

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390066** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.07.03

(22) Дата подачи заявки
2021.06.16

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
A61K 39/17 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)
A61K 39/255 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВЕКТОРЫ НВТ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕМАГГЛЮТИНИН ГРИППА, И ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **63/040,411**

(32) **2020.06.17**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/037631**

(87) **WO 2021/257706 2021.12.23**

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

(72) Изобретатель:

Касса Эмро, Мебатсьон Тезом (US)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Рекомбинантные вирусные векторы и содержащие их композиции для применения в качестве носителей для индукции иммунологического ответа. Мультивалентные вирусные векторы можно использовать в композициях или вакцинах, содержащих один или несколько рекомбинантных вирусных векторов, для защиты от различных патогенов. Формирование этих вирусных векторов может включать вставку и экспрессию чужеродных генов для защиты от различных патогенов. Дополнительно предлагаются способы получения и применения рекомбинантных вирусных векторов, а также иммуногенных композиций, которые включают векторы и/или антигены. В частности, иммуногенные композиции могут включать рекомбинантные вирусные векторы, такие как vHVT509, vHVT522 и/или vHVT523.

A1

202390066

202390066

A1

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВЕКТОРЫ НУТ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ
ГЕМАГГЛЮТИНИН ГРИППА, И ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И ИХ
ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США 63/040411, поданной 17 июня 2020 г.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящее описание ссылкой в полном объеме. Упомянутая копия ASCII, созданная 15 июня 2021 года, называется В120-АН022-ВО-1_SL.txt и имеет размер 69 660 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к рекомбинантным вирусным векторам для вставки и экспрессии чужеродных генов для применения в качестве безопасных носителей иммунизации для защиты от различных патогенов. Изобретение также относится к мультивалентной композиции или вакцине, содержащей один или несколько рекомбинантных вирусных векторов для защиты от различных патогенов. Настоящее изобретение относится к способам получения и применения рекомбинантных вирусных векторов, а также иммуногенных композиций, включающих векторы и/или антигены.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вакцинация домашней птицы широко используется для защиты стада домашней птицы от разрушительных заболеваний, включая болезнь Ньюкасла (англ. Newcastle disease, ND), инфекционную бурсальную болезнь (англ. infectious bursal disease, IBD), болезнь Марека (англ. Marek's disease, MD), инфекционный бронхит (англ. infectious bronchitis, IB), инфекционный ларинготрахеит (англ. infectious laryngotracheitis, ILT) и птичий грипп (англ. avian influenza, AI) например, высокопатогенный птичий грипп (англ. highly pathogenic avian influenza, HPAI). ND вызывается птичьим парамиксовирусом 1 (APMV-1), также называемым вирусом ND (англ. ND virus, NDV), принадлежащим к семейству Paramyxoviridae. В некоторых случаях MD вызывает герпесвирус куриных 2 (семейство Herpesviridae), также обозначаемый как вирус MD серотипа 1 (MDV1). IB вызывается вирусом IB (англ. IB virus, IBV), принадлежащим к семейству Coronaviridae, ILT вызывается герпесвирусом куриных 1 (семейство Herpesviridae), также называемым вирусом ILT (англ. ILT virus, ILTV), а AI вызывается вирусом AI (англ. AI virus, AIV),

принадлежащим к семейству Orthomyxoviridae.

Рекомбинантные вакцины могут быть использованы для обеспечения защитного иммунного ответа у птиц против одного или нескольких различных заболеваний. В частности, вакцины могут снизить смертность, клинические признаки и эффекты у птиц. Например, разработанные вакцины могут быть использованы для обеспечения защиты от инфекционной бурсальной болезни (также известной как болезнь Гамборо), болезни Ньюкасла (ND), инфекционного бронхита (IB), инфекционного ларинготрахеита (ILT), птичьего гриппа (AI) и/или болезни Марека у птиц, таких как куры.

Был предложен ряд рекомбинантных птичьих вирусных векторов с целью вакцинации птиц против этих птичьих патогенов. Используемые вирусные векторы включают авипоксвирусы, особенно вирус оспы домашней птицы (EP-A-0,517,292), вирус Марека, такой как серотипы 1, 2 и 3 (HVT) (WO87/04463; WO2013/082317), или, альтернативно, ILTV, NDV и птичий аденовирус. Когда некоторые из этих рекомбинантных птичьих вирусных векторов использовались для вакцинации, они демонстрировали различные уровни защиты.

Вирус болезни Марека (англ. Marek's disease virus, MDV) принадлежит к семейству Alphaherpesviridae и роду *Mardivirus*. Вирион MDV окружен оболочкой и имеет размер около 160 нм. Капсид включает большой геном линейной двухцепочечной ДНК размером от 100 до 200 т.п.н.

К серотипам MDV относятся MDV серотипа 1 (MDV1) и MDV серотипа 2 (MDV2), оба из которых являются патогенными для домашней птицы, тогда как MDV серотипа 3 (MDV3) не является патогенным. В некоторых случаях MDV3 упоминается как: герпесвирус индейковых 1, индюшинный герпесвирус и/или герпесвирус индеек (англ. herpesvirus of turkeys, HVT).

Различные штаммы MDV3 (т.е. HVT), такие как PB1 или FC-126, использовались для вакцинации птиц (например, цыплят) против MD, вызванной MDV1 и/или MDV2. Когда требуется защита от более вирулентных вариантов MDV1, HVT использовали в сочетании с вакцинным штаммом MDV2, например, SB1, или с аттенуированным вакцинным штаммом MDV1.

Несколько рекомбинантных герпесвирусов индеек (также называемых герпесвирус индейковых 1 или MDV серотипа 3) являются векторами, экспрессирующими антигены от различных патогенов (пат. США № 5 980 906, 5 853 733, 6 183 753, 5 187 087), включая IBDV, NDV, ILTV и AIV, были разработаны и лицензированы.

Несколько векторов рекомбинантных герпесвирусов индеек (HVT, также обозначаемых как герпесвирус индейковых 1 или MDV серотипа 3), экспрессирующих

антигены различных патогенов (пат. США № 5 980 906, 5 853 733, 6 183 753, 5 187 087), включая IBDV, NDV, ILTV и AIV, были разработаны и лицензированы. Например, вектор HVT, экспрессирующий защитный ген IBDV VP2, показал явные преимущества перед классическими вакцинами против IBD (Bublout et al. J.Comp. Path.2007, Vol. 137, S81-S84; Пат. США № 5 980 906). Другими представляющими интерес векторами HVT являются те, которые экспрессируют защитный(ые) ген(ы) NDV (Morgan et al 1992, Avian dis. 36, 858-70; Пат. США № 6 866 852; 5 650 153), ILTV (Johnson et al., 2010 Avian Dis 54, 1251-1259; Пат. США № 6 299 882; 5 853 733, EP 1801204) или NDV и IBDV (Пат. США № 9 114 108; WO2016102647, WO2013/057235, WO2015032910, WO2013144355). В US 2016/0158347 сообщалось об использовании олигодезоксинуклеотидного агониста TLR21 для усиления иммунного ответа против антигена, который экспрессируется вектором HVT.

Кроме того, с момента своего появления в 1996 г. в провинции Гуандун, Китай, вирусы высокопатогенного птичьего гриппа (HPAI) H5N1 линии A/goose/Guangdong/1/1996 (Gs/GD) распространились по всему миру, заражая домашних и диких птиц и иногда проникая в млекопитающих, включая человека. Со временем вирус H5N1 HPAI разделился на несколько филогенетически и антигенно различных клад и субклад, основанных на гене гемагглютинаина (HA) H5, и появились антигенные варианты, устойчивые ко многим штаммам вакцинных семян. Такое генетическое и антигенное разнообразие создало проблемы в поддержании соответствующих штаммов посевного материала H5 для вакцин домашней птицы. Таким образом, крайне желательна разработка вакцины против гриппа А H5 с широкой защитой, которая может обеспечить защиту от антигенно различных коциркулирующих вирусов, а также будущих дрейфующих вариантов.

Было исследовано несколько стратегий для преодоления этой проблемы и расширения репертуара нейтрализующих антител, включая поливалентные вакцины против H5N1, направленные на консервативные домены HA, и вакцины на основе антигенов из синтетической консенсусной ДНК. В соответствии с последней стратегией для создания антигенов с новыми консенсусными последовательностями H5 HA была использована ранее описанная методология, названная «Computationally Optimized Broadly Reactive Antigen (компьютерно-оптимизированный антиген с широкой реактивностью)» (COBRA). В предыдущих исследованиях с использованием мышей, хорьков и яванских макак антигенные вакцины COBRA HA защищали от летального заражения гомологичным и гетерологичным вирусом H5N1 HPAI, демонстрируя более эффективное удаление вируса и вызывая более широкий гуморальный ответ против различных клад и

субклад, чем моно- или поливалентные вакцины. В недавнем исследовании вакцины COBRA HA на основе вирусоподобных частиц (ВПЧ) обеспечили клиническую защиту цыплят, зараженных летальной дозой гомологичного вируса H5N1 HPAI. Однако при контрольном заражении дрейфующим вариантом вируса H5N1 HPAI, вакцины COBRA HA ВПЧ не обеспечивали клинической защиты или обеспечивали частичную клиническую защиту у цыплят, а снижение вирусыведения было субоптимальным для обоих контрольных штаммов. Кроме того, устойчивый ответ антител против HA, вызванный вакцинами COBRA против дрейфующего штамма, не приводил к защитной эффективности при заражении этим вирусом, что свидетельствует о том, что положительная прогностическая ценность титров антител к HA не является абсолютной. В совокупности эти результаты подчеркивают необходимость дальнейшего улучшения консенсусных последовательностей антигена и состава вакцины для усиления как клинической защиты, так и снижения выделения вируса при заражении антигенно разнообразными штаммами HPAI.

HVT реплицируется в лимфоцитах периферической крови птиц (ЛПК) и, таким образом, является системным вирусом, вызывающим длительный иммунный ответ, который в основном направлен на клеточную иммунную систему. HVT-вакцины коммерчески доступны в виде замороженных клеток, инфицированных HVT, и их можно применять к цыплятам в раннем возрасте, поскольку они относительно нечувствительны к антителам против HVT, таким как MDA. Поскольку новорожденный цыпленок сталкивается с инфекционным давлением MDV с первого дня своего существования, вакцины HVT прививают цыплятам как можно раньше, т.е. в день их вылупления из яйца (день первый) или даже до вылупления, еще находящимся в яйце. Этот последний подход, так называемая «вакцинация *in ovo*», представляет собой форму вакцинации эмбрионов, которая обычно применяется на 18 день эмбрионального развития (ЭР), примерно за 3 дня до вылупления.

Помимо использования в качестве вакцины как таковой, HVT также используется в качестве вирусной векторной вакцины для экспрессии и доставки различных иммуногенных белков домашней птице, см., например, WO 87/04463. Как правило, экспрессируемый ген кодирует (часть) защитный антиген микроорганизма, патогенного для домашней птицы, против которого требуется вакцинация. На протяжении многих лет многие гетерологичные гены экспрессировались в векторах HVT, таких как: вирус болезни Ньюкасла (NDV) (Sondermeijer et al., 1993, Vaccine, vol. 11, p. 349-358), вирус инфекционной бурсальной болезни (IBDV) (Darteil et al., 1995, Virology, vol. 211, p. 481-490) и антигене паразита (Cronenberg et al., 1999, Acta Viral., vol. 43, p. 192-197).

Было описано, что введение векторной вакцины HVT птице вызывает иммунный ответ против экспрессированного гетерологичного гена, а также против HVT, который защищает от MD. Это применяется в различных коммерческих векторных вакцинных продуктах HVT, например: ген белка F из NDV: Innovax™-ND (MSD Animal Health) и Vectormune™ HVT-NDV (Ceva); или ген VP2 из IBDV: Vaxxitek™ HVT+IBD (Merial; ранее назывался: Gallivac™ HVT-IBD; Aly, R. et al., Report and Opinion 2012;4(4):1-11), и Vectormune™ HVT-IBD (Ceva).

В качестве альтернативы вектор HVT использовался для экспрессии и доставки терапевтического белка, например, цитокина для управления иммунным ответом цыплят (WO 2009/156.367; Tarpey et al., 2007, Vaccine, vol. 25, p. 8529-8535).

Описано несколько способов встраивания гетерологичных генов в HVT, например, с использованием гомологичной рекомбинации (Sondermeijer et al., см. выше), регенерации космид (US 5961982) или бакмид (бактериальные искусственные хромосомы) (Baigent et al., 2006, J. Ген. Viral., vol. 87, p. 769-776).

Были исследованы многие генетические места для вставки гетерологичной генной конструкции в геном HVT, и было описано несколько подходящих, несущественных локусов, например, в уникальной короткой (Us) области генома HVT (EP 431.668); или в уникальной длинной (UL) области HVT (EP 794.257).

Для управления экспрессией гетерологичного гена в cassette экспрессии для HVT использовались различные промоторы, такие как: промотор gpX PRV (WO 87/04.463), промотор LTR вируса саркомы Рауса, промотор раннего гена SV40, промотор гена бета-актина курицы (EP 1.298.139) или промотор непосредственно раннего гена 1 из человеческого (hCMV IE1) или мышинового (mCMV IE1) цитомегаловируса, см.: EP 728.842. Недавно была описана векторная вакцина HVT, которая экспрессирует антигены как NOV, так и IBDV из одной конструкции: WO 2013/057.235.

Был использован вектор HVT, экспрессирующий защитный ген VP2 из IBDV (Bublott et al. J.Comp. Path.2007, Vol.137, S81-S84). Другими представляющими интерес векторами HVT являются те, которые экспрессируют NDV (Morgan et al 1992, Avian dis. 36, 858-70) или ILTV (Johnson et al., 2010 Avian Dis 54, 1251-1259). Одной из практических проблем совместного применения нескольких рекомбинантных вакцин на основе HVT является их интерференция. Более низкая защита индуцируется, по меньшей мере, против одного из заболеваний, когда смешиваются два рекомбинантных HVT, экспрессирующих разные антигены (RuRudolf Heine 2011; Issues of the Poultry Recombinant Viral Vector Vaccines which May Cause an Effect on the Economic Benefits of those Vaccines; документ, представленный на XVII Конгрессе Всемирной ветеринарной птицеводческой ассоциации

(WVPA) в Канкуне, Мексика, 14–18 августа 2011 г.; Slacum G, Hein R. and Lynch P., 2009, The compatibility of HVT recombinants with other Marek's disease vaccines, 58th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA, USA, March 23rd-25th, p 84).

Комбинация HVT и SB-1, вакцинного штамма герпесвируса куриных 3 (MDV серотип 2 или MDV-2), продемонстрировала синергетический эффект на защиту от MD (Witter and Lee, 1984, Avian Pathology 13, 75-92). Для решения проблемы интерференции представляет интерес оценка вируса SB-1 в качестве вакцинного вектора для экспрессии защитных антигенов, которые могут быть совместимы с вектором HVT и улучшать защиту от MD.

Геном SB-1 был клонирован и охарактеризован в бактериальной искусственной хромосоме (BAC) (Petherbridge et al., J. Virol. Methods 158, 11-17, 2009; Singh et al, Research in Veterinary Science 89, 140-145, 2010). Недавно была получена и проанализирована последовательность MDV2 SB-1 (Spatz and Schat, Virus Gene 42, 331-338, 2011). Делеция гликопротеина E вируса SB-1 была описана Petherbridge et al. (J. Virol. Methods 158, 11-17, 2009). Однако не сообщалось об исследованиях с использованием SB-1 в качестве вирусного вектора, экспрессирующего чужеродные защитные гены.

Было показано, что гены протеинкиназы UL13 и гликопротеина C (UL44) по отдельности необходимы для горизонтальной передачи MDV у кур (Jarosinski, et al, J. of Virology 81, 10575-10587, 2007; Jarosinski, et al, J. of Virology 84, 7911- 7916, 2010).

Одной из практических проблем совместного использования нескольких рекомбинантных вакцин на основе HVT является их интерференция. Более низкая защита индуцируется, по меньшей мере, против одной из болезней, когда смешиваются два рекомбинанта HVT, экспрессирующих разные антигены (Rudolf Heine 2011; Issues of the Poultry Recombinant Viral Vector Vaccines which May Cause an Effect on the Economic Benefits of those Vaccines; paper presented at the XVII World Veterinary Poultry Association (WVPA) Congress in Cancun, Mexico, Aug. 14-18, 2011; Slacum G, Hein R. and Lynch P., 2009, The compatibility of HVT recombinants with other Marek's disease vaccines, 58th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, Calif., USA, March 23rd-25th, p 84).

Учитывая потенциальное воздействие патогенов животных, таких как MDV, AIV, NDV и/или IBDV, на ветеринарное здравоохранение и экономику, необходимы эффективные способы профилактики инфекций и защиты животных. Существует потребность в решении комбинированных эффективных векторных вакцин и подходящем способе изготовления вакцины, который мог бы облегчить проблему интерференции, наблюдаемую между двумя векторными вакцинами на основе HVT.

Цитирование или указание любого документа в данной заявке не является

признанием того что такой документ доступен в качестве предшествующего уровня техники в настоящем изобретении.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе раскрыты рекомбинантные векторы, которые охватывают герпесвирус индеек, вирус болезни Марека (MDV) и/или герпесвирус индейковых. Например, рекомбинантные векторы могут включать мутантный полинуклеотид, кодирующий вирус болезни Марека (MDV), такой как vHVT509, vHVT522 и/или vHVT523. Также раскрыты композиции, например, иммуногенные композиции, и/или вакцины, которые включают рекомбинантные векторы vHVT509, vHVT522 и/или vHVT523.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из герпесвируса индеек (pHVT), вируса болезни Марека или герпесвируса индейковых, первую экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты из вируса птичьего гриппа, так что рекомбинантный вирусный вектор экспрессирует *in vivo* экзогенный гемагглютининовый антиген вируса птичьего гриппа и вторую экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты из птичьего заболевания, кодирующую и экспрессирующую по меньшей мере один антиген птичьего заболевания *in vivo*. В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может включать вирус болезни Марека серотипа 3. Кроме того, в некоторых случаях рекомбинантный вирусный вектор может включать вирус болезни Марека, серотип 3, штамм FC-126 (MDV-3 FC-126).

Иммуногенные композиции и рекомбинантные вирусные векторы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения птиц, таких как куры, каплуны, утки, гуси, индейки, фазаны, тетерева, перепела, лебеди, сквобы или голуби. Например, птицы, обработанные иммуногенной композицией, могут быть цыплятами.

Рекомбинантные вирусные векторы могут включать экзогенную нуклеиновую кислоту птичьего гриппа подтипа H5. Кроме того, экзогенный HA-антиген вируса птичьего гриппа может включать белок гемагглютинина COBRA-C H5. В некоторых случаях последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген HA птичьего гриппа, может быть оптимизирована по кодонам.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну аминокислотную последовательность вируса птичьего гриппа, последовательность которой имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с заранее определенной последовательностью, такой как последовательность, изображенная на фиг. 12, фиг. 18,

фиг. 28, фиг. 40 или фиг. 49. Например, ген, кодирующий белок синтетического гемагглютинина (НА) вируса НА Н5 птичьего гриппа, может иметь гомологию или идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов по отношению к референсной последовательности, такой как любая из изображенных на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40, или фиг. 49. Кроме того, композиция или вакцина могут включать фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, эксципиент, наполнитель или адъювант. В некоторых воплощениях экспрессированный антиген вируса птичьего гриппа может иметь гомологию или идентичность в диапазоне от около 80 до около 100 процентов по отношению к референсной последовательности, такой как последовательности, изображенные на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40, или фиг. 49.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может включать одну или несколько последовательностей экзогенных нуклеиновых кислот, которые кодируют антиген вируса инфекционной бурсальной болезни, антиген болезни Ньюкасла и/или антиген вируса инфекционного ларинготрахеита (ILT). Например, рекомбинантный вирусный вектор может включать экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни и/или антиген F болезни Ньюкасла.

В некоторых случаях вакцина может быть получена из нескольких компонентов. Компоненты вакцины для прививки птиц можно хранить в отдельных контейнерах до применения. Например, иммуногенные агенты, такие как клетки, включающие вирусный вектор, вирусные векторы, антигены и/или белки, можно хранить в контейнере, таком как ампула, и смешивать с разбавителем в отдельном контейнере перед применением. В частности, ампула может включать инфицированные клетки, замороженные в жидком азоте, которые включают вирусные векторы и/или антигены для конкретного заболевания, и могут быть объединены с разбавителем перед инъекцией целевому животному.

Вакцины для животных могут сочетать содержимое нескольких ампул от разных болезней с разбавителем в зависимости от целевого заболевания.

Иммуногенные композиции могут включать приемлемый для ветеринарии носитель, такой как растворители, дисперсионные среды, покрытия, адъюванты, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты, замедляющие адсорбцию, и их комбинации.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95

процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, кодирующей ген AIV H5 NA Cobra-C, как показано на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и/или фиг. 49. В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может содержать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов с последовательностью, которая кодирует ген AIV H5 NA Cobra-C вируса гриппа, как показано на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и/или фиг. 49. В частности, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95 процентов с последовательностью, которая кодирует ген AIV H5 NA Cobra-C, как показано на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и/или фиг. 49. Например, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну последовательность, имеющую гомологию или идентичность в диапазоне от около 80 до около 100 процентов с последовательностью, которая кодирует ген AIV H5 NA Cobra-C, как показано на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и/или фиг. 49.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, кодирующей капсидный белок (VP2) из IBDV, как показано на фиг. 17 или фиг. 29. В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может содержать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов с последовательностью, которая кодирует белок капсидного белка (VP2) из IBDV, как показано на фиг. 17 или фиг. 29. В частности, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95 процентов с последовательностью, которая кодирует белок капсидного белка (VP2) из IBDV, как показано на фиг. 17 или фиг. 29.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, имеющую гомологию или идентичность последовательности в диапазоне от около 80 до около 100 процентов с последовательностью, которая кодирует белок капсида IBDV (VP2), как показано на фиг. 17 или фиг. 29.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну

экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, кодирующей белок NDV-F, как показано на фиг. 39 или фиг. 50. В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может содержать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере идентичность последовательности 90 процентов с последовательностью, кодирующей белок NDV-F, показанный на фиг. 39 или фиг. 50. В частности, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95 процентов с последовательностью белка NDV-F, как показано на фиг. 39 или фиг. 50.

Например, рекомбинантный вирусный вектор может иметь гомологию или идентичность в диапазоне от около 80 до около 100 процентов с последовательностью белка NDV-F, как показано на фиг. 39 или фиг. 50.

Рекомбинантные вирусные векторы могут быть сконструированы методом рекомбинации, который включает трансфекцию клетки заранее определенным вирусом и вставочной плазмидой для вставки в сайт Intergenic I (IG1), содержащей первую экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), вторую экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HA птичьего гриппа и поли-A-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

Способ получения рекомбинантного вирусного вектора может включать трансфекцию клетки заданным вирусом и вставочной плазмидой для вставки в сайт Intergenic 1 (IG1) HVT, содержащей первую последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), вторая последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующая HA птичьего гриппа и поли-A-хвост SV40. В некоторых воплощениях вирусный вектор может включать фланкирующие последовательности из IG1.

После получения рекомбинантного вирусного вектора его можно извлечь и/или очистить. Например, перед использованием в иммуногенной композиции полученный рекомбинантный вирусный вектор может быть выделен и затем очищен для применения в иммуногенной композиции.

В иммуногенной композиции заданный вирус, такой как вирус болезни Марека, герпесвирус индеек (гHVT) или герпесвирус индейковых, находится в количестве, когда

композиция вводится птице, достаточном для индукции ответа на целевое заболевание, такое как иммунный ответ на любое из целевых заболеваний, включая вирус болезни Марека, вирус болезни Ньюкасла, вирус инфекционной бурсальной болезни и/или птичий грипп.

Иммуногенные композиции, такие как вакцины, могут быть получены после смешивания иммуногенного агента с одним или несколькими приемлемыми для ветеринарии носителями. Например, вакцина может быть получена путем объединения ампулы, содержащей иммуногенный агент, и приемлемого для ветеринарии носителя, такого как разбавитель. В частности, ампула для смешивания вакцины может включать иммуногенный агент, например, клетки, в состав которых входят вирусные векторы. Содержимое ампулы можно смешать с контейнером с растворителем. В некоторых вариантах вакцина может быть получена путем объединения ампулы, содержащей иммуногенные агенты, такие как клетки, содержащие вирусные векторы, замороженные в жидком азоте, с заданным количеством разбавителя.

Ампулы могут быть снабжены иммунологической композицией, имеющей титр в диапазоне от около 10^3 до около 10^7 БОЕ/мл. В одном воплощении иммунологическая композиция в ампуле может иметь титр в диапазоне от около 10^5 до 10^7 БОЕ/мл.

В некоторых воплощениях иммунологическая композиция в ампуле может быть более концентрированной, чем желаемая доза для введения. В некоторых воплощениях иммунологическая композиция в ампуле может быть примерно в 3 раза более концентрированной, чем желаемая доза для введения. Например, в воплощении, где доза вводимой вакцины составляет около 2500 БОЕ на дозу, высвобождаемая доза (т.е. количество в ампуле) может быть примерно в три раза больше, то есть около 7500 на дозу.

Минимально эффективные/защитные дозы (англ. *minimally effective/protective doses*, MPD) конкретного вирусного вектора, экспрессирующего один или несколько антигенов и/или белков, которые входят в состав вакцины, могут быть определены экспериментально. Как правило, MPD можно использовать для определения предпочтительного титра в иммунологической композиции. Например, титр высвобождения в US может быть кратным значению MPD. В частности, предпочтительный титр в иммунологической композиции, такой как вакцина, может примерно в 3 раза превышать MPD.

В некоторых случаях иммунологическая композиция, такая как вакцина, может иметь титр в диапазоне от около 1000 БОЕ/дозу до около 8000 БОЕ/дозу. Воплощение может включать вакцину, имеющую титр в диапазоне от около 2000 БОЕ/дозу до около 6000 БОЕ/дозу.

Воплощение вакцины для птиц может иметь титр в диапазоне от около 2200 БОЕ/дозу до около 4000 БОЕ/дозу. Некоторые птичьи вакцины, описанные в настоящем документе, могут иметь титр, превышающий около 2250 БОЕ/дозу. В частности, вакцина может иметь титр в диапазоне от около 2250 БОЕ/дозу до около 3000 БОЕ/дозу. Например, вакцина может иметь титр около 2500 БОЕ/дозу.

Некоторые воплощения иммуногенной композиции, такой как вакцина, могут включать титры, превышающие приблизительно 5000 БОЕ/дозу для MDV (т.е. HVT), в частности, для птиц, которые будут иметь относительно большую продолжительность жизни, таких как племенные птицы и несушки.

Способ индукции иммунного ответа у птиц против вируса болезни Марека, птичьего гриппа и вируса инфекционной бурсальной болезни может включать введение птице эффективного количества рекомбинантного вирусного вектора или эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в настоящем документе.

В одном воплощении рекомбинантный вирусный вектор может включать и экспрессировать *in vivo* экзогенный НА-антиген вируса птичьего гриппа и экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса болезни Ньюкасла. В некоторых случаях экзогенная последовательность птичьего гриппа может относиться к подтипу H5.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, кодирующую белок NDV, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с последовательностью, показанной на фиг. 39 или фиг. 50. В некоторых воплощениях белок, экспрессируемый *in vivo*, такой как белок NDV-F, может иметь гомологию или идентичность в диапазоне от около 80 до около 100 процентов по отношению к референсной последовательности, такой как последовательность, изображенная на фиг. 50. Молекула экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген НА птичьего гриппа в рекомбинантном вирусном векторе, может быть оптимизирована по кодонам.

Рекомбинантные вирусные векторы могут быть сконструированы путем трансфекции клетки предварительно определенным вирусом и вставочной плазмидой для сайта Intergenic 1 (IG1), содержащей промотор CMV мыши, экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса болезни Ньюкасла, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей НА птичьего гриппа и поли-A-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

Способ получения рекомбинантного вирусного вектора может включать трансфекцию клетки вирусом болезни Марека, а вставочная плаزمиды для сайта Intergenic 1 (IG1) может включать мышинный промотор CMV, последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса болезни Ньюкасла, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HA птичьего гриппа и поли-A-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

Любое продуцирование рекомбинантного вирусного вектора может быть восстановлено после продуцирования.

Иммуногенные композиции, как описано в данном документе, могут включать приемлемый для ветеринарии носитель.

Иммуногенные композиции могут включать рекомбинантный вирусный вектор в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа у птиц против вируса болезни Марека, и/или вируса птичьего гриппа, и/или вируса болезни Ньюкасла после введения иммуногенной композиции.

Способ индукции иммунного ответа у птиц против вируса болезни Марека, птичьего гриппа и вируса болезни Ньюкасла может включать введение птице эффективного количества одного или нескольких иммуногенных агентов, таких как клетки, инфицированные рекомбинантным вирусным вектором. В некоторых воплощениях определяют эффективное количество иммуногенной композиции, такой как вакцина.

Плаزمиды для вставки в сайт Intergenic 1 (IG1) заданного вируса, содержащая экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген и/или белок вируса болезни Ньюкасла, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую птичий грипп HA и полиA-хвост SV40.

Например, плазмиды для вставки в сайт Intergenic1 (IG1) MDV-3 может включать мышинный промотор CMV, экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса ньюкаслской болезни, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HA птичьего гриппа и поли-A-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

В некоторых случаях AIV, используемый в плазмиде, может относиться к подтипу H5. Молекулы или последовательности экзогенных нуклеиновых кислот, кодирующие антиген HA птичьего гриппа, могут быть оптимизированы по кодонам.

Композиция или вакцина могут включать рекомбинантный вирусный вектор,

который включает вирус, выбранный из вируса болезни Марека серотипа 3 (MDV-3) или герпесвируса индейковых 1 (MeHV-1). Кроме того, один или несколько экзогенных нуклеотидов, например, нуклеотид вируса птичьего гриппа, кодирующий и экспрессирующий ген синтетического белка гемагглютинаина (НА). Кроме того, дополнительный гетерологичный нуклеотид, кодирующий и экспрессирующий по меньшей мере один антиген птичьего патогена, такой как капсидный белок (VP2) вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV) или гибридный белок вируса ньюкаслской болезни (NDV-F), и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, эксципиент, наполнитель или адъювант.

Композиция или вакцина может включать по меньшей мере одну аминокислотную последовательность вируса птичьего гриппа, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с последовательностью, показанной на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и фиг. 49. Кроме того, композиция или вакцина могут включать фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, эксципиент, наполнитель или адъювант.

Композиция или вакцина могут включать вирусный вектор, имеющий аминокислотную последовательность, кодирующую по меньшей мере один капсидный белок (VP2) вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV), имеющий идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с заданной последовательностью, как показано на фиг. 17 или фиг. 29. Композиция или вакцина могут включать вирусный вектор, который включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с заранее определенной последовательностью, кодирующей ген синтетического гемагглютинаина (НА) вируса птичьего гриппа А (подтипа H5), такой как изображенный на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 или фиг. 49, и другую аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с заранее определенной последовательностью, которая кодирует белок IBDV VP2, как показано на фиг. 17 или фиг. 29.

Композиция или вакцина могут включать вирусный вектор, который включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с последовательностью, кодирующей белок NDV, такой как белок NDV-F, как показано на фиг. 50 или фиг. 39. Кроме того, композиция или вакцина могут включать

фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, эксципиент, наполнитель или адъювант.

Композиция или вакцина могут включать вирусный вектор, который включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с заранее определенной последовательностью, кодирующей ген белка синтетического гемагглютиниона (НА) птичьего вируса гриппа А (подтипа Н5), такого как изображенный на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 или фиг. 49, и другую аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с заранее определенной последовательностью, кодирующей гибридный белок вируса болезни Ньюкасла (NDV-F), как показано на фиг. 50 или фиг. 39.

Соответственно, цель изобретения состоит в том, чтобы не охватывать изобретением какой-либо ранее известный продукт, процесс изготовления продукта или способ применения продукта, так что заявители сохраняют за собой право и настоящим раскрывают отказ от ответственности в отношении любого ранее известного продукта, процесса или способа. Далее следует заметить, что изобретение не предназначен для того, чтобы охватить в рамках изобретения любой продукт, способов или получение продукта или способ применения продукта, который не удовлетворяет требованиям письменного описания и снятия запрета согласно USPTO (35 U.S.C. §112, первый абзац) или ЕРО (Статья 83 ЕРС), так что заявители оставляют за собой право и таким образом заявляют об отказе упоминания в формуле изобретения любых ранее известных продуктов, процесса изготовления продукта или способа использования продукта. При практическом применении изобретения может быть выгодно соблюдать Ст. 53(с) ЕРС и Правила 28(b) и (с) ЕРС. Все права явного отказа от любых воплощений, которые являются предметом любого(ых) выданного(ых) патента(ов) заявителя в линии этой заявки или в любой другой линии или в любой ранее поданной заявке любой третьей стороны, явным образом защищены. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как обязанность.

Указывается, что в этом раскрытии и особенно в формуле изобретения и/или абзацах, термины, такие как «содержит», «содержащий» и т.п. могут иметь значение которое придается термину в Патентном законе США; например, они могут означать «включает», «включен», «включающий» и т.п.; и что такие термины, как «состоящий в основном из» и «состоит в основном из» имеют значение, приписываемое им в патентном законе США, например, термины позволяют элементам не явным образом упоминаться, но исключать элементы, которые обнаружены в предшествующем уровне техники или

которые влияют на основную или новую характеристику изобретения.

Эти и другие воплощения описаны в следующем подробном описании или являются очевидными из него и охвачены им.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Этот файл патента или заявки содержит как минимум одну фигуру, выполненную в цвете. Копии публикации этих патента или патентной заявки с цветным(ыми) чертежом(ами) будут предоставлены ведомством по запросу и после оплаты необходимого сбора.

Следующее подробное описание, данное в качестве примера, но не предназначенное для ограничения изобретения исключительно описанными конкретными воплощениями, может быть лучше всего понято в сочетании с прилагаемыми чертежами.

Фиг. 1 представляет собой схему, показывающую вирусные конструкции и некоторые их элементы, которые можно использовать в описанных в данном документе иммуногенных композициях.

Фиг. 2 показаны карты расположения трехвалентных вирусных векторов vHVT-522 и vHVT-523.

Фиг. 3 представляет собой карту расположения праймеров для vHVT509.

Фиг. 2 фиг. 4 показана ПЦР-амплификация стока vHVT509 pre-MSV.

Фиг. 3 фиг. 5 показана ПЦР-амплификация стока vHVT509 X+12.

Фиг. 6 показаны результаты непрямого иммунофлуоресцентного анализа vHVT509 с использованием куриной сыворотки против AIV H5N2 (Charles Rivers Laboratories, Лот № J0210) и кроличьего антитела против куриных IgG, конъюгированного с FITC (Sigma, кат. # F8888, лот # 075M4812V).

Фиг. 7 показаны результаты двойного непрямого иммунофлуоресцентного анализа vHVT509.

Фиг. 8 показан ампликон ПЦР для анализа нуклеотидной последовательности vHVT509.

Фиг. 9 представляет собой графическое изображение контигов, полученных в результате каждой реакции секвенирования vHVT509 pre-MSV.

Фиг. 10 представляет собой графическое изображение контига, полученного в результате каждой реакции последовательности vHVT509 X+12.

Фиг. 11 показаны нуклеотидные последовательности исходного контига vHVT509 pre-MSV и пассажа X+12 и расположение праймеров для секвенирования (SEQ ID NO: 47). Черный = области рекомбинации, синий = промотор mCMV, красный = AIV HA COBRA-C, серый = синтетический поли-А, подчеркнутый = праймер для секвенирования.

Праймеры для секвенирования подчеркнуты с указанием направления праймера. Часть плеч рекомбинации окрашена в черный цвет, ген AIV HA COBRA-C окрашен в красный цвет.

Фиг. 12 показаны аминокислотные последовательности гена AIV HA COBRA-C в vHVT509 (SEQ ID NO: 48).

Фиг. 13 показаны нуклеотидные последовательности секвенированной области vHVT509 (SEQ ID NO: 47).

Фиг. 14 представляет собой схему конструкции плазмиды pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C.

Фиг. 15 представляет собой диаграмму плазмиды, показывающую лигирование фрагментов HindIII-BIpl.

Фиг. 16 представляет собой нуклеотидную последовательность плазмиды pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C (SEQ ID NO: 49), где: зеленый = плечи Intergene 1, оранжевый = SV40 полиА, темно-красный = H5 HA COBRA-C, синий = IRES, красный = VP2, черный = вектор.

Фиг. 17 представляет собой аминокислотную последовательность VP2 (SEQ ID NO: 50).

Фиг. 18 представляет собой аминокислотную последовательность H5 HA COBRA-C (SEQ ID NO: 48).

Фиг. 19 представляет собой схему, показывающую расположение праймеров для ПЦР на vHVT522.

Фиг. 20 представляет собой изображение агарозного геля, загруженного продуктами ПЦР с использованием следующих матриц: vHVT522 pre-MSV (дорожка 1), vHVT522 pre-MSV+12 (дорожка 2), vHVT013 (дорожка 3), донорная плазида (pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C (дорожка 4) и отрицательный контроль (дорожка 5) и различные пары праймеров, указанные в таблице 5.

Фиг. 21 показаны результаты двойного иммунофлуоресцентного анализа, который показывает репрезентативную картину из пассажа pre-MSV (P3) (A) и из пассажа pre-MSV+12 (B).

Фиг. 22 представляет собой схему, показывающую расположение праймеров для секвенирования на vHVT522.

Фиг. 23 показана ПЦР vHVT522 pre-MSV (P3) и X+12 (pre-MSV+12) для секвенирования.

Фиг. 24 представляет собой секвенированный контиг vHVT522 (P3) pre-MSV.

Фиг. 25 представляет собой секвенированный контиг vHVT522 pre-MSV+12.

На фиг. 26 представлена нуклеотидная последовательность vHVT522 (SEQ ID NO: 51) с расположением праймеров, где: зеленый = IG1 Arm (донорная плазмида pFIRESVP2), голубой = SV40 полиА, светло-зеленый = IG1 Arm (донорная плазмида vHVT013), оранжевый = NDV-F, фиолетовый = IRES, темно-красный = VP2, синий = mCMV, подчеркнутый = праймеры для секвенирования.

На фиг. 27 показана нуклеотидная последовательность секвенированной области vHVT522 (SEQ ID NO: 51).

На фиг. 28 показана аминокислотная последовательность гена AIV HA COBRA-C в vHVT522 (SEQ ID NO: 48).

На фиг. 29 показана аминокислотная последовательность гена IBDV VP2 в vHVT522 (SEQ ID NO: 50).

