4±1 дней. После периода инкубации планшеты фиксировали, окрашивали только на вектор и считывали. Титры рассчитывали для 50% конечной точки с применением способа Рида и Менча.

Положительный контроль (CPV-CDV-CAV2).

В общих чертах, осуществляли десятикратное серийное разбавление вакцины. Каждое разбавление добавляли к каждой из 5 лунок в количестве 100 микролитров на лунку в 96-луночные планшеты с посевом соответствующей концентрации клеток (CPV - MDCK в количестве 2×10⁵ клеток/мл, CDV - VERO в количестве 2×10⁵ клеток/мл, CAV2 - MDCK в количестве 2×10⁵ клеток/мл). Для каждой фракции антигена выполняли пять реплик. Планшеты инкубировали при 36±1°C и 5±0,5% CO₂ в течение 3-6 дней. После инкубационного периода планшеты фиксировали, окрашивали прямым конъюгатом FA и считывали. Титры рассчитывали для 50% конечной точки с применением способа Рида и Менча.

Сыворотка.

До 10 мл цельной крови с каждой собаки собирали каждую неделю на сыворотку, начиная с 0 DPV1. Конкретные моменты времени были следующие: 0 DPV1, 7 DPV1, 14 DPV1, 21 DPV1/0 DPV2, 7 DPV2 и 14 DPV2. Крови давали свернуться, центрифугировали при 1000-1300 × g для отделения сыворотки и распределяли на по крайней мере 2 аликвоты. Образцы сыворотки сохраняли при -20°C или более низкой температуре до оценки на титр антитела.

Серологический анализ выполняли, применяя анализ сывороточной нейтрализации (SN). SN-анализ применяли для измерения титров сывороточного антитела к CAV2, CPV-2b и CPV-2c.

В общих чертах, для серологического анализа CAdV2 серийные разбавления инактивированных нагреванием образцов сыворотки смешивали с одинаковыми объемами вирусной суспензии (от 50 до 300 FAID₅₀). Смесь сыворотки-вируса инкубировали при 36±1°C в течение одного часа. В 96-луночные микротитровальные планшеты после этого высевали клетки MDCK (2×10⁵ клеток/мл в количестве 0,1 мл/лунку). Планшеты инкубировали при 36±1°C в увлажненном 5±0,5% CO₂ инкубаторе в течение 5±1 дней. Планшеты фиксировали холодным ацетоном в течение 15±5 мин и вирус выявляли с помощью удельной флуоресценции. Невозможность выявления вируса путем иммунофлуоресценции указывала на присутствие SN-антител. Для определения титров SN-антител конечные точки 50% нейтрализации рассчитывали с применением способа Рида и Менча.

Таблица 4

Значения CAV2 SN GMT

| Группа | D0 (0 DPV1) | D7 | D14 | D21 (0 DPV2) | D28 | D35 | D43 (0 DPC) | D50 | D57 |
|-------------------------|----------------|-----|-----|-----------------|------|------|----------------|------|------|
| rCAV2-CPV VP2 | 1 | 703 | 967 | 645 | 3160 | 3069 | 2170 | 1448 | 1184 |
| MLV | 1 | 7 | 575 | 196 | 384 | 418 | 308 | 228 | 215 |
| Провокационный контроль | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

В общих чертах, для серологического анализа CPV-2b серийные разбавления инактивированных нагреванием образцов сыворотки смешивали с одинаковыми объемами вирусной суспензии (от 50 до 300 FAID50). Смесь сыворотки-вируса инкубировали при $36\pm 1^\circ\text{C}$ в течение одного часа. Клетки почек собаки (DKFD-00) ($2,5\times 10^5$ клеток/мл в количестве 0,1 мл/лунку) после этого добавляли во все лунки 96-луночного микротитровального планшета. Планшеты инкубировали при $36\pm 1^\circ\text{C}$ в увлажненном $5\pm 0,5\%$ CO_2 инкубаторе в течение 6 ± 1 дней. Планшеты фиксировали холодным ацетоном в течение 15 ± 5 мин и вирус выявляли с помощью удельной флуоресценции. Невозможность выявления вируса путем иммунофлуоресценции указывала на присутствие SN-антител. Для определения титров SN-антител конечные точки 50% нейтрализации рассчитывали с применением способа Рида и Менча.

Таблица 5

Значения CPV-2b SN GMT

| Группа | D0 (0 DPV1) | D7 | D14 | D21 (0 DPV2) | D28 | D35 | D43 (0 DPC) | D50 | D57 |
|-------------------------|----------------|----|------|-----------------|------|------|----------------|-------|-------|
| rCAV2-CPV VP2 | 1 | 1 | 1 | 6 | 724 | 484 | 558 | 484 | 14596 |
| MLV | 1 | 34 | 1085 | 2170 | 6137 | 6502 | 10935 | 10321 | 10321 |
| Провокационный контроль | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1007 | 8192 |

В общих чертах, для серологического анализа CPV-2c серийные разбавления инактивированных нагреванием образцов сыворотки смешивали с одинаковыми объемами вирусной суспензии (от 50 до 300 FAID50). Смесь сыворотки-вируса инкубировали при $36\pm 1^\circ\text{C}$ в течение одного часа. В 96-луночные микротитровальные планшеты после этого высевали клетки MDCK (7×10^4 клеток/мл в количестве 0,1 мл/лунку). Планшеты инкубировали при $36\pm 1^\circ\text{C}$ в увлажненном $5\pm 0,5\%$ CO_2 инкубаторе в течение 5 ± 1 дней. Планшеты фиксировали холодным ацетоном в течение 15 ± 5 мин и вирус выявляли с помощью удельной флуоресценции. Невозможность выявления вируса путем иммунофлуоресценции указывала на присутствие SN-антител. Для определения титров SN-антител конечные точки 50% нейтрализации рассчитывали с применением способа Рида и Менча.

Таблица 6

Значения CPV-2c SN GMT

| Группа | D0 (0 DPV1) | D7 | D14 | D21 (0 DPV2) | D28 | D35 | D43 (0 DPC) | D50 | D57 |
|-------------------------|----------------|----|-----|-----------------|------|------|----------------|------|-------|
| rCAV2-CPV VP2 | 1 | 1 | 2 | 9 | 911 | 684 | 383 | 342 | 10935 |
| MLV | 1 | 14 | 418 | 1772 | 6502 | 8192 | 6137 | 9742 | 7298 |
| Провокационный контроль | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 103 | 724 |

Четкий иммунный ответ был замечен относительно 3 групп при сравнении друг с другом антител CAdV2, CPV-2b и CPV-2c.

Группа CAdV2-CPV VP2 демонстрировала значительно более сильный иммунный ответ на CAdV2 в 7 DPV1 по сравнению с группой MLV, однако до 14 DPV1 значения GMT в группах были похожими. Титры антитела для обеих групп снижались до 21 DPV1, когда животные получали бустерную дозу. После бустерной дозы уровень антител в обеих группах достигал пика, а потом постепенно выравнивался, причем в группе CAdV2-CPV VP2 выравнивание было с более высоким титром, чем в группе MLV. Отрицательная контрольная группа оставалась отрицательной для антител CAdV2 на протяжении всего исследования.