На фиг. 30 представлена рестрикционная карта плазмиды pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C (донорная плазмида), использованной для приготовления двух зондов Саузерн-блоттинга. Зонды H5 и VP2, показанные черными полосами, охватывают сайты рестрикции, обведенные красными кружками.

Фиг. 31 представляет собой схему сайта встраивания антигена vHVT522, рестрикционную карту эндонуклеаз, используемых для саузерн-блоттинга, и ожидаемую длину фрагментов.

Фиг. 32 представляет собой схему сайта вставки антигена vHVT013 (Vaxxitek), рестрикционную карту эндонуклеаз, используемых для саузерн-блоттинга, и ожидаемую длину фрагментов.

Фиг. 33 представлена схема донорной плазмиды (pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C), рестрикционная карта эндонуклеаз, использованных для саузерн-блоттинга, и ожидаемая длина фрагментов.

На фиг. 34 показаны ожидаемые полосы Саузерн-блоттинга с использованием зонда VP2 на ДНК vHVT522, vHVT013 и донорной плазмиды (pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C), расщепленной рестрикционными ферментами BamHI, EcoRV или Not-I.

На фиг. 35 показаны ожидаемые полосы Саузерн-блоттинга с использованием зонда VP2 на ДНК vHVT522, vHVT013 и донорной плазмиды (pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C), расщепленной рестрикционными ферментами BamHI, EcoRV или Not-I.

На фиг. 36 показана схема конструкции донорной плазмиды pFwt-IRES[MOD]-COBRA-C.

На фиг. 37 показана схема плазмиды, показывающая конструирование плазмиды pFwt-IRES-COBRA-C путем замены гена Saudi-Arabia H9 в плазмиде, которая была создана ранее (pFwt-IRES-SaH9opt), на ген COBRA-C, извлеченный из pVP2-IRES-

COBRA-C.

На фиг. 38 показана нуклеотидная последовательность плазмиды pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C (SEQ ID NO: 52), где: зеленый = плечи Intergene 1, оранжевый = SV40 полиА, темно-красный = H5 HA COBRA-C, синий = IRES, красный = NDV-F, коричневый = промотор mCMV, черный = вектор.

На фиг. 39 показана аминокислотная последовательность NDV-F (SEQ ID NO: 53).

На фиг. 40 показана аминокислотная последовательность H5 HA COBRA-C (SEQ ID NO: 48).

Фиг. 41 представляет собой схему, показывающую расположение праймеров ПЦР на vHVT523.

Фиг. 42 представляет собой изображение агарозного геля, загруженного продуктами ПЦР с использованием следующих матриц: vHVT522 pre-MSV (дорожка 1), vHVT522 pre-MSV+12 (дорожка 2), vHVT013 (дорожка 3), донорная плазида (pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C (дорожка 4) и отрицательный контроль (дорожка 5) и различные пары праймеров, указанные в таблице 8.

Фиг. 43 показаны результаты двойного иммунофлуоресцентного анализа, который показывает репрезентативную картину из пассажа pre-MSV (P3) (A) и из пассажа pre-MSV+12 (B).

Фиг. 44 представляет собой схему, показывающую расположение праймеров для секвенирования на vHVT523.

На фиг. 45 показана ПЦР vHVT523 pre-MSV (P3) и X+12 (pre-MSV+12) для секвенирования.

На фиг. 46 показан секвенированный контиг vHVT523 (P3) pre-MSV.

На фиг. 47 показана нуклеотидная последовательность vHVT523 (SEQ ID NO: 54) с расположением праймеров, где: светло-зеленый = плечо IG1, синий = mCMV, оранжевый = NDV-F, фиолетовый = IRES, темно-красный = H5 HA, светло-синий = SV40 полиА, зеленый = плечо IG1, подчеркнутый = праймеры для секвенирования.

На фиг. 48 показана нуклеотидная последовательность секвенированной области vHVT523 (SEQ ID NO: 54).

На фиг. 49 показана аминокислотная последовательность гена AIV HA COBRA-C в vHVT523 (SEQ ID NO: 48).

На фиг. 50 показана аминокислотная последовательность гена NDV-F в vHVT523 (SEQ ID NO: 53).

На фиг. 51 показана прямоугольная диаграмма рассчитанных титров вирусывыделения на 30 день исследования.

На фиг. 52 показана прямоугольная диаграмма рассчитанных титров вирусывыделения на 32 день исследования.

На фиг. 53 показана диаграмма рассчитанных соотношений массы бурсы и массы тела по исследуемым группам.

На фиг. 54 показана диаграмма рассчитанных соотношений массы бурсы и массы тела в разбивке по полу и исследуемой группе.

Фиг. 55 представляет собой график, показывающий результаты экспериментов по выделению вируса у цыплят, которым вводили vHVT509, vHVT522 и vHVT523 или ложную вакцину перед заражением Minnesota/12582-1. Результаты показывают измеренное вирусывыделение в течение двух дней после заражения и четырех дней после заражения.

Фиг. 56 представляет собой график, показывающий результаты экспериментов по вирусывыделению у цыплят, которым вводили vHVT509, vHVT522 и vHVT523 или ложную вакцину перед заражением Egypt/N04915. Результаты показывают измеренное вирусывыделение в течение двух дней после заражения и четырех дней после заражения.

Фиг. 57 представляет собой график, показывающий результаты экспериментов по выделению вируса у цыплят, которым вводили vHVT509, vHVT522 и vHVT523 или ложную вакцину перед заражением Hungary/53433. Результаты показывают измеренное вирусывыделение в течение двух дней после заражения и четырех дней после заражения.

Фиг. 58 представляет собой гистограмму, показывающую результаты анализа ингибирования гемагглютинации, проведенного на цыплятах, вакцинированных одной из конструкций vHVT509, vHVT522 и vHVT523 или ложной вакциной до заражения (день 24, показано синим цветом) и после заражения (день 42, показано в оранжевом цвете). Цыплятам в этом исследовании заражали Minnesota/12582.

Фиг. 59 представляет собой гистограмму, показывающую результаты анализа ингибирования гемагглютинации, проведенного на цыплятах, вакцинированных одной из конструкций vHVT509, vHVT522 и vHVT523 или ложной вакциной до заражения (день 24, показан синим цветом) и после заражения (день 42, показан в оранжевом цвете). Куры в этом исследовании были заражены Egypt/N04915.

Фиг. 60 представляет собой гистограмму, показывающую результаты анализа ингибирования гемагглютинации, проведенного на цыплятах, вакцинированных одной из конструкций vHVT509, vHVT522 и vHVT523 или ложной вакциной до заражения (день 24, показано синим цветом) и после заражения (день 42, показано в оранжевом цвете). Цыплят в этом исследовании заражали Hungary/53433.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Указывается, что в этом раскрытии и особенно в формуле изобретения и/или абзацах, термины, такие как «содержит», «содержащий» и т.п. могут иметь значение которое придается термину в Патентном законе США; например, они могут означать «включает», «включен», «включающий» и т.п.; и что такие термины, как «состоящий в основном из» и «состоит в основном из» имеют значение, приписываемое им в патентном законе США, например, они позволяют элементам не явным образом упоминаться, но исключать элементы, которые обнаружены в предшествующем уровне техники или которые влияют на основную или новую характеристику изобретения.

Если не указано иное, технические термины используются в соответствии с обычным применением. Определения общих терминов в молекулярной биологии можно найти в Benjamin Lewin, *Genes V*. published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Термины в единственном числе включают множественные обозначаемые если контекстом ясно не указано иное. Аналогичным образом, слово «или» предназначен для включения «и» если контекст с очевидностью не указывает на иное. Слово «или» означает один из членов конкретного списка, а также включает в себя любое сочетание членов этого списка.

Термин «животное» используется в данном документе для обозначения всех млекопитающих, птиц и рыб. Животное может быть выбрано из группы, состоящей из семейства лошадиных (например, лошадь), семейства псовых (например, собак, волков, лис, койотов, шакалов), семейства кошачьих (например, львов, тигров, домашних кошек, диких кошек, других больших кошек, и других животных семейства кошачьих, включающих гепардов и рысей), овец (например, овца), бычьих (например, коровы), свиных (например, свиньи), птиц (например, кур, уток, гусей, индейки, перепела, фазана, попугая, певчих птиц, ястреба, вороны, страуса, эму и казуара), приматов (например, полуобезьян, долгопятов, обезьян, гиббонов, горилл) и рыб. Термин «животное» также включает отдельное животное на всех стадиях развития, включая стадии эмбриона и плода.

Термин «птица» может относиться к курице, каплуну, утке, гусю, индейке, фазану, рябчику, перепелу, лебедю, сквобу, голубю, попугаю, зяблику, ястребу, вороне, эму и казуару. Во многих воплощениях слово «птица» может использоваться для обозначения курицы.

Термин «полипептид» и «белок» применяются взаимозаменяемо в данном документе для обозначения полимера последовательных аминокислотных остатков.

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеотид» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо и относятся к РНК, ДНК, кДНК или кРНК и их производным, таким как содержащие модифицированные каркасы. Следует отметить, что изобретение обеспечивает полинуклеотиды содержащие последовательности комплементарные тем что описаны в данном документе. «Полинуклеотид», рассматриваемый в настоящем изобретении, включает как прямую цепь (5' - 3'), так обратную комплементарную цепь (3' - 5'). Полинуклеотиды согласно изобретению могут быть получены различными способами (например, путем химического синтеза, клонирования генов и т.д.) и могут иметь различные формы (например, линейные или разветвленные, одноцепочечные или двухцепочечные или их гибриды, праймеры, зонды и т.д.).

Термин «геномная ДНК» или «геном» используется взаимозаменяемо и относится к наследуемой генетической информации организма-хозяина. Геномная ДНК включает ДНК ядра (также называемой хромосомной ДНК), но также и ДНК пластид (например, хлоропластов) и других клеточных органелл (например, митохондрий). Геномная ДНК или геном, рассматриваемые в настоящем изобретении, также относятся к РНК вируса. РНК может быть положительной цепью или отрицательной цепью РНК. Термин «геномная ДНК», предусмотренный в настоящем изобретении, включает геномную ДНК, содержащую последовательности, комплементарные описанным в данном документе. Термин «геномная ДНК» также относится к информационной РНК (мРНК), комплементарной ДНК (кДНК) и комплементарной РНК (кРНК).

Термин «ген» используется широко для обозначения какого-либо сегмента полинуклеотида ассоциированного с биологической функцией. Таким образом, гены или полинуклеотиды включают интроны и экзоны, как в геномной последовательности, или только кодирующие последовательности, как в кДНК, такие как открытая рамка считывания (ORF), начинающаяся со стартового кодона (метиониновый кодон) и заканчивающаяся сигналом терминации (стоп-кодон). Гены и полинуклеотиды могут также включать области, которые регулируют их экспрессию, такие как области инициации транскрипции, трансляции и терминации транскрипции. Таким образом, также включены промоторы и участки связывания с рибосомами (в общем, эти регуляторные элементы находятся примерно между 60 и 250 нуклеотидами выше стартового кодона кодирующей последовательности или гена; Doree S M et al.; Pandher K et al.; Chung J Y et al), терминаторы транскрипции (как правило, терминатор расположен в пределах примерно 50 нуклеотидов ниже стоп-кодона кодирующей последовательности или гена;

Ward C K et al). Ген или полинуклеотид также относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует мРНК или функциональную РНК, или кодирует конкретный белок, и которая включает регуляторные последовательности.

Термин «гетерологичная ДНК» при использовании в данном документе, относится к ДНК, полученной из отличающегося организма, такого как другой тип клеток или вид, отличающийся от реципиента. Термин также относится к ДНК или ее фрагменту в том же геноме ДНК хозяина, где гетерологичная ДНК вставлена в участок генома, который отличается от ее изначального расположения.

«Режим дозирования» может относиться к схеме, в которой указаны как количество иммуногенной композиции, время введения и/или пути введения при лечении птиц иммуногенной композицией, которая разработана для того, чтобы вызвать желаемый эффект в данной заранее определенной популяции, и /или отдельных животных, например, снижение заболеваемости в данной популяции, например, вакцинированных птиц, снижение тяжести или подавление симптомов целевого заболевания и/или индукцию иммунного ответа у животного и/или его потомства.

«Иммунный ответ» относится к ответу, вызванному вакциной или воздействием вируса. Иммунный ответ может быть измерен как, без ограничения указанным, гуморальный иммунный ответ, например, вируснейтрализующие антитела, клеточный иммунный ответ, например, усиление ответов CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток, серологический ответ, например, с помощью ELISA и /или теста ингибирования гемагглютинации, и/или смягчение и/или уменьшение клинических симптомов и/или поддающихся измерению маркеров заболевания, на которые нацелена вводимая иммуногенная композиция.

Используемый в данном документе термин «антиген» или «иммуноген» означает вещество, которое индуцирует специфический иммунный ответ у животного-хозяина. Антиген может включать цельный организм, убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; часть или фрагмент ДНК, способной индуцировать иммунный ответ при презентировании животному-хозяину; полипептид, эпитоп, гаптен или любую их комбинацию. С другой стороны, иммуноген или антиген может содержать токсин или антитоксин.

Термин «иммуногенный белок или пептид», используемый в настоящем документе, включает полипептиды, которые являются иммунологически активными в том смысле, что после введения хозяину они способны вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против белка. Предпочтительно, если фрагмент белка такой,

что он имеет фактически такую же иммунологическую активность что и целый белок. Таким образом, белковый фрагмент по изобретению включает или фактически состоит из или состоит из по меньшей мере одного эпитопа или антигенной детерминанты. «Иммуногенный» белок или полипептид, при использовании в данном документе, включает полноразмерную последовательность белка, его аналогов или его иммуногенных фрагментов. Под «иммуногенным фрагментом» понимается фрагмент белка, который включает один или несколько эпитопов и таким образом вызывает иммунологический ответ, описанный выше. Такие фрагменты можно идентифицировать с использованием любого количества методов картирования эпитопов, хорошо известных в данной области. См., например, протоколы картирования эпитопов в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Например, линейные эпитопы можно определить, например, путем одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых носителях, пептидов, соответствующих частям белковой молекулы, и взаимодействия пептидов с антителами, когда пептиды все еще прикреплены к носителям. Такие методы известны в данной области и описаны, например, в Пат. США № 4 708 871. Точно так же конформационные эпитопы легко идентифицируются путем определения пространственной конформации аминокислот, например, с помощью рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См., например, протоколы картирования эпитопов выше.

Термин «иммуногенный белок или пептид» дополнительно предполагает делеции, добавления и замены в последовательности при условии, что полипептид функционирует, вызывая иммунологический ответ, как определено в настоящем документе. Термин «консервативная вариация» означает замену аминокислотного остатка другим биологически сходным остатком или замену нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что кодируемый аминокислотный остаток не изменяется или представляет собой другой биологически сходный остаток. В этом отношении особенно предпочтительные замены, как правило, будут консервативными по своей природе, то есть теми заменами, которые имеют место в семействе аминокислот. Например, аминокислоты в общем разделяют на четыре семейства: (1) кислые = аспаргат, глутамат; (2) основные=лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные = аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные = глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Примеры консервативных вариаций включает замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток, или

замену одного полярного остатка на друго полярный остаток, например, замена аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту, или глутамин на аспарагин, и т.п.; или похожая консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту, которая не оказывает основное воздействие на биологическую активность. Белки, имеющие фактически такую же аминокислотную последовательность как и референсная молекула, но обладающая незначительными аминокислотными заменами, которые фактически не влияют на иммуногенность белка, подпадают, следовательно, под определение референсного полипептида. Все полипептиды, полученных этими модификациями, включены в данный документ. Термин «консервативная вариация» также включает использование замещенной аминокислоты вместо незамещенной исходной аминокислоты при условии, что антитела, индуцированные полипептидом с заменой, также иммунореагируют с полипептидом без замены.

Термин «эпитоп» относится к участку антигена или гаптена, на который реагируют определенные В-клетки и/или Т-клетки. Термин также используется взаимозаменяемо с «антигенной детерминантой» или «участком антигенной детерминанты». Антитела, которые распознают один и тот же эпитоп, могут быть идентифицированы с помощью простого иммунологического анализа, показывающего способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью.

«Иммунологический ответ» на композицию или вакцину представляет собой развитие у хозяина клеточного и/или опосредованного антителами иммунного ответа на интересующую композицию или вакцину. Обычно «иммунологический ответ» включает, без ограничения указанным, один или несколько из следующих эффектов: выработку антител, В-клеток, хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных конкретно на антиген или антигены, включенные в представляющую интерес композицию или вакцину. Предпочтительно, если хозяин демонстрирует либо терапевтический, либо защитный иммунологический ответ, так что устойчивость к новой инфекции будет усиленной и/или клиническая тяжесть заболевания снизится. Такая защита будет демонстрироваться либо уменьшением, либо отсутствием симптомов, обычно проявляющихся у инфицированного хозяина, более быстрым временем выздоровления и/или снижением титра вируса у зараженного хозяина.

Используемый в данном документе термин «иммунологическая композиция» относится к любой композиции, которая способна индуцировать иммунный ответ у животного.

Используемый в данном документе термин «стимулятор иммунитета» означает любой агент или композицию, которые могут запускать иммунный ответ,

предпочтительно без инициирования или усиления специфического иммунного ответа, например, иммунного ответа против конкретного патогена. Кроме того, рекомендуется вводить иммуностимулятор в подходящей дозе.

Термины «рекомбинантный» и «генетически модифицированный» используются взаимозаменяемо и относятся к любой модификации, изменению или конструированию полинуклеотида или белка в его нативной форме или структуре или к любой модификации, изменению или конструированию полинуклеотида или белка в его естественной среде или окружении. Модификация, изменение или конструирование полинуклеотида или белка может включать, без ограничения перечисленным, делецию одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот, делецию целого гена, кодоновую оптимизацию гена, консервативную замену аминокислот, вставку одного или нескольких гетерологичных полинуклеотидов.

Термины «поливалентная вакцина или композиция», «комбинированная или комбинированная вакцина или композиция» и «поливалентная вакцина или композиция» используются взаимозаменяемо для обозначения композиции или вакцины, содержащей более одной композиции или вакцины. Поливалентная вакцина или композиция может содержать две, три, четыре или несколько композиций или вакцин. Поливалентная вакцина или композиция могут содержать рекомбинантные вирусные векторы, активные, аттенуированные или убитые вирусы дикого типа или смесь рекомбинантных вирусных векторов и вирусов дикого типа в активной, аттенуированной или убитой формах.

«Идентичность последовательности», как известно в данной области техники, относится к взаимосвязи между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, а именно референсной последовательностью и данной последовательностью, подлежащей сравнению с референсной последовательностью. Идентичность последовательности определяется путем сравнения данной последовательности с референсной последовательностью после того, как последовательности были оптимально выровнены для получения наивысшей степени сходства последовательностей, что определяется соответствием между строками таких последовательностей. При таком выравнивании идентичность последовательностей устанавливается на основе положения за положением, например, последовательности являются «идентичными» в конкретном положении, если в этом положении идентичны нуклеотиды или аминокислотные остатки. Общее количество таких идентичностей положений затем делят на общее количество нуклеотидов или остатков в референсной последовательности, чтобы получить % идентичности последовательности. Идентичность последовательностей можно легко рассчитать с помощью известных способов, включая,

без ограничения указанным, способы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), положения которой включены в настоящий документ ссылкой. Предпочтительные способы определения идентичности последовательностей предназначены для получения наибольшего совпадения между протестированными последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей закодированы в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичность последовательностей между заданными последовательностями. Примеры таких программ включают, без ограничения указанным, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FAS TA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). Программа BLASTX общедоступна в NCBI и других источниках (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), положения которых включены в данную заявку ссылкой). Эти программы оптимально выравнивают последовательности, используя штрафы за открытие разрыва по умолчанию, чтобы обеспечить наивысший уровень идентичности последовательностей между заданными и референсными последовательностями. В качестве иллюстрации, под полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, имеющую «идентичность последовательности» по меньшей мере, например, 80%, предпочтительно 85%, еще более предпочтительно 90%, наиболее предпочтительно 95% с референсной нуклеотидной последовательностью, подразумевается, что последовательность нуклеотидов данного полинуклеотида идентична референсной последовательности, за исключением того, что данная последовательность полинуклеотидов может включать до 20, предпочтительно до 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов референсной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде, содержащем нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, еще более предпочтительно 90%, наиболее предпочтительно 95% относительно референсной нуклеотидной последовательности, до 20%, предпочтительно до 15%, еще более предпочтительно 10%, наиболее предпочтительно 5% нуклеотидов в референсной последовательности могут

быть удалены или заменены другим нуклеотидом, или количество нуклеотидов до 20%, предпочтительно до 15%, еще более предпочтительно 10%, наиболее предпочтительно 5% от общего числа нуклеотидов в референсной последовательности могут быть вставлены в референсную последовательность. Эти мутации референсной последовательности могут возникать в 5'- или 3'-концевых положениях референсной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, вкрапленными либо индивидуально среди нуклеотидов в референсной последовательности, либо в одной или нескольких смежных группах в референсной последовательности. Аналогичным образом, когда полипептид, имеет данную аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере, например, 80%, предпочтительно 85%, еще более предпочтительно 90%, наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с референсной аминокислотной последовательностью, подразумевается, что данная аминокислотная последовательность полипептида идентична референсной последовательности, за исключением того, что данная последовательность полипептида может включать до 20%, предпочтительно до 15%, еще более предпочтительно 10%, наиболее предпочтительно 5% аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот референсной аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения данной полипептидной последовательности, имеющей идентичность последовательности по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, еще более предпочтительно 90%, наиболее предпочтительно 95% с референсной аминокислотной последовательностью, до 20%, предпочтительно до 15%, еще более предпочтительно 10%, наиболее предпочтительно 5% аминокислотных остатков в референсной последовательности могут быть делетированы или заменены другой аминокислотой, или количество аминокислот вплоть до 20%, предпочтительно вплоть до 15%, еще более предпочтительно 10%, наиболее предпочтительно 5% от общего числа аминокислотных остатков в референсной последовательности может быть вставлено в референсную последовательность. Эти изменения референсной последовательности могут происходить в амино- или карбокси-концевых положениях референсной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, вкрапленными либо индивидуально среди остатков в референсной последовательности, либо в одной или нескольких смежных группах в референсной последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Однако консервативные замены не учитываются как совпадения при определении идентичности последовательности.

«Гомология последовательностей», при использовании в данном документе,

относится к способу определения родства двух последовательностей. Для определения гомологии последовательностей выравнивают две или несколько последовательностей оптимальным образом и при необходимости вводят разрывы. Однако, в отличие от «идентичности последовательностей», замены консервативных аминокислот учитываются как совпадения при определении гомологии последовательностей. Другими словами, для получения полипептида или полинуклеотида, имеющего 95% гомологии последовательности с референсной последовательностью, 80%, предпочтительно 85%, еще более предпочтительно 90%, наиболее предпочтительно 95% аминокислотных остатков или нуклеотидов в референсной последовательности должны совпадать или содержать консервативную замену другой аминокислотой или нуклеотидом, или аминокислоты или нуклеотиды в количестве вплоть до 20%, предпочтительно вплоть до 15%, еще более предпочтительно 10%, наиболее предпочтительно 5% от общего количества аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включая консервативные замены, в референсной последовательности могут быть вставлены в референсную последовательность. Предпочтительно последовательность гомолога включает по меньшей мере участок из 50, еще более предпочтительно по меньшей мере 100, еще более предпочтительно по меньшей мере 250 и еще более предпочтительно по меньшей мере 500 нуклеотидов.

При использовании в данном документе термин «гомолог» включает ортологи, аналоги и паралоги. Термин «аналог» относится к двум полинуклеотидам или полипептидам, которые имеют одну и ту же или похожую функцию, но развивались отдельно в неродственных организмах. Термин «ортологи» относится к двум полинуклеотидам или полипептидам из различных видов, которые развились из общего гена-предшественника в ходе видообразования. Как правило, ортологи кодируют полипептиды имеющие одни и те же или похожие функции. Термин «паралог» относится к двум полинуклеотидам или полипептидам, которые являются родственными по причине дубликации в геноме. Паралоги как правило обладают различными функциями, но эти функции могут быть родственными. Аналоги, ортологи и паралоги полипептида дикого типа могут отличаться от полипептида дикого типа посттрансляционными модификациями, различиями в аминокислотной последовательности, или и тем и другим. В частности, гомологи изобретения будут в общем демонстрировать по меньшей мере 80-85 процентов, 85-90 процентов, 90-95 процентов, или 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов, 99 процентов идентичности последовательности, со всем или частью полипептидных или полинуклеотидных последовательностей, описанных выше, и будут демонстрировать похожие функции.

«Консервативная замена» относится к замене аминокислотного остатка или нуклеотида другим аминокислотным остатком или нуклеотидом, имеющим аналогичные характеристики или свойства, включая размер, гидрофобность и т.д., так что общая функциональность существенно не изменяется.

«Выделенный» означает измененный «рукой человека» по сравнению с естественным состоянием, то есть, если встречается в природе, то был изменен или удален из своей первоначальной среды, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, естественным образом присутствующий в живом организме, не является «выделенным», но тот же самый полинуклеотид или полипептид, выделенный из сосуществующих материалов в его естественном состоянии, является «выделенным», как данный термин используется в данной заявке.

Варианты включают аллельные варианты. Термин «аллельный вариант» относится к полинуклеотиду или полипептиду, содержащему полиморфизмы, которые приводят к изменениям в аминокислотных последовательностях белка и которые существуют в природной популяции (например, в виде или разновидности вируса). Такие естественные аллельные вариации обычно могут приводить к 1-5-процентной вариации полинуклеотида или полипептида. Аллельные варианты могут быть идентифицированы секвенированием интересующей последовательности нуклеиновой кислоты во множестве различных видов, что может быть легко проведено при использовании гибридизационных зондов для идентификации одного и того же генного локуса в этих видах. Любая и все такие нуклеотидные вариации и обусловленные ими аминокислотные полиморфизмы или вариации, которые являются результатом природных аллельных вариаций, и которые не изменяют функциональную активность интересующего гена, попадают в рамки данного изобретения.

Термин «идентичность» в отношении последовательностей может относиться к числу позиций с идентичными нуклеотидами или аминокислотами разделенному на число нуклеотидов или аминокислот в более короткой из двух последовательностей где выравнивание двух последовательностей может быть определено в соответствии с алгоритмом Вилбура и Липмана (Wilbur and Lipman). Идентичность последовательности или сходство последовательности двух аминокислотных последовательностей, или идентичность последовательности двух нуклеотидных последовательностей может быть определена с помощью пакета программного обеспечения «Vector NTI» (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Карлсбад, Калифорния). Когда последовательности РНК называются похожими, или обладают степенью идентичности последовательности или гомологии с последовательностью ДНК, тимидин (Т) в последовательности ДНК рассматривается как

равный урацилу (U) в последовательности РНК. Таким образом, последовательности РНК находятся в пределах объема изобретения и могут быть получены из последовательностей ДНК, если тимидин (T) в последовательностях ДНК рассматривать как равный урацилу (U) в последовательностях РНК.

Полинуклеотиды раскрытия включают последовательности, которые являются вырожденными из-за генетического кода, например, оптимизированная частота применения кодонов для конкретного хозяина. Используемый в данном документе термин «оптимизированный» относится к полинуклеотиду, который генетически сконструирован для увеличения его экспрессии у данного вида. Чтобы получить оптимизированные полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, последовательность ДНК гена белка может быть модифицирована для 1) включения кодонов, предпочитаемых высоко экспрессирующимися генами в конкретных видах; 2) для включения содержания A+T или G+C в составе нуклеотидных оснований, по существу обнаруженного в указанных видах; 3) образования иницирующей последовательности указанных видов; или 4) для исключения последовательностей, которые вызывают дестабилизацию, некорректное полиаденилирование, деградацию и терминацию РНК, или таких, которые образуют вторичную структуру шпилек или сайты сплайсинга РНК. Повышенная экспрессия белка у указанных видов может быть достигнута за счет использования частоты распределения использования кодонов у эукариот и прокариот или у определенного вида.

Термин «частота предпочтительного использования кодонов» относится к предпочтению демонстрируемому конкретной клеткой-хозяином в применении нуклеотидных кодонов для определения данной аминокислоты. Существуют 20 аминокислот, большая часть которых определена более чем одним кодоном. Следовательно, все вырожденные нуклеотидные последовательности включены в раскрытие при условии что аминокислотная последовательность полипептида, кодируемая нуклеотидной последовательностью является функционально неизменной.

Используемый в данном документе термин «ветеринарно-приемлемый носитель» включает любые без исключения растворители, дисперсионные среды, покрытия, адъюванты, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и фунгицидные средства, изотонические средства, вещества, замедляющие адсорбцию, и т.п.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что используемая в данном документе композиция может включать известные физиологически приемлемые стерильные растворы для инъекций. Для приготовления готового к применению раствора для парентеральной инъекции или инфузии водные изотонические растворы, такие как,

например, физиологический раствор или соответствующие растворы белков плазмы легко доступны. Кроме того, иммуногенные и вакцинные композиции по настоящему изобретению могут включать разбавители, изотонические агенты, стабилизаторы или адьюванты. Разбавители могут включать воду, физиологический раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Изотонические агенты могут включать, среди прочего, хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают, среди прочего, альбумин и щелочные соли этилендиамина тетрауксусной кислоты.

«Адьюванты», используемые в данном документе, могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Кембридж, Массачусетс), GPI-0100 (Galénica Pharmaceuticals, Inc., Бирмингем, Алабама), эмульсию вода-в-масле, эмульсию масло-в-воде, эмульсию вода-в-масле-в-воде. Эмульсия может быть основана, в частности, на легком жидком парафиновом масле (типа Европейской фармакопей); изопреноидном масле, таком как сквалан или скваленовое масло, полученное в результате олигомеризации алкенов, в частности изобутена или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, в частности растительные масла, этилолеат, пропиленгликольди-(каприлат/капрат), глицерилтри-(каприлат/капрат) или пропиленгликольдиолеат; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности сложных эфирах изостеариновой кислоты. Масло используется в сочетании с эмульгаторами для образования эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионогенные поверхностно-активные вещества, в частности сложные эфиры сорбитана, маннида (например, олеата ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и сополимерные блоки полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности продукты Pluronic, особенно L121. См. Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D.E.S.). JohnWiley and Sons, NY, pp 51-94 (1995) и Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997).

Иммуногенные композиции описаны в данном документе. В частности, настоящее изобретение относится к области ветеринарных вакцин, а именно к вакцинам на основе рекомбинантных вирусных векторов. В частности, в настоящем документе описаны иммуногенные композиции, которые включают рекомбинантные вирусные векторы для применения у птиц против одного или нескольких заболеваний, включая, без ограничения указанным, птичий грипп, болезнь Марека, болезнь Ньюкасла и инфекционную бурсальную болезнь.

Заболевания, на которые направлена раскрытая в данном документе иммуногенная

композиция, включают болезнь Марека (MD), которая представляет собой высокоинфекционное заболевание птиц. Клинические симптомы MD включают, без ограничения указанным, потерю массы, паралич, например, ног или крыльев, опухоли, такие как опухоли в сердце, яичниках, яичках, мышцах, легких, перьевых фолликулах и т.д., поражения глаз, неправильные зрачки и смертность. MD связана с наличием Т-клеточных лимфом в нескольких органах и нервах. В некоторых случаях антитела материнского происхождения (англ. maternally derived antibodies, MDA) от иммунных матерей могут обеспечить защиту новорожденных птиц.

Как описано, настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантные векторы, которые включают и экспрессируют антигены птичьих патогенов. Кроме того, рекомбинантные векторы можно использовать в иммуногенных композициях, например, вакцинах, включающих рекомбинантные векторы. Например, иммуногенная композиция или вакцина могут включать рекомбинантные векторы, которые включают гетерологичные полинуклеотиды, кодирующие и экспрессирующие по меньшей мере один антиген птичьего патогена. Кроме того, описаны способы лечения птиц, например, способы вакцинации против различных птичьих патогенов и способ получения рекомбинантных векторов.

Векторы могут включать, без ограничения указанным, вирусы, например, живые вирусы, инактивированные вирусы, такие как убитая вакцина, рекомбинантные вирусы и/или бактерии. Иммуногенные композиции, как описано в данном документе, могут включать один или несколько векторов.

Вакцинные векторы могут быть сконструированы из вируса. В некоторых случаях вирус для применения в рекомбинантном векторе для применения в иммуногенной композиции может быть заранее определен на основе свойств вируса. Например, предварительно определенный вирус для применения в рекомбинантном векторе может включать вирусы, включая, без ограничения указанным, герпесвирус индеек (HVT), вирус болезни Марека, такой как вирус болезни Марека серотипа 3 (MDV-3), MDV-1, MDV-2 и/или герпесвирус индейковых, такой как герпесвирус индейковых серотипа 1 (MeHV-1).

Например, введение векторной вакцины MDV-3 (HVT) домашней птице может вызвать иммунный ответ против экспрессированного гетерологичного гена. В некоторых случаях векторную вакцину против MDV-3 можно использовать для экспрессии и/или доставки терапевтического белка, например, цитокин для управления иммунным ответом животного (например, птицы).

Штамм MDV-3, такой как FC-126, можно использовать для конструирования вирусных векторов. Геномная нуклеотидная последовательность HVT (MDV-3) доступна,

например, в GenBank™ как: AF291866 (штамм FC-126).

Генетические местоположения для вставки гетерологичной генной конструкции в MDV-3 (т.е., HVT) могут включать, без ограничения указанным, несущественные локусы. Например, вставка может происходить в положении уникальной короткой (Us) области генома MDV-3, в уникальной длинной (UL) области HVT генома MDV-3.

Для управления экспрессией гетерологичного гена можно использовать различные промоторы, включая, без ограничения указанным, промотор gpX PRV, промотор LTR вируса саркомы Рауса, промотор раннего гена SV40, промотор гена бета-актина курицы и/или предранний 1 промотор гена бета-актина человека (hCMV IE1), промотор mCMV или мышинового (mCMV IE1) цитомегаловируса. В любом заданном вирусном векторе можно использовать один или несколько промоторов для управления экспрессией включенных последовательностей генов.

Для конструирования рекомбинантных векторов гетерологичная нуклеиновая кислота, которая должна быть встроена в геном вектора, обычно содержит по меньшей мере один гетерологичный ген или кодирующую область, которая кодирует антиген (по меньшей мере, его иммуногенную часть). В некоторых случаях конструкция может содержать промоторную последовательность для управления экспрессией гетерологичного гена и регуляторные сигналы, такие как энхансер или терминатор транскрипции. Такую комбинированную вставку часто называют «экспрессирующей кассетой».

Эффект от вставки экспрессирующей кассеты в геном вектора различается в зависимости от места и способа ее встраивания: геном вектора может стать больше, прежним или меньше по размеру в зависимости от того, что является конечным результатом – это добавление, замена или удаление генетического материала в геном, соответственно. Также может иметь значение расположение вставки: внутри кодирующей, некодирующей или регуляторной области генома. Среди прочего, этот выбор влияет на характеристики полученной векторной вакцины с точки зрения ее способности к репликации и экспрессии, а также ее генетической стабильности.

В некоторых случаях вирусные векторы могут быть сконструированы путем включения одной или нескольких вставок экзогенной последовательности в MDV-1, MDV-2 и/или MDV-3 с использованием донорной плазмиды. Кроме того, некоторые иммуногенные композиции могут включать две или несколько вирусных конструкций, которые включают экзогенные последовательности. Например, каждая из различных комбинаций вирусных векторов, образованных из MDV-1, MDV-2 и/или MDV-3, может включать одну или несколько экзогенных последовательностей против заболеваний для

образования иммуногенной композиции. Кроме того, несколько вирусных векторов могут быть объединены в иммуногенную композицию для обеспечения защиты от 3 или более заболеваний.

Как показано на фиг. 1, в некоторых воплощениях вакцинных векторов, описанных в настоящем документе, в качестве родительского вируса MDV-3 используется штамм FC-126 (например, Ross, LJ et al., J. Gen. Virol. 70, 1789-1804, 1989).

В зависимости от родительского вируса конструкция донорной плазмиды может варьировать. Донорные плазмиды могут включать, без ограничения указанным, промотор, такой как промотор mCMV, представляющий интерес ген для заболевания-мишени и/или остановку транскрипции, такую как полиА. Например, в воплощении, нацеленном на AIV, выбранная донорная плазида может включать промотор mCMV, AIV НА COBRA-C и/или полиА-хвост SV40. Такая донорная плазида может быть обозначена как pCD046-COBRA-C и модифицировать штамм MDV-3, FC-126, с образованием vHVT509, как показано на фиг. 1.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены AIV, может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью плазмиды, как показано на фиг. 16. В частности, нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены вируса гриппа и вируса гепатита В, может иметь более чем 90-процентную идентичность последовательности с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 16. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены вируса гриппа и вируса гепатита В, может иметь более чем 95-процентную идентичность последовательности с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 16.

В некоторых воплощениях штамм MDV-3, FC-126, может быть модифицирован для включения последовательности, кодирующей белок VP2 инфекционной бурсальной болезни (IBDV), с образованием вируса, известного как vHVT013 или Vaxxitek (научное обсуждение EPAR на сайте www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/vaxxitek-hvtibd-epar-scientific-discussion_en.pdf; www.biodic.go.jp/bch/download/lmo/H28.9.23_doubutsuiyaku_sp.pdf). Например, исходным вирусным вектором, используемым для конструирования модифицированного вирусного вектора, описанного в настоящем документе (который представляет собой вирусный

вакцинный штамм), может быть HVT013 или vHVT013, или активный ингредиент в VAXXИТЕК® (также иногда называемый vHVT013-069).

В частности, vHVT13 (или HVT013-69) является активным ингредиентом вакцины VAXXИТЕК® (HVT+IBD) Merial (Boehringer Ingelheim Animal Health's). В Пат. США № 5980906, конструкция HVT+IBD, широко известная как vHVT013, или vHVT013-69, или HVT013, или активный ингредиент в VAXXИТЕК® называется vHVT17. Вектор vHVT13 (или vHVT013-69, или HVT013) включает экспрессирующую кассету, содержащую промотор mCMV IE (SEQ ID NO:6), ген IBDV VP2 (SEQ ID NO:1, кодирующий SEQ ID NO:2) и полиА-хвост SV40 (SEQ ID NO:8), встроенный в сайт встраивания IG1.

Этот рекомбинантный вакцинный штамм, vHVT013 (вектор HVT, экспрессирующий ген IBDV VP2), был сконструирован в соответствии с протоколом, который включал нацеливание на область вставки посредством гомологичной рекомбинации между ДНК родительского штамма HVT, FC-126, с плазмидой, которая включала представляющий интерес ген, окруженный гомологическими плечами. Полученный рекомбинант может быть дополнительно модифицирован для создания вирусных векторов vHVT522 и/или vHVT523.

В некоторых воплощениях vHVT013 можно модифицировать путем добавления последовательности, кодирующей белок. В частности, vHVT013 может быть модифицирован для включения последовательности, кодирующей антиген и/или белок заболевания. Например, vHVT013 может быть модифицирован для включения последовательности, кодирующей антиген и/или белок птичьего гриппа. Как показано на фиг. 1, vHVT013 может быть модифицирован с использованием донорной плазмиды для включения последовательности, кодирующей антиген птичьего гриппа, который был сформирован в НА Cobra-C H5 для образования вирусного вектора vHVT522.

Например, vHVT013 может быть модифицирован с использованием донорной плазмиды для включения последовательности, кодирующей антиген птичьего гриппа. Как показано на фиг. 1, vHVT013 можно модифицировать с использованием плазмиды, которая включает последовательность, кодирующую антиген AIV, такую как Cobra-C H5 HA, с образованием вирусных векторов, таких как vHVT522 и/или vHVT523. В частности, можно использовать pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C, pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C, а также другие плазмиды, включающие различные комбинации экзогенных последовательностей.

В некоторых воплощениях vHVT522 может включать ген, кодирующий белок синтетического гемагглютинина (НА) вируса птичьего гриппа А (подтип H5), разработанный с помощью подходов компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA). Синтетический структурный капсидный белок VP2

вируса инфекционной бурсальной болезни.

Рекомбинантный вирусный вектор может быть сформирован с использованием вставочной плазмиды для сайта Intergenic I (IG1), которая может включать поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок H5 HA), участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и капсидный белок вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV VP2). Эта плазида может быть вставлена с помощью гомологичной рекомбинации в правое плечо IG1 и IBDV VP2 вируса Vaxxitek.

В некоторых воплощениях донорная плазида может представлять собой pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C, которая может представлять собой синтетически упорядоченную плазмиду, включающую правое плечо Intergenic I вируса Vaxxitek, поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок H5 HA), IRES и капсидный белок вируса инфекционной бурсальной болезни. Плазида может включать промотор mCMV исходного вируса. В частности, воплощение vHVT522 может включать промотор mCMV из начальной точки, вирус mHVT013, как показано на фиг. 1.

Рекомбинация может происходить *in vitro* во вторичных клетках фибробластов куриного эмбриона (2° CEF). Рекомбинантную селекцию можно осуществить с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA) с использованием куриной сыворотки против птичьего гриппа и ПЦР-амплификации со специфическими праймерами. Диаграммы плазмид показаны на фиг. 14 и фиг. 15.

В некоторых воплощениях плазида pVP2-IRES-Cobra-C может быть создана путем клонирования синтетического фрагмента COBR-C (Genscript Lot U5872BA260-3) в pVP2-IRES-Cobra-A. Кроме того, плазида pVP2-IRES-Cobra-C может быть модифицирована путем замены фрагмента HindIII-BspI новым синтетическим фрагментом VP2+COBC для удаления промежуточного участка последовательности между концом последовательности IRES и началом присутствующей последовательности COBRA-C в pVP2-IRES-Cobra-C. Полученная донорная плазида называется pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C. Донорная плазида, pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C, может быть использована для создания рекомбинантного вируса.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены AIV и IBDV, может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 16. В частности, нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены вируса гриппа и вируса

гепатита В, может иметь более чем 90-процентную идентичность последовательности с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 16. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены вируса гриппа и вируса гепатита В, может иметь более чем 95-процентную идентичность последовательности с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 16.

Рекомбинацию *in vitro* (IVR) можно осуществить путем совместной электропорации клеток 2° CEF с использованием линейаризованной pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C в качестве донорной плазмиды и вирусной ДНК, выделенной из vHVT013. Совместная электропорация может быть выполнена с использованием 1×10^7 2° CEF в 300 мкл Opti-MEM и может быть подвергнута электрошоку при 150 вольт с емкостью 950 в 2-мм кювете для электропорации. Затем трансфицированные клетки можно высевать в 96-луночный планшет и инкубировать в течение 4 дней. Затем клетки, выращенные в 96-луночном планшете, можно дублировать в два 96-луночных планшета. Один набор 96-луночных планшетов можно использовать для ИФА с использованием куриной поликлональной сыворотки против AIV H5 HA для выявления положительных лунок, содержащих рекомбинанты, а другой набор 96-луночных планшетов можно использовать для выделения инфицированных клеток из соответствующих положительных лунок.

Способы очистки рекомбинантных вирусов могут быть выполнены сначала путем дублирования 96-луночных планшетов и ИФА-отбора лунок, содержащих наибольшее количество ИФА-положительных бляшек с наименьшим количеством ИФА-отрицательных бляшек. Лунки, соответствующие этим критериям, затем могут быть собраны и доведены до 1 мл в DMEM + 2% FBS. Из исходного раствора объемом 1 мл можно отобрать 10-20 мкл и смешать с 1×10^7 2° CEF в 10 мл DMEM + 2% FBS, а затем можно разделить на аликвоты в новый 96-луночный планшет, пытаясь получить одиночные бляшки HVT на лунку. Надсадочную жидкость лунок, содержащий одиночные бляшки, можно проверить на отсутствие родительского вируса с помощью ПЦР. Этот процесс может быть повторен в течение нескольких раундов, пока во всех тестируемых лунках не будут показаны чистые рекомбинантные образцы полос и отсутствие родительского вируса.

В одном воплощении vHVT013 может быть модифицирован для кодирования двух или более экзогенных последовательностей. Например, воплощение может включать vHVT013, модифицированный последовательностями, кодирующими белок ньюкаслской болезни (NDV), такой как белок NDV-F, и дополнительную последовательность, кодирующую белок птичьего гриппа, такой как Cobra-C H5 HA, как показано на фиг. 1.

В частности, vHVT523 может включать ген, кодирующий синтетический белок

гемагглютинин (НА) вируса птичьего гриппа (AIV) А (подтип Н5), разработанный с помощью компьютерно-оптимизированных подходов с широкой реактивностью (COBRA). Этот конкретный белок также называется в этом документе как COBRA-C для компьютерно-оптимизированного антигена с широкой реактивностью версии С. Кроме того, vHVT523 может включать синтетический гибридный белок вируса болезни Ньюкасла (NDV) (F).

Конструкция vHVT523, полученная из рекомбинантного вируса HVT, может включать сайт Intergenic I во фрагменте BamHI I, который может включать промотор mCMV, гибридный белок F NDV, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), белок НА вируса птичьего гриппа (подтип Н5, COBRA-C) и SV40 полиА-хвост.

Донорной плазмидой может быть pFwt-IRES[MOD]-COBRA-C, каркас которой включает плазмиду, включающую синтетический фрагмент ДНК из плеча Intergenic I вируса vHVT013, поли-А хвост SV40, COBRA-C (белок Н5 НА), IRES, белок NDV-F и промотор mCMV. Рекомбинация может происходить *in vitro* во вторичных клетках фибробластов куриного эмбриона (2° CEF). Рекомбинантный отбор можно осуществить с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA) с использованием куриной сыворотки против птичьего гриппа и ПЦР-амплификации со специфическими праймерами.

В некоторых воплощениях плазида pFwt-IRES-COBRA-C может быть сконструирована путем замены гена Saudi-Arabia Н9 в созданной ранее плазмиде (pFwt-IRES-SaH9opt) на ген COBRA-C, извлеченный из pVP2-IRES-COBRA-C. Ген COBRA-C может быть выделен из pVP2-IRES-COBRA-C с использованием рестрикционных ферментов SalI и HindIII и клонирован в pFwt-IRES-SaH9opt, который также был расщеплен теми же ферментами. Плазмиду pFwt-IRES-Cobra-C дополнительно модифицировали путем замены фрагмента HindIII-BlnI новым синтетическим фрагментом F+COBC для удаления промежуточного участка последовательности между концом последовательности IRES и началом последовательности COBRA-C, присутствующей в pFwt-IRES-Cobra-C. Новая и правильная донорная плазида называется pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C. Эта плазида может быть использована для создания рекомбинантного вируса. Диаграммы воплощения конструкции плазмиды показаны на фиг. 36 и фиг. 37.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены AIV и NDV, может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 38. В частности,

нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены для AIV и NDV, может иметь идентичность последовательности более чем 90 процентов с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 38. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая донорную плазмиду, используемую для конструирования вирусного вектора, включающего антигены для AIV и NDV, может иметь идентичность последовательности более чем 95 процентов с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 38.

В некоторых воплощениях рекомбинацию *in vitro* (IVR) можно проводить путем совместной электропорации клеток 2° CEF с использованием линейаризованной pFwt-IRES[MOD]-COBRA-C в качестве донорной плазмиды и вирусной ДНК, выделенной из vHVT013. Совместная электропорация может быть выполнена с использованием 1×10^7 2° CEF в 300 мкМ Opti-MEM и шока при 150 вольт с емкостью 950 в кювете для электропорации 2 мм. Трансфицированные клетки можно высевать в 96-луночный планшет и инкубировать в течение 4 дней. Клетки, выращенные в 96-луночном планшете, затем можно дублировать в двух 96-луночных планшетах. Один набор 96-луночных планшетов можно использовать для IFA с использованием куриной поликлональной сыворотки против AIV H5 NA для выявления положительных лунок, содержащих рекомбинанты, а другой набор 96-луночных планшетов можно использовать для выделения инфицированных клеток из соответствующих положительных лунок.

Для выделения рекомбинантных вирусных векторов можно использовать способы очистки рекомбинантных вирусов. Эти способы очистки могут быть выполнены сначала путем дублирования 96-луночных планшетов и выбора IFA для лунок, содержащих наибольшее количество IFA-положительных бляшек с наименьшим количеством IFA-отрицательных бляшек. Лунки, соответствующие этим критериям, могут быть собраны и доведены до 1 мл в DMEM + 2% FBS. Из исходного раствора объемом 1 мл можно отобрать 10-20 мкл и смешать с 1×10^7 2° CEF в 10 мл DMEM + 2% FBS, а затем можно разделить на алиquotы в новый 96-луночный планшет, пытаясь получить одиночные бляшки HVT на лунку. Надосадочную жидкость из лунок, содержащих одиночные бляшки, можно проверить на отсутствие родительского вируса с помощью ПЦР. Этот процесс может быть повторен в течение нескольких раундов, пока во всех тестируемых лунках не будут показаны чистые рекомбинантные образцы полос и отсутствие родительского вируса.

Нуклеотидная последовательность плазмиды pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с

последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 16. Как показано, вирусная конструкция vHVT509 образуется из штамма MDV-3, FC-126, с добавлением последовательности, кодирующей *Sobra-C H5 HA*.

Выбор вирусного вектора может включать рассмотрение нескольких свойств вируса, включая, без ограничения указанным, репликацию вируса в хозяине, способность вируса индуцировать иммунный ответ, такой как гуморальный и/или клеточно-опосредованный иммунитет, снижение смертности, уменьшение представляющих интерес симптомов, простота получения вируса, способность включать вирус в иммуногенную композицию, простота введения птице и т.д. Вирусы, выбранные для применения в производстве иммуногенных композиций, могут включать один или несколько штаммов вирусов, таких как герпесвирус индеек (rHVT), такой как куриный герпесвирус, вирус болезни Марека, герпесвирус индейковых и/или другие вирусы, известные в данной области техники. В частности, различные штаммы HVT, MDV или MeHV могут быть выбраны для применения в качестве живой вирусной векторной вакцины для защиты от многих важных заболеваний, в частности от вирусных заболеваний, поражающих домашнюю птицу.

Иммунизация с использованием вируса болезни Марека (MDV) серотипа 3 (MDV-3), также известного как герпесвирус индеек (HVT), используется во всем мире для защиты популяции кур от MDV. Кроме того, HVT использовался для разработки живой вирусной векторной вакцины для защиты от многих важных вирусных болезней домашней птицы благодаря ее постоянной репликации в организме хозяина, ее способности индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет, а также ее относительно простому получению и введению, среди прочих преимуществ.

Конкретный штамм MDV (т.е. HVT), MDV-1, MDV-2 и/или MDV-3 может быть выбран по заранее определенным свойствам, представляющим интерес для желаемого продукта или применения (т. введения конкретному классу животного). Эти свойства могут включать, без ограничения указанным, эффективность против представляющего интерес заболевания, в частности, в некоторых случаях эффективность вирусного вектора против представляющего интерес заболевания. Например, эффективность вирусного вектора против заболевания, которое он сам кодирует, и/или против заболевания, от которого происходят экзогенные последовательности. Например, экзогенные последовательности, кодирующие антигены и/или белки, полученные из IBD, ND, AIV, например, AIV H5, и/или любого другого представляющего интерес вируса. Штамм MDV, в частности, MDV-3, можно использовать для конструирования рекомбинантного вирусного вектора. Например, штамм MDV-3 FC-126 можно использовать для

иммуногенной композиции благодаря его постоянной репликации в организме хозяина, его способности индуцировать как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунитет, а также его относительно легкому получению и введению, среди прочих преимуществ. Например, клон 2 MDV-3 FC-126 можно использовать для образования представляющей интерес рекомбинантной конструкции.

Рекомбинантные вакцинные векторы могут быть сконструированы из заранее определенных вирусов с использованием плазмид. Плазмиды можно использовать для встраивания одной или нескольких желаемых последовательностей в заданный вирус с образованием рекомбинантного вирусного вектора. Кроме того, экзогенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая предварительно выбранные антигены, может быть включена в некоторые рекомбинантные вакцинные векторы. В частности, последовательность, кодирующая представляющие интерес белки, например, последовательности, которые кодируют антигены одной или нескольких болезней птиц, можно встроить в вирусный вектор с использованием плазмиды.

В некоторых случаях плазмиды можно использовать для вставки экспрессирующей кассеты в вирусный вектор. Например, кассета экспрессии может включать предварительно выбранную ДНК, которая может включать один или несколько генов и последовательностей, контролирующих их экспрессию (например, регуляторную последовательность). Кассета экспрессии может дать указание клеточному механизму вырабатывать РНК и/или белок (белки). Экспрессирующие кассеты могут обеспечивать модульное клонирование кодирующих белок последовательностей.

В некоторых случаях экспрессирующая кассета может включать несколько компонентов, например, промоторную последовательность, открытую рамку считывания и/или нетранслируемые области. Экспрессирующие кассеты могут быть трансфецированы в различные векторы. В частности, в вектор можно вставить промотор и ДНК из желаемого гена.

Последовательности, происходящие из одного или нескольких заболеваний, таких как птичий грипп (AI), например, высокопатогенный птичий грипп (HPAIV), инфекционная бурсальная болезнь (IBDV), болезнь Ньюкасла (NDV), вирус инфекционного ларинготрахеита (ILT), HVT, MDV, например, представляющие интерес вирусы MDV-1, MDV-2 или MDV-3, MeHV и/или птичьих вирусы, можно комбинировать с образованием иммуногенного агента для применения в иммуногенной композиции. Например, иммуногенная композиция может представлять собой вакцину, такую как поливалентная вакцина.

Последовательности, включая экзогенные последовательности, можно

использовать для конструирования вирусного вектора. Например, некоторые вирусные векторы могут включать последовательности, происходящие от птичьих патогенов, включая, без ограничения указанным, вирус птичьего энцефаломиелита, птичий реовирус, птичий парамиксовирус, птичий метапневмовирус, птичий грипп, птичий аденовирус, птичий вирус оспы, птичий коронавируса, птичий ротавирус, куриный вирус анемии, астровирус птиц, парвовирус птиц, вирус болезни Ньюкасла, вирус болезни Марека, вирус инфекционной бурсальной болезни, кокцидиоз (*Eimeria* sp.), *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Pasteurella* sp., *Avibacterium* sp., *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Clostridium* sp. и *E. coli*.

В некоторых воплощениях вирусные векторы для применения в иммуногенной композиции, такой как вакцина, могут включать гены, последовательности или нуклеотиды, кодирующие представляющий интерес антиген или полипептид, включая, без ограничения указанным, гибридный белок вируса ньюкаслской болезни (NDV-F), гемагглютинин нейраминидазу вируса ньюкаслской болезни (NDV-HN), гликопротеин С вируса болезни Марека (gC), гликопротеин В вируса болезни Марека (gB), гликопротеин Е вируса болезни Марека (gE), гликопротеин I вируса болезни Марека (gI), гликопротеин вируса болезни Марека H (gH) или гликопротеин L вируса болезни Марека (gL), IBDV VP2, IBDV VPX, IBDV VP3, IBDV VP4, гликопротеин В из ILTV, гликопротеин I из ILTV, ILTV UL32, гликопротеин D из ILTV, гликопротеин E из ILTV, гликопротеин C из ILTV, грипп гемагглютинин (HA), нейраминидазу гриппа (NA), защитные гены, полученные из *Mycoplasma gallisepticum* (MG) или *Mycoplasma synoviae* (MS), или их комбинации. Примеры трехвалентных вирусных векторов показаны на фиг. 2.

Рекомбинантный вирусный вектор может быть сконструирован методом рекомбинации, который включает трансфекцию клетки вирусом и вставочной плазмидой или донорной плазмидой для инсерции в конкретный сайт вируса.

Нуклеотидные вставки, доставленные в вирус с помощью донорной плазмиды, могут включать последовательности, кодирующие желаемые белки, такие как антигены, или могут быть выбраны на основе эффекта экспрессии последовательностей *in vivo*. Донорные плазмиды могут быть выбраны по определенным свойствам плазмиды, таким как способность вводить последовательности в определенный сайт, например, плазида может включать фланкирующие гомологичные области для прямой рекомбинации с вирусом, сила экспрессии рекомбинантного антигена и/или стадия экспрессии в жизненном цикле вируса.

Например, донорную плазмиду можно использовать для введения желаемых последовательностей в локус рекомбинации вируса. Например, последовательности могут

быть вставлены в локус рекомбинации MDV-3, такой как локус Intergene 1, расположенный во фрагменте BamHI-I.

В некоторых воплощениях выбранная донорная плазида может включать один или несколько промоторов mCMV, поли-А-хвост SV40, экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген птичьего гриппа, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), экзогенную последовательность, кодирующую антиген вируса инфекционной бурсальной болезни и/или экзогенную последовательность, кодирующую антиген вируса болезни Ньюкасла.

В частности, рекомбинантный вирусный вектор может быть сконструирован методом рекомбинации, который включает трансфекцию клетки MDV-3 (например, вирусом герпеса индеек (HVT)) и вставочной плазмидой для встраивания в сайт Intergenic I (IG1) из MDV-3, которая может включать поли-А-хвост SV40, экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген птичьего гриппа, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген вируса инфекционной бурсальной болезни, и/или экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген вируса болезни Ньюкасла.

Вставки для включения в донорную плазмиду и впоследствии образованный вирусный вектор могут включать последовательности, кодирующие желаемые белки, такие как антигены, или могут быть выбраны на основе эффекта экспрессии последовательностей, который будет иметь *in vivo*.

Экзогенные последовательности, вставленные в вирус для формирования вирусного вектора, в некоторых случаях могут быть оптимизированы по кодонам.

Могут быть разработаны иммуногенные композиции, такие как вакцины, которые включают конструкции vMDV-H5 (т.е. vHVT-H5), которые включают различные вставки H5 и/или вставки для антигенов других заболеваний. В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может быть сконструирован так, чтобы включать синтетический ген белка гемагглютинина (HA) вируса птичьего гриппа А (подтип H5) с использованием подхода компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA). Например, рекомбинантный MDV (т.е. HVT) может быть сконструирован так, чтобы включать синтетический ген белка гемагглютинина (HA) вируса птичьего гриппа А (подтип H5) с использованием COBRA.

В частности, могут быть разработаны рекомбинантные вакцины MDV HA H5, которые включают различные вставки H5, вставки для антигенов других заболеваний и/или другие функциональные вставки. *in vivo* рекомбинантный вектор HVT со вставкой H5 (vMDV-H5 и/или vHVT-H5) продемонстрировал многообещающие результаты против

HPAI у домашней птицы. В некоторых воплощениях в одном вирусном векторе может быть предусмотрена одна вставка H5. Однако воплощения вирусного вектора могут включать множественные генные вставки H5.

Сочетание технологий COBRA и vMDV (т.е. vHVT) может улучшить контроль вируса H5 HPAI в полевых условиях. Использование живого вируса в качестве векторной платформы может повысить эффективность COBRA HA.

Использование рекомбинантных технологий вместе с COBRA для создания иммуногенных агентов для иммуногенных композиций, предназначенных для птиц, может улучшить борьбу с вирусами в полевых условиях. Например, использование COBRA и рекомбинантных вирусных векторов для конструирования иммунологической композиции может привести к улучшенному контролю вируса H5 HPAI.

Например, молекула экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген HA птичьего гриппа, может быть оптимизирована по кодонам при использовании в вирусном векторе, таком как MDV-3.

Могут быть сформированы вирусные векторы, которые включают одну или несколько представляющих интерес последовательностей. В частности, вирусный вектор может представлять собой рекомбинантный MDV, который включает промотор, антиген птичьего вируса и/или полиА-хвост SV40 в области рекомбинации MDV, а также другие последовательности, кодирующие представляющие интерес гены и/или функциональности.

В некоторых воплощениях рекомбинантный MDV может быть сконструирован так, чтобы включать антиген, такой как ген белка вируса птичьего гриппа. Такие рекомбинантные конструкции MDV могут также включать промотор, ген белка AIV, предварительно выбранные последовательности для вставки в заранее определенные сайты MDV.

Рекомбинантная конструкция MDV может включать промотор mCMV, AIV HA COBRA-C, полиА-хвост SV40 в области рекомбинации сайта Intergenic 1 штамма MDV-3. Например, вирусный вектор vHVT509 может представлять собой рекомбинантный MDV-3, который включает промотор mCMV, AIV HA COBRA-C, полиА-хвост SV40 в области рекомбинации сайта Intergenic 1 штамма MDV-3 FC-126.

Нуклеотидная последовательность вирусного вектора vHVT509 может идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью секвенированной области vHVT509 на фиг. 13. В некоторых воплощениях может быть желательно использовать нуклеотидную последовательность,

которая имеет более чем около 90% идентичность и/или гомологию с последовательностью для vHVT509, как показано на фиг. 13.

В одном воплощении аминокислотная последовательность гена AIV HA COBRA-C, используемая в vHVT509, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, как показано на фиг. 12. В зависимости от целевого заболевания, целевых животных и/или свойств животных может быть желательным использовать вирусный вектор, имеющий по меньшей мере часть нуклеотидной последовательности, которая имеет более чем около 90% идентичность и/или гомологию с последовательностью для vHVT509, как показано на фиг. 13.

В некоторых воплощениях донорная плаزمиды, используемая для формирования вирусного вектора, может включать последовательность, кодирующую антиген птичьего гриппа. Вирусный вектор можно модифицировать с помощью плазмиды, которая включает последовательность, кодирующую антиген AIV. В некоторых воплощениях vHVT522 может включать ген, кодирующий белок синтетического гемагглютинина (HA) вируса птичьего гриппа А (подтип H5), разработанный с помощью подходов компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA).

Донорная плазмиды. В некоторых случаях рекомбинантная вирусная конструкция может быть получена из родительского вируса, такого как MDV-3. В частности, такой штамм, как MDV-3 FC-126 (Igarashi T. et al., J. Gen. Virol. 70, 1789-1804, 1989) может быть использован. Например, в некоторых воплощениях вирусного вектора исходным вирусом может быть клон 2 MDV-3 FC-126. Для введения желаемых последовательностей в локус рекомбинации MDV-3 можно использовать донорную плазмиду. В некоторых случаях донорная плазмиды может быть сконструирована так, что по меньшей мере часть плазмиды гомологична вирусу-мишени. Например, донорная плазмиды может быть сконструирована так, что по меньшей мере часть вставки находится в локусе рекомбинации MDV3, таком как локус Intergene 1, расположенный в фрагменте BamHI-I.

Донорные плазмиды могут быть выбраны и/или сконструированы на основе представляющих интерес свойств. Донорная плазмиды может включать промотор, представляющий интерес ген и полиА (остановку транскрипции). Промоторы могут быть выбраны по различным свойствам, определенным как полезные для разработчика. Например, промоторы могут различаться по силе (например, сильный, средний, слабый) и/или по кинетическому классу (то есть по времени активации, например, немедленно ранние, ранние, поздние промоторы) и могут быть выбраны по конкретной силе, конкретном времени активации или комбинации переменных. Интересующий ген может

включать последовательность дикого типа или оптимизированную по кодонам последовательность. В некоторых случаях донорная плаزمида может включать полиА-последовательности. Выбор конкретной полиА-последовательности для применения в плазмиде может быть обусловлен способностью полиА-последовательности сочетаться с заданным геном, ее способностью ингибировать и/или избегать рекомбинацию с другим геном, использующим аналогичный полиА, ее влиянием на уровень экспрессии рекомбинантного гена, его совместимостью с последовательностью, кодирующей рекомбинантный ген, и/или другие желаемые свойства или эффекты, известные в данной области.

Донорные плазмиды могут быть сконструированы так, чтобы они содержали один или несколько антигенов и/или белков, происходящих от болезней, против которых иммуногенная композиция обеспечивает защиту. Например, донорные плазмиды могут включать антигены, полученные из IBD, ILT, ND, AI, MD и/или любой их комбинации.

Донорные плазмиды могут включать промотор, такой как промотор mCMV, представляющий интерес ген для целевого заболевания и полиА (остановка транскрипции). Например, в воплощении, нацеленном на AIV, выбранная донорная плаزمида может включать промотор mCMV, AIV НА COBRA-C и/или полиА-хвост SV40. Такая донорная плазмида может быть обозначена как pCD046-COBRA-C.

Примеры донорных плазмид включают, без ограничения указанным, pCD046-COBRA-C, pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C, pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C, а также другие плазмиды, включающие различные комбинации экзогенных последовательностей.

Нуклеотидная последовательность плазмиды pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 38. Нуклеотидная последовательность плазмиды pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью плазмиды, показанной на фиг. 16.

Рекомбинантный вирус для применения в качестве вектора может быть получен описанным в данном документе способом. В частности, рекомбинацию *in vitro* (IVR) можно осуществить путем совместной электропорации клеток вторичного фибробласта куриного эмбриона (CEF) с использованием донорной плазмиды, такой как pCD046-COBRA-C, и вирусной ДНК, выделенной из желаемого вируса, такого как штамм MDV-3, FC-126. Совместная электропорация может быть выполнена с использованием 1×10^7

вторичных CEF в 200 мкл среды с восстановленной сывороткой и шоком при 150 вольт с емкостью 950 в кювете для электропорации 2 мм. Трансфицированные клетки CEF можно засеивать средой для роста клеток, такой как 2% фетальная телячья сыворотка (FBS), содержащаяся в базальной среде (такой как модифицированная Дульбекко среда Игла «DMEM»), в 96-луночном планшете и инкубировать при 37°C, в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 4-5 дней. Клетки, выращенные в 96-луночном планшете, затем можно дублировать в два 96-луночных планшета и инкубировать еще 2 или 3 дня при 37°C, в инкубаторе с 5% CO₂. Один набор дублированных 96-луночных планшетов может быть подвергнут скринингу на рекомбинантный вирус с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA) с использованием куриной сыворотки против AIV H5N2 и кроличьих антител против куриных IgY (IgG) (целая молекула)-конъюгированных с FITC. Чтобы получить чистую популяцию рекомбинантного вируса, CEF из положительных по IFA лунок в соответствующем 96-луночном планшете можно выделить и обработать на стадии очистки.

Очистку рекомбинантного вируса можно проводить путем разбавления смеси популяций (рекомбинантный и исходный вирус) в 96-луночном планшете с последующим скринингом IFA и ПЦР. После идентификации рекомбинантного вируса можно проводить дальнейшее разведение CEF в соответствующих лунках дублированного планшета до тех пор, пока в лунке планшета не останется только чистый рекомбинантный вирус. Вкратце, лунки в соответствующем 96-луночном планшете, положительные на IFA, могут быть собраны путем трипсинизации с помощью TrypLE Express и доведены до 1 мл с помощью 10% FBS-DMEM. Из 1 мл исходного раствора можно удалить 5-20 мкл исходного раствора, в зависимости от количества бляшек в лунке, смешать с 3-5x10⁶ CEF в 20 мл 2% FBS-DMEM и аликвотировать в новый 96-луночный планшет в попытке иметь одну бляшку HVT на лунку. 96-луночные планшеты можно дублировать через 4 дня инкубации при 37°C, 5% CO₂ инкубаторе, и каждую лунку можно проверить на наличие рекомбинантного вируса с помощью IFA и ПЦР. Лунки, которые, как оказалось, содержали больше рекомбинантного вируса, путем сравнения паттернов ПЦР-амплификации, могут быть собраны, и стадия очистки повторяется, как описано выше, до тех пор, пока не будут получены чистые рекомбинантные популяции.

Для завершения ПЦР-анализа рекомбинантного вируса вирусная ДНК может быть выделена из вирусного вектора, например, vHVT509. Праймеры для ПЦР могут быть разработаны для идентификации присутствия вируса HA COBRA-C, промотора mCMV, полиА-хвоста SV40 и/или фланкирующих рекомбинационных плечей вируса HVT (MDV-3). ПЦР-амплификацию можно проводить с использованием матрицы ДНК вместе с

парами праймеров, такими как MB080 (CGAACAААСТТСАТСГСТАТGC (SEQ ID NO: 1)) и MB081 (TAACTCAAATGCGAAGCGTTGC (SEQ ID NO: 2)), mCMV-F (AACTCCGCCCGTTTTATG (SEQ ID NO: 3)) и хвост-R SV40 (TCGACTCTAGAGGATCCG (SEQ ID NO: 4)), и SV40 pro-F (AGCTTGGCTGTGGAATGT (SEQ ID NO: 5)) и syntail-R (ATGTTCTGGCACCTGCAC (SEQ ID NO: 6)), где последовательности перечислены в соответствии с прямой цепью (от 5' к 3'). ПЦР можно проводить с использованием стандартных условий, известных в данной области, и/или условий, описанных в приведенных в данном документе примерах.

Другие вирусные векторы, которые включают другие вставки, включая, без ограничения указанным, vHVT522 и vHVT523, могут включать другие экзогенные последовательности. Например, рекомбинантный вирусный вектор, такой как рекомбинантный вирус vHVT522, может включать следующие экзогенные последовательности, включая: MB080 (CGAACAААСТТСАТСГСТАТGC (SEQ ID NO: 7)) и MB081 (TAACTCAAATGCGAAGCGTTGC (SEQ ID NO: 8)), COBc-FF (TGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGC) (SEQ ID NO: 9), Vp2-FF-ak (GTCACACTAGTAGCCTACGAAAGAGTGGC (SEQ ID NO: 10)) и poly A tail-RR (CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA (SEQ ID NO: 11)), где последовательности перечислены в соответствии с прямой цепью (5' - 3').

Другой вариант рекомбинантного вирусного вектора, такого как рекомбинантный вирус vHVT523, может включать следующие экзогенные последовательности, в том числе: MB080 (CGAACAААСТТСАТСГСТАТGC (SEQ ID NO: 7)) и MB081 (TAACTCAAATGCGAAGCGT (SEQ ID NO: 12)), COBc-FF (TGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGC (SEQ ID NO: 9)), NDV-F1 (ATGGGCTCCAAACCTTCTAC (SEQ ID NO: 13)) и polyA tail-RR (CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA (SEQ ID NO: 11)), где последовательности перечислены в соответствии с прямой цепью (5' - 3').

Экспрессию можно определить с помощью описанного в данном документе анализа. Анализ непрямой иммунофлуоресценции (IFA) можно проводить на созданном вирусном векторе, например, vHVT509. CEF, инокулированные вирусным вектором, например, vHVT509, можно зафиксировать ледяным 95% ацетоном в течение пяти минут при комнатной температуре и высушить на воздухе в течение 10 минут. После регидратации планшета с помощью PBS можно добавить два первичных антитела: 1) куриную сыворотку против вируса гриппа H5N2 в разведении 1:500 и 2) моноклональное антитело L78 против MDV-3 в разведении 1:3000 и инкубировать в течение 1 часа при 37°C. После трех промывок PBS можно добавить два вторичных антитела: 1) кроличьи

антитела против куриных IgG-FITC в разведении 1:500 и 2) ослиные антитела против мышинных IgG-Alexa Fluor 568 в разведении 1:300. Планшеты можно инкубировать при 37°C в течение 1 часа, а затем три раза с PBS. Клетки можно наблюдать для идентификации IFA-положительных бляшек с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием фильтров флуоресцеинизотиоцианата (FITC) и фильтров тетраметилродамин изотиоцианата (TRITC) инвертированного микроскопа.

Анализ геномной ДНК вирусного вектора, такого как vHVT509, можно проводить путем определения нуклеотидной последовательности части области рекомбинационного плеча, а также встроенной генной кассеты. Набор праймеров, MB080 и MB081, использовали для амплификации всей встроенной генной кассеты, включая часть плеча рекомбинации. ПЦР-амплификацию можно проводить следующим образом: 94°C в течение 2 мин, 30 циклов 94°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 сек, 68°C в течение 3 мин и окончательное удлинение при 68°C в течение 5 мин. Продукт ПЦР размером 3,6 т.п.н. может быть очищен. Всего восемь реакций ПЦР по 25 мкл на реакцию можно объединить и очистить с помощью набора. Конечную элюцию можно подтвердить электрофорезом в агарозном геле. Подробные праймеры для секвенирования перечислены в таблице 4.

Анализ генетической стабильности можно проводить с использованием серийных пассажей. Запасы prMSV могут быть переданы во вторичный CEF путем слепых пассажей. Вкратце, 100 мкл предыдущего пассажа можно инокулировать в монослой CEF в колбе T25. Клетки можно инкубировать в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ до тех пор, пока они не превратятся в вирусные бляшки достаточного размера (обычно 3–4 дня). Зараженные вирусом CEF могут быть собраны путем трипсинизации с помощью TgprLE Express (Gibco # 12604) и могут быть доведены до общего объема 1 мл с помощью 10% FBS-DMEM и 10% DMSO для хранения LN₂. Приблизительно 50–100 мкл исходного раствора можно перенести на свежую культуру CEF в колбе T25. Всего может быть проведено 13 пассажей (X+12) из prMSV (X-1). *in vitro* характеристика штаммов X+12 может быть проведена для ПЦР-скрининга, анализа нуклеотидной последовательности трансгенной кассеты и экспрессии AIV HA COBRA-C с помощью двойного IFA, как описано ранее.

После нескольких циклов очистки бляшек можно выделить чистый рекомбинантный вирус (например, vHVT509). vHVT509 может быть протестирован с помощью IFA и ПЦР для проверки соответствующей вставки трансгена, а также для подтверждения отсутствия остаточного родительского вируса. Затем рекомбинантный вирус (например, vHVT509) может быть перенесен из одной лунки 96-луночного планшета в флаконы T-25, флаконы T-150 и, наконец, роллерные флаконы (площадь

поверхности 850 см) для получения исходного материала перед MSV.

ПЦР-анализ, в частности, ПЦР-амплификацию с различными праймерами, можно использовать для подтверждения того, что вирусный вектор, например, vHVT509, может иметь ожидаемую схему амплификации и ампликон в стоке preMSV и на уровне пассажей X+12.

Такой анализ может помочь гарантировать, например, что образованный рекомбинантный вирусный вектор MDV-3 (например, герпесвирус индеек (rHVT)) может включать и экспрессировать *in vivo* молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую желаемые антигены птичьих болезней, например, экзогенный антиген вируса птичьего гриппа.

Рекомбинантный вирусный вектор vHVT509 показан на фиг. 13, на которой изображены нуклеотидные последовательности vHVT509.

В некоторых случаях антиген AIV, такой как синтетический ген белка гемагглютинина (HA) вируса птичьего гриппа А (подтип H5), разработанный с помощью подхода компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA) (т.е. COBRA-C (белок HA H5)) может быть объединен по меньшей мере с одним антигеном птичьего вируса.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, кодирующей ген AIV H5 HA Cobra-C, показанный на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и/или фиг. 49. В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может содержать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов с последовательностью, которая кодирует ген HA Cobra-C AIV H5, показанный на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и/или фиг. 49. В частности, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95 процентов с последовательностью, которая кодирует ген HA Cobra-C AIV H5, показанный на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и/или фиг. 49.

Например, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну последовательность, имеющую гомологию или идентичность в диапазоне от около 80 до около 100 процентов с последовательностью, которая кодирует ген AIV H5 HA Cobra-C, как показано на фиг. 12, фиг. 18, фиг. 28, фиг. 40 и/или фиг. 49.

В некоторых воплощениях ген белка НА COBRA-C H5 или его часть можно комбинировать с синтетическим белком вируса инфекционной бурсальной болезни, таким как капсидный белок VP2 из IBDV, белок вируса болезни Ньюкасла, такой как белок F болезни Ньюкасла (ген NDV-F) или любой представляющий интерес антигенный белок птичьего заболевания.

Например, в некоторых случаях могут быть вставлены кДНК из гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни и поли-А-последовательность. Например, кДНК может быть получена из геномной РНК из вирионов, выделенных из бурсы кур. Лocus вставки может быть определен, и вставка может быть нацелена на плазмидные последовательности, гомологичные вирусу. Таким образом, в некоторых случаях, например, когда исходным вирусом является HVT FC-126, плазида-мишень может включать последовательности, гомологичные последовательностям вируса HVT FC-126.

В некоторых воплощениях последовательность или частичная последовательность антигена IBDV может быть использована в вирусном векторе. Например, последовательность белка IBDV, фланкированная последовательностью, полученной из области IG1 MDV-3, может обеспечить гомологичную рекомбинацию в MDV-3 (например, вирус Vaxxitek).

В одном аспекте воплощения нуклеотидная и/или аминокислотная последовательность, кодирующая антиген или полипептид IBDV, имеет по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов идентичности последовательности к полипептиду, имеющему референсную последовательность, или к консервативному варианту, аллельному варианту, гомологу или иммуногенному фрагменту, содержащему по меньшей мере восемь или по меньшей мере десять последовательных аминокислот одного из этих полипептидов или комбинацию этих полипептидов.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, кодирующей капсидный белок (VP2) из IBDV, как показано на фиг. 17 или фиг. 29. В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может содержать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90-процентную идентичность последовательности с последовательностью, которая кодирует белок капсидного белка (VP2) из IBDV, как показано на фиг. 17 или фиг. 29. В частности, рекомбинантный вирусный вектор может

включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95 процентов с последовательностью, которая кодирует белок капсидного белка (VP2) из IBDV, как показано на фиг. 17 или фиг. 29. Например, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95 процентов с последовательностью, которая кодирует белок капсидного белка (VP2) IBDV, как показано на фиг. 17 или фиг. 29.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, имеющую гомологию или идентичность последовательности в диапазоне от около 80 до около 100 процентов с последовательностью, которая кодирует белок капсида IBDV (VP2), как показано на фиг. 17 или фиг. 29.