В отличие от иммунного ответа на антитело CAdV2 в 2 вакцинированных группах, иммунный ответ на антитело CPV группы CAdV2-CPV VP2 был минимальным до второй вакцинации, когда титр антитела CPV достиг пика в 7 DPV2, а потом выравнивался до провокации с применением CPV. После провокации иммунный ответ в группах CAdV2-CPV VP2 снова достиг пика. Вакцина MLV хорошо реагировала на первую вакцинацию, с дополнительным ответом на вторую вакцинацию. Уровень антитела CPV в группе MLV выравнивался после второй вакцинации и не демонстрировал значительного повышения на протяжении фазы провокации в исследовании. Отрицательные контрольные животные оставались отрицательными для антител CPV на протяжении всей фазы вакцинации до первого кровопускания после времени провокации, когда они демонстрировали значительный титр антитела CPV.

Клинические наблюдения.

Всех животных наблюдали и каждый день измеряли ректальную температуру для базового уровня до ближайшей десятой градуса (Фаренгейт) в -2, -1 и 0 DPC. После провокации животных наблюдали каждый день в течение периода до 14 дней, когда измеряли ректальную температуру и осуществляли наблюдение клинических признаков. Клетки с животными не чистили до завершения наблюдений соответствующего дня.

Клинические признаки CPV включали, кроме прочего, следующие: (1) кровавый стул - характерный стул, содержащий по крайней мере 10% крови, обычно в сочетании с диареей и/или слизью; стул обычно имеет темно-красный цвет и имеет заметный сильный железный запах; (2) слизеподобный стул - характерный стул, содержащий по крайней мере 10% слизи, может сочетаться с диареей и может содержать или не содержать кровь. Слизеподобный стул может иметь или не иметь структуру и/или форму; (3) диарея - водянистая, без структуры, однородные лужи; (4) жар указывался, если ректальная температура составляла $\geq 103,4^{\circ}\text{F}$ и по крайней мере на 1 градус по Фаренгейту выше базового уровня температуры. Гипотермия указывалась, если температура составляла $99,5^{\circ}\text{F}$ или ниже и по крайней мере на один градус по Фаренгейту ниже базового уровня температуры.

Всех собак взвешивали до ближайшей десятой килограмма (кг) в 0, 7 и 14 DPC для определения потери/прибавки веса после провокации. Все показатели фиксировали в Записях массы тела.

Относительно клинических признаков единичный случай любого клинического признака, типичного для инфекции CPV, включая, диарею, слизь в стуле или кровь в стуле после провокации, которые определяли животное как положительное на клинические признаки. Отсутствие аппетита, подавленность/сонливость и наличие рвоты также записывали как подтверждающие критерии для оценки животного как положительного на инфицирование парвовирусом.

У четырех (4) из 18 животных в этом исследовании наблюдалась диарея или рвота в 2 DPC. Эти клинические данные не относятся к типичным признакам начала CPV в 3-4 DPC и могут быть обусловлены голоданием и/или процедурой анестезии, которую применяют во время провокации. Они не считаются признаками инфекции CPV.

Группа rCAV2-CPV VP2 (группа 1) не демонстрировала признаков инфекции до 10 DPC, когда у одного из 6 животных наблюдали кровавый, слизеподобный стул в течение 1 дня. Следует отметить, что 1 животное в группе не демонстрировало признаков рвоты в 2 DPC, а это не охватывается кругом признаков начала CPV, как было указано выше, и, таким образом, не считается признаком инфекции.

В группе MLV (группа 2) 2 из 6 животных демонстрировали клинические признаки в 5 и 7 DPC, причем у собаки #12 наблюдали слизеподобный стул в 7 DPC, а у собаки #13 наблюдалась диарея в 5 и 7 DPC. Также следует отметить, что у 3 животных этой группы наблюдались признаки рвоты или диареи в 2 DPC, а это не охватывается кругом признаков начала CPV, как было указано выше, и таким образом, не считается признаком инфекции.

Все собаки в отрицательной контрольной группе (группа 3) демонстрировали ряд клинических признаков, от умеренных до тяжелых (диарею, слизеподобный стул, обезвоживание, рвоту, отсутствие аппетита, кровавый стул), начиная с 4 DPC и заканчивая 11 DPC, когда 4 животных умерли от CPV (3 в 7 DPC и 1 в 8 DPC).

Пирексия: для пирексии единичный случай пирексии (ректальная температура $\geq 103,4^{\circ}\text{F}$ и по крайней мере на 1 выше, чем базовый уровень до провокации) после провокации определял животное как относящееся к категории положительных.

Испытуемая группа rCAV2-CPV VP2 (группа 1) демонстрировала 1 случай пирексии у 3 из 6 животных; 1 в 9 DPC и 2 в 12 DPC. Ни у одного из 6 животных в группе MLV (группа 2) пирексия не наблюдалась. В отрицательной контрольной группе (группа 3) 3 из 6 животных демонстрировали по крайней мере 1 случай пирексии (у 1 животного наблюдали 2 случая) от 4 до 5 DPC. У двух из 6 животных наблюдали гипотермию в 7 DPC.

Масса тела: для определения потери/прибавки массы в еженедельном режиме массу каждого отдельного животного оценивали путем вычитания значения массы от показателя предыдущей недели.

Ни у одного животного в испытуемой группе rCAV2-CPV VP2 (группа 1) и испытуемой группе MLV (группа 2) не наблюдали потери массы в 7 или 14 DPC. Все животные в отрицательной контрольной группе (группа 3) демонстрировали потерю массы в 7 DPC от 0,1 до 0,8 килограмма. Животные, которые оставались в испытании в группе 3 в 14 DPC, имели прибавку в весе в 7 DPC.

Лимфопения: для лимфопении единичный случай лимфопении ($\geq 50\%$ потеря по сравнению с базовым уровнем до провокации) после провокации определял собаку как относящуюся к категории положительных. В этом исследовании испытуемая группа rCAV2-CPV VP2 (группа 1) включала 3 из 6 животных с по крайней мере 1 случаем лимфопении с началом в 9 - 12 DPC. Группа MLV (группа 2) не демонстрировала признаков лимфопении. Все животные в отрицательной контрольной группе (группа 3) имели по крайней мере 1 случай лимфопении с началом в 4 DPC.

Лейкопения: для лейкопении единичный случай лейкопении ($\geq 50\%$ потеря по сравнению с базовым уровнем до провокации) после провокации определял собаку как относящуюся к категории положительных. В этом исследовании испытуемая группа rCAV2-CPV VP2 (группа 1) и группа MLV (группа 2) не

демонстрировали признаков лейкопении. Отрицательная контрольная группа (группа 3) включала 5 из 6 животных, которые имели по крайней мере 1 случай лейкопении с началом в 6 ДРС.

Изоляция вируса из образцов фекалий: для изоляции вируса CPV из фекалий единичный случай выявления вируса CPV в фекалиях после провокации определял собаку как относящуюся к категории положительных. Титр фекального вируса $CPV \leq 1,5 \text{ Log}_{10} \text{FAID50/мл}$ записывали как отрицательный для изоляции фекального вируса CPV. Все другие записанные титры $>1,5 \text{ Log}_{10} \text{FAID50/мл}$ причисляли к категории положительных для выявления фекального вируса CPV.

В этом исследовании группа rCAV2-CPV VP2 (группа 1) включала 4 из 6 животных, которые демонстрировали по крайней мере 1 день вирусывыделения, которое начиналось между 8 и 14 ДРС. В группе MLV (группа 2) не выделялось количество живого вируса, поддающееся выявлению. Все животные в отрицательной контрольной группе выделяли количество вируса, поддающееся выявлению, в фекалиях, начиная с 3 или 4 ДРС, и это продолжалось до 9 ДРС.