В одном воплощении вирусный вектор может включать полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере часть MDV, антиген AIV и/или антиген NDV. Гетерологичные полинуклеотиды, кодирующие и экспрессирующие антиген NDV-F, могут быть использованы для формирования донорной плазмиды. В некоторых воплощениях вместо последовательностей, кодирующих белок VP2, можно использовать последовательности, кодирующие гибридный белок вируса болезни Ньюкасла (NDV-F). В частности, гибридный белок вируса болезни Ньюкасла (NDV-F), который фланкирован последовательностью, полученной из области IG1. Это может усилить гомологичную рекомбинацию в вирус для рекомбинантного вирусного вектора. Например, использование последовательности белка NDV-F, фланкированной последовательностью, полученной из области IG1, может обеспечить гомологичную рекомбинацию в MDV-3 (например, вирус Vaxxitek).

В одном аспекте воплощения нуклеотидная последовательность, кодирующая и экспрессирующая антиген NDV-F, имеет по меньшей мере идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, представленной на фиг. 39 или фиг. 50, или консервативный вариант, аллельный вариант, гомолог или иммуногенный фрагмент, содержащий по меньшей мере восемь или по меньшей мере десять последовательных аминокислот одного из этих полипептидов, или комбинацию этих полипептидов.

Рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность

последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, кодирующей белок NDV-F, как показано на фиг. 39 или фиг. 50. В некоторых воплощениях рекомбинантный вирусный вектор может содержать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов с последовательностью, которая кодирует белок NDV F (NDV-F), показанный на фиг. 39 или фиг. 50. В частности, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95 процентов с последовательностью белка NDV-F, показанного на фиг. 39 или фиг. 50.

Например, рекомбинантный вирусный вектор может иметь гомологию или идентичность в диапазоне от около 80 до около 100 процентов с последовательностью белка NDV-F, как показано на фиг. 39 или фиг. 50.

Промоторы могут присутствовать в исходном вирусе или промотор может быть встроен в вирусный вектор с использованием плазмиды. Например, в одном воплощении вирусный вектор может включать только промотор родительского вируса, такой как промотор mCMV.

Функциональная вставка может включать полиА-хвост SV40. ПолиА-хвост SV40 может быть вставлен в определенный сайт вирусного вектора. Например, полиА-хвост SV40 может быть вставлен в сайт intergenic 1 области рекомбинации штамма MDV-3 FC-126. Такая конструкция используется в вирусных векторах vHVT522 и vHVT523, как описано в данном документе.

В частности, рекомбинантная вирусная конструкция может включать ген, кодирующий белок синтетического гемагглютинина (НА) вируса птичьего гриппа А, сконструированный с использованием подхода компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA). Например, вирусный вектор vHVT522 может включать синтетический ген белка гемагглютинина вируса птичьего гриппа А, в частности, COBRA-C (белок H5 НА), сконструированный с использованием COBRA, а также синтетический структурный капсидный белок VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни. Рекомбинантный вирусный вектор vHVT522 показан на фиг. 26, на которой изображены нуклеотидные последовательности vHVT522.

В некоторых воплощениях по меньшей мере часть вирусного вектора может включать нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95

процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью секвенированной области vHVT522, показанной на фиг. 27.

В одном воплощении аминокислотная последовательность гена AIV HA COBRA-C, используемая в vHVT522, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, показанной на фиг. 28. Аминокислотная последовательность гена IBDV VP2 в вирусном векторе vHVT522 может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, показанной на фиг. 29.

Воплощение может включать вставочную плазмиду для сайта Intergenic I (IG1) вирусного вектора, такого как штамм MDV-3, который может включать поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок H5 HA), участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и капсидный белок вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV VP2). Например, вставочная плазида может быть использована для встраивания поли-А-хвоста SV40, COBRA-C (белок H5 HA), внутреннего сайта посадки рибосомы (IRES) и капсидного белка вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV VP2) в правое плечо IG1 вируса MDV-3 (например, MDV-3 FC126, используемого в вакцине Vaxxitek).

Например, плазида, используемая в изобретении, может включать pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C.

В некоторых случаях изобретение может включать синтетически упорядоченную плазмиду, которая включает правое плечо Intergenic I из MDV-3 (например, вируса Vaxxitek), поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок H5 HA), IRES и капсидный белок вируса инфекционной бурсальной болезни.

Некоторые воплощения вирусного вектора могут включать только внешний промотор родительского вируса, который был ранее модифицирован. Например, внешний промотор, такой как mCMV, может присутствовать в ранее модифицированном родительском вирусе, таком как vHVT013.

Кроме того, некоторые воплощения плазмиды могут включать гены, придающие устойчивость к антибиотикам к одному или нескольким антибиотикам, включая, без ограничения указанным, тетрациклин, канамицин, ампициллин и т.д. и/или их комбинации. В частности, в вирусный вектор может быть введен ген, придающий устойчивость к антибиотикам к ампициллину.

Экзогенная ДНК может быть введена в плазмиду, которую затем используют для введения экзогенной ДНК в вирусный вектор для создания рекомбинантного вируса.

Например, донорная плаزمида, например, pVP2-IRES-Cobra-C, может быть создана путем клонирования синтетического фрагмента COBRA-C (лот Genscript U5872BA260-3) в pVP2-IRES-Cobra-A. Плазмида pVP2-IRES-Cobra-C может быть дополнительно модифицирована путем замены фрагмента HindIII-BlnI новым синтетическим фрагментом VP2+COBC для удаления промежуточного участка последовательности между концом последовательности IRES и началом последовательности COBRA-C, присутствующей в pVP2-IRES-Cobra-C.

Нуклеотидная последовательность плазмиды pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C, используемая для конструирования vHVT522, может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, показанной на фиг. 16.

В одном воплощении аминокислотная последовательность, кодирующая белок H5 HA Cobra-C в плазмиде pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C, используемая для конструирования vHVT522, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, показанной на фиг. 18.

Донорские плазмиды для применения в создании рекомбинантного вируса могут включать различные конфигурации, включая, без ограничения указанным, pCD046-COBRA-C, pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C, pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C.

Например, как можно видеть на фиг. 16 изображена нуклеотидная последовательность плазмиды pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C, которая используется для формирования вирусного вектора vHVT522, показывает конструкцию плазмиды, имеющую плечи Intergene 1 (зеленый), SV40 полиА (оранжевый), H5 HA COBRA-C (темно-красный), IRES (синий), VP2 (красный) и вектор (черный).

Другим примером вакцинного вектора для иммуногенных композиций является vHVT523, как описано в данном документе. vHVT523 может включать несколько участков экзогенной ДНК. Воплощение рекомбинантного вирусного вектора, vHVT523, частично показано на фиг. 48, на которой изображена частичная нуклеотидная последовательность vHVT523.

Изображенная нуклеотидная последовательность плазмиды pFwt-IRES-COBRA-C, которая используется при формировании вирусного вектора vHVT523, показывает конструкцию плазмиды, имеющую плечо IG1 (светло-зеленый), mCMV (синий), NDV-F (оранжевый), IRES (фиолетовый), H5 HA (темно-красный), SV40 полиА (светло-синий) и плечо IG1 (зеленый). Кроме того, на фиг. 38 показано расположение конкретных

представляющих интерес нуклеотидов в плазмиде для вирусного вектора vHVT523.

Эти участки экзогенной ДНК могут быть отобраны по желаемым свойствам и/или кодированию и экспрессии желаемых генов *in vivo*. Например, vHVT523 может включать ген, кодирующий один или несколько белков синтетического гемагглютинина (HA) вируса птичьего гриппа А (подтип Н5), сконструированных с помощью подхода компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA), синтетического гибридного белка (F) вируса болезни Ньюкасла (NDV).

В некоторых воплощениях по меньшей мере часть вирусного вектора может включать нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью секвенированной области vHVT523, показанной на фиг. 48.

Аминокислотная последовательность гена NDV-F, используемая в вирусном векторе vHVT523, может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, которая кодирует белок NDV-F, показанный на фиг. 39 или фиг. 50. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность гена NDV-F, используемая в вирусном векторе vHVT523, может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов с последовательностью, кодирующей белок NDV-F, показанный на фиг. 39 или фиг. 50.

В частности, рекомбинантный вирусный вектор может включать по меньшей мере одну экзогенную аминокислотную последовательность, имеющей идентичность последовательности по меньшей мере 95 процентов с последовательностью белка NDV-F, как показано на фиг. 39 или фиг. 50.

Например, рекомбинантный вирусный вектор включает аминокислотную последовательность, имеющую гомологию или идентичность в диапазоне от около 80 процентов до около 100 процентов с последовательностью белка NDV-F, как показано на фиг. 39 или фиг. 50.

Гены могут быть вставлены в вектор с использованием плазмиды. Вставочная плазида для сайта Intergenic I (IG1) вирусного вектора может включать поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок Н5 HA), участок внутренней посадки рибосомы (IRES), гибридный белок вируса ньюкаслской болезни (NDV-F) и мышинный промотор CMV, фланкированный последовательностью, полученной из области IG1 представляющего интерес вируса, для облегчения гомологичной рекомбинации. В частности, вставочная плазида для сайта Intergenic I (IG1) вирусного вектора MDV-3 может включать,

например, поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок Н5 НА), участок внутренней посадки рибосомы (IRES), гибридный белок вируса болезни Ньюкасла (NDV-F) и промотор CMV мыши, фланкированные последовательностью, полученной из области IG1 MDV-3, для облегчения гомологичной рекомбинации.

Плазмида для применения при создании вирусного вектора для применения в иммуногенной композиции может включать один или несколько участков, гомологичных участкам ДНК в месте встраивания заданного вируса, а также последовательности, кодирующие представляющие интерес гены и/или белки. Например, плазмида, используемая при создании вирусного вектора для применения в иммуногенной композиции, может включать гомологичные участки, соответствующие правому и левому плечу Intergenic I вируса MDV-3, поли-А-хвосту SV40, белку НА Н5 COBRA-C, IRES и гибриднему белку NDV (F).

Нуклеотидная последовательность плазмиды pFwt-IRES[MOD]-Cobra, используемая для конструирования vHVT523, может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, показанной на фиг. 38.

В одном воплощении аминокислотная последовательность для Н5 НА Cobra-C в плазмиде pFwt-IRES[MOD]-Cobra, используемая для конструирования vHVT523, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, представленной на фиг. 40.

Аминокислотная последовательность NDV-F в плазмиде pFwt-IRES[MOD]-Cobra, использованная для конструирования вирусного вектора vHVT523, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, показанной на фиг. 39 или фиг. 50.

Кроме того, в плазмиду могут быть введены экзогенные последовательности, кодирующие функциональные свойства, такие как промоторы или гены, которые придают устойчивость к антибиотикам. Промоторы, такие как промотор mCMV, могут быть введены в плазмиду для встраивания в вирусный вектор, такой как вектор MDV-3. Кроме того, ген устойчивости к ампициллину может быть введен в плазмиду для применения в создании вирусных векторов.

Например, плазмида (т.е. pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C) для применения в конструировании вирусного вектора может быть модифицирована из pFwt-IRES-COBRA-

С. Плазмида pFwt-IRES-COBRA-C может быть сконструирована путем замены гена Saudi-Arabia H9 в ранее созданной плазмиде (pFwt-IRES-SaH9opt) геном COBRA-C, извлеченным из pVP2-IRES-COBRA-C. Ген COBRA-C может быть выделен из pVP2-IRES-COBRA-C с использованием рестрикционных ферментов с использованием SalI и HindIII и может быть клонирован в pFwt-IRES-SaH9opt, который может быть расщеплен теми же ферментами. Плазмиду pFwt-IRES-Cobra-C дополнительно модифицировали путем замены фрагмента HindIII-BlnI новым синтетическим фрагментом F+COBC для удаления промежуточного участка последовательности между концом последовательности IRES и началом последовательности COBRA-C, присутствующей в pFwt-IRES-Cobra-C. Донорная плазмида, pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C, может быть использована для создания рекомбинантного вируса.

Иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, могут включать одну или несколько из следующих рекомбинантных вирусных конструкций, включая, без ограничения указанным, vHVT509, vHVT522 и/или vHVT523.

Способ получения рекомбинантного вирусного вектора может включать трансфекцию клетки MDV (т.е. вирусом герпеса индеек (HVT)), таким как MDV-3, и вставочной плазмидой для встраивания в сайт Intergenic1 (IG1) из MDV-3, которая включает поли-А-хвост SV40, экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HA птичьего гриппа, участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни. В некоторых воплощениях вставочная плазмида может включать фланкирующие последовательности из IG1 для облегчения вставки плазмиды в исходный вирус с образованием вирусного вектора.

Любой из описанных в данном документе вирусных векторов может быть включен в иммуногенную композицию. Иммуногенные композиции могут включать приемлемый для ветеринарии носитель, а также рекомбинантные вирусные векторы.

Вирусные векторы, такие как рекомбинантные вирусы MDV-3, могут присутствовать в иммуногенной композиции в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа у птицы при введении композиции птице. Например, иммуногенная композиция может индуцировать иммунный ответ на одно или несколько заболеваний птиц, таких как вирус болезни Марека, вирус инфекционной бурсальной болезни и/или птичий грипп.

Способ индукции иммунного ответа у птиц против вируса болезни Марека, птичьего гриппа, вируса инфекционной бурсальной болезни и/или вируса болезни Ньюкасла путем введения птице эффективного количества рекомбинантного вирусного

вектора или эффективного количества композиции, которая включает антигены целевого(ых) вируса(ов).

Эффективное количество активного ингредиента (например, вирусного вектора) можно измерить в бляшкообразующих единицах. В частности, вирусный вектор можно вводить в дозе, превышающей примерно 1000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на дозу 0,2 мл. В некоторых воплощениях доза 0,2 мл может включать вирусный вектор в дозе, превышающей примерно 2500 БОЕ.

Например, в одном воплощении доза вакцины (например, 0,2 мл) может включать по меньшей мере $3,0 \log_{10}$ БОЕ рекомбинантного вируса, вводимого подкожно. В некоторых случаях доза, вводимая *in ovo*, может включать более примерно $3,6 \log_{10}$ БОЕ на дозу.

В зависимости от пути введения доза может быть доставлена животному, может быть одинаковой, однако может быть доставлена в различном объеме носителя. Например, доза, доставляемая птице, может быть одинаковой как для введения *in ovo*, так и для подкожного введения, однако объем будет составлять 50 мкл и 200 мкл, соответственно.

Минимально эффективные/защитные дозы (MPD) конкретного вирусного вектора, экспрессирующего один или несколько антигенов и/или белков, которые входят в состав вакцины, могут быть определены экспериментально. Как правило, MPD можно использовать для определения предпочтительного титра в иммунологической композиции. Например, титр в иммуногенной композиции может быть кратным значению MPD. В частности, предпочтительный титр в иммунологической композиции, такой как вакцина, может примерно в 3 раза превышать MPD.

В некоторых случаях иммунологическая композиция, такая как вакцина, может иметь титр в диапазоне от около 1000 БОЕ/дозу до около 8000 БОЕ/дозу. Воплощение может включать вакцину, имеющую титр в диапазоне от около 2000 БОЕ/дозу до около 6000 БОЕ/дозу.

Воплощение вакцины для птиц может иметь титр в диапазоне от около 2200 БОЕ/дозу до около 4000 БОЕ/дозу. Некоторые птичьи вакцины, описанные в настоящем документе, могут иметь титр, превышающий около 2250 БОЕ/дозу. В частности, вакцина может иметь титр в диапазоне от около 2250 БОЕ/дозу до около 3000 БОЕ/дозу. Например, вакцина может иметь титр около 2500 БОЕ/дозу.

В некоторых случаях эффективное количество вирусного вектора может зависеть от типа или функции животного. Например, в птицеводстве может потребоваться использование высоких титров БОЕ для долгоживущих птиц, таких как племенные птицы

и несушки. Например, дозы, имеющие титры более чем около 5000 БОЕ/дозу для MDV (т.е. HVT), могут вводиться птицам, которые будут иметь относительно долгую продолжительность жизни, таким как племенные птицы и несушки.

В некоторых воплощениях окончательная вакцинная композиция может быть получена путем смешивания ампулы иммунологической композиции с разбавителем. Такая иммунологическая композиция может иметь общий титр антигена и/или вируса в диапазоне от около 10^3 до около 10^7 БОЕ/мл иммуногенной композиции. В частности, воплощение иммунологической композиции для применения в ампуле может иметь общий титр антигена и/или вируса в диапазоне примерно от 10^5 до 10^7 БОЕ/мл иммуногенной композиции.

В некоторых воплощениях фракции вирусных векторов в иммуногенных композициях могут быть определены для компонентов, которые индуцируют ответ против представляющих интерес заболеваний. Например, фракции иммуногенной композиции могут включать одну или несколько последовательностей, кодирующих антиген и/или белок болезни Марека, инфекционной бурсальной болезни, болезни Ньюкасла, птичьего гриппа и/или вируса инфекционного ларинготрахеита (ILT), так что каждая фракция превышает около 1000 БОЕ. В некоторых случаях фракции иммуногенной композиции могут включать одну или несколько последовательностей, кодирующих антиген и/или белок для MD, IBD, ND, AI и/или ILTV, так что каждая фракция включает более чем около 2000 БОЕ соответствующего иммуногенного агента.

В некоторых воплощениях иммуногенная композиция, такая как вакцина, может иметь суммарный титр, превышающий около 6000 БОЕ/дозу.

Иммунологические композиции и/или вакцины можно вводить различными способами в зависимости от животных (например, типа, возраста, состояния), дозы и/или желаемого результата. Например, можно использовать подкожную (п/к) инъекцию. В некоторых случаях может быть достаточно одной инъекции. С другой стороны, может быть желательным проведение двух или более инъекций для обеспечения желаемого иммунного ответа. Кроме того, в некоторых случаях путь введения может быть *in ovo*. Например, вакцинация *in ovo*, которая представляет собой форму вакцинации эмбрионов, может проводиться в заранее определенный день эмбрионального развития (ED). Вакцинация *in ovo* может происходить в разное время эмбрионального развития примерно с 15 по 21 день. В частности, введение *in ovo* может происходить с 18 по 19 день эмбрионального развития. Например, вакцинация *in ovo* может происходить примерно на 18 день эмбрионального развития (ЭР), примерно за 3 дня до вылупления.

Иммунологическую композицию можно вводить птицам. Например, вакцина,

описанная в настоящем документе, может быть введена птице, такой как курица, каплун, утка, гусь, индейка, фазан, тетерев, перепел, лебедь, сквоб и/или голубь. В конкретных воплощениях птица, получающая описанную в настоящем документе вакцину, представляет собой курицу.

Режимы дозирования могут быть использованы для улучшения экономических показателей птицеводства. Например, иммуногенные композиции, такие как вакцины, можно вводить птицам на разных стадиях жизни с целью защиты цыплят, взрослых птиц или и тех, и других.

В некоторых воплощениях может быть разработан режим дозирования для доставки эффективных количеств вирусного вектора, достаточных для того, чтобы вызвать желаемый эффект у данной заранее определенной популяции и/или у отдельных животных, например, снижение заболеваемости в данной популяции, например, вакцинированных птиц, уменьшая тяжесть и/или подавляя симптомы целевого заболевания и/или индуцируя иммунный ответ в популяции, животных и/или их потомстве.

Определения в отношении режимов дозирования могут быть связаны с желаемыми результатами, компонентами, выбранными для применения в иммуногенной композиции, путем введения, таким как парентеральное, подкожное введение и/или введение *in ovo*, количеством или дозами, доставляемыми, например, при однократном введении или множественными дозами (например, одним или несколькими бустерами), и/или конкретными свойствами животного или популяции животных, подлежащих лечению, например, возраста, размера, статуса здоровья и/или состояния животных.

Как указывалось выше, способы лечения могут различаться в зависимости от желаемого результата. Например, введение *in ovo*, а также подкожное введение цыплятам можно использовать для обеспечения или установления коллективного иммунитета в стаде, для ингибирования и/или предотвращения состояний и/или клинических симптомов, связанных с целевыми птичьими вирусами.

Режим дозирования может включать вакцинацию птиц, таких как куры, по меньшей мере одной дозой иммуногенной композиции, как описано в настоящем документе. Дозы иммуногенных композиций могут находиться в диапазоне от около 0,01 мл до около 0,5 мл. Например, доза иммуногенной композиции, описанная в данном документе, может быть введена подкожно в виде дозы примерно 0,2 мл. В некоторых случаях при использовании введения *in ovo* дозы могут находиться в диапазоне около 0,05 мл.

Схемы дозирования также могут включать рекомендации по путям введения и/или

времени в зависимости от пути воздействия. Например, может быть желательным доставить дозу иммуногенной композиции птице подкожным путем воздействия в определенном возрасте, в частности примерно в течение первой недели после вылупления. В некоторых случаях птицам можно вводить иммуногенные композиции подкожно в возрасте около 1 дня.

В другом воплощении иммуногенная композиция может быть доставлена в яйцо, что приводит к пути введения *in ovo*. Например, может быть желательным доставить дозу иммуногенной композиции птице путем воздействия *in ovo* в определенном возрасте яйца, в частности, примерно на 18-19 день эмбрионального развития, в зависимости от иммуногенные композиции и желаемые результаты.

Множественные дозы иммуногенных композиций можно вводить по схеме дозирования. В некоторых воплощениях птицам можно вводить две или более доз вакцины.

Иммуногенная композиция может включать рекомбинантный вирусный вектор MDV-3, который имеет и способен экспрессировать *in vivo* экзогенный HA-антиген вируса птичьего гриппа и экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса болезни Ньюкасла. В некоторых случаях птичий грипп относится к подтипу H5.

Рекомбинантный вирусный вектор может быть сконструирован методом рекомбинации, включающим трансфекцию клетки MDV и вставочной плазмидой для сайта Intergenic 1 (IG1) из MDV, содержащей поли-A-хвост SV40, молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую HA птичьего гриппа, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген F вируса болезни Ньюкасла и промотор CMV мыши, окруженных последовательностями из области IG1.

Например, способ получения рекомбинантного вирусного вектора MDV-3, который может включать трансфекцию клетки MDV-3 и вставочной плазмидой для сайта Intergenic 1 (IG1) из MDV, содержащей поли-A-хвост SV40, молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую HA птичьего гриппа, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген F вируса болезни Ньюкасла, и промотор CMV мыши, окруженные последовательностями из области IG1. После получения вектора рекомбинантного вируса MDV-3 его можно выделить и/или очистить.

Иммуногенные композиции могут включать приемлемый для ветеринарии носитель, такой как растворители, дисперсионные среды, покрытия, адъюванты, стабилизаторы, разбавители, такие как сахароза, гидролизат казеина, дикалийфосфат,

дигидрофосфат калия, натриевая соль фенолового красного, гидроксид натрия и/или вода, наполнители, такие как диметилсульфоксид, среда, сыворотка, такая как фетальная телячья сыворотка или сыворотка теленка, гидрокарбонат натрия, феноловый красный, соляная кислота и/или очищенная вода, консерванты, антибактериальные агенты, фунгицидные агенты, изотонические агенты, агенты, замедляющие адсорбцию, и их комбинации.

Иммуногенной композиции при введении птице может быть достаточно для индукции желаемого ответа, такого как снижение и/или ингибирование клинических систем целевого(ых) заболевания(й), иммунного ответа у птицы против вируса болезни Марека, вируса птичьего гриппа и /или вирус болезни Ньюкасла.

Способ индукции иммунного ответа у птиц против вируса болезни Марека, птичьего гриппа и вируса болезни Ньюкасла, включающий введение птице эффективного количества рекомбинантного вирусного вектора или эффективного количества композиции.

Плазмида для вставки в сайт Intergenic1 (IG1) MDV-3 (т.е. HVT), содержащая поли-А-хвост SV40, молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую НА птичьего гриппа, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) и экзогенную нуклеиновую молекулу кислоты, кодирующую антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни.

Плазмида для вставки в сайт Intergenic 1 (IG1) MDV-3 (т.е. HVT), содержащая поли-А-хвост SV40, экзогенную последовательность, кодирующую НА птичьего гриппа, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген F вируса ньюкаслской болезни и промотор CMV мыши, окруженные последовательностями из области IG1. В некоторых воплощениях плазмида может включать экзогенную последовательность, кодирующую птичье влияние НА подтипа H5. Кроме того, плазмида может включать экзогенную последовательность, кодирующую антиген НА птичьего гриппа, которая оптимизирована по кодонам.

Способ вакцинации животного или индуцирования иммуногенного или защитного ответа у животного, который включает по меньшей мере одно введение композиции или вирусного вектора, как описано в настоящем документе.

Конструкции для живого вакцинного вектора MDV (т.е. vHVT) могут включать вставку гена вируса H5. В некоторых воплощениях вирусный вектор может включать множественные генные вставки H5. Конструкция COBRA может включать как птичий грипп, так и болезнь Марека, серотип 3. Например, вакцины, включающие такую конструкцию COBRA, можно вводить в возрасте 1 дня подкожно в целевой дозе 2500 бляшкообразующих единиц (БОЕ) вакцины против болезни Марека в объеме 0,2 мл на

птицу.

Кроме того, воплощение вакцинного вектора может включать антигены, полученные из других ветвей птичьего гриппа, таких как H9 и/или H7.

Вакцинированные птицы могут оставаться клинически здоровыми без клинических признаков вакцинации рекомбинантным вектором MDV-3 H5 (например, rHVT-H5) и/или после контрольного заражения. Вакцинированные птицы могут сероконвертироваться до любого заражения, например, заражения с использованием гомологичного вируса Tк/MN/15 или гетерологичного вируса заражения Egypt/14. Например, после контрольного заражения вакцинированные птицы могут иметь антитела к контрольным вирусам, что приводит к обнаруживаемым титрам антител.

Кроме того, вакцинные конструкции, описанные в настоящем документе, могут снижать выделение у птиц, когда вакцинированные птицы впоследствии подвергаются воздействию вирусной птичьей болезни.

Следует понимать, что последовательности, полинуклеотиды и/или белки по изобретению могут отличаться от точных последовательностей, проиллюстрированных и описанных в данном документе. Таким образом, изобретение предусматривает делеции, добавления и замены показанных последовательностей при условии, что последовательности функционируют в соответствии со способами изобретения. В этом отношении, в особенности предпочтительными заменами будут, как правило, консервативные по своей природе замены, т.е. замены которые имеют место в пределах семейства аминокислот. Например, аминокислоты обычно делятся на четыре семейства: (1) кислые — аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Разумно предсказать, что выделенная или не встречающаяся в природе замена лейцина изолейцином или валином или наоборот; аспартат с глутаматом или наоборот; треонин с серином или наоборот; или аналогичная консервативная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не окажет существенного влияния на биологическую активность. Таким образом, белки, имеющие по существу такую же аминокислотную последовательность, как проиллюстрированные и описанные последовательности, но имеющие минорные аминокислотные замены, которые существенно не влияют на иммуногенность белка, входят в объем изобретения.

Изобретение дополнительно охватывает нуклеотидные последовательности, кодирующие функционально и/или антигенно эквивалентные варианты и производные

антигенов по изобретению и их функционально эквивалентные фрагменты. Эти функционально эквивалентные варианты, производные и фрагменты проявляют способность сохранять антигенную активность. Например, изменения в последовательности ДНК, не изменяющие кодируемую аминокислотную последовательность, а также такие, которые приводят к консервативным заменам аминокислотных остатков, делециям или добавлениям одной или нескольких аминокислот, замене аминокислотных остатков на аминокислотные аналоги являются изменениями, которые не будут существенно влиять на свойства кодируемого полипептида. Консервативные замены аминокислот: глицин/аланин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота; серин/треонин/метионин; лизин/аргинин; и фенилаланин/тирозин/триптофан.

В некоторых воплощениях замена представляет собой консервативное изменение, при котором аминокислота заменяется другой аминокислотой с аналогичной химической структурой, аналогичными химическими свойствами или аналогичным объемом боковой цепи. Введенные аминокислоты могут иметь такую же полярность, гидрофильность или гидрофобность, что и аминокислоты, которые они заменяют. Консервативные замены аминокислот хорошо известны в данной области. Если аминокислоты имеют одинаковую полярность, это также можно определить по шкале гидропатии для боковых цепей аминокислот.

Хотя настоящее изобретение и его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что в нем могут быть сделаны различные изменения, замены и модификации без отклонения от сущности и объема изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые даны только в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 Изготовление vHVT509

vHVT509 содержит ген, кодирующий синтетический белок гемагглютинин (HA) вируса птичьего гриппа А (подтип H5), разработанный с помощью подходов компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA). Цель этого протокола состояла в том, чтобы сконструировать и охарактеризовать рекомбинантный HVT, который содержит промотор mCMV, AIV HA COBRA-C, полиА-хвост SV40 в сайте Intergenic 1 области рекомбинации из MDV-3 FC-126 (герпесвирус индейки (HVT)).

Родительским вирусом рекомбинанта был клон 2 MDV-3 FC-126 (т.е. клон 2 HVT Fc126). Локусом рекомбинации был локус Intergene 1, расположенный во фрагменте BamHI-I. Донорной плазмидой была pCD046-COBRA-C, содержащая промотор mCMV, AIV НА COBRA-C и полиА-хвост SV40. Рекомбинация происходила *in vitro* в клетках вторичного фибробласта куриного эмбриона (2° CEF). Отбор рекомбинантов осуществляли с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA) с использованием куриной сыворотки против птичьего гриппа и ПЦР-амплификации со специфическими праймерами.

Получение рекомбинантного вируса. Рекомбинацию *in vitro* (IVR) проводили путем совместной электропорации вторичных клеток CEF с использованием pCD046-COBRA-C в качестве донорной плазмиды и вирусной ДНК, выделенной из MDV-3 FC-126 (т.е. HVT Fc126). Совместную электропорацию проводили с использованием 1×10^7 вторичных CEF в 300 мкл Opti-MEM (Gibco, кат. № 31985) и подвергали электрошоку при 150 вольт с емкостью 950 в 2-миллиметровой кювете для электропорации. Трансфицированные клетки CEF высевали в DMEM, содержащей 2% FBS (Gibco кат. №11960), в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ инкубаторе в течение 4-5 дней. Затем клетки, выращенные в 96-луночном планшете, дублировали в два 96-луночных планшета и инкубировали еще 2 или 3 дня при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Один набор дублированных 96-луночных планшетов подвергали скринингу на наличие рекомбинантного вируса с помощью IFA с использованием куриной сыворотки против вируса гриппа H5N2 (Charles River Laboratories, Лот № J0210) и кроличьих антител против куриных IgY (IgG) (целая молекула)-конъюгированных с FITC (Sigma кат. № F8888, лот № 075M4812V). Чтобы получить чистую популяцию рекомбинантного вируса, CEF из IFA-положительных лунок в соответствующем 96-луночном планшете извлекали и подвергали стадии очистки.

Очистка рекомбинантного вируса. Очистку рекомбинантного вируса проводили путем разбавления смеси популяций (рекомбинантный и исходный вирус) в 96-луночном планшете с последующим скринингом IFA и ПЦР. После идентификации рекомбинантного вируса проводили дальнейшее разведение из CEF в соответствующих лунках дублированного планшета до тех пор, пока в лунке планшета не останется только чистый рекомбинантный вирус. Вкратце, лунки в соответствующем 96-луночном планшете, положительные по IFA, собирали путем трипсинизации с помощью TrypLE express (Gibco # 12604) и довели до 1 мл с помощью 10% FBS-DMEM. Из 1 мл исходного раствора удаляли 5-20 мкл исходного раствора, в зависимости от количества бляшек в лунке, и смешивали с $3-5 \times 10^6$ CEF в 20 мл 2% FBS-DMEM и аликвотировали в

новый 96-луночный планшет в попытке получить одну бляшку HVT на лунку. 96-луночные планшеты дублировали через 4 дня инкубации при 37°C, 5% CO₂ инкубаторе и каждую лунку тестировали на наличие рекомбинантного вируса с помощью ИФА и ПЦР. Лунки, в которых оказалось больше рекомбинантного вируса, при сравнении паттернов ПЦР-амплификации, собирали, и стадию очистки повторяли, как описано выше, до получения чистых рекомбинантных популяций.

ПЦР-анализ рекомбинантного вируса: Вирусную ДНК экстрагировали из vHVT509 с помощью набора QIA DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, кат. № 69506). Праймеры для ПЦР были разработаны для идентификации присутствия AIV НА COBRA-C вируса гепатита В, промотора mCMV, полиА-хвоста SV40, фланкирующих рекомбинационных плеч вируса HVT. Амплификацию ПЦР проводили с использованием ~200 нг матрицы ДНК вместе с парами праймеров и условиями ПЦР, указанными в таблице ниже.

Таблица 1

Праймеры	Последовательность (5' -> 3')
MB080	CGAACAAACTTCATCGCTATGC (SEQ ID NO: 1)
MB081	ТААСТСAAATGCGAAGCGTTGC (SEQ ID NO: 2)
mCMV.F	ААСТССGССCGТТТТATG (SEQ ID NO: 3)
SV40tail.R	TCGACTCTAGAGGATCCG (SEQ ID NO: 4)
SV40pro.F	AGCTTGGCTGTGGAATGT (SEQ ID NO: 5)
syntail.R	ATGTTCTGGCACCTGCAC (SEQ ID NO: 6)

Таблица 1 - Продолжение

Наборы праймеров	Условия ПЦР
MB080 + MB081	94°C, 2 мин
mCMV.F + SV40tail.R	30 циклов 94°C, 30 сек, 60°C, 30 сек, 68°C, 3 мин
SV40pro.F + syntail.R	68°C, 5 мин

Анализ экспрессии: анализ непрямой иммунофлуоресценции (ИФА) проводили на vHVT509. CEF, инокулированные vHVT509, фиксировали ледяным 95% ацетоном в течение пяти минут при комнатной температуре и сушили на воздухе в течение 10 минут. После регидратации планшета с помощью PBS добавляли два первичных антитела: 1) куриную сыворотку против AIV H5N2 (Charles Rivers Laboratories, Lot#J0210) в разведении 1:500 и 2) моноклональное антитело L78 против HVT (Meril Select, Гейнсвилл, Джорджия) в разведении 1:3000 и инкубировали в течение 1 часа при 37°C.

После трех промывок PBS, добавляли два вторичных антитела, 1) кроличьи антитела против куриных IgG-FITC (Sigma кат. № F8888, партия № 075M4812V) в разведении 1:500 и 2) ослиные анти-мышинные IgG-Alexa Fluor 568 (Molecular Probe # A10037, партия № 1752099) в разведении 1:300. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 часа, а затем трижды инкубировали с PBS. Клетки наблюдали для выявления IFA-положительных бляшек с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием фильтров флуоресцеинизотиоцианата (FITC) и тетраметилродамин изотиоцианата (TRITC) инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti.

Анализ геномной ДНК: Геномную ДНК vHVT509 определяли путем определения нуклеотидной последовательности части рекомбинационной области плеча, а также встроенной генной кассеты. Набор праймеров, MB080 и MB081, использовали для амплификации всей встроенной генной кассеты, включая часть плеча рекомбинации. ПЦР-амплификацию проводили следующим образом: 94°C в течение 2 мин, 30 циклов 94°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 с, 68°C в течение 3 мин и окончательное удлинение при 68°C в течение 5 мин. Продукт ПЦР размером 3,6 т.п.н. очищали с использованием набора для экстракции из геля QIAquick (Qiagen #28706) в соответствии с инструкциями производителя. Всего восемь реакций ПЦР по 25 мкл на реакцию объединяли и очищали с использованием набора. Конечную элюцию подтверждали электрофорезом в агарозном геле.

Серийные пассажи для анализа генетической стабильности. Стоки pre-MSV (п. 3) пассировали во вторичных CEF путем слепых пассажей. Вкратце, 100 мкл предыдущего пассажа инокулировали в монослой CEF в колбе T25. Клетки инкубировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ до тех пор, пока они не приобретут достаточный размер вирусных бляшек (обычно 3-4 дня). Зараженные вирусом CEF собирали путем трипсинизации с помощью TrypLE Express (Gibco # 12604) и доводили до общего объема 1 мл с помощью 10% FBS-DMEM и 10% DMSO для хранения LN2. Приблизительно 50-100 мкл исходного раствора переносили в свежую культуру CEF в колбе T25. Всего было проведено 13 пассажей (X+12) из pre-MSV (X-1). Была проведена *in vitro* характеристика штаммов X+12 для ПЦР-скрининга, анализа нуклеотидной последовательности трансгенной кассеты и экспрессии AIV HA COBRA-C с помощью двойного IFA, как описано ранее.

Результаты

Рекомбинантный вирус: после двух циклов очистки бляшек был выделен чистый рекомбинантный вирус (vHVT509). vHVT509 был протестирован с помощью IFA и ПЦР для проверки соответствующей вставки трансгена, а также отсутствия остаточного родительского вируса. vHVT509 переносили из одной лунки 96-луночного планшета в

флаконы Т-25, флаконы Т-150 и, наконец, роллерные флаконы (площадь поверхности 850 см) для получения стока перед MSV.

ПЦР-анализ: ПЦР-амплификация с различными праймерами, перечисленными в таблице 1, подтвердила, что vHVT509 имеет ожидаемую схему амплификации и ампликон в стоке pre-MSV (фиг. 4) и на уровне пассажей X+12 (фиг. 5).

Таблица 2

Набор праймеров	Ожидаемые ампликоны (п.н.)	
	vHVT509	MDV-3 FC-126 (т.е., HVT Fc126)
MB080 + MB081	3648	323
mCMV.F + SV40tail.R	3319	нет
SV40pro.F + syntail.R	Нет	нет

Анализ экспрессии: результаты IFA показывают, что vHVT509 экспрессирует гены AIV НА COBRA-C в инфицированных вирусом CEF (фиг. 6). С использованием FITC-фильтра и TRITC-фильтра микроскопа подсчитывали более 300 бляшек vHVT509. Общая экспрессия гена НА COBRA-C соответствует бляшкам HVT на исходном материале pre-MSV и на уровне пассажей X+12. См. фиг. 7 для изображений подсчитанных вирусных бляшек, полученных через FITC- и TRITC-фильтры.

Таблица 3

Вирус	Dual IFA	
	Анти-AIV H5N2 сывортка Положительные бляшки	Анти-HVT mAb Положительные бляшки
vHVT509 pre-MSV	318	318
vHVT509 X+12	435	435

Геномный анализ. Анализ геномной ДНК vHVT509 проводили с помощью ПЦР-амплификации с последующим определением нуклеотидной последовательности. Праймеры для амплификации части генома vHVT509 и определения последовательности описаны в таблице ниже. Набор праймеров, MB080 и MB081, использовали для амплификации всего промотора mCMV, гена НА COBRA-C, последовательностей поли-А-хвоста SV40, включая часть фланкирующей области (плечи Intergene 1). Общий ампликон ПЦР размером 3648 п.н. был очищен (фиг. 8) и нуклеотидные последовательности были определены с использованием праймеров для секвенирования, описанных в таблице ниже.

Таблица 4

Праймеры	Последовательности (5' - 3')
MB081	ТААСТСAAATGCGAAGCGTTGC (SEQ ID NO: 2)
mCMV.F	AACTCCGCCCGTTTTATG (SEQ ID NO: 3)
H5coRP1	TTAGAGGCTTCACTCCATC (SEQ ID NO: 14)
H5coFP	ATGGAGAAAATAGTGCTTCT (SEQ ID NO: 15)
H5coFP1	CATCAGGGGTGAGCTCAGC (SEQ ID NO: 16)
H5coFP2	GCCCCAAATATGTGAAATC (SEQ ID NO: 17)
MB080	CGAACAAACTTCATCGCTATGC (SEQ ID NO: 1)

Реакции секвенирования проводили с помощью Eurofins MWG Operon (www.operon.com), а контиг (фиг. 9 и фиг. 10) создавали с использованием модуля Contig Express пакета Vector NTI Advance 11.5.

Нуклеотидные последовательности исходного контига vHV509 pre-MSV и пассажира X+12 и расположение праймера для секвенирования показаны на фиг. 11. Праймеры для секвенирования подчеркнуты с указанием направления праймера. Черный = области рекомбинации, синий = промотор mCMV, красный = AIV НА COBRA-C, серый = синтетический поли-А, подчеркнутый = праймер для секвенирования. Плечи рекомбинации окрашены в черный цвет, а ген AIV НА COBRA-C окрашен в красный цвет.

Фиг. 12 показана аминокислотная последовательность гена НА COBRA-C AIV в vHVT509.

Фиг. 13 показана в текстовом формате нуклеотидная последовательность vHVT509.

Выводы. Данные ПЦР-скрининга и нуклеотидного анализа vHVT509 показали, что промотор mCMV, последовательности НА COBRA-C вируса AIV, хвостовая кассета поли-А SV40 были вставлены между плечом Intergene 1 генома MDV-3 FC-126 (т.е. HVT Fc126). vHVT509 экспрессирует белок AIV НА COBRA-C в инфицированных вирусом CEF. ПЦР-скрининг и анализ последовательности образцов vHVT509 X+12 показывают, что vHVT509 сохраняет кассету трансгена после серийных пассажей. Кроме того, vHVT509 стабильно экспрессировали белок НА COBRA-C после пассажей (на уровне X+12).

Пример 2. Изготовление vHVT522

vHVT522 содержит ген, кодирующий синтетический белок гемагглютинин (НА) вируса птичьего гриппа А (подтип Н5), разработанный с помощью подходов компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA). Синтетический структурный капсидный белок VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни.

Цель протокола состояла в том, чтобы сконструировать вставочную плазмиду для сайта Intergenic I (IG1), которая будет содержать поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок H5 HA), участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и капсидный белок вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV VP2) для гомологичной рекомбинации в правое плечо IG1 вируса Vaxxitek и IBDV VP2.

Донорной плазмидой была pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C, остов которой состоит из синтетически упорядоченной плазмиды, содержащей правое плечо Intergenic I вируса Vaxxitek, поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок H5 HA), IRES, и капсидный белок вируса инфекционной бурсальной болезни. Плазмида содержит промотор mCMV исходного вируса. Рекомбинация происходила *in vitro* в клетках вторичного фибробласта куриного эмбриона (2° CEF). Отбор рекомбинантов осуществляли с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA) с использованием куриной сыворотки против птичьего гриппа и ПЦР-амплификации со специфическими праймерами. Диаграммы плазмид показаны на фиг. 14 и фиг. 15.

Плазмида pVP2-IRES-Cobra-C была ранее создана путем клонирования синтетического фрагмента COBR-C (Genscript Lot U5872BA260-3) в pVP2-IRES-Cobra-A. Плазмиду pVP2-IRES-Cobra-C дополнительно модифицировали путем замены фрагмента HindIII-BlnI новым синтетическим фрагментом VP2+COBC для удаления промежуточного участка последовательности между концом последовательности IRES и началом последовательности COBRA-C, присутствующей в pVP2-IRES-Cobra-C. Новая и правильная донорная плазмида называется pVP2-IRES[MOD]-Cobra-C. Эта плазмида используется для создания рекомбинантного вируса.

Создание рекомбинантов. Рекомбинацию *in vitro* (IVR) проводили путем совместной электропорации клеток 2°CEP с использованием линейаризованной pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C в качестве донорной плазмиды и вирусной ДНК, выделенной из vHVT013. Совместную электропорацию проводили с использованием 1×10^7 2° CEP в 300 мкл Opti-MEM и подвергали электрошоку при 150 вольт с емкостью 950 в 2-миллиметровой кювете для электропорации. Трансфицированные клетки высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение 4 дней. Затем клетки, выращенные в 96-луночном планшете, дублировали в два 96-луночных планшета. Один набор 96-луночных планшетов использовали для IFA с использованием куриной поликлональной сыворотки против AIV H5 HA для выявления положительных лунок, содержащих рекомбинанты, а другой набор 96-луночных планшетов использовали для выделения инфицированных клеток из соответствующих положительных лунок.

Очистка рекомбинанта: Способы очистки рекомбинантного вируса сначала

выполняли путем дублирования 96-луночных планшетов и выбора IFA для лунок, содержащих наибольшее количество IFA-положительных бляшек с наименьшим количеством IFA-отрицательных бляшек. Лунки, соответствующие этим критериям, затем собирали и доводили до 1 мл в DMEM + 2% FBS. Из исходного раствора объемом 1 мл отбирали 10-20 мкл и смешивали с 1×10^7 2° CEF в 10 мл DMEM+2% FBS и распределяли аликвоты на новый 96-луночный планшет, пытаясь получить одиночные бляшки HVT на лунку. Надосадочную жидкость лунок, содержащих одиночные бляшки, тестировали на отсутствие родительского вируса методом ПЦР. Этот процесс повторяли в течение нескольких циклов до тех пор, пока во всех тестируемых лунках не показывались чистые рекомбинантные образцы полос и отсутствие родительского вируса. Четыре лунки для ПЦР *pre* собирали и замораживали (P0), vHVT-VP2-IRES[MOD]-COBRA C #2, #5, #6 и #12. Из 4 два сестринских клона (#5 и #6) были размножены во флаконе T-25 (P1) и, в конечном итоге, во флаконе T-150 (P2). Одна из двух стадий P2 размножения, vHVT-VP2-IRES[MOD]-COBRA-C, #6, была затем размножена в роллерных флаконах 3X 850 см², собрана и заморожена как P3, сток *pre*-MSV (vHVT-522 IBD-AI (P3) #6 11-May-2018 AK). Двенадцать серийных пассажей выполняли во флаконах T-25 после стока *pre*-MSV (X+12).

ПЦР-анализ. Вирусную ДНК экстрагировали из vHVT522 (*pre*-MSV) и vHVT522 X+12 с помощью набора QIA DNaseasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, кат. № 69506). Праймеры для ПЦР были разработаны для специфической идентификации присутствия кодирующей последовательности H5 HA COBRA-C, которая должна присутствовать только в рекомбинантном вирусе, но отсутствовать в родительском вирусе vHVT013. Также были разработаны праймеры для ПЦР для амплификации всей кассеты, включая часть плеча рекомбинации, промотор и рекомбинантные гены для подтверждения секвенированием целостности вируса (таблица 5). ПЦР проводили с использованием 500 нг матрицы ДНК вместе с указанными в таблице 1 парами праймеров. Условия амплификации ПЦР были следующие: 94°C – 2 мин; 40 циклов 94°C – 30 сек, 58°C – 45 сек, 68°C – 1 или 6 мин; 68°C – 5 мин (время удлинения корректировали в соответствии с ожидаемым размером продукта).

Анализ экспрессии: анализ непрямой иммунофлуоресценции (IFA) проводили на vHVT522. CEF, инокулированные vHVT522, фиксировали ледяным 95% ацетоном в течение 20 минут при -20°C и сушили на воздухе в течение 10 минут. Затем планшеты повторно гидратировали с помощью PBS и проводили два набора двойного окрашивания для проверки одновременной экспрессии антигенов в каждой вирусной бляшке. В одном наборе два первичных антитела, сыворотку куриной инфекционной бурсальной болезни

(IBD) (Charles Rivers Laboratories, лот. G0117) в разведении 1:500 и моноклональное антитело L78.2 против HVT (Boehringer Ingelheim Animal Health, ВИАН, Гейнсвилл, Джорджия) в разведении 1:3000 добавляли для проверки экспрессии антигенов VP2 и MDV-3 (HVT). Во втором наборе два первичных антитела, добавляли инактивированную куриную сыворотку H5N2 (Charles River Laboratories, лот. J0210) в разведении 1:300 и моноклональное антитело L78.2 против HVT (Boehringer Ingelheim Animal Health, ВИАН, Гейнсвилл, Джорджия) в разведении 1:3000. Все планшеты с первичными антителами инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После трех промывок PBS, добавляли два вторичных антитела, Alexa Fluor 568 козье антитело против куриных IgG (Invitrogen, кат. № A11041, лот № 1868220) в разведении 1:300 и антитело против мышинных IgG-FITC (Sigma, кат. № F2012- 1 мл, партия № 5LBG3032) в разведении 1:300. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 часа с последующими тремя промывками PBS. Клетки наблюдали для выявления ИФА-положительных бляшек с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием фильтров флуоресцеинизотиоцианата (FITC) и тетраметилродаминизотиоцианата (TRITC) инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti.

Геномный анализ: геномную ДНК vHVT522 определяли путем определения нуклеотидной последовательности части рекомбинационного плеча области, а также встроенной генной кассеты. Набор праймеров, MB080 и MB081, использовали для амплификации всей встроенной генной кассеты, включая часть плеча рекомбинации. ПЦР-амплификацию проводили следующим образом: 94°C в течение 2 мин, 30 циклов 94°C в течение 30 с, 58°C в течение 45 с, 68°C в течение 6 мин и окончательное удлинение при 68°C в течение 5 мин. Продукт ПЦР размером 5,6 т.п.н. подвергали гель-очистке с использованием набора Qiagen Gel Extraction Kit (кат. № 28706, лот. #157036708), и весь фрагмент секвенировали с использованием праймеров для секвенирования, перечисленных в таблице ниже.

Таблица 5. (SEQ ID NO: 1 и 18-21, соответственно)

Праймер	Последовательность (5'→3')
M8080	CGAACAACCTTCATCGCTATGC
M8081	ТААСТСАААТГСГААГСГТ
COBc-FF	TGGTATG GG TACCACCATAGCAATGAGC
Vp2-FF-ak	GTCACACTAGTAGCCTACGAJKAGAGTGGC
PolyAtail-RR	CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA

Набор праймеров	Ожидаемый размер (Родительский вирус - VHVT013)	Ожидаемый размер (Рекомб. вирус - VHVT522)
Vp2-FF-ak/PolyA tail-RR	400 п.н.	2,669 п.н.
PolyA tail-RR/COBc-FF	-	699 п.н.
MB080/MB081	3,350 п.н.	5,637 п.н.

Саузерн-блот-анализ: общая геномная ДНК была извлечена из vHVT013-69 TC5 (pre-MSV от Vaxxitek), vHVT522 pre-MSV и vHVT522 pre-MSV+13, сначала путем переноса материал в коническую пробирку на 50 мл и центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут. Для саузерн-блоттинга материал pre-MSV пассировали еще один раз после 12-го пассажа (следовательно, pre-MSV +13), чтобы собрать достаточно клеток для выделения вирусной геномной ДНК. Осадки клеток ресуспендировали с 1 мл PBS. Добавляли 14 мл буфера для лизиса клеток вместе со 150 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировали в течение 2 часов при 55°C. После инкубации добавляли 600 мкл 5M NaCl. Добавляли равный общий объем фенола и осторожно встряхивали в течение нескольких минут. Затем материал центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Водную фазу (верхнюю фазу) переносили в новую пробирку на 50 мл и повторяли экстракцию еще два раза хлороформом, как описано выше. Конечную водную фазу переносили в поликарбонатную центрифужную пробирку и добавляли 30 мл 100% этанола. После осторожного перемешивания раствор оставляли на ночь при -20°C. На следующий день раствор центрифугировали при 20000 об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость сливали, а осадок ДНК промывали 70% этанолом, охлажденным на льду. Осадок ДНК сушили на воздухе в течение 10 минут. К высушенному осадку добавляли 500 мкл 20 mM NEPEPES. Полную геномную ДНК хранили при 4°C.

Для каждого расщепления рестриктазами использовали 10 мкг геномной ДНК (3 мкг для донорной плазмиды) в концентрации 1 мкг ДНК на 10 мкл смеси для расщепления рестриктазами. Геномную ДНК vHVT013 (отрицательный контроль), донорную плазмиду pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C, vHVT522 pre-MSV и vHVT522 pre-MSV+13 расщепляли в течение ночи при 37 °C с помощью эндонуклеаз рестрикции BamHI, EcoRV и NotI. После расщепления рестриктазами количество геномной ДНК и донорной плазмиды сначала уравнивали путем проведения дот-блоттинга и определения VP2 и NDV-F. Всего 3 мкг vHVT522 pre-MSV, 2 мкг vHVT522 pre-MSV+13, 1 мкг vHVT013 и 1 нг донорной плазмиды в сумме 40 мкл 1X загрузочного буфера наносили на 1% агарозный гель и прогоняли при 25V ночью в холодильной камере. Каждое расщепление и прогон дублировали для каждого используемого зонда.

Агарозный гель помещали в раствор для депуризации, раствор для денатурации и раствор для нейтрализации каждый на 7 минут. Для переноса ДНК из агарозного геля на положительно заряженную нейлоновую мембрану в течение около 2 часов использовали станцию вакуумного переноса при 5Hg. После переноса мембрану обрабатывали 0,4 М раствором NaOH, а затем нейтрализовали буфером SSC-HCL. Затем мембрану сушили на воздухе и сшивали УФ-излучением. Мембраны предварительно гибридизовали в течение 1 часа, а затем гибридизовали с зондом в течение ночи при 55°C в соответствии с инструкциями производителя набора для хемилюминесцентной гибридизации и детекции North2South (Thermo Scientific).

Используемые зонды выделяли расщеплением из донорной плазмиды pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C. Зонд VP2 получали расщеплением донорной плазмиды эндонуклеазами рестрикции MScI и NotI и очисткой на геле фрагмента размером 1,3 т.п.о. Зонд H5 получали расщеплением донорной плазмиды эндонуклеазами рестрикции NcoI и NotI и очисткой на геле фрагмента размером 1,7 т.п.о. Каждую из полос экстрагировали из геля и очищали с использованием набора Qiagen's Gel Extraction Kit (Qiagen, кат. № 28706). В соответствии с инструкциями производителей набора для мечения North2South Biotin Random Prime Labeling Kit (Thermo Scientific) продукты, извлеченные из геля, были помечены путем включения биотинилированных нуклеотидов. Одну мембрану исследовали с помощью зонда VP2, а другую - с помощью зонда H5. После гибридизации в течение ночи выполняли несколько промывок в жестких условиях до тех пор, пока мембраны не помещали в блокирующий буфер, а затем через 30 минут к блокирующему буферу добавляли стрептавидин-HRP. После промывки мембран от любого несвязавшегося стрептавидина-HRP добавляли субстратный раствор люминала и пероксида. Затем мембраны помещали в систему Biorad Chemidoc Imaging System™ и получали изображения в режиме хемилюминесцентной детекции.

Результаты

ПЦР-анализ: ПЦР-анализ vHVT522 pre-MSV (X) и pre-MSV+12 (X+12) проводили с использованием ПЦР-праймеров, перечисленных в таблице 5 и показанных на карте vHVT522 на фиг. 19. Как показано на фиг. 20, размеры продуктов ПЦР после геле-электрофореза хорошо соответствуют ожидаемым размерам и паттернам полос. Нет никаких признаков родительского вируса vHVT013 в vHVT522 на фиг. 20.

Анализ экспрессии: Рекомбинантные вирусные бляшки vHVT522 визуализировали с использованием фильтров TRITC и FITC для двойного окрашивания. Фильтр FITC (зеленый) показывает экспрессию HVT, ожидаемую во всех вирусных бляшках, тогда как фильтр TRITC (красный) показывает экспрессию рекомбинантных антигенов, либо VP2,

либо H5 HA, в зависимости от типа первичного антитела, используемого для окрашивания. Было подсчитано более 300 бляшек при сравнении FITC-HVT и TRITC-VP2 или FITC-HVT и TRITC-H5 HA как в исходном материале vHVT522 (P3) Pre-MSV, так и в vHVT522 X+12, который прошел *in vitro* в течение 12 циклов после стадии P3 (pre-MSV). Сводка количества бляшек показана в таблице 6, а репрезентативная фигура показана на фиг. 21. Все наблюдаемые бляшки были положительными при двойном окрашивании.

Таблица 6

Двойное окрашивание	vHVT522 (P3) pre-MSV	vHVT522 X+12
HVT / IBDV VP2	398/ 398	461/461
HVT / H5 HA	420/420	413 / 413

Геномный анализ: геномную ДНК стока vHVT522 pre-MSV (P3) и X+12 использовали в качестве матрицы для амплификации части области плеча рекомбинации, а также всей встроенной генной кассеты с использованием набора праймеров MB080 и MB081. Продукт ПЦР размером 5,6 т.п.н. подвергали гель-очистке, и весь фрагмент секвенировали с использованием праймеров для секвенирования, перечисленных в таблице 7 и схематически показанных на фиг. 22.

Таблица 7. (SEQ ID NO: 22, 15, 23-25, 1, 18, 26, 3 и 27-36, соответственно)

Название праймера	Последовательность (5' -> 3')
H5C0FFP1	GAAGCTCTGCGATCTAGATGG
H5C0FP	ATGGAGAAADТДGTGCTTCT
H5C0FP1	GAGCTCAGCATGTCCATAACC
H5C0FP2	TCAAACAGATTAGTCCTTGCG
H5C0RP	TCCAATGGATCGTTACAATGC
MB080	CGAACAAACTTCATCGCTATGC
MB081	ТААСТСАААТGCGAAGCGT
mCMV-AklCORR	TCTAGAACTCGTCGATCGCAGC
mCMVF	AACTCCGCCCGTTTTATG
mCMVP1	TCAGCACGGTCATGCACCT
VP2-AK1	GAGATAACCCAGCCAATCACATCC
VP2-AK2	ATGGTAGCTACATGCGACAGC
VP2-AK3	CTACTGCAGACTAGTGAGTCGG
VP2-AK4	GCTCTGCAGTGTGTAGTGAGC
VP2-F	AGATTGCAGGAGCATTTGGCT
IRES-F	CCTGGCGACAGGTGCCTC
H5CORP2	GCTGGACTGGCCTTCTCC
H5coRP1	TTGTGTCAACCTGCTCTGTGC
IRES-R	TTGAATACGCTTGAGGAGAGCC

ПЦР с использованием следующих матриц: vHVT522 pre-MSV (дорожка 1), vHVT522 pre-MSV+12 (дорожка 2) устанавливали с использованием пар праймеров

MB080 и MB081 для амплификации всей встроенной генной кассеты, включая часть плеча рекомбинации. Продукт ПЦР размером 5,6 т.п.н. экстрагировали из геля и использовали для анализа последовательности с использованием праймеров, перечисленных в Таблице 7. Анализ последовательности был выполнен компанией Eurofins MWG Operon LLC.

Контиги для секвенирования собирали из реакций секвенирования с праймерами, указанными в таблице 7. См. фиг. 24 для vHVT522 pre-MSV и фиг. 25 для секвенированных контигов vHVT522 pre-MSV+12.

Результаты секвенирования, полученные для vHVT522 pre-MSV+12, сравнивали с использованием программного обеспечения Vector NTI для формирования выравнивания. Выравнивание точно соответствует последовательности vHVT522 pre-MSV.

Саузерн-блот-анализ: Саузерн-блот анализ выполняли для определения фрагментов генов VP2 и H5. На фиг. 30 представлена карта плазмиды pVP2-IRES[MOD]-COBRA-C, которую использовали для получения двух зондов, использованных в Саузерн-блотах. Эта плазида содержит гены H5 и VP2, которые находятся в vHVT522. Зонд VP2, 1,3 т.п.н., фланкирован MscI и NotI, а зонд H5, 1,7 т.п.н., фланкирован сайтами рестрикции NcoI и NotI. После расщепления плазмиды каждой парой эндонуклеаз рестрикции каждый фрагмент экстрагировали из геля и использовали в качестве матрицы для получения биотинилированного ДНК-зонда.

Ожидаемый размер фрагментов ДНК, полученных рестрикционным расщеплением каждой конструкции, рассчитывали с использованием программного обеспечения Vector NTI. Как показано на фиг. 34 и фиг. 35 полученные ожидаемые размеры соответствуют фактической полосе, полученной после проявления саузерн-блота. Паттерны специфических фрагментов ДНК, обнаруженные как в геномной ДНК Pre-MSV, так и в Pre-MSV+13 vHVT522, идентичны. Тем не менее, между маркерами 1 и 1,6 т.п.н. наблюдается заметный мазок (показан красной стрелкой), картина которого не меняется при использовании эндонуклеазы рестрикции, которая, вероятно, возникает из-за частично деградировавшего генома.

Выводы: На основании ПЦР, иммунофлуоресценции и анализа последовательности vHVT522 нет доказательств того, что родительский vHVT013 остался. Данные демонстрируют, что vHVT522 представляет собой рекомбинантный HVT, экспрессирующий ген VP2 из IBDV и ген H5 (низкий путь) из AIV под контролем промотора mCMV (VP2) и последовательности IRES (HA). Данные также демонстрируют, что vHVT522 стабилен генетически и фенотипически через 12 пассажей после pre-MSV.

Пример 3. Изготовление vHVT523

vHVT523 содержит ген, кодирующий синтетический белок гемагглютинаина (HA)

вируса птичьего гриппа (AIV) А (подтип Н5), разработанный с помощью подходов компьютерно-оптимизированных антигенов с широкой реактивностью (COBRA). Этот конкретный белок также называется в этом документе как COBRA-C для компьютерно-оптимизированного антигена с широкой реактивностью версии С. vHVT523 также содержит синтетический гибридный белок вируса болезни Ньюкасла (NDV) (F).

Цель этого протокола заключалась в конструировании рекомбинантного вируса HVT, в котором сайт Intergenic I во фрагменте BamHI I будет содержать промотор mCMV, гибридный белок F NDV, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), белок HA вируса птичьего гриппа (подтип Н5, COBRA-C) и поли-А хвост SV40.

Донорной плазмидой была pFwt-IRES[MOD]-COBRA-C, каркас которой состоит из плазмиды, содержащей фрагмент синтетической ДНК из плеча Intergenic I вируса vHVT013, поли-А-хвост SV40, COBRA-C (белок Н5 HA), IRES, белок NDV-F и промотор mCMV. Рекомбинация происходила *in vitro* в клетках вторичного фибробласта куриного эмбриона (2° CEF). Отбор рекомбинантов осуществляли с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA) с использованием куриной сыворотки против птичьего гриппа и ПЦР-амплификации со специфическими праймерами.

Плазмида pFwt-IRES-COBRA-C была впервые сконструирована путем замены гена Saudi-Arabia H9 в ранее созданной плазмиде (pFwt-IRES-SaH9opt) геном COBRA-C, извлеченным из pVP2-IRES-COBRA-C. Ген COBRA-C экстрагировали из pVP2-IRES-COBRA-C с помощью рестрикционных ферментов с использованием SalI и HindIII и клонировали в pFwt-IRES-SaH9opt, который также расщепляли теми же ферментами. Плазмиду pFwt-IRES-Cobra-C дополнительно модифицировали путем замены фрагмента HindIII-BlpI новым синтетическим фрагментом F+COBC для удаления промежуточного участка последовательности между концом последовательности IRES и началом последовательности COBRA-C, присутствующей в pFwt-IRES-Cobra-C. Новая и правильная донорная плазмида называется pFwt-IRES[MOD]-Cobra-C. Эта плазмида используется для создания рекомбинантного вируса. Схемы конструкции плазмиды показаны на фиг. 36 и фиг. 37

Получение рекомбинантного вируса. Рекомбинацию *in vitro* (IVR) проводили путем совместной электропорации клеток 2°CEP с использованием линеаризованной pFwt-IRES[MOD]-COBRA-C в качестве донорной плазмиды и вирусной ДНК, выделенной из vHVT013. Совместную электропорацию проводили с использованием 1×10^7 2° CEF в 300 мкл Opti-MEM и подвергали электрошоку при 150 вольт с емкостью 950 в 2-миллиметровой кювете для электропорации. Трансфицированные клетки высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение 4 дней. Затем клетки, выращенные в 96-

луночном планшете, дублировали в два 96-луночных планшета. Один набор 96-луночных планшетов использовали для ИФА с использованием куриной поликлональной сыворотки против AIV H5 NA для выявления положительных лунок, содержащих рекомбинанты, а другой набор 96-луночных планшетов использовали для выделения инфицированных клеток из соответствующих положительных лунок.

Очистка рекомбинанта: Способы очистки рекомбинантного вируса сначала выполняли путем дублирования 96-луночных планшетов и выбора ИФА для лунок, содержащих наибольшее количество ИФА-положительных бляшек с наименьшим количеством ИФА-отрицательных бляшек. Лунки, соответствующие этим критериям, затем собирали и доводили до 1 мл в DMEM + 2% FBS. Из 1 мл запаса отбирали 10–20 мкл и смешивали с 1×10^7 2° CEF в 10 мл DMEM+2% FBS и распределяли аликвоты на новый 96-луночный планшет, пытаясь получить одиночные бляшки HVT на лунку. Надсадочную жидкость лунок, содержащих одиночные бляшки, тестировали на отсутствие родительского вируса методом ПЦР. Этот процесс повторяли в течение нескольких циклов до тех пор, пока во всех тестируемых лунках не показывались чистые рекомбинантные образцы полос и отсутствие родительского вируса. Пять лунок для ПЦР pure собирали и замораживали (P0), vHVT-Fwt-IRES[MOD]-COBRA-C, R3(P0) #1, #2, #3, #4 и #5. Из 5 два сестринских клона (#1 и #4) были размножены во флаконе T-25 (P1) и, в конечном итоге, во флаконе T-150 (P2). Одна из двух стадий P2 размножения, vHVT-Fwt-IRES[MOD]-COBRA-C, #1, была затем размножена в роллерных бутылках 3X 850 см², собрана и заморожена как сток P3 pre-MSV (vHVT-523 NDV-AI (P3) #1 11-May-2018 AK). Двенадцать серийных пассажей выполняли во флаконах T-25 после стока pre-MSV (X+12).

ПЦР-анализ: Вирусную ДНК экстрагировали из vHVT523 (pre-MSV) и vHVT523 X+12 с помощью набора QIA DNaseasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, кат. № 69506). Праймеры для ПЦР были разработаны для специфической идентификации присутствия кодирующей последовательности H5 NA COBRA-C, которая должна присутствовать только в рекомбинантном вирусе, но отсутствовать в родительском вирусе vHVT013. Также были разработаны праймеры для ПЦР для амплификации всей кассеты, включая часть плеча рекомбинации, промотор и рекомбинантные гены для подтверждения секвенированием целостности вируса. ПЦР проводили с использованием 500 нг матрицы ДНК вместе с указанными парами праймеров, указанными в таблице 1. Условия амплификации ПЦР были следующие: 94°C – 2 мин; 40 циклов 94°C – 30 сек, 58°C – 45 сек, 68°C – 1 или 6 мин; 68°C – 5 мин (время удлинения корректировали в соответствии с ожидаемым размером продукта).

Анализ экспрессии: Непрямой иммунофлуоресцентный анализ (IFA) проводили на vHVT523. CEF, инокулированные vHVT523, фиксировали ледяным 95% ацетоном в течение 20 минут при -20°C и сушили на воздухе в течение 10 минут. Затем планшеты повторно гидратировали с помощью PBS и проводили два набора двойного окрашивания для проверки одновременной экспрессии антигенов в каждой вирусной бляшке. В одном наборе два первичных антитела, сыворотку куриного вируса ньюкаслской болезни (ND) (Charles Rivers Laboratories, Lot. C0117A) в разведении 1:300 и моноклональное антитело L78.2 против HVT (Boehringer Ingelheim Animal Health, BIAH, Гейнсвилл, Джорджия) в разведении 1:3000 добавляли для проверки экспрессии антигенов NDV-F и HVT, соответственно. Во втором наборе два первичных антитела, добавляли инактивированную куриную сыворотку H5N2 (Charles River Laboratories, лот. J0210) в разведении 1:300 и моноклональное антитело L78.2 против HVT (Boehringer Ingelheim Animal Health, BIAH, Гейнсвилл, Джорджия) в разведении 1:3000. Все планшеты с первичными антителами инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После трех промывок PBS, добавляли два вторичных антитела, Alexa Fluor 568 козье антитело против куриных IgG (Invitrogen, кат. № A11041, лот № 1868220) в разведении 1:300 и антитело против мышиных IgG-FITC (Sigma, кат. № F2012- 1 мл, партия № 5LBG3032) в разведении 1:300. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 часа с последующими тремя промывками PBS. Клетки наблюдали для выявления IFA-положительных бляшек с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием фильтров флуоресцеинизотиоцианата (FITC) и тетраметилпродамин изотиоцианата (TRITC) инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti.

Геномный анализ: геномную ДНК vHVT523 определяли путем определения нуклеотидной последовательности части рекомбинационного плеча области, а также встроенной генной кассеты. Набор праймеров, MB080 и MB081, использовали для амплификации всей встроенной генной кассеты, включая часть плеча рекомбинации. ПЦР-амплификацию проводили следующим образом: 94°C в течение 2 мин, 30 циклов 94°C в течение 30 с, 58°C в течение 45 с, 68°C в течение 6 мин и окончательное удлинение при 68°C в течение 5 мин. Продукт ПЦР размером 5,9 т.п.н. подвергали гель-очистке с использованием набора Qiagen Gel Extraction Kit (кат. № 28706, лот. #157036708), и весь фрагмент секвенировали с использованием праймеров для секвенирования, перечисленных в таблице ниже.

Таблица 8. (SEQ ID NO: 1, 18, 19, 37 и 21, соответственно)

Праймер	Последовательность (5'->3')
MB080	CGAACAACCTTCATCGCTATGC

MB081	ТААСТСАААТГСГААГСГТ
COBc-FF	TGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGC
NDV-F1	ATGGGCTCCAAACCTTCTAC
PolyA tail-RR	CACTG CATTCTAGTTGTGG TTTGTCCA

Набор праймеров	Ожидаемый размер (Родительский вирус - vHVT013)	Ожидаемый размер (Рекомб. вирус - vHVT523)
NDV-F1/PolyA tail-RR	-	4,022 п.н.
PolyA tail-RR/COBc-FF	-	700 п.н.
MB080/MB081	3,350 п.н.	5,913 п.н.

Результаты

ПЦР-анализ: ПЦР-анализ vHVT523 pre-MSV (X) и pre-MSV+12 (X+12) проводили с использованием ПЦР-праймеров, перечисленных в таблице 8 и показанных на карте vHVT523 на фиг. 41. Как показано на фиг. 42, размеры продуктов ПЦР после гелеэлектрофореза хорошо соответствуют ожидаемым размерам и образцам полос. Кроме того, нет никаких доказательств присутствия родительского вируса vHVT013 в vHVT523.

Анализ экспрессии. Рекомбинантные вирусные бляшки vHVT523 визуализировали с использованием фильтров TRITC и FITC для двойного окрашивания. Фильтр FITC (зеленый) показывает экспрессию HVT, ожидаемую во всех вирусных бляшках, тогда как фильтр TRITC (красный) показывает экспрессию рекомбинантных антигенов, либо NDV-F, либо H5 NA, в зависимости от типа первичного антитела, используемого для окрашивания. Было подсчитано более 300 бляшек при сравнении FITC-HVT и TRITC-NDV-F или FITC-HVT и TRITC-H5 NA как в исходном материале vHVT523 (P3) pre-MSV, так и в vHVT523 X+12, который прошел *in vitro* в течение 12 раундов после стадии P3 (pre-MSV). Сводка количества бляшек показана в таблице ниже, а репрезентативная цифра показана на фиг. 43. Все наблюдаемые бляшки были положительными при двойном окрашивании.

Таблица 9

Двойное окрашивание	vHVT523 (P3) pre-MSV	vHVT523 X+12
HVT / NDV F	325/325	345/345
HVT / H5 NA	412/412	423/423

Геномный анализ: геномную ДНК стока vHVT523 pre-MSV (P3) и X+12 использовали в качестве матрицы для амплификации части рекомбинационной области плеча, а также всей встроенной генной кассеты с использованием набора праймеров MB080 и MB081. Продукт ПЦР размером 5,9 т.п.н. очищали в геле, и весь фрагмент

секвенировали с использованием праймеров для секвенирования, перечисленных в таблице ниже и схематически показанных на фиг. 41.

Таблица 10. (SEQ ID NO: 38-41, 22, 15, 42-44, 35, 45, 36, 1, 18, 3, 27 и 46, соответственно)

НАЗВАНИЕ ПРАЙМЕРА	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (5' -> 3')
312P2	TATGCCCAGGGATAAGGAGG
312P4	CTGGTGGCAATATGGATT
312P6	CGTCAACAATTCAATCAGA
CMV-FF	TTGGCTGAGCTGCGTTCTACG
H5COFFP1	GAAGCTCTGCGATCTAGATGG
H5COFP	ATGGAGAAAATAGTGCTTCT
H5COFP1	ACGAGTTCATCAGGGTACCG
H5COFP2	AGCTGGGTAATGGTTGTTTC
H5CORP	AKGTGKAA1XTGCTTTGI
H5CORP1	TTGTGTCAACCTGCTCTGTCG
HSCORRP1	TTCCAACGGCCTCAAACCTGAG
IRES-R	TTGAATACGCTTGAGGAGAGCC
MB080	CGAACAACTTCATCGCTATGC
MB081	ТААСТСАААТГСГААГСГТ
MCMVF	AACTCCGCCCGTTTTATG
MCMVP1	TCAGCACGGTTCATGCACTCT
NOVF-R	GAGACGAAGTGTATACATTGACTGC

ПЦР с использованием следующих матриц: vHVT523 pre-MSV (дорожка 1), vHVT523 pre-MSV+12 (дорожка 2) проводили с использованием пар праймеров MB080 и MB081 для амплификации всей встроенной генной кассеты, включая часть плеча рекомбинации. Продукт ПЦР размером 5,6 т.п.н. экстрагировали из геля и использовали для анализа последовательности с использованием праймеров, перечисленных в Таблице 10. Анализ последовательности был выполнен компанией Eurofins MWG Operon LLC.

Контиги для секвенирования собирали из реакций секвенирования с праймерами, указанными в Таблице 10. См. фиг. 46 для секвенированных контигов vHVT523 pre-MSV.

Результаты секвенирования, полученные от vHVT523 pre-MSV, сравнивали с использованием программного обеспечения Vector NTI для формирования вышеуказанного выравнивания. Созданное выравнивание точно соответствовало ожидаемой последовательности vHVT523.

Выводы: На основании ПЦР, иммунофлуоресценции и анализа последовательности vHVT523 нет никаких доказательств того, что родительский vHVT013 остался. Данные демонстрируют, что vHVT523 представляет собой рекомбинантный HVT, экспрессирующий гибридный (F) ген из NDV и ген H5 (низкий путь) из AIV под контролем промотора mCMV (F) и последовательности IRES (HA). Данные также демонстрируют, что vHVT523 стабилен генетически и фенотипически через 12 пассажей

после pre-MSV.

Пример 4. Оценка эффективности кандидатов птичьего гриппа-болезни Марека, серотип 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-AI-IBDV, vHVT523-AI-NDV и vHVT509-AI), вводимых однодневным SPF-цыплятам, против заражений высокопатогенным птичьим вирусом гриппа

Цель этого исследования заключалась в том, чтобы определить эффективность кандидатов птичьего гриппа-болезни Марека, серотипа 3, живого вектора болезни Марека, введенных однодневным цыплятам SPF, против заражения тремя высокопатогенными штаммами вируса птичьего гриппа (HPAIV).

Исследуемые первичные переменные: 1. Смертность и типичные клинические признаки, связанные с высокопатогенным птичьим гриппом и 2. Процент птиц, выделяющих вирус, и вирусная нагрузка в мазках из ротоглотки.

Сто сорок четыре (144) однодневных цыпленка SPF из стада SPAFAS T36 были разделены на 12 групп в соответствии с таблицей ниже. Все птицы были вакцинированы или ложновакцинированы подкожным (п.к.) путем, согласно приведенной ниже таблице, vHVT522-AI-IBDV (P5 082918) в дозе 2560 БОЕ/0,2 мл; vHVT523-AI-NDV (P5 082918) в дозе 2360 БОЕ/0,2 мл; и vHVT509-AI (vHVT509 X+5 071318) в дозе 2160 БОЕ/0,2 мл. Птиц содержали группами обработки, по 18 птиц на группу.

Таблица 11

Группа	Вакцина БОЕ/дозу	Путь/ объем (мл)	Количество Помещенных птиц	Количество Птиц при заражении	Заражение H5*
1	vHVT522 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Minnesota/12582
2	vHVT523 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Minnesota/12582
3	vHVT509 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Minnesota/12582
4	Ложновакцинированные контроли заражения	0.2 мл / п.к.	12	10	Minnesota/12582
5	vHVT522 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Egypt/N04915
6	vHVT523 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Egypt/N04915
7	vHVT509 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Egypt/N04915
8	Ложновакцинированные контроли заражения	0.2 мл / п.к.	12	10	Egypt/N04915
9	vHVT522 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Hungary/53433
10	vHVT523 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Hungary/53433

11	vHVT509 ~2,500	0.2 мл / п.к.	12	10	Hungary/53433
12	Ложновакцинированные контроли заражения	0.2 мл / п.к.	12	10	Hungary/53433

*Птиц заражали на 28 день исследования в SEPRL одним из A/turkey/Minnesota/12582/2015, клада 2.3.4.4 - H5N2 [Minnesota/12582]; A/Egypt/N04915/2014, H5N1, клада 2.2.1 – H5N1 [Egypt/N04915]; или третий, определяемый, штамм, интрахоанальным путем, с $\sim 10^{6,0}$ EID₅₀ на дозу.

Тестовые вакцины, использованные в исследовании, показаны в таблице ниже.