Итог результатов.

Таким образом, собак в возрасте от 6 недель 2 дней до 7 недель 2 дней подвергали вакцинации с применением 1,0 мл нижеприведенных вакцин в 0 ДРВ1 и 21 ДРВ1: (группа 1) rCAV2-CPV VP2 = 8,0 logs/мл; (группа 2) MLV Combo - CAV2/CDV/CPV = 4,7/2,6/3,9 logs/мл; (группа 3) PBS-Контроль. Всех вакцинированных собак подвергали провокации вирулентным CPV-2b, ороназально в 22 ДРВ2.

Исследуемая вакцина rCAV2-CPV VP2 не соответствовала критериям эффективности при введении в двухдозовом режиме в количестве 8,0 logs на дозу. У трех (3) собак наблюдалась лихорадка, выделение CPV в фекалиях и лимфопения, а у 1 собаки наблюдались четкие клинические признаки парвовируса собак. У четвертой собаки наблюдалось только выделение CPV. Оказалось, что вакцина обеспечивает начальную защиту приблизительно до 10 ДРС, которая заключалась в задержке начала клинических признаков инфекции по сравнению с отрицательными контрольными образцами. У одного вакцинированного животного отмечали полное помутнение роговицы по неизвестной причине.

Пример 8. Приготовление фармацевтических композиций (ВАКЦИН), включающих rCAV-EHV-4 p430/RabG (n).

Приготовление фармацевтических композиций (вакцин), включающих rCAV-EHV-4 p430/RabG (n) вакцину.

Рецептирование вакцины.

Посевной материал культуры ткани rCAV-EHV-4 pp430/RabG (N) разбавляли 0,01M PBS до целевой дозы. Адьювантов не использовали.

Инокуляция свиней с применением rCAV-EHV-4 pp430/RabG (n) и оценка серологического ответа.

План исследований: для вакцинированных поросят и контрольных групп в возрасте 4-8 недель (одна/две дозы) вводили 2 мл/дозу внутримышечно.

Для исследования свойств векторной вакцины для молодых поросят rCAV-EHV-4 P(GG430) RABG (N) C1 испытывали в вакцинационно-серологическом исследовании.

Более подробно, поросят вакцинировали дважды с применением rCAV-EHV-4 p430/RabG (N) C1 в дозе 6,7 logs в 0 и 21 дни исследования (двухэтапная вакцинация, 2x rCAV). Невакцинированная группа служила в качестве отрицательного контроля.

Серология: анализы по измерению сероконверсии после вакцинации Индукцию нейтрализующих антител CAdV-2 после вакцинации испытывали в сыворотке животных, вакцинированных один раз или два раза с применением вакцины rCAV-2 p430 RabG. Вакцинированные животные демонстрировали заметные титры нейтрализации вируса (VN) к CAdV2, тогда как образцы сыворотки невакцинированных групп не имели заметного уровня нейтрализующего антитела CAdV-2 (табл. 2). Быстрые тесты на ингибирование флуоресцентного свечения (RFFIT), которые выполняли на образцах сыворотки в Лаборатории бешенства Канзасского университета, продемонстрировали заметные титры RFFIT у 3 из 12 вакцинированных животных и не выявили заметных титров RFFIT в контрольных группах измерения бешенства нейтрализующих антител. Также осуществляли испытание полного антитела против бешенства с помощью ELISA и выделения вируса, а также вирусывыделения CAdV.

Таблица 7

| Серология | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|----------|-------|-------|----------|-------|-----------|------------------|-------|-----------|
| | День наблюдения | 0 DPV1 | | | 21 DPV1 | | | 35 DPV1, 14 DPV2 | | |
| | АНАЛИЗ | CAV-2 VN | ELISA | RFFIT | CAV-2 VN | ELISA | RFFIT | CAV-2 VN | ELISA | RFFIT |
| | ID поросят | | | | | | | | | |
| Плцебо-контроль | 502 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| | 506 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| | 508 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| | 525 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| | 527 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| | 529 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| | 531 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| | 548 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| | 580 | < 2 | | ** | | | | < 2 | | ** |
| Вакцинованные гCAV-2 МСР RabG | 501 | < 2 | | ** | 45 | | ** | 128 | | ** |
| | 507 | < 2 | | ** | 32 | | ** | 128 | | ** |
| | 509 | < 2 | | ** | 64 | | ** | 91 | | ** |
| | 516 | < 2 | | ** | 23 | | ** | 45 | | ** |
| | 517 | < 2 | | ** | 2 | | ** | 23 | | ** |
| | 519 | < 2 | | ** | < 2 | | ** | 16 | | 0,1 IU/мл |
| | 521 | < 2 | | ** | 45 | | ** | 181 | | ** |
| | 524 | < 2 | | ** | 45 | | ** | 64 | | ** |
| | 528 | < 2 | | ** | 32 | | ** | 91 | | ** |
| | 532 | < 2 | | ** | 16 | | ** | 23 | | 0,1 IU/мл |
| | 533 | < 2 | | ** | < 2 | | ** | 45 | | ** |
| | 534 | < 2 | | ** | 64 | | 0,1 IU/мл | 181 | | ** |

Эти результаты подтверждают применение промоторов EHV-4 согласно настоящему изобретению в векторе CadV, демонстрируя эффективную экспрессию нужного трансгена (путем оценки экспрессии для определения пропорции вируса вакцины, которая приводит к экспрессии нужного трансгена в инфицированных клетках), а также вирусное спасение и иммуногенность трансгена у вакцинированных животных. Оценка экспрессии даже была невозможна с векторами CadV с экспрессионными кассетами под управлением промоторов CMV. Все композиции и способы, которые раскрываются и заявляются авторами, могут быть получены и выполнены без лишних экспериментов в свете представленного описания. Хотя композиции и способы согласно настоящему изобретению были описаны на примерах предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области станет понятна возможность внесения изменений в композиции и способы и этапы или последовательность этапов описанного авторами способа без отклонения от идеи, сущности и объема изобретения. Более конкретно, станет очевидно, что некоторые агенты, которые являются химически и физиологически родственными, могут замещать описанные авторами агенты при достижении таких же или подобных результатов. Все подобные замещения и модификации, являющиеся очевидными для специалистов в данной области, считаются охватываемыми сущностью, объемом и идеей изобретения, которые определяются представленной ниже формулой изобретения.

Библиография.

Представленные ниже источники, в той мере, в которой они представляют процедурные и другие детали, дополнительные к изложенным авторами, специально включены в настоящее описание путем ссылки.