Таблица 12

Настоящее название продукта	1. Птичий грипп-бурсальная болезнь-болезнь Марека, серотип 3, живой вектор болезни Марека [vHVT522-AI-IBDV] 2. Птичий грипп-болезнь Ньюкасла-болезнь Марека, серотип 3, живой вектор болезни Марека [vHVT523-AI-NDV] 3. Птичий грипп- вакцина против болезни Марека, подтип H5, серотип 3, живой вектор болезни Марека [vHVT509-AI]
Состав	1-3. Все вакцины были разведены до целевой дозы ~2500 БОЕ/0,2 мл.
производитель	Merial Inc. (US Veterinary Biologics Est. 298)
Требования к хранению	Жидкий азот
Применяемая доза и путь	1-3. 0,2 мл на птицу, вводится подкожно (п.к.)

Материал для заражения, использованный в исследовании, показан в таблице ниже.

Таблица 13

Научное название	Птичий грипп типа H5
Штамм/связь с тестируемой вакциной	1. A/turkey/Minnesota/12582/2015, Clade 2.3.4.4 - H5N2 [Minnesota/12582] 2. A/Egypt/N04915/2014, H5N1, Clade 2.2.1 – H5N1 [Egypt/N04915] 3. TBD
Источник материала	Юго-восточная исследовательская лаборатория птицеводства (SEPRL)
Процедура заражения	При разведении, которое приведет к дозе примерно 106,0 EID ₅₀ /0,1 мл
Требования к хранению	-70°C
Применяемая доза	~106,0 EID ₅₀ /0,1 мл-доза
Путь введения	0,1 мл на птицу введением внутрь хоаны

Животные, использованные в исследовании, показаны в таблице ниже.

Таблица 14

Вид	<i>Gallus domesticus</i>
Штамм/Порода	SPF-цыплята
Источник	SPAFAS
Пол	Самка/самец
Масса	N/A
Возраст	Суточный
Номер	144 однодневных цыпленка
Физиологический статус	Здоровый и проворный
Критерии включения	Все птицы выглядят здоровыми и проворными
Кондиционирование/а кклиматизация	N/A
Серологический статус	N/A
Критерий исключения	Животные, ослабленные, страдающие заболеванием или травмой, беспокойные или иным образом непригодные для включения в исследование, по мнению исследователя, исключались из исследования.
Идентификация животных	Птиц идентифицировали в соответствии с размещением по блокам и по пронумерованным лентам.
Критерии исключения из исследования	После включения в исследование животных, ослабленных, страдающих заболеванием или травмой, беспокойных или иным образом непригодных для пребывания в исследовании, по мнению исследователя, удаляли.

Хронология исследования представлена в таблице ниже.

Таблица 15

День исследования или диапазон	Активность
День 0	Сто сорок четыре (144) однодневных цыпленка SPF были распределены в группы 1-12 в соответствии с Разделом 2.1. Все птицы были вакцинированы или ложновакцинированы п.к. путем в соответствии с разделами 1.1 и 2.1. В каждый блок помещали восемнадцать (18) птиц. Птиц из разных групп, получавших одинаковую обработку, содержали вместе в Merial, разделив на два блока.
Дни 24-28	Все группы были сокращены до десяти (10) птиц, и для индивидуальной идентификации были помечены пронумерованными лентами на шею (пронумерованные ленты прикрепляли только зараженным птицам: 10 на группу, всего 120 птиц). Кровь забирали путем венепункции из крыловой или яремной вены. Все группы были доставлены в SEPRL и помещены в изоляционные блоки (десять птиц на единицу, по одной единице на группу) в помещении BSL-3 в SEPRL. Фактическая активность в день исследования
День 28	Всех птиц заражали HPAIV в соответствии с Разделами 1.3 и 2.1 внутрианальным путем, 0,1 мл на птицу.
День 29-42	Птиц ежедневно осматривали на наличие любых неблагоприятных реакций на заражение и клинических признаков HPAIV, включая

	гибель.
День 30*	Мазки из ротоглотки собирали у всех птиц (включая птиц, найденных мертвыми в этот день исследования) и хранили в среде для инфузии мозга и сердца (ВНІ) при -70°С до проведения молекулярного тестирования для определения вирусывыделения.
День 32*	Мазки из ротоглотки собирали у всех оставшихся птиц (включая птиц, найденных мертвыми в этот день исследования) и хранили в инфузионной среде мозга и сердца (ВНІ) при -70°С до проведения молекулярного тестирования для определения вирусывыделения.
День 42	У всех оставшихся птиц собирали кровь и птиц умерщвляли.

* Образцы мазков собирали только в дни исследования 30 и 32 от всех птиц, которые были живыми в эти дни, а также от птиц, найденных мертвыми в эти конкретные дни исследования. Все другие птицы, которые были найдены мертвыми или были умерщвлены в любой другой день исследования, не использовались для отбора образцов.

На 24 день исследования все группы были сокращены до 10 (десяти) птиц в каждой группе и птиц помечали с помощью ленты на шее для индивидуальной идентификации. Образцы крови собирали путем венепункции из крыловой или яремной вены.

На 25 день исследования все группы были доставлены в Юго-восточную исследовательскую лабораторию птицеводства (Southeastern Poultry Research Laboratory, SEPRЛ) и помещены в изоляционные блоки, по десять (10) голов в блоке.

На 28 день исследования всех птиц заражали НРАІV A/turkey/Minnesota/12582/2015; Clade 2.3.4.4; [Minnesota/12582], при 105.9 EID50 на дозу (Группы 1-4); A/Egypt/N04915/2014, H5N1, clade 2.2.1; [Egypt/N04915], при 106.5 EID50 на дозу (Группы 5-8); или A/domestic turkey/Hungary/53433/2016, Clade 2.3.4.4В – H5N8 [Hungary/53433] в дозе 105,9 EID50 на дозу путем введения внутрь хоан.

В дни исследования 28-42 за птицами ежедневно наблюдали любые неблагоприятные реакции на заражение и клинические признаки НРАІV, включая гибель. Клинические признаки включают, без ограничения указанным, тяжелую депрессию, симптомы со стороны нервной или дыхательной системы и/или смерть. В конце периода наблюдения (42 день исследования) у выживших брали кровь на серологию и умерщвляли.

В дни исследования 30 и 32 у всех птиц собирали мазки из ротоглотки (включая птиц, найденных мертвыми в эти дни выборки); и хранят в инфузионной среде мозга и сердца (ВНІ) при -70 °С до проведения молекулярного тестирования для определения выделения вируса.

На 42 день исследования у всех оставшихся птиц собирали кровь и птиц умерщвляли.

Все животные содержались одинаково. Птиц содержали в изоляторах с

отрицательным давлением. Воду и корм давали *ad libitum*.

Все птицы содержались в помещениях Merial до транспортировки. Между 25-м и 28-м днями исследования всех птиц переводили в SEPRL, где их помещали в блоки, одобренные BSL-3, на оставшуюся часть исследования.

Аналитическое тестирование

Вакцина: каждый экспериментальный вакцинный препарат титровали от одного до трех раз для определения фактической введенной дозы (ADG). Титры определяли для всех фракций вакцины, включая вирус болезни Марека и генную вставку птичьего гриппа.

Заражение: контрольные вирусы титровали один раз в яйцах, чтобы определить фактическую введенную дозу заражения.

Серология: сыворотку, собранную до и после заражения, использовали в анализах ингибирования гемагглютинации (HI) для определения уровней антител против выбранных штаммов AIV.

Вирусовыделение – RT-PCR: Вирусная нагрузка HPAIV была протестирована с помощью RT-PCR в реальном времени в собранных мазках с помощью SEPRL. Мазки из ротоглотки собирали на 30 и 32 дни исследования и хранили в среде VNI при -70°C до обработки. Вирусную РНК экстрагировали с использованием набора для выделения вирусной РНК MagMAX™-96 AI/ND® (Ambion, Inc.) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные экстракты вирусной РНК количественно определяли с помощью одностадийной qRRT-PCR, нацеленной на матричный ген гриппа, с использованием системы ПЦР в реальном времени 7500 FAST (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США). Стандартные кривые для количественного определения вирусной РНК были построены с использованием РНК, экстрагированной из разведений тех же титрованных запасов контрольных вирусов. Титр выделения ($\text{Log}_{10}/\text{мл}$) измеряли с помощью RT-PCR. Положительный результат мазка для каждой птицы определяли как один или несколько случаев положительного результата RT-PCR после контрольного заражения у каждой птицы. Для анализа все отрицательные образцы считались ниже предела обнаружения, установленного для каждого вируса.

Утилизация животных: Все птицы, погибшие во время исследования, и птицы, умерщвленные в Merial, были уничтожены путем сжигания на экспериментальной ферме. Птицы, которые умерли или умерли в конце исследования в SEPRL, были утилизированы в соответствии с рекомендованными и утвержденными процедурами на объекте SEPRL BSL-3.

Результаты

В таблице ниже показано количество птиц с положительным результатом на

HPAIV и процент защиты/инфицирования по исследовательским группам.

Таблица 16

Группа	Вакцина БОЕ/дозу*	Заражение H5**	# положительных/ # общему количеству птиц	% Защиты (% Инфекции)
1	VHVT522 2,560	Minnesota/12582	0/10	100
2	VHVT523 2,360	Minnesota/12582	0/10	100
3	VHVT509 2,160	Minnesota/12582	0/10	100
4	Ложновакцинированные контроли заражения	Minnesota/12582	10/10	(100%)
5	VHVT522 2,560	Egypt/N04915	0/10	100
6	VHVT523 2,360	Egypt/N04915	1/10	90
7	VHVT509 2.160	Egypt/N04915	0/10	100
8	Ложновакцинированные контроли заражения	Egypt/N04915	10/10	(100%)
9	VHVT522 2,560	Hungary/53433	0/10	100
10	VHVT523 2,360	Hungary/53433	1/10	90
11	VHVT509 2,160	Hungary/53433	0/10	100
12	Ложновакцинированные контроли заражения	Hungary/53433	10/10	(100%)

*Все птицы были заражены на 28-й день исследования в SEPRL путем введения внутрь хоан с помощью HPAIV A/turkey/Minnesota/12582/2015; clade 2.3.4.4; [Minnesota/12582], по 1059EID50 на дозу (группы 1-4); A;Egypt/N04915/2014. H5N1, clade 2.2.1; [Egypt/N04915], при 106,5EID50 на дозу (группы 5-8); или A/domestic turkey/Hungary/53433/2016. Clade 2.3.4.4B - H5N8 [Hungary/53433] по 1059EID50 на дозу.

Сводка результатов сброса показана в таблице ниже и на фиг. 55-57. Гистограммы титров выделения для 30-го и 32-го дня исследования показаны на фиг. 51 и фиг. 52, соответственно.

Таблица 17

Группа	Вакцина БОЕ/дозу*	Заражение H5**	Среднее орофарингеальное вирусовыделение EID50/мл*/ Std	
			День 30	День 32
1	VHVT522 2,560	Minnesota/12582	2,5/1,4	2,6/1,9
2	VHVT523 2,360	Minnesota/12582	3,1 / 1,3	3,8 / 2,2

3	VHVT509 2,160	Minnesota/12582	1,6/0,9	1,2/0,4
4	Ложновакцинированные контроли заражения	Minnesota/12582	7,3 / 0,6	N/A
5	VHVT522 2,560	Egypt/N04915	2,9/1,4	3,0/1,4
6	VHVT523 2,360	Egypt/N04915	3,0/1,2	3,5/1,6
7	VHVT509 2,160	Egypt/N04915	2,5/1,1	2,2/1,3
8	Ложновакцинированные контроли заражения	Egypt/N04915	6,6 / 0,6	N/A
9	VHVT522 2,560	Hungary/53433	1,8 / 0,9	1,7/1,2
10	VHVT523 2.360	Hungary/53433	2,8/1,4	2,9/1,5
11	VHVT509 2,160	Hungary/53433	1,3/0,0	1,4/0,4
12	Ложновакцинированные контроли заражения	Hungary/53433	6,0/1,2	6,6 / N/A

* Предел обнаружения для использованной RT-PCR составил 1,1 для Minnesota/12582; 1,7 для Egypt/N04915; и 1,4 для Hungary/53433. Все образцы с титрами ниже 1,1 (группы 1-4); ниже 1,7 (группы 5-8); или ниже 1,4 (группы 9-12) считались отрицательными. Для целей статистических расчетов всем отрицательным образцам было присвоено значение «1,0» (группы 1-4); «1,6» (группы 5–8) или «1,3» (группы 9–12) для расчетов. «Все инфицированные с ложной вакцинацией (за исключением одной птицы в группе 12) были либо мертвы, либо были подвергнуты эвтаназии из-за клинических признаков перед сбором образцов на 32-й день исследования.

В таблице ниже показана частота положительного выделения из ротоглотки по дням и группам.

Таблица 18

Группа	Вакцина БОЕ/дозу*	Заражение H5**	Орофарингеальные мазки # птиц с вирусывыделением / # протестированных птиц	
			День 30	День 32
1	VHVT522 2,560	Minnesota/12582	6/10	5/10
2	VHVT523 2.360	Minnesota/12582	9/10	7/10
3	VHVT509 2.160	Minnesota/12582	5/10	3/10
	Ложновакцинированные контроли заражения	Minnesota/12582	10/10	N/A
5	VHVT522 2,560	Egypt/N04915	6/10	6/10

6	VHVT523 2,360	Egypt/N04915	8/10	7/10
7	VHVT509 2,160	Egypt/N04915	5/10	2/10
8	Ложновакцинированные контроли заражения	Egypt/N04915	10/10	N/A
9	VHVT522 2,560	Hungary/53433	3/10	1 / 10
10	VHVT523 2,360	Hungary/53433	7/10	8/10
11	VHVT509 2,160	Hungary/53433	0/10	1 / 10
12	Ложновакцинированные контроли заражения	Hungary/53433	10/10	1 / 1

*Все зараженные птицы с ложной вакцинацией были либо мертвы, либо были подвергнуты эвтаназии из-за клинических признаков перед сбором образцов (за исключением одной птицы в группе 12) — образцы не были взяты на 32-й день для групп 7 и 8.

В таблице ниже представлены сводные результаты HI по дням и группам.

Таблица 19

Группа	Вакцина БОЕ/дозу*	HI LOG ₂ GMT*		# птиц с антителами / # протестированных птиц	
		День 24	День 42	День 24	День 42
1	VHVT522 2,560	3,2	5,9	8/10	10/10
2	VHVT523 2,360	2,5	6,3	3/10	10/10

Группа	Вакцина БОЕ/дозу*	HI		# птиц с антителами / # протестированных птиц	
		Log ₂ GMT*		День 24	День 42
		День 24	День 42		
3	VHVT509 2,160	3,3	4,7	9/10	10/10
4	Ложновакцинированные контроли заражения	2,0	N/A	0/10	N/A
5	VHVT522 2,560	3,5	7,5	9/10	10/10
6	vHVT523 2,360	2,9	6,8	6/10	9/9
7	VHVT509 2.160	3,8	6,0	9/10	10/10
8	Ложновакцинированные контроли заражения	2,0	N/A	0/10	N/A
9	VHVT522 2,560	3,6	5,3	10/10	10/10

10	VHVT523 2,360	2,8	6,0	6/10	9/9
11	VHVT509 2,160	4,2	5,2	10/10	10/10
12	Ложновакцинированные контроли заражения	2,0	N/A	0/10	N/A

*Предел обнаружения для теста HI составлял 8. Титры ниже 8 GMT (3 log₂ GMT) считались отрицательными и выражались как 4 GMT (2 log₂ GMT). Образцы тестировали против штамма вируса заражения для соответствующих групп (Группы 1–4 (Minnesota/12582), группы 5–8 с использованием [Egypt/N04915] и группы 9–12 с использованием [Hungary/53433]). Все протестированные образцы использовались в расчетах среднего GMT (отрицательным образцам было присвоено значение 4GMT (2 log₂ GMT) для целей расчета).

**Все зараженные птицы с ложной вакцинацией были либо мертвы, либо были подвергнуты эвтаназии из-за клинических признаков перед сбором образцов — образцы не были собраны на 42-й день для групп 4, 8 и 12.

В таблице ниже показано количество птиц с положительной реакцией на HPAIV и процент инфицирования по группам. Ни одна птица не была исключена из исследования.

Таблица 20

Группа	Материал заражения	Вакцина Доза	Путь/Объем	# птиц	# положительных/ общее # птиц	% защиты (% инфекции)
1	Minnesota/12582	vHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	10	0/10	100
2	Minnesota/12582	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	10	0/10	100
3	Minnesota/12582	VHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	10	0/10	100
4	Minnesota/12582	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	10	10/10	(100)
5	Egypt/N04915	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	10	0/10	100
6	Egypt/N04915	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	10	1/10	90
7	Egypt/N04915	vHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	10	0/10	100
8	Egypt/N04915	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	10	10/10	(100)
9	Hungary/53433	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	10	0/10	100
10	Hungary/53433	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	10	1/10	90
11	Hungary/53433	vHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	10	0/10	100
12	Hungary/53433	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	10	10/10	(100)

Частота клинических признаков, таких как тяжелая депрессия, признаки со стороны нервной или дыхательной системы и/или смерть, показана в следующей таблице.

Таблица 21

			# с признаком	Всего # Птиц
Клинический признак NEUROSGN	Группа	Вакцина_Доза		
	1	vH VT522 ~2500	0	10
	2	VHVT523 ~2500	0	10
	3	VHVT509 ~2500	0	10
	4	Ложновакцинированные контроли заражения	0	10
	5	vHVT522 ~2500	0	10
	6	vHVT523 ~2500	0	10
	7	VHVT509 ~2500	0	10
	8	Ложновакцинированные контроли заражения	0	10
	9	vHVT522 ~2500	0	10
	10	vHVT523 ~2500	0	10
	11	vHVT509 ~2500	0	10
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	1	10
	Всего			
DEPRESS	Группа	Вакцина_Доза		
	1	VHVT522 ~2500	0	10
	2	VHVT523~2500	0	10
	3	VHVT509 ~2500	0	10
	4	Ложновакцинированные контроли заражения	1	10
	5	VHVT522 ~2500	0	10
	6	VHVT523 ~2500	1	10
	7	VHVT509 ~2500	0	10
	8	Ложновакцинированные контроли заражения	1	10
	9	VHVT522 ~2500	0	10
	10	VHVT523 ~2500	0	10
	11	VHVT509 ~2500	0	10
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	1	10
	Всего			4

Таблица 21- Продолжение

			# с признаком	Всего # Птиц
RESPDIS	Группа	Вакцина Доза		
	1	VHVT522 ~2500	0	10
	2	VHVT523 ~2500	0	10
	3	VHVT509 ~2500	0	10
	4	Ложновакцинированные контроли заражения	1	10
	5	VHVT522 ~2500	0	10
	6	vH VT523 ~2500		10
	7	vHVT509 ~2500	0	10
	8	Ложновакцинированные контроли заражения	0	10
	9	vHVT522 ~2500	0	10
	10	vHVT523 ~2500	0	10
	11	vHVT509 ~2500	0	10
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	0	10
	Всего			2
OTHERCO	Группа	Вакцина Доза		
	1	vHVT522 ~2500	0	10
	2	VHVT523 ~2500	0	10
	3	vHVT509 ~2500	0	10
	4	Ложновакцинированные контроли заражения	0	10
	5	VHVT522 ~2500	0	10
	6	VHVT523 ~2500	0	10
	7	VHVT509 ~2500	0	10
	8	Ложновакцинированные контроли заражения	0	10
	9	VHVT522 ~2500	0	10
	10	VHVT523 ~2500	0	10
	11	VHVT509 ~2500	0	10
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	0	10
	Всего			0

В таблице ниже показана частота смертности по исследуемым группам.

Таблица 22

Группа	Материал для заражения	Вакцина Доза	Путь Объем	Количество животных	Подвернутых эвтаназии		Обнаружено мертвыми	
					N	%	N	%
1	Minnesota/12582	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	10	10	100,0	0	0
2	Minnesota/12562	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	10	10	100,0	0	0
3	Minnesota/12582	VHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	10	10	100 0	0	0
4	Minnesota/12582	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	10	1	10,0	9	90,0
5	Egypt/N04915	vHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	10	10	1000	0	0
6	Egypt/N04915	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	10	10	100 0	0	0
7	Egypt/N04915	VHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	10	10	100 0	0	0
8	Egypt/N04915	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	10	1	10,0	9	90,0
9	Hungary/53433	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	10	10	100,0	0	0
10	Hungary/53433	VHVI523 ~2500	п.к./0,2 мл	10	9	90,0	1	10,0
11	Hungary/53433	VHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	10	10	100,0	0	0
12	Hungary/53433	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	10	2	20,0	8	80,0

Результаты ПЦР/вирусовыделения по дневным исследовательским группам и ID животных в каждой исследовательской группе показаны в таблице ниже.

Таблица 23

Группа	Вакцина Доза	ID	ДЕНЬ	
			30	32
1	VHVT522 ~2500	221	Log10(EID50) 4,71	Log10(EID50) 4,93
		222	2,8	<=1,1
		223	3,62	5,07
		224	<=1,1	<=1,1
		225	<=1,1	<=1,1

		220	3,58	4,28
		227	<=1,1	<=1,1
		228	<=1,1	<=1,1
		229	4 05	1,46
		230	2,48	4,96
2	VHV1523 ~2500	231	3,92	5,21
		232	2,64	2,48
		233	1,18	<=1,1
		234	4,28	5,89
		235	278	<=1,1
		236	2,67	4,41
		237	4,48	4,88
		238	4,68	5,36
		239	<=1,1	<=1,1
		240	3,62	6,28
3	vHV 1509 ~2500	241	1,53	<=1,1
		242	<=1,1	1,2G
		243	2 28	<=1,1
		244	<=1,1	<=1,1
		245	<=1,1	<=1 1
		246	<=1,1	<=1,1
		247	352	1,14
		248	1,18	<=1,1
		249	<=1,1	<=1,1
		250	2,84	2,13
4	Ложновакцинированные контроли заражения	251	7,73	
		252	7,65	
		253	6,69	
		254	7,21	
		255	7,08	
		256	7,16	

Таблица 23 - Продолжение

			ДЕНЬ	
			30	32
Группа	Вакцина Доза	ID	Log10(EID5Q)	Log10(EIDS0)
		257	805	
		258	781	
		259	6,97	
		260	6,27	
5	VHVT522 ~2500	261	5,57	4,01
		202	4,49	4,02
		263	<= 1,7	<= 1,7
		264	<= 1,7	<= 1,7

		265	3,47	4,33
		266	3,4	4,29
		267	2,32	2,42
		268	<= 1,7	<= 1,7
		20 У	<= 1,7	<= 1,7
		270	3,49	4,09
6	vHVT523 ~2500	271	4,69	4,03
		272	3,87	4,71
		273	2,74	4,09
		274	3,61	4,02
		275	214	<= 1,7
		1276	3,05	5,2
		277	<= 1,7	<= 1,7
		278	4,66	5,4
		2	<= 1,7	<= 1,7
		280	2,2	1,93
7	vHVT509 ~2500	281	4 14	<=1,7
		282	3,32	4,12
		283	3,92	5,08
		284	3,16	<= 1,7
		285	<= 1,7	<= 1,7
		286	<= 1,7	<= 1,7
		287	<= 1,7	<= 1,7
		288	2,15	<= 1,7
		289	<= 1,7	<=1,7
		290	<= 1,7	<= 1,7
8	Ложновакцинированные контроли заражения	291	5,62	
		292	6,86	
		293	6,96	
		294	6,56	

Таблица 23 - Продолжение

			ДЕНЬ	
			30	32
Группа	Вакцина Доза	ID	Log10(EID50)	Log10(EID50)
		295	6,88	
		296	5,92	
		297	7,27	
		298	7,42	
		299	6,1	
		300	6,41	
9	VHVT522 ~2500	301	2,91	<= 1,4
		302	<= 1,4	<= 1,4

		303	2,42	<= 1,4
		304	<= 1,4	<= 1,4
		305	3,86	4,06
		306	<= 1,4	<= 1,4
		307	<= 1,4	<= 1,4
		308	<= 1,4	<= 1,4
		309	<= 1,4	<= 1,4
		310	<= 1,4	<= 1,4
10	VHVT523 ~2500	311	2,54	2,33
		312	<= 1,4	<= 1,4
		313	<= 1,4	2,04
		314	4,34	3,67
		315	<= 1,4	<= 1,4
		316	2,16	2,83
		317	5,2	5,17
		318	1,62	2,96
		319	3,34	1,58
		320	4,09	5,4
11	VHVT509 ~2500	321	<= 1,4	<= 1,4
		322	<= 1,4	<= 1,4
		323	<= 1,4	<= 1,4
		324	<= 1,4	<= 1,4
		325	<= 1,4	<= 1,4
		326	<= 1,4	<= 1,4
		327	<= 1,4	<= 1,4
		328	<= 1,4	<= 1,4
		329	<= 1,4	<= 1,4
		330	<= 1,4	2,52
12	Ложновакцинированные контроли заражения	331	3,04	
		332	6,66	

Таблица 23 - Продолжение

			ДЕНЬ	
			30	32
Группа	Вакцина Доза	ID	Log10(EID50)	Log10(EID50)
		333	7,10	
		334	6,71	
		335	5,7	
		336	6,6	
		337	5,54	
		338	6,03	
		339	6,95	
		340	6,01	

В таблице ниже приведены статистические данные наблюдаемых результатов ПЦР по исследовательским группам.

Таблица 24

			N	Сред.	Ст. о.	Мин	25 PCTL	Медиана	75 PCTL	Макс
День	Группа	Вакцина_Доза								
30	1	VHVT522 ~2500	10	2,5	1,4	10	1,0	2,6	3,6	4,7
	2	VHVT523 ~2500	10	3,1	1,3	1,0	2,6	3,2	4,3	4,7
	3	VHVT609 ~2500	10	1,6	0,9	1,0	1,0	1,1	2,3	3,5
	4	Ложновакцинированные контроли заражения	10	7,3	0,6	0,3	7,0	7,2	7,7	8,1
	5	VHVT622 ~25000	10	2,9	1,4	1,6	1,6	2,9	3,5	5,6
	6	VHVT523 ~2500	10	30	1,2	1,6	2,1	2,9	39	4,7
	7	VHVT509 ~2500	10	2,5	1,1	1,6	1,6	1,9	3,3	4,1
	8	Ложновакцинированные контроли заражения	10	6,6	0,6	5,6	6,1	6,7	7,0	7,4
	9	VHVT522 ~2500	10	1,8	0,9	1,3	1,3	1,3	2,4	3,4
	10	VHVT523 ~2500	10	2,8	1,4	1,3	1,3	2,7	4,1	5,2
	11	vHVT523 ~2500	10	1,3	0,0	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	10	6,0	1,2	3,0	5,7	6,3	6,7	7,2
32	1	VHVT622 ~2500	10	2,6	1,9	1,0	1,0	1,2	4,9	5,1
	2	VHVT523 ~2500	10	38	22	1,0	1,0	4,6	5,4	6,3
	3	VHVT609 ~2500	10	1,2	0,4	1,0	1,0	1,0	1,1	2,1
	5	VHVT522 ~2500	10	3,0	1,4	1,6	1,0	1,2	4,3	4,7
	6	VHVT523 ~2500	in	3,5	1,6	1,6	1,6	4,1	4,7	5,4
	7	VHVT609 ~2500	10	2,2	1,3	1,6	1,6	1,6	1,6	5,1
	9	VHVT522 ~2500	10	1,7	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	5,0
	10	VHVT623 ~2500	10	2,9	1,5	1,3	1,6	2,0	3,7	5,4
	11	VHVT509 ~2500	10	1,4	0,4	1,3	1,3	1,3	1,3	2,5
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	1	6,6		6,6	6,6	6,6	6,6	6,6

В таблице ниже показана частота положительных/отрицательных результатов ПЦР по дням и группам.

Таблица 25

День	Группа	вакцина_доза	Log10(EID50)				
			Количество Животных	Отрицательно		Положительно	
				N	%	N	%
30	1	VHVT522 ~2500	10	4	40,0	6	60,0
	2	VHVT523 ~2500	10	1	10,0	9	90,0
	3	VHVT509 ~2500	10	5	50,0	5	50,0
	4	Ложновакцинированные контроли заражения	10	0	0	10	100,0

	5	VHVT522 ~2500	10	4	40,0		60,0
	6	VHVT523 ~2500	10	2	20,0	8	80,0
	7	VHVT509 ~2500	10	5	50,0	5	50,0
	8	Ложновакцинированные контроли заражения	10	0	0	10	100,0
	9	VHVTG22 ~2500	10	7	70,0	3	30,0
	10	VHVT523 ~2500	10	3	30,0	7	70,0
	11	VHVT609 ~2500	10	10	100,0	0	0
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	10	0	0	10	100,0
32	1	VHVT622 ~2500	10	5	50,0	5	50,0
	2	VHVT623 ~2600	10	3	30,0	7	70,0
	3	VHVT509 ~2500	10	7	70,0	3	30,0
	5	VHVT622 ~2500	10	4	40,0	6	60,0
	6	VHVT523 ~2500	10	3	30,0	7	70,0
	7	VHVT509 ~2500	10	8	80,0	2	20,0
	9	VHVT522 ~2500	10	9	90,0	1	10,0
	10	VHVT523 ~2500	10	2	20,0	8	80,0
	11	VHVT609 ~2500	10	9	90,0	1	10,0
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	1	0	0	1	100,0

Предел обнаружения RT-PCR для контрольного заражения Minnesota/12582 составлял 1,1.

Предел обнаружения RT-PCR для контрольного заражения Hungary/53433 составлял 1,4.

Предел обнаружения RT-PCR для контрольного заражения Egypt/N04915 составлял 1,7.

Все образцы с титрами ниже предела обнаружения считали отрицательными. Для целей статистических расчетов всем отрицательным образцам было присвоено значение «0,1» меньше предела обнаружения.

В таблице ниже показаны результаты ингибирования гемагглютинации в исследуемых группах, зараженных Minnesota/12582, в разбивке по группам, ID животных и дням.

Таблица 26

			День			
			24		42	
Группа	Вакцина Доза	ID	Титр AIV	+/-	Титр AIV	+/-
1	VHVT522 ~2500	221	8	Положительный	128	Положительный
		222	6	Положительный	32	Положительный
		223	16	Положительный	16	Положительный

		224	32	Положительный	256	Положительный
		225	8	Положительный	16	Положительный
		226	8	Положительный	64	Положительный
		227	4	Отрицательный	32	Положительный
		228	4	Отрицательный	32	Положительный
		229	8	Положительный	256	Положительный
		230	16	Положительный	128	Положительный
2	vHVT523 ~2500	231	4	Отрицательный	128	Положительный
		232	4	Отрицательный	16	Положительный
		233	32	Положительный	64	Положительный
		234	4	Отрицательный	256	Положительный
		235	1	Отрицательный	37	Положительный
		236	4	Отрицательный	256	Положительный
		237	4	Отрицательный	128	Положительный
		238	4	Отрицательный	32	Положительный
		239	8	Положительный	16	Положительный
		240	e	Положительный	M2	Положительный
3	VHVI509 ~2500	241	8	Положительный	8	Положительный
		242	16	Положительный	37	Положительный
		243	8	Положительный	8	Положительный
		244	4	Отрицательный	37	Положительный
		245	32	Положительный	32	Положительный
		246	10	Положительный	64	Положительный
		247	8	Положительный	16	Положительный
		248	8	Положительный	32	Положительный
		249	8	Положительный	32	Положительный
		250	8	Положительный	64	Положительный
4	Ложновакцинированные контроли заражения	251	4	Отрицательный	-	-
		252	4	Отрицательный	-	-
		253	4	Отрицательный	-	-
		254	4	Отрицательный	-	-
		255	4	Отрицательный	-	-

Таблица 26 - Продолжение

		День					
		24			42		
Группа	Вакцина Доза	ID	Титр AIV	+ /-	Титр AIV	+ /-	
		256	4	Отрицательный	-	-	
		257	4	Отрицательный	-	-	
		258	4	Отрицательный	-	-	
		259	4	Отрицательный	-	-	
		260	4	Отрицательный	-	-	

Предел обнаружения для реакции ингибирования гемагглютинации – 8. Все образцы, указанные как «<8», являются отрицательными, и им было присвоено значение

«4» для расчета среднего геометрического титра.

В таблице ниже приведены расчеты среднего геометрического титра результатов ингибирования гемагглютинации Minnesota/12582 по дням и исследовательским группам.

Таблица 27

День	Группа	Вакцина Доза	Путь Объем	среднее геометрическое	Титр Log2
24	1	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	9,2	3,2
24	2	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	5,7	2,5
24	3	VHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	9,8	3,3
24	4	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	4,0	2,0
42	1	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	59,7	5,9
42	2	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	78,8	6,3
42	3	vHVI 509 - 2500	п.к./0,2 мл	26,0	4,7

В следующей таблице показана частота положительных результатов ингибирования гемагглютинации Minnesota/12582 по дням и исследуемым группам.

Таблица 28

DAY	Group	Вакцина Доза	Количество животных	НП			
				Отрицательный		Положительный	
				N	%	N	%
24	1	VHVT522 ~2500	10	2	20,0	8	80,0
	2	VHVT523 ~2500	10	7	70,0	3	30,0
	3	VHVT509 ~2500	10	1	10,0	9	90,0
	4	Ложновакцинированные контроли заражения	10	10	100,0	0	0
42	1	VHVT522 ~2500	10	0	0	10	100,0
	2	VHVT623 ~2500	10	0	0	10	100,0
	3	VHVT509 ~2500	10	0	0	10	100,0

Фиг. 58 показана гистограмма результатов ингибирования гемагглютинации на 24 и 42 дни для цыплят, зараженных Minnesota/12582.

В таблице ниже показаны результаты ингибирования гемагглютинации в исследуемых группах, зараженных Egypt/N04915, в разбивке по группам, ID животных и дням.

Таблица 29

			День			
			24		42	
Группа	Вакцина Доза	ID	Титр AIV	+ /-	Титр AIV	+ /-

5	VHVT522 ~2500	261	16	Положительный	128	Положительный
		262	8	Положительный	64	Положительный
		263	32	Положительный	128	Положительный
		264	8	Положительный	128	Положительный
		265	4	Отрицательный	256	Положительный
		266	16	Положительный	256	Положительный
		267	8	Положительный	256	Положительный
		268	8	Положительный	128	Положительный
		269	16	Положительный	256	Положительный
		270	16	Положительный	512	Положительный
6	VHVT523 ~2500	271	16	Положительный	256	Положительный
		272	8	Положительный	256	Положительный
		273	4	Отрицательный	256	Положительный
		274	4	Отрицательный	256	Положительный
		275	8	Положительный	256	Положительный
		276	8	Положительный	256	Положительный
		277	4	Отрицательный	16	Положительный
		278	4	Отрицательный	-	-
		279	16	Положительный	32	Положительный
		280	16	Положительный	16	Положительный
7	VHVT509 ~2500	281	32	Положительный	512	Положительный
		282	8	Положительный	64	Положительный
		283	8	Положительный	512	Положительный
		284	4	Отрицательный	8	Положительный
		285	32	Положительный	128	Положительный
		286	16	Положительный	16	Положительный
		287	32	Положительный	128	Положительный
		288	8	Положительный	16	Положительный
		289	16	Положительный	16	Положительный
		290	16	Положительный	128	Положительный
6	Ложновакцинированные контроли заражения	291	4	Отрицательный	-	-
		292	4	Отрицательный	-	-
		293	4	Отрицательный	-	-
		294	4	Отрицательный	-	-
		295	4	Отрицательный	-	-
		296	4	Отрицательный	-	-

Таблица 29 – Продолжение

		День				
		24			42	
Группа	Вакцина_Доза	ID	Титр AIV	+ /-	Титр AIV	+ /-
		297	4	Отрицательный	-	-
		298	4	Отрицательный	-	-

		299	4	Отрицательный	-	-
		300	4	Отрицательный	-	-

Предел обнаружения для реакции ингибирования гемагглютинации – 8. Все образцы, указанные как «<8», являются отрицательными, и им было присвоено значение «4» для расчета среднего геометрического титра.

В таблице ниже приведены расчеты среднего геометрического титра результатов ингибирования гемагглютинации Egypt/N04915 по дням и исследовательским группам.

Таблица 30

День	Группа	Вакцина доза	Путь Объем	Геометрическое среднее	Титр Log ₂
24	5	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	11,3	3,5
24	6	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	7,5	2,9
24	1	VHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	13,9	3,8
24	8	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	4,0	2,0
42	5	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	181,0	7,5
42	6	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	109,7	6,8
42	7	VHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	64,0	6,0

В таблице ниже показана частота положительных результатов ингибирования гемагглютинации Egypt/N04915 по дням и исследуемым группам.

Таблица 31

День	Группа	Вакцина Доза	Количество Животных	Н			
				Отрицательный		Положительный	
				N	%	N	%
24	5	VHVT622 ~2500	10	1	10,0	9	90,0
	6	VHVT523 ~2500	10	4	40,0	6	60,0
	7	VHVT609 ~2500	10	1	10,0	9	40,0
	8	Ложновакцинированные контроли заражения	10	10	100,0	0	0
42	5	VHVT522 ~2500	10	0	0	10	100,0
	6	VHVT523 ~2500	9	0	0	9	100,0
	7	VHVT509 ~2500	10	0	0	10	100,0

На фиг. 59 показана гистограмма результатов ингибирования гемагглютинации на 24 и 42 день для цыплят, зараженных Egypt/N04915.

В таблице ниже показаны результаты ингибирования гемагглютинации в исследуемых группах, зараженных Hungary/53433, в разбивке по группам, ID животных и дням.

Таблица 32

			День			
			24		42	
Группа	Вакцина_Доза	ID	Титр AIV	+ /-	Титр AIV	+ /-
0	VHVT522 ~2500	301	8	Положительный	16	Положительный
		302	16	Положительный	64	Положительный
		303	16	Положительный	256	Положительный
		304	8	Положительный	64	Положительный
		305	16	Положительный	64	Положительный
		306	16	Положительный	32	Положительный
		307	32	Положительный	32	Положительный
		308	8	Положительный	16	Положительный
		309	8	Положительный	32	Положительный
		310	8	Положительный	16	Положительный
10	VHVT523 ~2500	311	8	Положительный	16	Положительный
		312	16	Положительный	32	Положительный
		313	8	Положительный	64	Положительный
		314	4	Отрицательный	512	Положительный
		315	8	Положительный	8	Положительный
		316	4	Отрицательный	256	Положительный
		317	16	Положительный	128	Положительный
		318	8	Положительный	16	Положительный
		319	4	Отрицательный	256	Положительный
		320	4	Отрицательный	-	-
111	VHVT509 ~2500	321	32	Положительный	128	Положительный
		322	32	Положительный	32	Положительный
		323	16	Положительный	16	Положительный
		324	64	Положительный	64	Положительный
		325	16	Положительный	16	Положительный
		326	8	Положительный	32	Положительный
		327	16	Положительный	64	Положительный
		328	16	Положительный	64	Положительный
		329	16	Положительный	64	Положительный
		330	8	Положительный	8	Положительный
12	Ложновакцинированные контроли заражения	331	4	Отрицательный	-	-
		332	4	Отрицательный	-	-
		333	4	Отрицательный	-	-
		334	4	Отрицательный	-	-
		335	4	Отрицательный	-	-
		336	4	Отрицательный	-	-

Таблица 32 – Продолжение

			День			
			24		42	
Группа	Вакцина_Доза	ID	Титр AIV	+ /-	Титр AIV	+ /-
		337	4	Отрицательный	-	-
		338	4	Отрицательный	-	-
		339	4	Отрицательный	-	-
		340	4	Отрицательный	-	-

Предел обнаружения для реакции ингибирования гемагглютинации – 8. Все образцы, указанные как «<8», являются отрицательными, и им было присвоено значение «4» для расчета среднего геометрического титра.

В таблице ниже приведены расчеты среднего геометрического титра результатов ингибирования гемагглютинации Hungary/53433 по дням и исследовательским группам.

Таблица 33

День	Группа	Вакцина_доза	Путь объем	Геометрическое среднее	Титр Log2
24	9	vIVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	12,1	3,6
24	10	VHVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	7,0	2,8
24	11	vHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	18,4	4,2
24	12	Ложновакцинированные контроли заражения	п.к./0,2 мл	4,0	2,0
42	9	VHVT522 ~2500	п.к./0,2 мл	39,4	5,3
42	10	VMVT523 ~2500	п.к./0,2 мл	64,0	6,0
42	11	vHVT509 ~2500	п.к./0,2 мл	36,8	5,2

В таблице ниже показана частота положительных по Hungary/53433 результатов ингибирования гемагглютинации по дням и исследуемым группам.

Таблица 34

			НИ				
			Количество животных	Отрицательный		Положительный	
				N	%	N	%
День	Группа	Вакцина_доза					
24	9	VHVT522 ~2500	10		0	10	100,0
	10	VHVT523 ~2500	10	4	40,0	6	60,0
	11	VHVT509 ~2500	10	0	0	10	100,0
	12	Ложновакцинированные контроли заражения	10	10	100,0	0	0

42	9	VHVT522 ~2500	10	0	0	10	100,0
	10	VHVT523 ~2500	9		0	9	100,0
	11	VHVT509 ~2500	10	0	0	10	100,0

Фиг. 60 показана гистограмма результатов ингибирования гемагглютинации на 24 и 42 день для цыплят, зараженных Hungary/53433.

В таблице ниже показаны результаты экспериментов по вирусовыделению в зависимости от контрольного материала, дозы вакцины и дня исследования. Образцы мазков из ротоглотки собирали на 30 и 32 дни исследования. Титр выделения (Log10/мл) измеряли с помощью RT-PCR. Положительный результат мазка для каждой птицы определяли как один или несколько случаев положительного результата RT-PCR после контрольного заражения у каждой птицы. Отрицательные образцы считались ниже предела обнаружения, установленного для каждого вируса. Гистограммы результатов выделения на 30 и 32 дни исследования показаны на фиг. 51 и фиг. 52, соответственно.

Таблица 35

Материал для заражения	Вакцина_Доза	ДЕНЬ	Количество птиц	Количество вирусовыделения	Процент вирусовыделения
Egypt/N04015	Ложновакцинированные контроли заражения	30	10	10	100,0
Egypt/N04015	vHVT509 ~2500	30	10	5	50,0
Egypt/N04015	vHVT509 ~2500	32	10	2	20,0
Egypt/N04015	vHVT522 ~2500	30	10	6	60,0
Egypt/N04015	vHVT522 ~2500	32	10	6	60,0
Egypt/N04015	vHVT523 ~2500	30	10	8	80,0
Egypt/N04015	vHVT523 ~2500	32	10	7	70,0
Hungary/53433	Ложновакцинированные контроли заражения	30	10	10	100,0
Hungary/53433	Ложновакцинированные контроли заражения	32	1	1	100,0
Hungary/53433	vHVT509 ~2500	30	10	0	0,0
Hungary/53433	vHVT509 ~2500	32	10	1	10,0
Hungary/53433	vHVT522 ~2500	30	10	3	30,0
Hungary/53433	vHVT522 ~2500	32	10	1	10,0
Hungary/53433	vHVT523 ~2500	30	10	7	70,0
Hungary/53433	vHVT523 ~2500	32	10	8	80,0
Minnesota/12582	Ложновакцинированные контроли заражения	30	10	10	100,0
Minnesota/12582	VHVT509 ~2500	30	10	5	50,0
Minnesota/12582	vHVT509 ~2500	32	10	3	30,0
Minnesota/12582	vHVT522 ~2500	30	10	6	60,0
Minnesota/12582	vHVT522 ~2500	32	10	5	50,0
Minnesota/12582	vHVT523 ~2500	30	10	9	90,0
Minnesota/12582	vHVT523 ~2500	32	10	7	70,0

В таблице ниже представлены предполагаемые различия \log_{10} на 30 день исследования между обработанными группами (1, 2 и 3) и контрольной группой 4, которым вводили Minnesota/12582.

Таблица 36

Метка	Предполагаемое различие	Нижний ДИ для различия	Верхний ДИ для различия
Группа: 1 vs 4	-4,7380	-5,7465	-3,7295
Группа: 2 vs 4	-4,1370	-5,1455	-3,1285
Группа: 3 vs 4	-5,6270	-6,6355	-4,6185

Поскольку 95% доверительные интервалы для средних различий \log_{10} титров между обработанными группами (1, 2 и 3) и группой 4 не содержат 0, средние титры для экспериментальных групп (1, 2 и 3) значительно меньше, чем средний титр для группы 4.

В таблице ниже представлены предполагаемые различия \log_{10} на 30 день исследования между обработанными группами (5, 6 и 7) и контрольной группой 8, которые были заражены Egypt/N04915.

Таблица 37

Метка	Предполагаемое различие	Нижний ДИ для различия	Верхний ДИ для различия
Группа: 5 vs 8	-3,6860	-4,6757	-2,6963
Группа: 6 vs 8	-3,5840	-4,5737	-2,5943
Группа: 7 vs 8	-4,1310	-5,1207	-3,1413

Поскольку 95% доверительные интервалы для средних различий \log_{10} титров между обработанными группами (5, 6 и 7) и группой 8 не содержат 0, средние титры для экспериментальных групп (5, 6 и 7) значительно меньше, чем средний титр для группы 8.

В таблице ниже представлены предполагаемые различия \log_{10} на 30 день исследования между обработанными группами (9, 10 и 11) и контрольной группой 12, которые были заражены Hungary/53433.

Таблица 38

Метка	Предполагаемое различие	Нижний ДИ для различия	Верхний ДИ для различия
Группа: 9 vs 12	-4,2110	-5,1489	-3,2731
Группа: 10 vs 12	-3,2610	-4,1989	-2,3231

Группа: 11 vs 12	-4,7400	-5,6779	-3,8021
---------------------	---------	---------	---------

Поскольку 95% доверительные интервалы для средних различий log₁₀ титров между обработанными группами (9, 10 и 11) и группой 12 не содержат 0, средние титры для экспериментальных групп (9, 10 и 11) значительно меньше, чем средний титр для группы 12.

Выводы. В условиях этого испытания все протестированные конструкции были способны обеспечить необходимую клиническую защиту от клинических признаков и смертности; все протестированные кандидаты также смогли значительно снизить среднее вирусывыделение на 30 и 32 день; с общим лучшим снижением (средний титр и количество вирусывыделяющих птиц) для всех протестированных контрольных штаммов у птиц, вакцинированных конструкциями vHVT509, а затем vHVT522. Уровни антител и количество птиц, положительных при предварительном заражении HI, были сходными между vHVT522 и vHVT509; и несколько более низкие уровни наблюдались с vHVT523. Все протестированные конструкции обеспечивают необходимую клиническую защиту, снижение вирусывыделения и адекватные уровни HI до вакцинации. На основании клинической защиты, выделения и уровней антител конструкции с лучшими общими результатами были vHVT509, за которыми следуют vHVT522 и vHVT523.

Пример 5. Эффективность птичьего гриппа-бурсальной болезни-болезни Марека, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-AI-IBDV) при заражении вирусами инфекционной бурсальной болезни, штаммами STC Classic и Variant-E

Целью данного исследования является оценка иммуногенности vHVT522-AI-IBDV при заражении вирусом инфекционной бурсальной болезни (штаммы STC и VAR-E).

Первичной исследуемой переменной является влияние вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV) на наблюдение макроскопических поражений (STC) или соотношения массы тела (В/В wt.) (VAR-E). Для целей данного исследования макроскопические поражения включают перибурсальный отек, и/или отек, и/или макроскопические кровоизлияния в ткань бурсы. Любая птица с указанными повреждениями была зарегистрирована как положительная.

Тестовая вакцина, использованная в исследовании, была следующей.

Таблица 39

Настоящее имя продукта	Птичий грипп-бурсальная болезнь-болезнь Марека, серотип 3, живой вектор болезни Марека [vHVT522-AI-IBDV]
Состав	Вакцину разбавляли до целевой дозы ~2500 БОЕ/0,2 мл.
Изготовитель	Merial Inc. (US Veterinary Biologics Est. 298)
Условия хранения	Жидкий азот
Применяемая доза и путь	0,2 мл на птицу, вводится подкожно (п/к)

Материал для заражения, использованный в исследовании, был следующим.

Таблица 40

Научное название	1. Вирус инфекционной бурсальной болезни (IBDV)
Штамм/отношение к тестируемой вакцине	1a. IBDV Classical-STC 1b. IBDV Variant-E
Источник материала	1a. Merial, Inc. (STC) 1b. University of Delaware (VAR-E)
Условия хранения	-70 °C
Применяемая доза	1a. 0,03 мл на птицу внутриглазным путем ($\sim 10^{2,0}$ EID ₅₀ /дозу) 1b. 0.03 мл на птицу внутриглазным путем (IO) ($\sim 10^{3,0}$ EID ₅₀ /дозу)
Путь введения	внутриглазным путем (IO)

Животные, использованные в исследовании, были следующими.

Таблица 41

Вид	<i>Gallus domesticus</i>
Штамм/Порода	SPF-цыплята
Источник	SPAFAS
Пол	Самка/самец
Масса	N/A
Возраст	100 однодневных цыплят
Количество	100 однодневных цыплят
Физиологический статус	Здоровый и проворный
Критерии включения	Все птицы выглядят здоровыми и проворными
Кондиционирование/а климатизация	N/A
Серологический статус	N/A
Критерий исключения	Животные, ослабленные, страдающие заболеванием или травмой, беспокойные или иным образом непригодные для включения в исследование, по мнению исследователя, исключались из исследования.
Идентификация животных	Птиц идентифицировали в соответствии с размещением по блокам и по пронумерованным лентам.
Критерии исключения из исследования	После включения в исследование животных, ослабленных, страдающих заболеванием или травмой, беспокойных или иным образом непригодных для пребывания в исследовании, по мнению исследователя, удаляли.

Сто (100) однодневных цыплят SPF из стада C17 SPAFAS были отнесены к Группам 1-5. На один изоляционный блок приходилось по 20 птиц. Все птицы были вакцинированы или ложновакцинированы. Группы 1-2 были вакцинированы птичьим гриппом-бурсальной болезнью-болезнью Марека, серотипом 3, живым вектором болезни Марека, vHVT-522 IBD-AI (P3) #6, лот 11-May-2018 АК, в количестве 2050 БОЕ HVT/0,2 мл дозу. Группы 3-5 инокулировали только разбавителем Марека DJ612, срок годности 20

января.

Таблица 42

группа	Вакцина БОЕ/дозу*	Путь/Объем (мл)	Количество размещенных птиц	Количество зараженных птиц*	Заражение
1	vHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	0,2 мл/п.к.	20	~20	IBDV STC
2	vHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	0,2 мл/п.к.	20	~20	IBDV VAR-E
3	Ложновакцинирован ные/ IBDV STC Контроли заражения	0,2 мл/п.к.	20	~20	IBDV STC
4	Ложновакцинирован ные/ IBDV VAR-E Контроли заражения	0,2 мл/п.к.	20	~20	IBDV VAR-E
5	Ложновакциниро- ванные, ложнозараженные (Отрицательные контроли)	0,2 мл/п.к.	20	~20	Ложнозараженные

*В каждой группе заражали до 20 птиц в зависимости от ранней смертности.

Все животные содержались одинаково. Птиц содержали в изоляторах с отрицательным давлением на время испытания. Воду и корм давали *ad libitum*.

За птицами, зараженными STC, наблюдали в течение 4 дней после заражения. В конце периода наблюдения (32 день исследования) птиц подвергали вскрытию и исследовали на наличие макроскопических поражений IBDV STC.

Для целей этого теста в отношении STC макроскопические поражения должны включать перибурсальный отек, и/или отек, и/или макроскопические кровоизлияния в ткани бурсы. Любая птица с указанными повреждениями была зарегистрирована как положительная.

Остальных птиц, зараженных VAR-E и ложнозараженных, наблюдали в течение 11 дней после заражения. В конце периода наблюдения (39 день исследования) птиц умерщвляли и определяли пол, массу тела и массу бурсы.

Для целей этого теста в отношении VAR-E уменьшенный размер (атрофия) на основе соотношения В/В wt. было соблюдено.

В день 0 птиц вакцинировали или ложновакцинировали п.к. путем перед тем, как их поместили в изоляционные блоки с отрицательным давлением. Вакцины разбавляли разбавителем вакцины против болезни Марека соответственно для введения целевых доз.

На 13 день исследования всем оставшимся птицам помечали с помощью ленты на шее для индивидуальной идентификации.

На 21 день исследования птиц из групп 1 и 3 заражали IBDV-STC, EP-1 Lot 080116, в дозе 101,8 EID50/0,03 мл.

На 25 день исследования всех оставшихся птиц, зараженных IBDV-STC (группы 1 и 3), подвергали эвтаназии и проводили вскрытие для исследования обширных поражений бурсы.

На 28 день исследования всех птиц заражали Var-E IBDV 1084-E CP2 3-14-95 Lot 031495 в дозе 102,9 EID50/0,03 мл, или заражали ложно.

На 39 день исследования у всех птиц, оставшихся в группах 2, 4 и 5, определяли пол, массу тела и массу бурсы.

Результаты

Количество птиц с положительным тестом на бурсальную болезнь после заражения IBDV-STC показано в таблице ниже.

Таблица 43

Группа	Вакцина Доза/ Фактическая доза	Заражение	# птиц	# положительных/ общему # птиц	% защиты (% инфекции)
1	vHVT522-AI-IBDV 2050 БОЕ/дозу	IBDV-STC	20	0/20	100
3	Ложновакцинированные VIBDV STC контроли заражения	IBDV-STC	20	18/20	(90)

Среднее значение соотношений В/В wt. по исследуемым группам после заражения IVDB VAR-E или ложновакцинированных и ложнозараженных показаны в таблице ниже.

Таблица 44

Группа	Вакцина / Фактическая доза	Заражение	# птиц	Средняя масса бурсы (г)	Средняя масса тела (г)	Среднее соотношение В/ВW
2	VHVT522-A1-IBDV 2050 БОЕ/0.2 мл дозу	IBDV VAR-E	19	1,39	384,05	0,36
4	Ложновакцинированные/ IBDV VAR-E контроли заражения	IBDV VAR-E	19	0,45	374,47	0,12
5	Ложновакцинированные, ложнозараженные (Отрицательные контроли)	ложнозараженные	20	2,27	435,20	0,52

Массы тела

Массу тела и бурсальную массу собирали, и соотношение В/В wt. (соотношение массы бурсы/массы тела x 100) рассчитывали для каждой птицы. Сводная статистика по соотношениям В/В wt. показаны в таблице ниже.

Таблица 45

Группа	Вакцина фактически БОЕ/дозу	N	Средн.	Ст.откл.	Мин.	Q ₁	Медиана	Q ₃	Макс
2	vHVT522-AI-IBDV 2050 БОЕ/0,2 мл дозу	19	0,36	0,17	0,09	0,22	0,29	0,56	0,62
4	Ложновакцинированные/ IBDV VAR-E контроли заражения	19	0,12	0,03	0,08	0,09	0,12	0,14	0,18
5	Sham- Ложновакцинированные, ложнозараженные (Отрицательные контроли)	20	0,52	0,15	0,30	0,44	0,50	0,57	1,07

P-значения были скорректированы для множественных сравнений с использованием метода Тьюки-Крамера, и их можно наблюдать при попарных групповых сравнениях.

В таблице ниже показаны p-значения и скорректированные p-значения парных сравнений отношения бурсы к массе тела и парных сравнений отношения бурсы к массе тела по полу среди групп.

Таблица 46

		Пол				
		F			M	
Сравнение групп	p-значение	Скорректированное p-значение	p-значение	Скорректированное p-значение	p-значение	Скорректированное p-значение
2vs.4	<,0001	<0001	<,0001	<,0001	0,0073	0,0747
4 vs. 5	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

В таблице ниже показаны птицы, которые были исключены из исследования, по идентификатору животного и группе исследования. Днем исследования 0 был 23 августа 2018 года.

Таблица 47

ID	Группа	Вакцина/Целевая доза	Заражение	Блок	Дата смерти	Причина смерти	День исследования
21	4	Ложновакцинированные/ IBDV VAR-E контроли заражения	IBDV VAR-E	14	31AUG2018	эвтаназия	8
61	2	vHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	IBDV VAR-E	16	30AUG2018	эвтаназия	7

В таблице ниже показаны данные о смертности животных в исследовании по

идентификатору животного и группе исследования. Днем исследования 0 был 23 августа 2018 года.

Таблица 48

ID	Группа	Вакцина/Целевая доза	Заражение	Блок	Дата смерти	Причина смерти	День исследования	Исключено
47	3	Ложновакцинированные/ IBDV STC контроли заражения	IBOV-STC	15	17SEP2018	Эвтанизия	25	Нет
49	3	Ложновакцинированные /IBDV STC контроли заражения	IBDV-STC	15	17SEP2018	Эвтанизия	25	Нет
69	3	Ложновакцинированные /IBDV STC контроли заражения	IBDV-STC	15	17SEP2018	Эвтанизия	25	Нет

В таблице ниже показано количество птиц с положительными показателями бурсальной болезни и процент положительных результатов по исследуемым группам. У одного животного в группе 3 наблюдали депрессию после заражения IBDV-STC.

Таблица 49

Группа	Вакцина/Целевая Доза	Заражение	# птиц	# положительных/ общему # птиц	% защиты (% инфекции)
1	vHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	IBDV-STC	20	0/20	100
3	Ложновакцинированные /IBDV STC контроли заражения	IBDV-STC	20	18/20	(90)

Частота наблюдаемых макроскопических поражений показана в следующей таблице.

Таблица 50

			# с признаками	Всего # Птиц
Макроскопическое поражение	Группа	Вакцина/Целевая доза		
Перибурсальный отек	1	VHVT522-AHBDV 2.500 pfu	0	20
	3	Ложновакцинированные /IBDV STC контроли заражения	~13	20
	Всего		13	40
ОТЕК	Группа	Вакцина/Целевая доза		
	1	VHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	0	20
	3	Ложновакцинированные /IBDV STC контроли заражения	4	20
	Всего		4	40

NVL	Группа	Вакцина/Целевая доза		
	1	VHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	20	20
	3	Ложновакцинированные /IBDV STC контроли заражения	2	20
	Всего		22	40
Макроскопическое кровоизлияние	Группа	Вакцина/Целевая доза		
	1	VHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	С	20
	3	Ложновакцинированные /IBDV STC контроли заражения	I	20
	Всего		1	40
Другие макроскопические поражения	Группа	Вакцина/Целевая доза		
	1	VHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	0	20
	3	Ложновакцинированные /IBDV STC контроли заражения	1	20
	Всего		1	40

В таблице ниже показано наблюдаемое отношение массы бурсы к массе тела (В/BW) по группам и идентификаторам животных у животных, зараженных IBDV VAR-E, и животных, подвергнутых ложному заражению.

Таблица 51

				Масса бурсы (г)	Масса тела (г)	Соотношение В/BW
Группа	Вакцина/Целевая доза	Заражение	ID			
2	vHVT522-AI-IBDV 2500 БОЕ	IBDV VAR-E	62	1,16	398,00	0,29
			63	2,11	375,00	0,56
			64	1,56	376,00	0,41
			65	1,01	391,00	0,26
			66	0,55	369,00	0,15
			67	0,80	392,00	0,20
			68	1,08	384,00	0,28
			69	0,31	336,00	0,09
			70	0,82	373,00	0,22
			71	1,02	454,00	0,22
			72	1,52	402,00	0,38
			73	2,30	418,00	0,55
			74	2,28	388,00	0,59
			75	0,80	353,00	0,23
			76	2,38	403,00	0,59
			77	1,83	408,00	0,45
			78	0,75	377,00	0,20
			79	2,06	360,00	0,57
			80	2,10	340,00	0,62

Таблица 51 – Продолжение

			Масса бурсы (г)	Масса тела (г)	Соотношение В/BW
4	Ложновакцинированные IBDV VAR-E контроли заражения	IBDV VAR- E	22 0,32	386,00	0,08
			23 0,36	397,00	0,09
			24 0,48	369,00	0,13
			26 0,20	220,00	0,09
			26 0,25	264,00	0,09
			27 0,42	323,00	0,13
			28 0,50	362,00	0,14
			29 0,35	346,00	0,10
			30 0,42	479,00	0,09
			31 0,43	484,00	0,09
			32 0,65	463,00	0,14
			33 0,54	435,00	0,12
			34 0,51	380,00	0,13
			35 0,55	451,00	0,12
			36 0,63	383,00	0,16
			37 0,70	384,00	0,18
			38 0,46	269,00	0,17
			39 0,40	353,00	0,11
			40 0,46	367,00	0,13
6	Ложное вакцинирование, ложное заражение (Отрицательные контроли)	Ложное заражение	1 2,04	434,00	0,47
			2 1,82	455,00	0,40
			3 1,58	377,00	0,42
			4 2,30	429,00	0,54
			6 2,84	494 00	0,57
			6 2,16	418,00	0 52
			7 2,72	464,00	0,59
			8 1,97	445,00	0,44
			9 2,09	438,00	0,48
			10 2,44	400,00	0,61
			11 1,83	426,00	0,43
			12 1,43	471,00	0,30
			13 2,55	446,00	0,5
			14 2,48	508,00	0,49
			16 1,57	408,00	0,38
			16 2,53	446 00	0,57
			17 2,86	472,00	0,61
			18 2,15	458,00	0,47
			19 1,65	305,00	0,54
			20 4,39	410,00	1,07

Коробчатые диаграммы соотношений массы бурсы к массе тела по группам, по полу и по группам показаны на фиг. 53 и фиг. 54, соответственно.

В таблице ниже показаны наблюдаемые средние отношения В/ВW по группам.

Таблица 52

			# птиц	Средняя масса бурсы (г)	Средняя масса тела (г)	Соотно- шение средних ВW
Группа	Вакцина/целевая доза	Заражение				
2	VHVT522-AM8DV 2500 БОЕ	IBDV VAR-E	19	1,39	384,05	0,36
4	Ложное вакцинирование /IBDV VAR-E контроли заражения	IBDV VAR-E	19	0,45	374,47	0,12
6	Ложное вакцинирование, ложное заражение (Отрицательные контроли)	Ложное заражение	20	2,27	435,20	0,52

Сводная статистика по соотношениям В/В wt. приведены в таблице ниже.

Таблица 53

		N	Среднее	Ст. Откл.	Мин	Q1	Медиана	Q3	Макс
Группа	Вакцина/Целевая доза								
2	VHVT522-AMBDV 2500 БОЕ	19	0,36	0,17	0,09	0,22	0,29	0,56	0,62
4	Ложное вакцинирование /IBDV VAR-E контроли заражения	19	0,12	0,03	0,08	0,09	0,12	0,14	0,18
5	Ложное вакцинирование, ложное заражение (Отрицательные контроли)	20	0,52	0,15	0,30	0,44	0,50	0,57	1,07

Соотношения В/В wt. были смоделированы с использованием линейной модели, где группа, пол и группа по полу использовались в качестве фиксированных эффектов для групп 2, 4 и 5. Р-значения фиксированных эффектов приведены в таблице ниже.

Таблица 54

Тип 3 Тесты фиксированных эффектов				
Эффект	Num DF	Den DF	F-значение	Pr>F
Группа	2	52	42,96	<,0001
ПОЛ	1	52	2,86	0,0969
Группа*ПОЛ	2	52	0,83	0,4407

Средние наименьших квадратов (LSMeans) для соотношений В/В wt. по группам и LSMeans по полу и группам представлены в таблице ниже.

Таблица 55

		Пол	
		F	M
Группа	LSM ± StdErr	LSM ± StdErr	LSM ± StdErr
2	0,36 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,3 ± 0,04
4	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,05
5	0,52 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,49 ± 0,04

Результаты групповых сравнений и групповых сравнений по полу представлены в таблице ниже. Р-значения были скорректированы для множественных сравнений с использованием способа Тьюки-Крамера.

Таблица 56

			Пол			
			F		M	
Сравнение групп	р-значение	Скорректированное р-значение	р-значение	Скорректированное р-значение	р-значение	Скорректированное р-значение
2 с 4	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0073	0.0747
2 с 5	0.0004	0.0012	0.0203	0.1774	0.0053	0.0564
4 с 5	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Выводы. В условиях этого испытания птичий грипп-бурсальная болезнь-болезнь Марека, серотип 3, живой вектор болезни Марека (vHVT522-AI-IBDV) смогли обеспечить необходимую защиту от заражения IBDV-STC через 21 день после вакцинации. Защита от IBDV-VarE также наблюдалась по статистически значимым различиям между средними значениями соотношений В/В wt. по сравнению со средним значением соотношений В/В wt. ложновакцинированных зараженных птиц (контроли, зараженные VAR-E). Также была статистически значимая разница между средним значением соотношений В/В wt. зараженных контролей по сравнению со средними значениями соотношений В/В wt. отрицательных контролей.

Пример 6 Эффективность птичьего гриппа-болезни Ньюкасла-болезни Марека, серотип 3, живого вектора болезни Марека (vHVT523-AI-NDV) при заражении вирусом болезни Ньюкасла, GB Texas

Цель этого исследования заключалась в оценке эффективности vHVT523-AI-NDV у суточных птиц после заражения вирусом болезни Ньюкасла.

Первичной исследуемой переменной было развитие клинических признаков вируса болезни Ньюкасла (NDV), включая смертность.

Тестируемая вакцина была следующей.

Таблица 57

Настоящее название продукта	Птичий грипп-болезнь Ньюкасла-болезнь Марека, серотип 3, живой вектор болезни Марека [vHVT523-AI-NDV]
Состав	~2500 БОЕ/дозу 0,2 мл
производитель	Merial Inc. (US Veterinary Biologics Est. 298)
Требования к хранению	Жидкий азот
Применяемая доза и путь	0.2 мл на дозу для п.к. пути введения

Материал для заражения для этого исследования был следующим.

Таблица 58

Научное название	Вирус болезни Ньюкасла
Штамм/связь с тестируемой вакциной	GB Texas
Источник материала	USDA CVB-L
Номера лота или серийные номера	061303
Процедура заражения	Развести в TPB
Требования к хранению	-70 C°
Применяемая доза	~104,0 EID50/0,1 мл-доза
Путь введения	0,1 мл на птицу внутримышечно (в.м.)

Животные, использованные в этом исследовании, были следующими.

Таблица 59

Вид	<i>Gallus domesticus</i>
Штамм/Порода	SPF-цыплята
Источник	SPAFAS
Пол	Самка/самец
Масса	N/A
Возраст	100 однодневных цыплят
Количество	40 однодневных цыплят
Физиологический статус	Здоровый и проворный
Критерии включения	Все птицы выглядят здоровыми и проворными
Кондиционирование/акклиматизация	N/A
Серологический статус	N/A
Критерий исключения	Животные, ослабленные, страдающие заболеванием или травмой, беспокойные или иным образом непригодные для включения в исследование, по мнению исследователя, исключались из исследования.
Идентификация животных	Птиц идентифицировали в соответствии с размещением по блокам и по пронумерованным лентам.
Критерии исключения из исследования	После включения в исследование животных, ослабленных, страдающих заболеванием или травмой, беспокойных или иным образом непригодных для пребывания в исследовании, по мнению исследователя, удаляли.

Сорок (40) дневных цыплят SPF, стадо SPAFAS W67, были распределены по группам 1 или 2 в соответствии с таблицей ниже. Десять (10) птиц были распределены на один изоляционный блок (2 единицы на группу). Птиц вакцинировали или ложновакцинировали. Группа 1 была вакцинирована птичьим гриппом-болезнью Ньюкасла-болезнью Марека, серотип 3, живым вектором болезни Марека (vHVT523-AI-NDV), (P3 #1), 11-Мая-2018 АК, в дозе 2390 БОЕ HVT/0,2 мл; и группа 2 была ложновакцинирована только разбавителем Marek, лот DJ612, срок годности 20 ЯНВАРЯ.

Таблица 60

группа	Вакцина / Целевая доза	Путь/Объем	# вакцинирован ных птиц	# зараженных птиц*
1	vHVT523-AI-NDV 2500 БОЕ/дозу	п.к. / 0,2 мл	20	~20
2	Ложновакцинированные/ Контроль заражения	п.к. / 0,2 мл	20	~20

Все животные содержались одинаково. Птиц содержали в изоляторах с отрицательным давлением на время испытания. Воду и корм давали *ad libitum*.

У всех птиц наблюдали клинические признаки болезни Ньюкасла, включая симптомы со стороны центральной нервной системы или органов дыхания, и/или смерть в течение 14 дней после заражения. По окончании периода наблюдения выживших уничтожали.

Хронология исследования представлена в таблице ниже.

Таблица 61

День исследования или диапазон	Активность
День 0	Сорок (40) однодневных SPF-цыплят были распределены в Группы 1 и 2. Десять (10) птиц были распределены на один изоляционный блок (2 единицы на группу). Птиц вакцинировали или ложновакцинировали п.к. путем перед тем, как их поместили в изоляционные блоки. Всех птиц помечали с помощью ленты на шее для индивидуальной идентификации перед заражением.
День 28	Всех оставшихся птиц заражали NDV Texas GB внутримышечно (в.м.) по 0,1 мл на птицу.
Дни 28-42	Птиц ежедневно осматривали на наличие любых неблагоприятных реакций на заражение, особенно нервные или респираторные клинические признаки, включая гибель.
День 42	Все оставшиеся птицы были умерщвлены.

Результаты

В таблице ниже показано количество птиц с положительным результатом на NDV и процент положительных результатов по исследуемым группам.

Таблица 62

Группа	Вакцина / Фактическая доза	Путь/ Объем	# птиц	# положительных/ общему # птиц	% Защиты (% инфекции)
1	VHVT523-AI-NDV 2390 БОЕ/дозу	п.к./0.2 мл	20	0/20	100
2	Ложновакцинированные/ контроль заражения	п.к./0.2 мл	20	20/20	(100)

Частота положительных по NDV на изоляционный блок показана в таблице ниже.

Таблица 63

			Результат NDV	
			# положительных	Общее # Птиц
Группа	Вакцина	Блок	0	10
1	VHVT523-AI-NDV 2500 БОЕ/дозу	89		
		90	0	10
		Всего	0	20
2	Ложновакцинированные/ контроль заражения	Блок	10	10
		91		
		92	10	10
		Всего	20	20

Выводы: В условиях этого испытания птичий грипп-болезнь Ньюкасла-болезнь Марека, серотип 3, живой вектор болезни Марека (vHVT523-AI-NDV) соответствовали критериям приемлемости, защищая $\geq 95\%$ птиц от заражения вирулентным вирусом болезнь Ньюкасла Texas GB. Вирулентность контрольного вируса наблюдали по инфекционности и уровню смертности 100% в контрольной контрольной группе с ложной вакцинацией.

Пример 7 Безопасность вакцины против птичьего гриппа-бурсальной болезни-болезни Марека, подтип H5, серотип 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI)

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить безопасность вакцины против птичьего гриппа-бурсальной болезни-болезни Марека, подтипа H5, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI) при пятикратном обратном пассировании в цыплятах SPF и возможности ее распространения среди непривитых контактов.

Сущность

В день исследования 0 двадцать (20) птиц SPF были распределены с использованием таблицы рандомизации на две обработки: вакцинацию (15 цыплят) и контакты (5 цыплят). Пятнадцать однодневных цыплят были вакцинированы 0,2 мл vHVT522-IBD-AI, X+5, лот 072419, при дозе 8280 VP2/AI и 7480 БОЕ/0,2 мл дозы HVT, а

контакты оставались необработанными. Птицы из группы 1 были обозначены как обратный пассаж 1 (BP1) и были помечены лентой на шее для идентификации в соответствии с таблицей рандомизации. В 7, 14, 21, 28, 35, 42 и 49 дни исследования птиц отбирали в соответствии с таблицей рандомизации для отбора образцов и обратных пассажей в соответствии с Разделом 4 и Разделом 5. На 28, 35, 42, 49 и 77 дни исследования птиц умерщвляли и подвергали вскрытию для исследования макроскопических поражений, связанных с болезнью Марека. В условиях этого испытания вакцина против птичьего гриппа-бурсальной болезни-болезни Марека, подтип H5, серотип 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, была безопасной и не возвращалась к вирулентности после обратных пассажей *in vivo*. Вакцина также не распространялась на невакцинированных контактных птиц. Однако исследование проводилось с использованием материала X+5, а не MSV.

График событий

День 0: Двадцать однодневных цыплят с SPF распределяли с использованием таблицы рандомизации на две обработки: вакцинация (15 цыплят) и контакты (5 цыплят). Пятнадцать однодневных цыплят SPF были вакцинированы, а контакты остались необработанными. Птицы из группы 1 были обозначены как обратный пассаж 1 (BP1) и были помечены лентой на шее для идентификации в соответствии с таблицей рандомизации. Первоначальные вакцинированные и контакты содержались вместе в одной и той же секции (по 20 птиц на секцию).

День 7: Пять первичных вакцинированных из группы 1 были отобраны в соответствии с таблицей рандомизации, у них отбирали кровь путем пункции сердца и умерщвляли. Образцы крови объединяли, аликвоту использовали в качестве инокулята, а оставшуюся часть переносили в анализ для экстракции лейкоцитарной пленки (VCE) для проверки выделения вируса. Аликвоту VCE сохраняли для будущего молекулярного анализа. Двадцать однодневных цыплят SPF были отнесены к группе 2 с использованием таблицы рандомизации для двух видов обработки, вакцинированных (15 цыплят) и контактов (5 цыплят). Пятнадцать однодневных цыплят SPF были обозначены как BP2 и им инокулировали 0,25 мл объединенной крови из G1 (BP1). Контакты остались необработанными. Всех птиц из группы 2 для идентификации в соответствии с таблицей рандомизации помечали с помощью ленты на шее. Инокулированные BP2 и контактные птицы содержались вместе в одном блоке (по 20 птиц в блоке).

День 14: Пять первично инокулированных птиц (BP2) из группы 2 отбирали в соответствии с таблицей рандомизации, у них брали кровь путем пункции сердца и умерщвляли. Образцы крови объединяли, аликвоту использовали в качестве инокулята, а

оставшуюся часть переносили в анализ для экстракции лейкоцитарной пленки (ВСЕ) для проверки выделения вируса. Аликвоту ВСЕ сохраняли для будущего молекулярного анализа. Двадцать однодневных цыплят SPF были отнесены к группе 3 с использованием таблицы рандомизации для двух видов обработки, вакцинированных (15 цыплят) и контактов (5 цыплят). Пятнадцать однодневных цыплят SPF были обозначены как ВР3 и им инокулировали 0,25 мл объединенной крови из G2 (ВР2). Контакты остались необработанными. Всех птиц из группы 3 для идентификации в соответствии с таблицей рандомизации помечали с помощью ленты на шее. Инокулированные ВР3 и контактные птицы содержались вместе в одном блоке (по 20 птиц в блоке).

День 21: Пять инокулированных птиц (ВР3) из группы 3 отбирали в соответствии с таблицей рандомизации, у них брали кровь путем пункции сердца и умерщвляли. Образцы крови объединяли, аликвоту использовали в качестве инокулята, а оставшуюся часть переносили в анализ для экстракции лейкоцитарной пленки (ВСЕ) для проверки выделения вируса. Аликвоту ВСЕ сохраняли для будущего молекулярного анализа. Двадцать однодневных цыплят SPF были отнесены к группе 4 с использованием таблицы рандомизации для двух видов обработки, вакцинированных (15 цыплят) и контактов (5 цыплят). Пятнадцать однодневных цыплят SPF были обозначены как ВР4 и им инокулировали 0,25 мл объединенной крови из G3 (ВР3). Контакты остались необработанными. Всех птиц из группы 4 для идентификации в соответствии с таблицей рандомизации помечали с помощью ленты на шее. Инокулированные ВР4 и контактные птицы содержались вместе в одном блоке (по 20 птиц в блоке). У всех контактов из группы 1 брали кровь из крыла, и ВСЕ был проведен индивидуально для этих образцов для проверки выделения вируса. Эти птицы не подвергались эвтаназии и после отбора образцов были помещены обратно в блок, из которого они были изъяты. Аликвоту образцов ВСЕ сохраняли для молекулярного анализа.

День 28: Пять инокулированных птиц (ВР4) из группы 4 отбирали в соответствии с таблицей рандомизации, у них брали кровь путем пункции сердца и умерщвляли. Образцы крови объединяли, аликвоту использовали в качестве инокулята, а оставшуюся часть переносили в анализ для экстракции лейкоцитарной пленки (ВСЕ) для проверки выделения вируса. Аликвоту ВСЕ сохраняли для будущего молекулярного анализа. Двадцать однодневных цыплят SPF были отнесены к группе 5 с использованием таблицы рандомизации для двух видов обработки, вакцинированных (15 цыплят) и контактов (5 цыплят). Пятнадцать однодневных цыплят SPF были обозначены как ВР5 и им инокулировали 0,25 мл объединенной крови из G4 (ВР4). Контакты остались необработанными. Всех птиц из группы 5 для идентификации в соответствии с таблицей

рандомизации помечали с помощью ленты на шее. Инокулированные ВРЗ и контактные птицы содержались вместе в одном блоке (по 20 птиц в блоке). Дополнительные 21-дневные цыплята с SPF были отнесены к группе 6 с использованием таблицы рандомизации для двух обработок, вакцинации (15 цыплят) и контактов (5 цыплят). Пятнадцать цыплят были назначены вакцинированными и были вакцинированы с помощью vHVT522-IBD-AI. Контакты остались необработанными. Всех птиц из группы 6 для идентификации в соответствии с таблицей рандомизации помечали с помощью ленты на шее. vHVT522-IBD-AI использовали в качестве вакцины, а контактные птицы содержались вместе в одном блоке (по 20 птиц в блоке). У всех контактов из группы 2 брали кровь из крыла, и проводили ВСЕ индивидуально для этих образцов, чтобы проверить выделение вируса. Эти птицы не подвергались эвтаназии и после отбора образцов были помещены обратно в блок, из которого они были изъяты. Аликвоту образцов ВСЕ сохраняли для молекулярного анализа. Все остальные птицы из группы 1 были умерщвлены и подвергнуты вскрытию для исследования макроскопических поражений, связанных с болезнью Марека.