1. Buonavoglia, C. and V. Martella, Canine respiratory viruses. Vet Res, 2007. 38(2): p. 355-73.

2. Tham, K.M., G.W. Horner, and R. Hunter, Isolation and identification of canine adenovirus type-2 from the upper respiratory tract of a dog. *N Z Vet J*, 1998. 46(3): p. 102-5.
3. Hamelin, C., P. Jouvence, and R. Assaf, Association of a type-2 canine adenovirus with an outbreak of diarrhoeal disease among a large dog congregation. *J Diarrhoeal Dis Res*, 1985. 3(2): p. 84-7.
4. Macartney, L., H.M. Cavanagh, and N. Spibey, Isolation of canine adenovirus-2 from the faeces of dogs with enteric disease and its unambiguous typing by restriction endonuclease mapping. *Res Vet Sci*, 1988. 44(1): p. 9-14.
5. Benetka, V., et al., Canine adenovirus type 2 infection in four puppies with neurological signs. *Vet Rec*, 2006. 158(3): p. 91-4.
6. Appel, M., et al., Pathogenicity of low-virulence strains of two canine adenovirus types. *Am J Vet Res*, 1973. 34(4): p. 543-50.
7. Appel, M., L.E. Carmichael, and D.S. Robson, Canine adenovirus type 2-induced immunity to two canine adenoviruses in pups with maternal antibody. *Am J Vet Res*, 1975. 36(08): p. 1199-202.
8. Bittle, J.L., W.A. Grant, and F.W. Scott, Canine and feline immunization guidelines--1982. *J Am Vet Med Assoc*, 1982. 181(4): p. 332-5.
9. Curtis, R. and K.C. Barnett, The 'blue eye' phenomenon. *Vet Rec*, 1983. 112(15): p. 347-53.
10. Bru, T., S. Salinas, and E.J. Kremer, An update on canine adenovirus type 2 and its vectors. *Viruses*, 2010. 2(9): p. 2134-53.
11. Hu, R.L., et al., Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody response against rabies. *Vaccine*, 2007. 25(29): p. 5301-7.
12. Hu, R., et al., Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies virus glycoprotein. *Microbes Infect*, 2006. 8(4): p. 1090-7.
13. Li, J., et al., A single immunization with a recombinant canine adenovirus expressing the rabies virus G protein confers protective immunity against rabies in mice. *Virology*, 2006. 356(1-2): p. 147-54.
14. Henderson, H., et al., Oral immunization of raccoons and skunks with a canine adenovirus recombinant rabies vaccine. *Vaccine*, 2009. 27(51): p. 7194-7.

15. Bouet-Cararo, C., et al., Canine adenoviruses elicit both humoral and cell-mediated immune responses against rabies following immunisation of sheep. *Vaccine*, 2011. 29(6): p. 1304-10.
16. Liu, Y., et al., Efficacy and safety of a live canine adenovirus-vectored rabies virus vaccine in swine. *Vaccine*, 2008. 26(42): p. 5368-72.
17. Fischer, L., et al., Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge. *Vaccine*, 2002. 20(29-30): p. 3485-97.
18. Yang, S., et al., Complete protection of cats against feline panleukopenia virus challenge by a recombinant canine adenovirus type 2 expressing VP2 from FPV. *Vaccine*, 2008. 26(11): p. 1482-7.
19. Zhang, S., et al., Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 345-50.
20. Gallichan, W.S., et al., Mucosal immunization with a recombinant adenovirus vector induces local and systemic immunity and protection from herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol*, 1995. 371B: p. 1581-5.
21. Lubeck, M.D., et al., Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994. 10(11): p. 1443-9.
22. Wang, Y., et al., The use of an E1-deleted, replication-defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein for early vaccination of mice against rabies virus. *J Virol*, 1997. 71(5): p. 3677-83.
23. Papp, Z., L.A. Babiuk, and M.E. Baca-Estrada, The effect of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1. *Vaccine*, 1999. 17(7-8): p. 933-43.
24. Babiuk, L.A. and S.K. Tikoo, Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. *J Biotechnol*, 2000. 83(1-2): p. 105-13.
25. Wright, N., et al., High prevalence of antibodies against canine adenovirus (CAV) type 2 in domestic dog populations in South Africa precludes the use of CAV-based recombinant rabies vaccines. *Vaccine*, 2013. 31(38): p. 4177-82.
26. Kremer, E.J., et al., Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol*, 2000. 74(1): p. 505-12.

27. Linne, T., Differences in the E3 regions of the canine adenovirus type 1 and type 2. *Virus Res*, 1992. 23(1-2): p. 119-33.
28. Chartier, C., et al., Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1996. 70(7): p. 4805-10.
29. Lopez de Turiso, J.A., et al., Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol*, 1992. 66(5): p. 2748-53.
30. Langeveld, J.P., et al., First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J Virol*, 1994. 68(7): p. 4506-13.
31. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2):521-30. Bryant, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., and Alcamì, A. 2003. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *The EMBO Journal* Vol. 22 (4): 833-846.
33. Bustin, S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25(2): 169-193.
34. Charoensawan, V., Wilson, D., Teichmann, S.A. 2010. Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 38(21):7364-77
35. Colle, C.F. 3rd, O'Callaghan, D.J. 1995. Transcriptional analyses of the unique short segment of EHV-1 strain Kentucky A. *Virus Genes*;9(3):257-68.
36. Donnelly, M.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D., and Ryan, M.D. 2001. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol*. 82(Pt 5):1013-25
37. Dorsch-Häsler, K., Keil, G.M., Weber, F., Jasin, M. Schaffner, W., and Koszinowski, U.H. 1985. A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *PNAS* Vol. 82: 8325-8329.

38. Drummer, H.E., Studdert, M.J., Crabb, B.S. 1998. Equine herpesvirus-4 glycoprotein G is secreted as a disulphide-linked homodimer and is present as two homodimeric species in the virion. *J. Gen. Virol.* 79: 1205-1213
39. Fields, B, Knipe, D.M.; and Howley, P.M. 2013. *Virology*. 6th ed. Philadelphia; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams&Wilkins
40. Foecking, M.K., Hofstetter, H. 1986. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene* 45(1):101-5.
41. Goodwin, E.C. & Rottman, F.M. 1992. The 3'flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J.Biol.Chem.* 267: 16330-16334.
42. Jang, S.K., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Witherell, G.W., Wimmer, E. 1990. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme.*;44(1-4):292-309.
43. Kim, D.W., Uetsuki, T., Kaziro, Y., Yamaguchi, N., Sugano, S. 1990. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene* 16;91(2):217-23.
44. Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A. et al. 2001. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73: 56-65.
45. Luke, GA and Ryan, MD. 2013. The protein coexpression problem in biotechnology and biomedicine: virus 2A and 2A-like sequences provide a solution. *Future Virology*, Vol. 8, No. 10, Pages 983-996.
46. Ma, G., Eschbaumer, M., Said, A., Hoffmann, B., Beer, M., Osterrieder, N. 2012. An equine herpesvirus type 1 (EHV-1) expressing VP2 and VP5 of serotype 8 bluetongue virus (BTV-8) induces protection in a murine infection model. *PLoS One.* 2012;7(4):e34425. doi: 10.1371/journal.pone.0034425. Epub 2012 Apr 12.
47. Ma, G., Azab, W., Osterrieder, N. 2013. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet Microbiol.* 167(1-2):123-34.
48. Nolan, T. Rebecca E Hands, R.E., and Bustin S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR *Nature Protocols* 1: 1559-1582
49. Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Kaaden, O.R., and O'Callaghan, D.J. 1996. The equine herpesvirus 1 IR6 protein influences virus growth

at elevated temperature and is a major determinant of virulence. *Virology* 226:243-251.

50. Proudfoot, N.J. 2011. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes&Development* 25:1770-1782.

51. Ptashne, M. 2014. The Chemistry of Regulation of Genes and Other Things *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 289, (9) 5417–5435. Reed, L.J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* (27) 3; 493-497.

52. Rosas, C.T., Konig, P., Beer, M., Dubovi, E.J., Tischer, B.K., Osterrieder, N., 2007a. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhoea virus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 88 (3), 748–757.

53. Rosas, C.T., B.K. Tischer, G.A. Perkins, B. Wagner, L.B. Goodman, N. Osterrieder. 2007b . Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV) *Virus Research*, 125 , pp. 69–78.

54. Rosas, C.T., Van de Walle, G.R., Metzger, S.M., Loelzer, K., Dubovi, E.J., Kim, S.G., Parrish, C.R., Osterrieder, N., 2008. Evaluation of a vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza. *Vaccine* 26 (19), 2335–3234.

55. Ryan, M.D.,and Drew J. 1994. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J*Feb 15;13(4):928-33.

56. Said, A., Elke Lange, E., Beer, M. Damiani, A., Osterrieder, N. 2013. Recombinant equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine protects pigs against challenge with influenza A(H1N1)pmd09 *Virus Research* 173: 371– 376

57. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* Dec;22(12):1567-72. Epub 2004 Nov 21.

58. Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., Osterrieder, N., 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Tech.* 40, 191–197.

59. Tischer, B.K., Kaufer, B.B., Sommer, M., Wussow, F., Arvin, A., and Osterrieder, N. A Self-Excisable Infectious Bacterial Artificial Chromosome Clone of Varicella-Zoster Virus Allows Analysis of the Essential Tegument Protein Encoded by ORF9. *J. Virol.* 81 (23), 2007, 13200–13208.
60. Tischer, B.K, Smith, G.A., and Osterrieder, N. in: Jeff Braman (ed.), *In vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition, Methods in Molecular Biology*, vol. 634, DOI 10.1007/978-1-60761-652-8_30, © Springer Science+Business Media, LLC 2010, Chapter 30: En Passant Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System.
61. Thompson, S.R. 2012. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol.* Nov;20(11):558-66.
62. Trapp, S., von Einem, J., Hofmann, H., Kostler, J., Wild, J., Wagner, R., Beer, M., Osterrieder, N., 2005. Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *J. Virol.* 79, 5445–5454.
63. Wellington, J.E., Allen, G.P., Gooley, A.A., Love, D.N., Packer, N.H., Yan, J.X., Whalley, J.M. 1996. The highly O-glycosylated glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 is encoded by gene 71. *J Virol.* 70(11):8195-8.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAdV), который включает экспрессионную кассету, кодирующую гетерологическую ДНК, функционально связанную с промоторной последовательностью герпесвируса-4 (EHV4) непарнокопытных, причем промоторная последовательность EHV4 представляет собой

или i) промоторную последовательность ORF 42 EHV4, включающую полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 32,

или ii) промоторную последовательность ORF 70 EHV4, включающую полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 31.

2. Вектор rCAdV по п.1, где промоторная последовательность герпесвируса-4 (EHV4) представляет собой промоторную последовательность ORF 42 EHV4.

3. Вектор rCAdV по п.1, где промоторная последовательность герпесвируса-4 (EHV4) представляет собой промоторную последовательность ORF 70 EHV4.

4. Вектор rCAdV по п.2, где промоторная последовательность ORF 42 EHV4 включает полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 30.

5. Вектор rCAdV по п.3, где промоторная последовательность ORF 70 EHV4 включает полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 29.

6. Вектор rCAdV по п.5, где промоторная последовательность ORF 70 EHV4 включает SEQ ID NO: 29.

7. Вектор rCAdV по п.4, где промоторная последовательность ORF 42 EHV4 включает SEQ ID NO:30.

8. Вектор rCAdV по п.3, где промоторная последовательность ORF 70 EHV4 включает SEQ ID NO: 31.

9. Вектор rCAdV по п.2, где промоторная последовательность ORF 42 EHV4 включает SEQ ID NO: 32.

10. Вектор rCAdV по п.1, где вектор rCAdV представляет собой инфекционный аденовирус собачьих.

11. Вектор rCAdV по п.1, где гетерологическая ДНК кодирует антигенный эпитоп, фактор роста или слитый белок, где гетерологическая ДНК включает терапевтический ген.

12. Вектор rCAdV по п.11, где гетерологическая ДНК кодирует антигенный эпитоп.

13. Вектор rCAdV по п.12, где антигенный эпитоп является патогеном собачьих или кошачьих.

14. Вектор rCAdV по п.12, где антигенный эпитоп выделен из патогена животного, предназначенного для получения пищевых продуктов.

15. Вектор rCAdV по п.13, где антигенный эпитоп выбран из группы, к которой относятся антиген Morbillivirus, гликопротеин бешенства, белок оболочки вируса лейкоза кошачьих (FeLV), антиген вируса иммунодефицита, антиген парвовируса, антиген поксвируса.

16. Вектор rCAdV по п.14, где патоген животного, предназначенного для получения пищевых продуктов, выделен из организма свиньи, крупного рогатого скота, коня, домашней птицы и/или овцы.

17. Иммуногенная композиция, включающая вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAAdV) по п.1; и приемлемый с ветеринарной точки зрения носитель или разбавитель.

18. Иммуногенная композиция по п.17, где носитель или разбавитель является пригодным для перорального, чрескожного, внутримышечного или интраназального применения.

19. Вакцина, включающая вектор рекомбинантного аденовируса собачьих (rCAAdV) по п.1; и приемлемый с ветеринарной точки зрения носитель или разбавитель.

20. Способ получения иммуногенной композиции, который включает:

а) введение в клетку-хозяина вектора rCAAdV по п.1;

б) культивирование инфицированных клеток при подходящих условиях;

в) сбор вектора rCAAdV из инфицированных клеток;

г) и смешивание собранных на этапе в) векторов rCAAdV с фармацевтически приемлемым носителем.

21. Способ уменьшения или предотвращения клинических признаков, вызванных инфицированием патогеном животного, включающий введение эффективного количества иммуногенной композиции по п.17.

22. Способ по п.21, где иммуногенную композицию вводят один раз.

23. Способ по п.21, где иммуногенную композицию вводят двумя дозами.

24. Способ по п.21, где иммуногенную композицию вводят перорально, чрескожно, внутримышечно или интраназально.

25. Способ уменьшения или предотвращения болезни, вызванной инфицированием патогеном животного, включающий введение эффективного количества иммуногенной композиции по п.17.

26. Набор для уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, вызванных патогеном животного, содержащий:

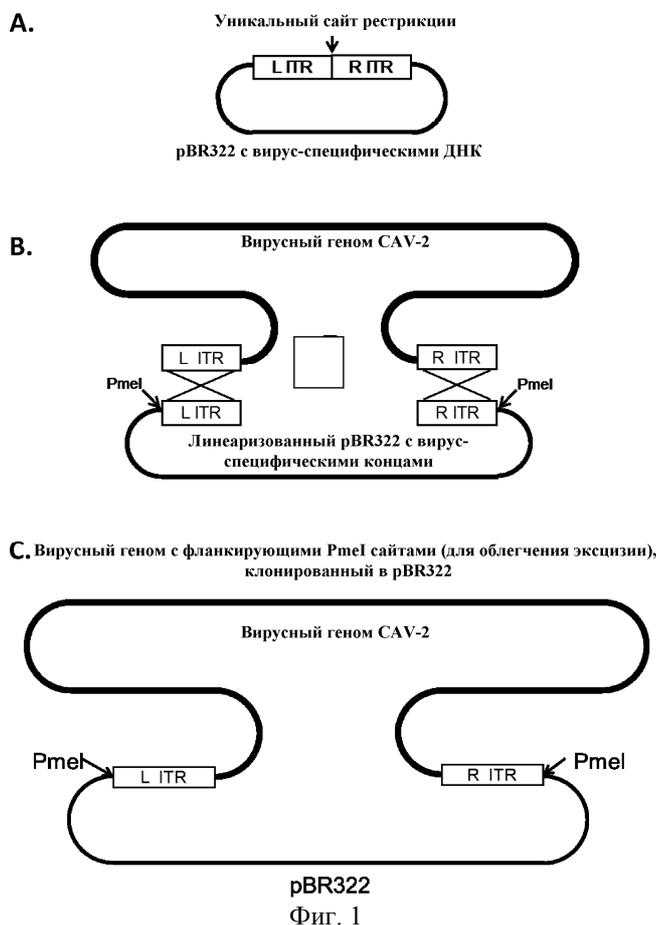
а) иммуногенную композицию по п.17; и

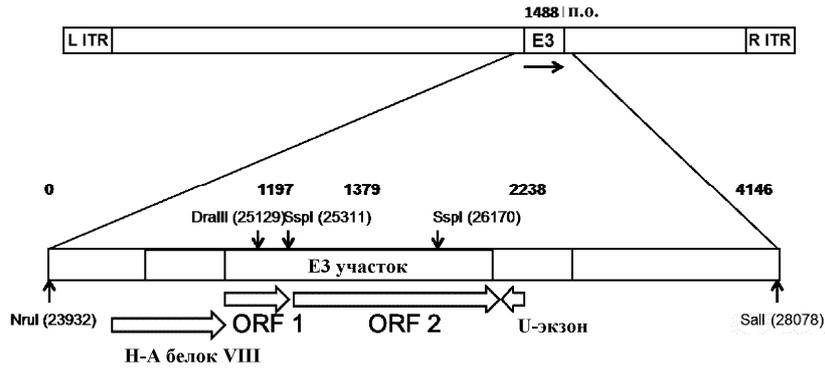
а) б) дозатор, способный водить вышеупомянутому животному иммуногенную композицию.

27. Линия эукариотических клеток-хозяев, экспрессирующих rCAAdV по любому из пп.1-16.

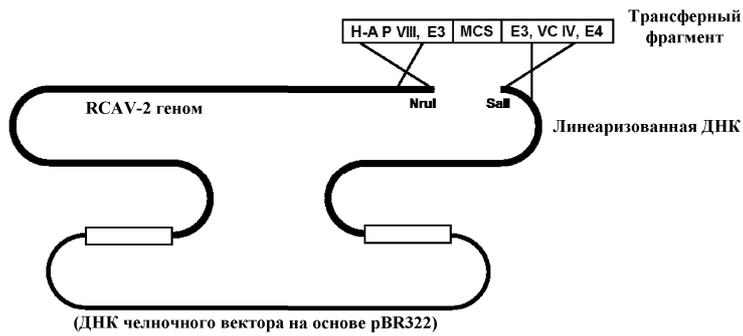
28. Линия эукариотических клеток-хозяев по п.27, где линия клеток-хозяев является линией клеток PK/WRL, линией клеток RK13, линией клеток MDBK, линией клеток ST, линией клеток AI-ST, линией клеток VERO, линией клеток Sf9, линией клеток Sf21, Sf plus или линией клеток MDCK.

29. Линия прокариотических клеток-хозяев, экспрессирующих rCAAdV по любому из пп.1-16.

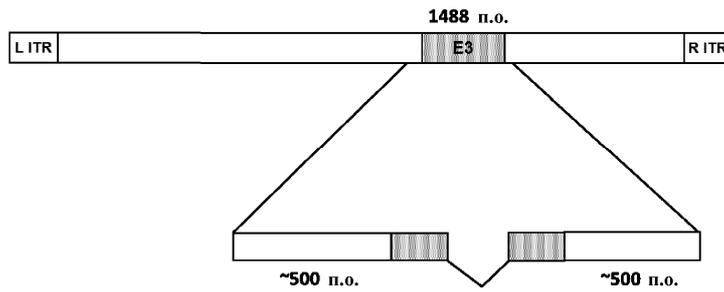




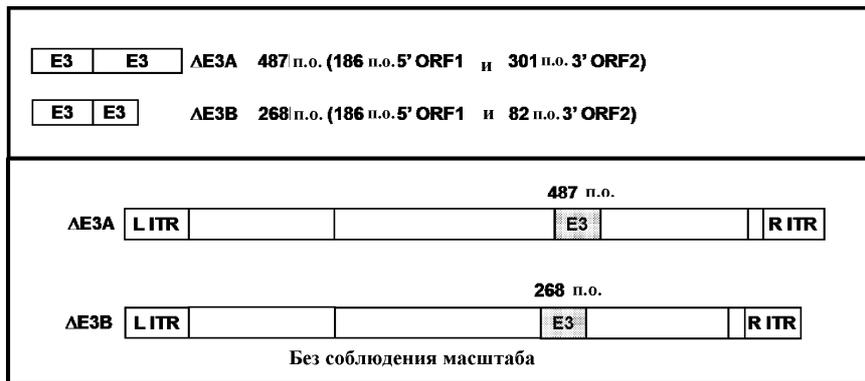
Фиг. 2



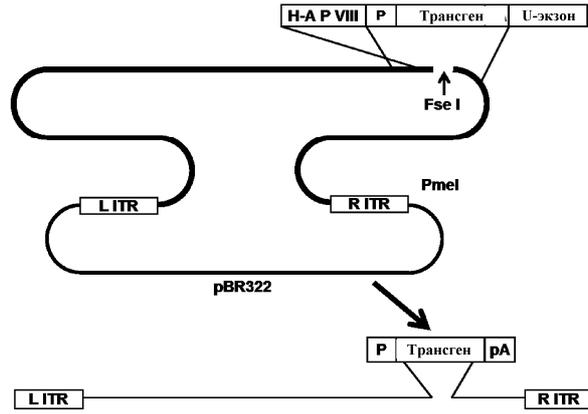
Фиг. 3



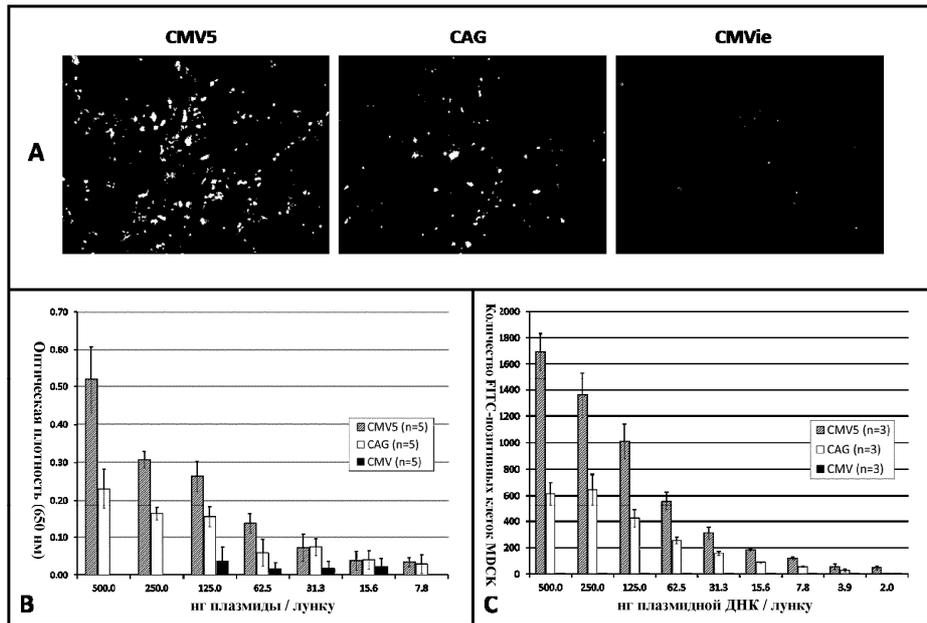
Фиг. 4



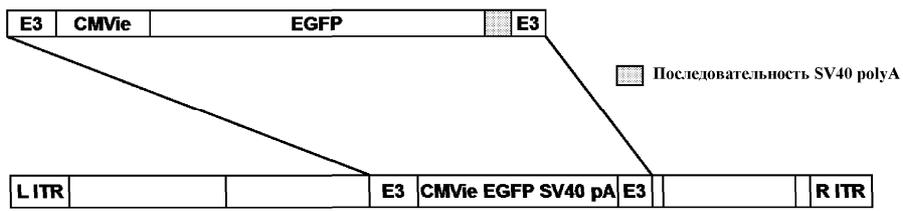
Фиг. 5



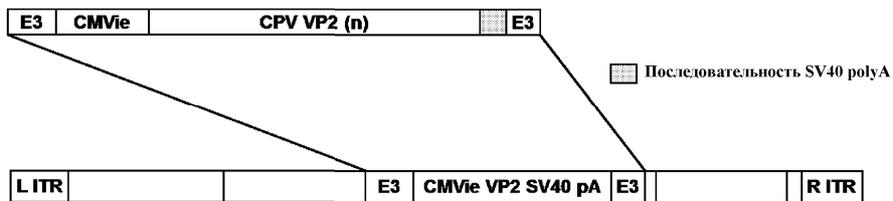
Фиг. 6



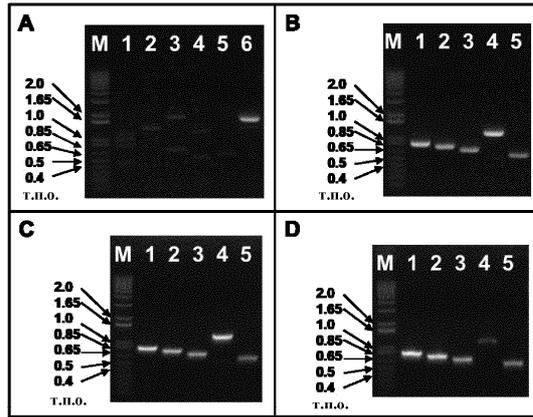
Фиг. 7



Фиг. 8



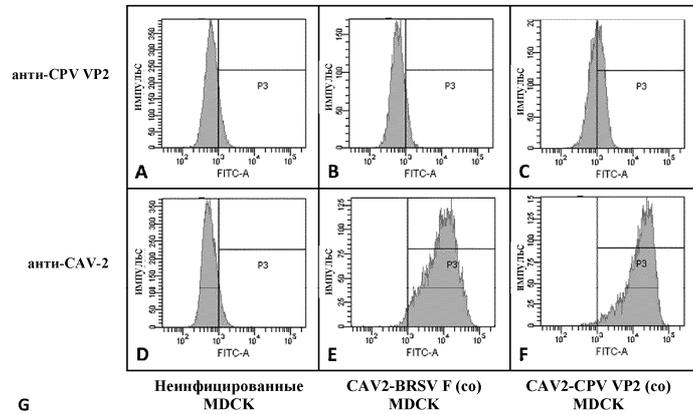
Фиг. 9



E

| Реакция (полоса) | Набор праймеров | Ожидаемый размер продукта (п. о.) |
|------------------|---------------------|--|
| 1 | H-A P VIII, VP2 | 841 |
| 2 | VP2, U-экзон | 801 |
| 3 | VP2, VP2 | 709 |
| 4 | VP2, VP2 | 1200 |
| 5 | VP2, VP2 | 595 |
| 6 | H-A P VIII, U-экзон | 1697 для рCAV-2 (>3 т. о. для рCAV2 -VP2) |

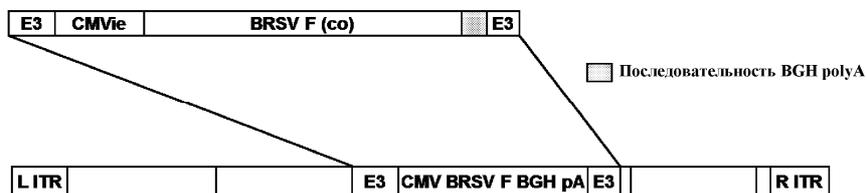
Фиг. 10



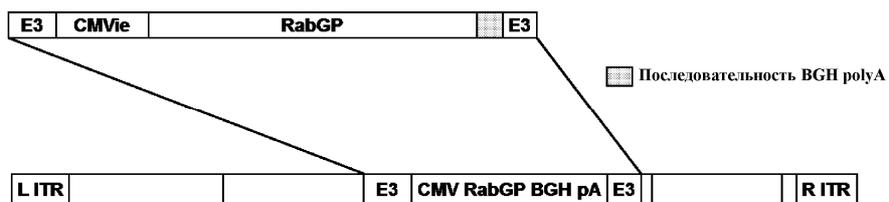
G

| Панель | Образец | Антитело | % позитивных клеток | FITC-A сред. |
|--------|------------------------|--------------|---------------------------|-----------------|
| A | Неинфицированные MDCK | анти-CPV VP2 | 15,1 | 1271 |
| B | MDCK/CAV2-BRSV F (co) | анти-CPV VP2 | 12,6 | 1209 |
| C | MDCK/CAV2-CPV VP2 (co) | анти-CPV VP2 | 50,4 | 1440 |
| D | Неинфицированные MDCK | анти-CAV2 | 9,7 | 1260 |
| E | MDCK/CAV2-BRSV F (co) | анти-CAV2 | 98,2 | 1206 |
| F | MDCK/CAV2-CPV VP2 (co) | анти-CAV2 | 99,4 | 20498 |

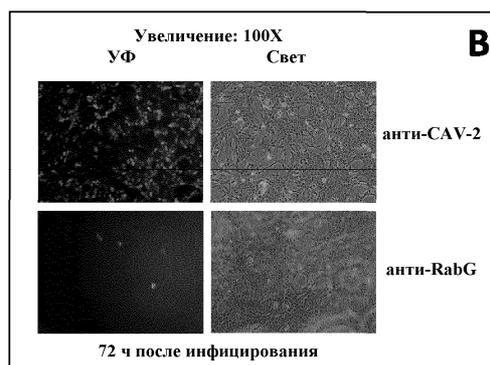
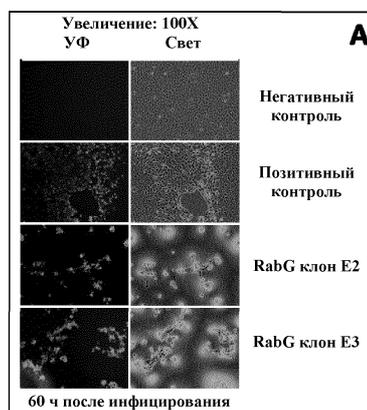
Фиг. 11



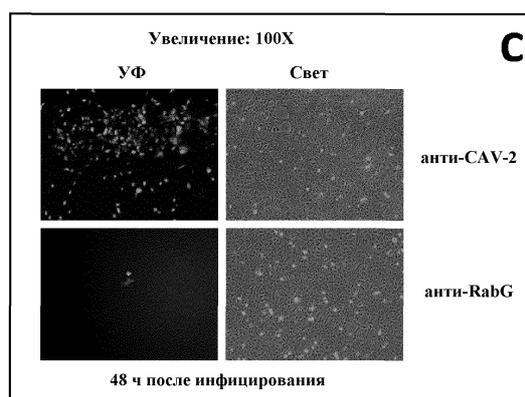
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 14 (продолжение)

| Рекомбинантный вирус | Сред. белок CAV-2 | Инфицированные CAV-2 клетки (%) | Сред. белок VP2 | Экспрессирующие VP2 клетки (%) |
|------------------------------|-------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| CAV2 CMVie BRSV F | 518113 | 48,47 | n/a | 0,23 |
| CAV2 CMVie CPV VP2 (деспл.) | 656218 | 62,21 | 178929 | 2,61 |
| CAV2 CMVie CPV VP2 (Gen0.95) | 697527 | 63,99 | 164591 | 2,59 |

Фиг. 15

| Рекомбинантный вирус | Сред. белок CAV-2 | Инфицированные CAV-2 клетки (%) | Сред. белок VP2 | Экспрессирующие VP2 клетки (%) | Сред. белок VP2 | Экспрессирующие VP2 клетки (%) |
|-------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| CAV2 CMVie BRSV F | 249037 | 16,13 | 47389 | 0,80 | n/a | 0,45 |
| CAV2 gG430 CPV VP2 (деспл.) | 265134 | 18,28 | 151824 | 18,20 | 260564 | 14,17 |
| CAV2 gG430 CPV VP2 (Gen0.95) | 292271 | 32,82 | 136458 | 28,31 | 221600 | 19,68 |
| CAV2 MCP455 CPV VP2 (Gen0.95) | 248349 | 24,65 | 188663 | 35,78 | 292102 | 29,73 |
| | Анти-CAV2-FITC pAb | | Анти-CPV VP2-FITC | | Анти-CPV VP2 pAb | |

Фиг. 16

A

| Разбавление PBS | | | | | | |
|--|------|------|-----|-----|-----|---|
| 1/64 | 1/32 | 1/16 | 1/8 | 1/4 | 1/2 | 1 |
| CAV-2 CMVie BRSV F | | | | | | |
| | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| CAV-2 gG430 CPV VP2 (Despl) (суп./лизат) | | | | | | |
| | | | | ● | ● | ● |
| CAV-2 gG430 CPV VP2 (Gen0.95) (суп./лизат) | | | | | | |
| | | | | ● | ● | ● |
| CAV-2 MCP CPV VP2 (Gen0.95) (суп./лизат) | | | | | | |
| ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |

B

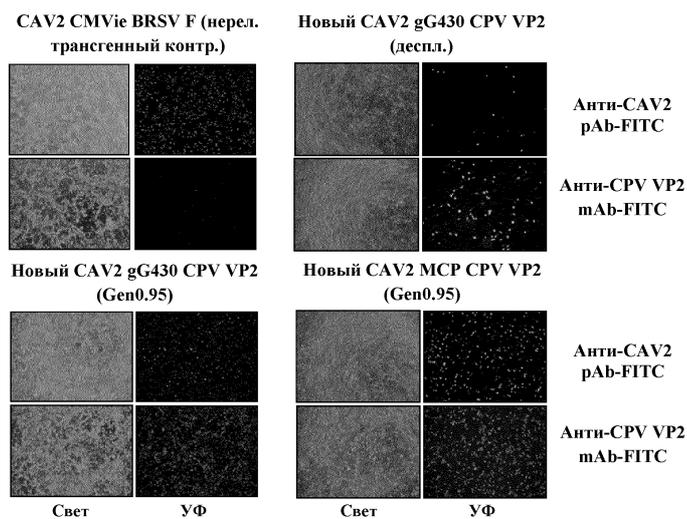
| | | Супернатанты / лизаты из инфицированных рекомбинантным вирусом клеток | | | |
|-------------|--------|---|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Рек. вирус | | CAV-2 CMVie BRSV F | CAV-2 gG430 CPV VP2 (Despl) | CAV-2 gG430 CPV VP2 (Gen0.95) | CAV-2 MCP CPV VP2 (Gen0.95) |
| Разбавление | 1 | - | +++ | ++ | +++ |
| | 0.5 | - | +++ | + | +++ |
| | 0.25 | - | +++ | + | +++ |
| | 0.125 | - | +++ | + | +++ |
| | 0.0625 | - | ++ | +/- | +++ |
| | 0.0312 | - | + | - | ++ |
| | 0.0156 | - | +/- | - | + |

Фиг. 17

| Рекомбинантный вирус | Сред. белок CAV-2 | Инфицированные CAV-2 клетки (%) | Сред. белок RabG | Экспрессирующие RabG клетки (%) |
|------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|
| CAV2 gG430 CPV VP2 (Gen0.95) | 516801 | 46,22 | n/a | 0,63 |
| Перв. CAV2 CMVie RabG (n) | 375281 | 16,79 | 33298 | 1,58 |
| CAV2 MCP455 RabG (n) | 542598 | 54,41 | 90294 | 14,22 |
| | Анти-CAV2-FITC pAb | | Анти-RabG-FITC | |

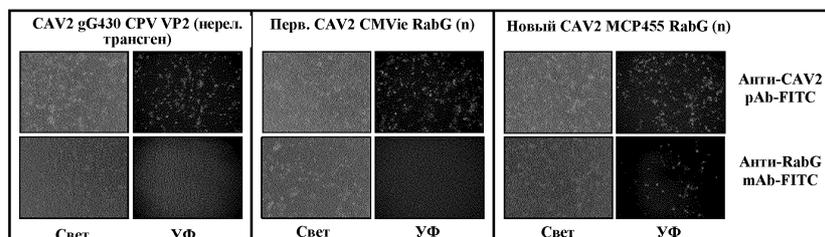
Фиг. 18

IFA на экспрессию CPV VP2 в инфицированных клетках AI-ST 2015



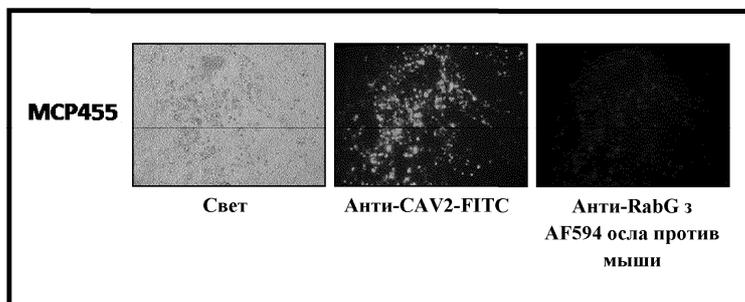
Фиг. 19А

IFA на экспрессию RabG в инфицированных клетках AI-ST 2015



Фиг. 19В

IFA на экспрессию RabG в клетках В1V1 2011 MDCK – двойная окраска на RabG и CAV-2



Фиг. 19С