День 35: У всех контактов из группы 3 брали кровь из крыла, и индивидуально проводили ВСЕ на этих образцах, чтобы проверить выделение вируса. Эти птицы не подвергались эвтаназии и после отбора образцов были помещены обратно в блок, из которого они были изъяты. Аликвоту образцов ВСЕ сохраняли для молекулярного анализа. Все остальные птицы из группы 2 были умерщвлены и подвергнуты вскрытию для исследования макроскопических поражений, связанных с болезнью Марека.

День 42: Пять инокулированных птиц (ВР5) из группы 5 и пять вакцинированных птиц из группы 6 отбирали в соответствии с таблицей рандомизации, у них брали кровь путем пункции сердца и умерщвляли. Образцы крови были объединены и переданы в аналитический центр для извлечения лейкоцитарной пленки (ВСЕ) для подтверждения выделения вируса. Аликвоту ВСЕ сохраняли для будущего анализа генетической стабильности. У всех контактов из группы 4 брали кровь из крыла, и индивидуально проводили ВСЕ на этих образцах, чтобы проверить выделение вируса. Эти птицы не подвергались эвтаназии и после отбора образцов были помещены обратно в блок, из которого они были изъяты. Аликвоту образцов ВСЕ сохраняли для молекулярного анализа. Все остальные птицы из группы 3 были умерщвлены и подвергнуты вскрытию для исследования макроскопических поражений, связанных с болезнью Марека.

День 49: у всех контактов из групп 5 и 6 брали кровь из крыла, и индивидуально проводили ВСЕ на этих образцах, чтобы проверить выделение вируса. Аликвоту образцов ВСЕ сохраняли для молекулярного анализа. Все оставшиеся птицы из группы 4 были

умерщвлены и подвергнуты вскрытию для исследования макроскопических поражений, связанных с болезнью Марека.

День 77: Все оставшиеся птицы из групп 5 и 6 были умерщвлены и подвергнуты некропсии для изучения макроскопических поражений, связанных с болезнью Марека.

Дизайн исследования

Для этого исследования использовали сто двадцать (120) однодневных цыплят SPF (вид *Gallus domesticus*), самцов и самок. Дизайн исследования показан в Таблице 64 ниже.

Таблица 64

Группа	Обработка (День исследования)	Инокулят	Путь	Объем (мл)	Возраст (Дни)	# птиц Вакцини рованные /Контакты
1	BP1 vHVT522-IBD-AI/ BP1 контакты (День 0)	vHVT522-IBD-AI/ NA	п.к./NA	0,20	1	15/5
2	BP2 vHVT522-IBD-AI/ BP2 vHVT522-IBD-AI Контакты (День 7)	Объединенная кровь BP1 vHVT522-IBD- AI/ NA	п.к./NA	0,25	1	15/5
3	BP3 vHVT522-IBD-AI/ BP3 vHVT522-IBD-AI Контакты (День 14)	Объединенная кровь BP2 vHVT522-IBD- AI/ NA	п.к./NA	0,25	1	15/5
4	BP4 vHVT522-IBD-AI/ BP4 vHVT522-IBD-AI Контакты (День 21)	Объединенная кровь BP3 vHVT522-IBD- AI/ NA	п.к./NA	0,25	1	15/5
5	BP5 vHVT522-IBD-AI/ BP5 vHVT522-IBD-AI Контакты (День 28)	BP4 vHVT522-IBD- AI/ NA	п.к./NA	0,25	1	15/5
6	vHVT522-IBD-AI/ вакцинированные/конт акты (День 28)	vHVT522-IBD-AI/ NA	п.к./NA	0,20	1	15/5

Тестовая вакцина

Вакцину разводили в разбавителе Марека для группы 1, чтобы получить 8280 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на дозу, определенных по генам VP2 и AI; 7480 определенных по HVT; или для группы 6, чтобы получить 9640 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на дозу, определенных по генам VP2 и AI; или 8680, определенных по HVT. Вакцину хранили в жидком азоте.

Обработки

Птиц вакцинировали однократно или инокулировали материалом обратного

пассажа в суточном возрасте п.к. путем. Все вакцинации и инокуляции были зарегистрированы в Регистрационной форме об инокуляции/размещении. Образцы у птиц отбирали в соответствии с графиком, изложенным выше. Птиц наблюдали в течение 28 дней (группа 1-4) или 49 дней (группы 5 и 6) с последующим вскрытием. Клинические признаки болезни Марека, смертность и макроскопические поражения (при наличии) были зарегистрированы в протоколе вскрытия.

Клинические наблюдения

На протяжении всего исследования ежедневно наблюдали за их общим состоянием здоровья и самочувствием всех цыплят, а также за любыми побочными реакциями на вакцину. Все наблюдения заносились в журнал исследования. Птиц наблюдали до 28 дней после вылупления (группы 1-4) или 49 дней после вылупления (группы 5 и 6) на наличие клинических признаков, связанных с болезнью Марека, включая, без ограничения указанным: парали, двигательные симптомы и тяжелое истощение или депрессия. Клинические признаки, если они присутствовали, регистрировались в протоколе вскрытия.

Выделение HVT - ВСЕ для образцов крови

Образцы крови обрабатывали индивидуально или объединяли для ВСЕ (выделение лейкоцитарной пленки). Каждый образец ВСЕ инокулировали отдельно на подготовленные фибробласты куриного эмбриона (CEF). Планшеты инкубировали при 37°C в течение пяти дней, а затем проверяли на цитопатический эффект HVT (ЦПЭ). Помимо ЦПЭ, бляшки, выделенные из последнего обратного пассажа, окрашивали специфическими антителами.

Результаты и оценка

Результаты представлены в таблицах 65-67 ниже.

Таблица 65

Результаты объединенных образцов по дням и группам

Группа	Обработка	День	Результат (MDV CPE)
1	BP1 vHVT522-IBD-AI	7	Положительный
2	BP2 vHVT522-IBD-AI	14	Положительный
3	BP3 vHVT522-IBD-AI	21	Положительный
4	BP4 vHVT522-IBD-AI	28	Положительный
5	BP5 vHVT522-IBD-AI	42	Положительный
6	vHVT522-IBD-AI вакцинированные	42	Положительный

Таблица 66

Результаты для контактов по дням и группам

Группа	Обработка	День	Результат (MDV CPE) (отобранные/положительные)
1	BP1 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	21	Отрицательный (0/5)
2	BP2 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	28	Отрицательный (0/5)
3	BP3 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	35	Отрицательный (0/5)
4	BP4 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	42	Отрицательный (0/5)
5	BP5 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	49	Отрицательный (0/5)
6	vHVT522-IBD-AI вакцинированные Контактировавшие	49	Отрицательный (0/5)

Таблица 67

Группа	Тип	Обработка	# Птиц	# положительных/общее # птиц
1	Вакцинированные	BP1 vHVT522-IBD-AI	10	0/10
	Контактировавшие	BP1 Контактировавшие	5	0/5
2	Вакцинированные	BP2 vHVT522-IBD-AI	10	0/10
	Контактировавшие	BP2 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	5	0/5
3	Вакцинированные	BP3 vHVT522-IBD-AI	10	0/10
	Контактировавшие	BP3 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	5	0/5
4	Вакцинированные	BP4 vHVT522-IBD-AI	10	0/10
	Контактировавшие	BP4 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	5	0/5
5	Вакцинированные	BP5 vHVT522-IBD-AI	9	0/9
	Контактировавшие	BP5 vHVT522-IBD-AI Контактировавшие	5	0/5
6	Вакцинированные	vHVT522-IBD-AI Вакцинированные	10	0/10
	Контактировавшие	Контактировавшие	5	0/5

Обсуждение/Заключение

В условиях этого испытания вакцина против птичьего гриппа-бурсальной болезни-болезни Марека, подтип H5, серотип 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, была безопасной и не возвращалась к вирулентности после обратных пассажей

in vivo. Вакцина также не распространялась на невакцинированных контактных птиц. Однако исследование проводилось с использованием материала X+5, а не MSV, и часть обратного пассажа будет повторена с MSV.

Пример 8. Оценка эффективности вакцины против птичьего гриппа-бурсальной болезни-болезни Марека, подтип H5, серотип 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, введенной *in ovo* или подкожно однодневным SPF цыплятам. Против vMDV, вакцины против вируса GA22 птичьего гриппа - бурсальной болезни - болезни Марека, подтип H5, серотип 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI)

Цель этого исследования заключалась в оценке эффективности вакцины против птичьего гриппа, бурсальной болезни и болезни Марека, подтипа H5, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, введенной *in ovo* или подкожно однодневным цыплятам SPF.

Сущность

В день исследования 0 18-19-дневные эмбрионы, SPF, стадо SPAFAS T41, в группах 1 и 3 были вакцинированы или ложновакцинированы. Эмбрионы в группах 2 и 4 (~46 эмбрионов в группе) инкубировали без какой-либо обработки. Эмбрионы из группы 1 были вакцинированы *in ovo* 0,05 мл vHVT522-IBD-AI, X+5, 2330AI/VP2 и 2180 БОЕ/0,05 мл дозы HVT. Инокулированные эмбрионы помещали обратно в инкубатор с регулируемой влажностью. После вакцинации и ложной вакцинации эмбрионы в группе 1 инкубировали и выводили отдельно от групп 2-4. На 3 день исследования тридцать пять (35) птиц были случайным образом выбраны из жизнеспособных вылупившихся цыплят из групп 1-3 и двадцать пять (25) из группы 4 с использованием таблицы рандомизации. 130 однодневных цыплят SPF из групп 1-4 распределяли по изоляционным блокам и помечали с помощью ленты в соответствии с таблицей рандомизации. Все птицы в группах 1, 3 и 4 помещали в изоляционный блок без обработки. Птиц в группе 2 вакцинировали подкожно (п.к.) 0,2 мл vHVT522-IBD-AI, X+5, при дозе 2280 AI/VP2 и 2070 БОЕ/0,2 мл HVT. Всех птиц помечали с помощью ленты на шее для индивидуальной идентификации. На 7 день исследования всех птиц (в возрасте 5 дней) из групп 1-3 заражали внутрибрюшинно 0,2 мл на птицу vMDV GA22 в дозе 27600 клеток/0,2 мл. В период между 7-м и 52-м днями исследования за всеми птицами ежедневно наблюдали на предмет любых неблагоприятных реакций на заражение. На 52 день исследования всех оставшихся птиц умерщвляли и подвергали вскрытию для исследования макроскопических поражений, связанных с болезнью Марека. В условиях этого испытания птицы в группах 1 и 2, вакцинированные вакциной против птичьего гриппа,

бурсальной болезни и болезни Марека, подтипа H5, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, соответствовали критерии приемлемости для защиты от vMDV. Вирулентность вируса была подтверждена инфекционностью, наблюдаемой в группе 3. Минимальная защитная доза была установлена на уровне 2070 БОЕ/0,2 мл для однодневных цыплят при подкожном введении и 2180 БОЕ/0,05 мл при введении *in ovo*.

График событий

День 0: восемнадцати-девятнадцатидневные эмбрионы в группах 1 и 4 были вакцинированы или ложновакцинированы. Эмбрионы в группах 2 и 3 (~90 эмбрионов) инкубировали без какой-либо обработки, а эмбрионы в группе 4 были ложно инокулированы только разбавителем вакцины против болезни Марека. Инокулированные эмбрионы помещали обратно в инкубатор с регулируемой влажностью. После вакцинации и ложной вакцинации эмбрионы в группах 2-4 инкубировали и выводили отдельно от группы 1.

День 3: тридцать пять (35) птиц были случайным образом выбирали из жизнеспособных вылупившихся цыплят из групп 1-3 и двадцать пять (25) из группы 4 с использованием таблицы рандомизации. 130 однодневных цыплят SPF из групп 1-4 распределяли по изоляционным блокам и помечали с помощью ленты в соответствии с таблицей рандомизации. На каждый изоляционный блок распределяли от одиннадцати до тринадцати птиц (3 единицы для групп 1-3 и 2 единицы для группы 4). Все птицы в группах 1, 3 и 4 помещали в изоляционный блок без обработки. Птиц в группе 2 вакцинировали п.к. Всех птиц помечали с помощью ленты на шее для индивидуальной идентификации.

День 7: Всех птиц (в возрасте 5 дней) из групп 1-3 заражали, как описано ниже.

День 7-52: Птиц ежедневно осматривали на наличие любых неблагоприятных реакций на заражение.

День 52: Птиц умерщвляли и подвергали вскрытию для исследования макроскопических поражений, связанных с болезнью Марека.

Дизайн исследования

Двести десять (210) эмбрионов/130 однодневных цыплят SPF (вид *Gallus domesticus*) самцов и самок стада SPAFAS T41 использовали для этого исследования. Дизайн исследования показан в Таблице 68 ниже.

Таблица 68

Группа	Вакцина БОЕ/дозу*	Объем дозы/Путь	~Количество эмбрионов/Вакцинированных птиц	Количество размещенных птиц	Зараженные*
1	vHVT522-IBD-AI AI/VP2=2,330 HVT = 2,180	0.05 мл/ <i>in ovo</i>	59 (эмбрионы)	35	Да
2	vHVT522-IBD-AI AI/VP2=2,280 HVT = 2,070	0.2 мл/п.к.	35** (птицы)	35	Да
3	Ложновакцинированные/ Контроли заражения	0.05 мл/ <i>in ovo</i>	59 (эмбрионы)	35	Да
4	Невакцинированные/незараженные (Отрицательные контроли)	N/A	N/A**	25	Нет

*Всех птиц из групп 1-3 заражали vMDV, штамм GA22, в 5-дневном возрасте внутрибрюшинным путем (в.б.).

**Сорок шесть 18-19-дневных эмбрионов на группу (группы 2 и 4) были отобраны в день исследования 0 и распределены по группам 2 и 4. Тридцать пять (35) птиц использовали для однократной вакцинации группы 2 в день исследования 3.

Тестовая вакцина

Вакцину разводили в разбавителе Марека, чтобы получить 2330 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на дозу, определенных по генам VP2 и AI; или 2180, определенных по HVT для вакцинации *in ovo*. Для вакцинации п.к. вакцину разводили в разбавителе Марека, чтобы получить 2280 БОЕ на дозу, определенных по генам VP2 и AI; или 2070, определенных по HVT. Вакцину хранили в жидком азоте. Контрольным продуктом (КП) был разбавитель вакцины против болезни Марека (ложная вакцина). Контрольным материалом был вирулентный вирус болезни Марека (vMDV), изолят GA22.

Обработки

Птиц в группах 1–3 вакцинировали или ложновакцинировали однократно либо методом *in ovo* (18–19 дней эмбрионального развития), либо п.к. путем в однодневном возрасте с помощью vHVT522-IBD-AI или разбавителя Марека. Птиц помечали с помощью ленты на шее на 3 день исследования, а группы 1-3 подвергали заражению на 7 день исследования. За всеми птицами наблюдали до 52-го дня исследования, а вскрытие всех оставшихся птиц проводили в конце экспериментального периода.

Клинические наблюдения

На протяжении всего исследования ежедневно наблюдали за их общим состоянием здоровья и самочувствием всех цыплят, а также за любыми побочными реакциями на вакцину. Все наблюдения заносились в журнал исследования. В конце периода

наблюдения (52 день исследования) все оставшиеся птицы были подвергнуты эвтаназии и вскрытию, а также обследованы на наличие макроскопических поражений болезни Марека. Поражения включали, без ограничения указанным, следующие органы: печень, сердце, селезенка, половые железы, почки, кожа, поражения мышц и увеличение нервов. Из трех разных отрядов отбирали от одной до пяти птиц на блок, чтобы проводить вскрытие от 1 до 15 птиц за раз до тех пор, пока не будут вскрыты все птицы в исследовании. Порядок блоков, в которых производили вскрытие птиц, выбирали случайным образом в соответствии с таблицей рандомизации. Макроскопические поражения и смертность были зарегистрированы в протоколе вскрытия.

Результаты и оценка

Результаты представлены в таблицах 69-70 ниже.

Таблица 69

Результаты вакцинации/вылупления

Группа	Путь	Всего яиц	Всего вакцинированных яиц	Всего # вылупленных	% вылупленных
1	<i>In ovo</i> /0,05 мл	59	59	49	83,1
2	<i>In ovo</i> /0,05 мл	59	59	51	86,4

Таблица 70

Количество птиц с положительным результатом на болезнь Марека и процент положительных результатов по группам

Группа	Вакцина Фактическое БОЕ/дозу	Путь/ Объем	Заражение	# Положительных/ Всего # птиц	% Защиты (% Инфекции)
1	vHVT522-IBD-AI AI/VP2=2,330 HVT = 2,180	<i>In ovo</i> /0,05 мл	vMDV GA22	2/35	94,3
2	vHVT522-IBD-AI AI/VP2=2,280 HVT = 2,070	п.к./ 0,2 мл/	vMDV GA22	2/34	94,1
3	Ложновакцинированные/ Контроли заражения	<i>In ovo</i> /0,05 мл	vMDV GA22	32/35	(94,4)
4	Невакцинированные/ незараженные (Отрицательные контроли)	/A	N/A	0/24	100

Обсуждение/Заключение

В условиях этого испытания птицы в группах 1 и 2, вакцинированные вакциной

против птичьего гриппа, бурсальной болезни и болезни Марека, подтипа H5, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, соответствовали критерии приемлемости для защиты от vMDV. Вирулентность вируса была подтверждена инфекционностью, наблюдаемой в группе 3. Минимальная защитная доза была установлена на уровне 2070 БОЕ/0,2 мл дозы для однодневных цыплят при подкожном введении и 2180 БОЕ/0,05 мл дозы при введении *in ovo*.

Пример 9 Оценка эффективности вакцины против птичьего гриппа-бурсальной болезни-болезни Марека, подтипа H5, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, введенной *in ovo* или подкожно однодневным SPF цыплятам, Против вируса инфекционной бурсальной болезни, классический штамм STC

Цель этого исследования заключалась в оценке эффективности вакцины против птичьего гриппа, бурсальной болезни и болезни Марека, подтипа H5, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, введенной *in ovo* 18–19-дневным эмбрионам или подкожно однодневным цыплятам SPF.

Сущность

В день исследования 0 18-19-дневные эмбрионы, SPF, стадо SPAFAS T41, в группах 1 и 3 были вакцинированы или ложновакцинированы. Эмбрионы в группе 2 (75 эмбрионов в группе) инкубировали без какой-либо обработки. Эмбрионы из группы 1 были вакцинированы *in ovo* 0,05 мл vHVT522-IBD-AI, X+5, 2620 БОЕ/0,05 дозы AIV HA и IBDV VP2 и 2490 БОЕ/0,05 мл дозы HVT. Инокулированные эмбрионы помещали обратно в инкубатор с регулируемой влажностью. После вакцинации и ложной вакцинации эмбрионы в группе 1 инкубировали и выводили отдельно от групп 2 и 3. На 3 день исследования тридцать шесть (36) птиц были случайным образом выбраны из жизнеспособных вылупившихся цыплят из групп 1-3 с использованием таблицы рандомизации. Все птицы 1 и 3 групп были помещены в изоляционный блок без обработки. Птиц в группе 2 вакцинировали подкожно (п.к.) 0,2 мл vHVT522-IBD-AI, X+5, 2170 БОЕ/0,2 дозы AIV HA и IBDV VP2 и 1950 БОЕ/0,2 мл дозы HVT. На 25 день исследования количество птиц было уменьшено до 30 птиц на группу (десять птиц на блок) для групп 1-3 с использованием схемы рандомизации, и все дополнительные птицы были подвергнуты эвтаназии. Всем остальных птиц для индивидуальной идентификации помечали с помощью ленты на шее для индивидуальной идентификации. На 31 день исследования всех остальных птиц заражали внутриглазным путем по 0,03 мл на птицу IBDV-STC, STC EP1, партия 080116, в дозе 102,7 EID50/0,03 мл. В период между 32 и 35 днями исследования за всеми птицами ежедневно наблюдали на предмет любых неблагоприятных реакций на заражение. На 35 день исследования все оставшиеся птицы

были подвергнуты эвтаназии и вскрыты для исследования на предмет наличия макроскопических поражений бursы. В условиях этого испытания птицы в группах 1 и 2, вакцинированные вакциной против птичьего гриппа, бурсальной болезни и болезни Марека, подтипа H5, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, соответствовали критерии приемлемости для защиты от IBDV-STC. Вирулентность вируса была подтверждена инфекционностью, наблюдаемой в группе 3. Минимальная защитная доза была установлена на уровне 2170 БОЕ/0,2 мл для однодневных цыплят при подкожном введении и 2620 БОЕ/0,05 мл при введении *in ovo* в соответствии с требованиями 9 CFR 113.331(c)(3).

График событий

День 0: Восемнадцати-девятнадцатидневные эмбрионы в группах 1 и 3 были вакцинированы или ложновакцинированы. Эмбрионы 2 группы (75 эмбрионов) инкубировали без какой-либо обработки. Все эмбрионы помещали обратно в инкубатор с регулируемой влажностью. После вакцинации и ложной вакцинации эмбрионы в группе 1 инкубировали и выводили отдельно от групп 2 и 3.

День 3: Тридцать шесть (36) птиц были случайным образом выбраны из жизнеспособных вылупившихся цыплят из групп 1-3 с использованием таблицы рандомизации. 108 однодневных цыплят SPF из групп 1-3 были помещены в изоляционные блоки. На каждый изоляционный блок распределяли по двенадцать птиц (3 блока на группу). Все птицы в группах 1 и 3 были помещены в изоляционные блоки без обработки на 3 день исследования. Птиц в группе 2 вакцинировали п.к.

День 25: количество птиц было уменьшено до 30 птиц на группу (десять птиц на единицу) для групп 1-3 с использованием схемы рандомизации, и все дополнительные птицы были подвергнуты эвтаназии. Всем остальных птиц для индивидуальной идентификации помечали с помощью ленты на шее для индивидуальной идентификации.

День 31: Всех оставшихся птиц (в возрасте 28 дней) заражали, как описано ниже.

День 32-35: В течение 4 дней после заражения всех птиц наблюдали на наличие любых неблагоприятных реакций на контрольное заражение.

День 35: Все оставшиеся птицы были подвергнуты эвтаназии и вскрытию для исследования макроскопических поражений бursы.

Дизайн исследования

Для этого исследования использовали двести двадцать пять (225) эмбрионов/108 однодневных SPF цыплят (вид *Gallus domesticus*) самцов и самок стада SPAFAS T41. Дизайн исследования показан в Таблице 71 ниже.

Таблица 71

Группа	Вакцина БОЕ/дозу*	Доза Объем/ Путь	Количество эмбрионов/вак- цинированных птиц	Количе- ство размещ- енных птиц	Количество птиц при заражении
1	vHVT522-IBD-AI AIV HA и IBDV VP2=2,620 HVT = 2,490	0.05 мл/ <i>in ovo</i>	75 (эмбрионы)	36	30
2	vHVT522-IBD-AI AI/VP2=2,280 HVT = 2,070	0.2 мл/п.к.	36 (птицы) ¹	36	30
3	Ложновакцинированные/ Контроли заражения	0.05 мл/ <i>in ovo</i>	59 (эмбрионы)	36	30

¹Семьдесят пять (75) 18-19-дневных эмбрионов были отобраны в день исследования 0 и распределены в группу 2.

Тридцать шесть (36) птиц использовали для вакцинации AQ для группы 2 в день исследования 3.

Тестируемая вакцина

Вакцину разводили в разбавителе Марека, чтобы получить 2620 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на дозу, определенных по генам HA AIV и IBDV VP2; или 2490, определенных по генам HVT для вакцинации *in ovo*. Для однократной вакцинации вакцину разводили в разбавителе Марека, чтобы получить 2170 БОЕ на дозу, определенных по генам IBD2 и AIV HA; или 1950, определенных по HVT. Вакцину хранили в жидком азоте. Контрольным продуктом (КП) был разбавитель вакцины против болезни Марека (ложная вакцина). Контрольным материалом был вирус инфекционной бурсальной болезни (IBDV-STC), номер партии STC EP1, партия 080116, хранившийся при -70°C и доза 102,7 EID50/доза 0,03 мл (внутриглазное введение).

Обработки

Птиц однократно вакцинировали либо путем *in ovo* (18-19 дней эмбрионального развития), либо п.к. путем (однодневный возраст) вакциной vHVT522-IBD-AI. Все вакцинации были зарегистрированы в регистрационной форме вылупления/вакцинации из групп, которые получили вакцинацию *in ovo* или ложную вакцинацию (группы 1 и 3).

Птиц заражали в возрасте 28 дней (31 день исследования). Заражение было записано в форме записи заражения персоналом, проводящим открытое исследование. За всеми зараженными птицами наблюдали в течение 4 дней после заражения, после чего проводили эвтаназию и вскрытие для изучения наличия макроскопических поражений в фабрициевой сумке. Макроскопические поражения и смертность регистрировали в форме записи баллов IBDV STC.

Клинические наблюдения

На протяжении всего исследования ежедневно наблюдали за их общим состоянием здоровья и самочувствием всех цыплят, а также за любыми побочными реакциями на вакцину или заражение (дни 32-35). Все наблюдения заносились в журнал исследования.

В конце периода наблюдения (35 день исследования) птиц обследовали на наличие макроскопических поражений, вызванных классическим заражением STC IBDV. От одной до пяти птиц на единицу отбирали из трех разных единиц для вскрытия 1-15 птиц за раз, пока все птицы в исследовании не были вскрыты. Порядок подразделений, в которых производилось вскрытие птиц, выбирался случайным образом в соответствии с таблицей рандомизации. Результаты вскрытия были записаны в форме регистрации результатов IBDV-STC. Для целей этого теста макроскопические поражения должны включать перибурсальный отек, и/или отек, и/или макроскопическое кровоизлияние в ткань бursy. Любая птица с указанными повреждениями была зарегистрирована как положительная.

Вакцинные препараты титровали пять раз для определения фактической введенной дозы (ADG). Титры определяли для всех фракций вакцины, включая вирус болезни Марека, вирус инфекционной бурсальной болезни (VP2) и вставки гена птичьего гриппа (HA).

Результаты и оценка

Результаты представлены в таблицах 72-74 ниже.

Таблица 72

Результаты вакцинации/вылупления

Группа	Вакцина БОЕ/дозу	Путь	# вакцинированных яиц	# вылупившихся яиц	% вылупившихся
1	vHVT522-IBD-AI AIV HA and IBDV VP2=2,620 HVT = 2,490	<i>In ovo</i> /0,05 мл	75	69	92
3	Ложновакцинированные/ Контроли заражения	<i>In ovo</i> /0,05 мл	75	60	80

Таблица 73

Количество птиц с положительным результатом на болезнь Марека и защиту или заражение по группам

Группа	Вакцина БОЕ/дозу	Путь/ Объем	# Положительных/ Общему # птиц	% Защиты (% Инфекции)
1	vHVT522-IBD-AI AIV HA и IBDV VP2=2,620 HVT = 2,490	<i>In ovo</i> /0.05 мл	3/30	90
2	vHVT522-IBD-AI AIV HA & IBDV VP2=2, 170 HVT = 1,950	п.к./ 0.2 мл/	0/30	94.1
3	Ложновакцинированные/ Контроли заражения	<i>In ovo</i> /0.05 мл	27/30	(90)

Обсуждение/Заключение

В условиях этого испытания птицы в группах 1 и 2, вакцинированные вакциной против птичьего гриппа, бурсальной болезни и болезни Марека, подтипа H5, серотипа 3, живого вектора болезни Марека (vHVT522-IBD-AI), X+5, соответствовали критерию приемлемости для защиты от IBDV-STC. Вирулентность вируса была подтверждена инфекционностью, наблюдаемой в группе 3. Минимальная защитная доза была установлена на уровне 2170 БОЕ/0,2 мл дозы для однодневных цыплят при подкожном введении и 2620 БОЕ/0,05 мл дозы при введении *in ovo*.

Связанные заявки, описанные выше, все документы, цитируемые в них или во время их рассмотрения («документы, цитируемые заявкой»), все документы, цитируемые или упоминаемые в документах, цитируемых заявками, и все документы, цитируемые или упоминаемые в настоящем документе («документы, цитируемые в настоящем документе»), и все документы, цитируемые или упоминаемые в цитируемых в настоящем документе документах, вместе с любыми инструкциями производителя, описаниями, спецификациями продуктов и описаниями продуктов для любых продуктов, упомянутых в настоящем документе, или в любом документе, включенном в настоящий документ ссылкой, настоящим включены в настоящий документ ссылкой и могут использоваться при практическом осуществлении изобретения. Более конкретно, все ссылочные документы включены ссылкой в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был конкретно и индивидуально указан как включенный ссылкой.

Имея таким образом подробно описанные предпочтительные воплощения настоящего изобретения, следует понимать, что изобретение описанное в параграфах выше не ограничено определенными деталями, изложенными в описании выше, поскольку множество их очевидных вариаций возможны без отхода от духа и объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вирусный вектор, содержащий:
 - по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из заранее определенного вируса, выбранного из: герпесвируса индеек (rHVT); вируса болезни Марека; или герпесвируса индейковых;
 - первую последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты из вируса птичьего гриппа, такую, что рекомбинантный вирусный вектор экспрессирует *in vivo* гемагглютининовый антиген экзогенного вируса птичьего гриппа; и
 - вторую последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты из болезни птиц, кодирующую и экспрессирующую по меньшей мере один антиген болезни птиц *in vivo*.
2. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что заданный вирус представлен вирусом болезни Марека серотипа 3.
3. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что заданный вирус представлен штаммом FC-126 вируса болезни Марека.
4. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что птичий грипп относится к подтипу H5.
5. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что первая последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген HA птичьего гриппа, оптимизирована по кодонам.
6. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что вторая последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты кодирует антиген вируса инфекционной бурсальной болезни, антиген болезни Ньюкасла или антиген вируса инфекционного ларинготрахеита (ILT_V).
7. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что вторая последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты кодирует антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни или антиген F болезни Ньюкасла.
8. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, сконструированный с помощью способа рекомбинации, включающего трансфекцию клетки заранее определенным вирусом и вставочной плазмидой для вставки в сайт Intergenic I (IG1), содержащей первую экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), вторую экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HA птичьего гриппа и поли-А-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.
9. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, дополнительно содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по

меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с последовательностью, кодирующей белок AIV H5 HA.

10. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность гена AIV HA COBRA-C, используемая в рекомбинантном вирусном векторе, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с заданной последовательностью.

11. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность гена IBDV VP2 рекомбинантного вирусного вектора имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с заданной последовательностью.

12. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность гена NDV-F рекомбинантного вирусного вектора имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с заданной последовательностью.

13. Способ получения рекомбинантного вирусного вектора по п. 1, включающий способ рекомбинации, включающий трансфекцию клетки заранее определенным вирусом и вставочной плазмидой для вставки в сайт Intergenic I (IG1), содержащей первую экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), вторую экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HA птичьего гриппа и поли-A-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

14. Композиция, содержащая рекомбинантный вирусный вектор по п. 1 и приемлемый для ветеринарии носитель.

15. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что заданный вирус находится в количестве, когда композиция вводится птице, достаточном для индукции иммунного ответа у птицы против вируса болезни Марека, и/или вируса инфекционной бурсальной болезни, и/или птичьего гриппа.

16. Способ индукции иммунного ответа у птиц против вируса болезни Марека, птичьего гриппа и вируса инфекционной бурсальной болезни, включающий введение птице эффективного количества рекомбинантного вирусного вектора по п. 1 или

эффективного количества композиции по п. 14.

17. Рекомбинантный вирусный вектор, содержащий и экспрессирующий *in vivo*: экзогенный антиген НА вируса птичьего гриппа, и экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса болезни Ньюкасла.

18. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1 или 17, отличающийся тем, что птичий грипп относится к подтипу H5.

19. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 17, отличающийся тем, что молекула экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген НА птичьего гриппа, оптимизирована по кодонам.

20. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 17, сконструированный с помощью метода рекомбинации, включающего трансфекцию клетки заранее определенным вирусом и вставочной плазмидой для сайта Intergenic 1 (IG1), содержащей промотор CMV мыши, экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса болезни Ньюкасла, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую НА птичьего гриппа и поли-A-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

21. Способ получения рекомбинантного вирусного вектора по п. 17, включающий способ рекомбинации, включающий трансфекцию клетки заданным вирусом и вставочной плазмидой для сайта Intergenic 1 (IG1), содержащей промотор CMV мыши, экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса болезни Ньюкасла, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую НА птичьего гриппа и поли-A-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

22. Способ по п. 13 или 21, дополнительно включающий выделение рекомбинантного вирусного вектора.

23. Композиция, содержащая рекомбинантный вирусный вектор по п. 21 и приемлемый для ветеринарии носитель.

24. Композиция по п. 23, отличающаяся тем, что рекомбинантный вирусный вектор находится в количестве, когда композиция вводится птице, достаточном для индукции иммунного ответа у птицы против вируса болезни Марека, и/или вируса птичьего гриппа, и/или вируса болезни Ньюкасла.

25. Композиция по п. 14 или 23, отличающаяся тем, что птица представляет собой курицу, каплуна, утку, гуся, индейку, фазана, тетерева, перепела, лебедя, сквоба или голубя.

26. Композиция по п. 14 или 23, отличающаяся тем, что птица представляет собой курицу.

27. Способ индукции иммунного ответа у птиц против вируса болезни Марека, птичьего гриппа и вируса болезни Ньюкасла, включающий введение птице эффективного количества рекомбинантного вирусного вектора по п. 17 или эффективного количества композиции по п. 23.

28. Способ по п. 16 или 27, отличающийся тем, что птица представляет собой курицу, каплуна, утку, гуся, индейку, фазана, тетерева, перепела, лебедя, сквоба или голубя.

29. Способ по п. 16 или 27, отличающийся тем, что птица представляет собой курицу.

30. Плаزمида для встраивания в сайт Intergenic 1 (IG1) заданного вируса, содержащая экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую НА птичьего гриппа, и поли-А-хвост SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

31. Плазмида для встраивания в сайт Intergenic 1 (IG1) заданного вируса, содержащая промотор CMV мыши, последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую F-антиген вируса болезни Ньюкасла, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую НА птичьего гриппа и хвост поли А SV40, окруженные последовательностями из области IG1.

32. Плазмида по п. 30 или 31, отличающаяся тем, что птичий грипп относится к подтипу H5.

33. Плазмида по п. 30 или 31, отличающаяся тем, что молекула экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген НА птичьего гриппа, оптимизирована по кодонам.

34. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 21, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность гена AIV НА COBRA-C, используемого в рекомбинантном вирусном векторе, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с заданной последовательностью.

35. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 21, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность гена IBDV VP2 рекомбинантного вирусного вектора имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с

заданной последовательностью.

36. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность гена NDV-F рекомбинантного вирусного вектора имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 85 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов с заданной последовательностью.

37. Композиция или вакцина, включающая:

рекомбинантный вирусный вектор, содержащий:

заранее определенный вирус, выбранный из болезни Марека серотипа 3 (MDV-3) или герпесвируса индейковых 1 (MeHV-1);

по меньшей мере один полинуклеотид вируса птичьего гриппа А, кодирующий и экспрессирующий ген белка синтетического гемагглютинина (НА); и

по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид, кодирующий и экспрессирующий по меньшей мере один антиген птичьего патогена, содержащий по меньшей мере один из числа:

капсидного белка (VP2) вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV); или

гибридного белка вируса болезни Ньюкасла (NDV-F); и

фармацевтически или ветеринарно приемлемого носителя, эксципиента, наполнителя или адьюванта.

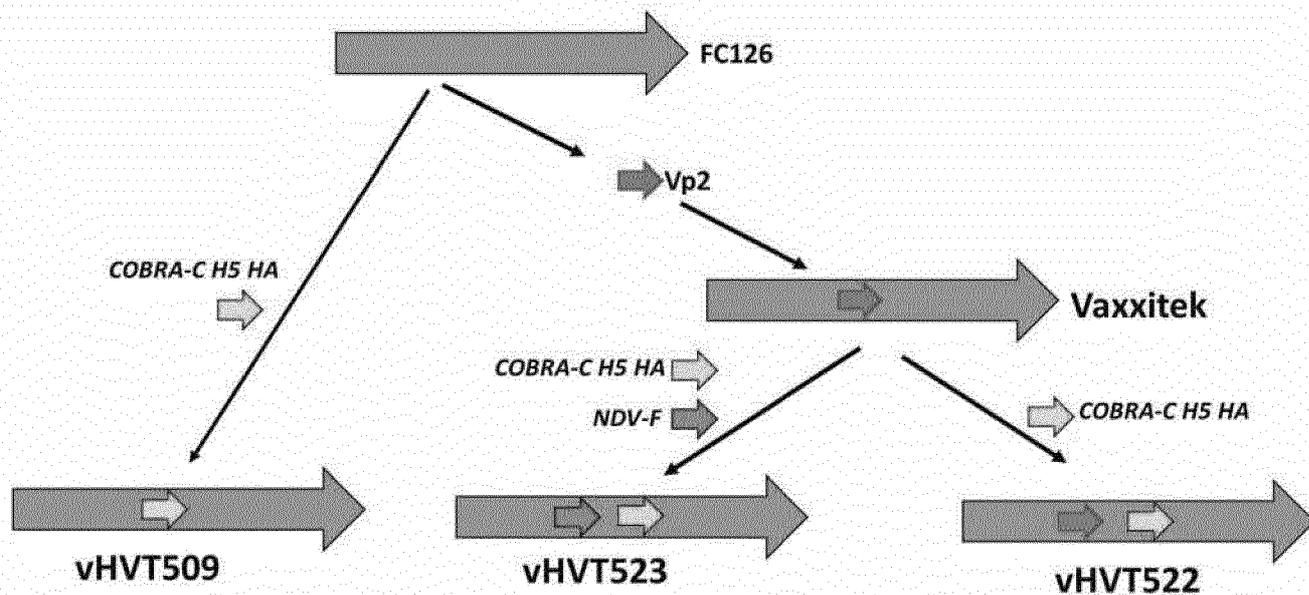
38. Композиция или вакцина по пункту 37, отличающаяся тем, что по меньшей мере один полинуклеотид вируса птичьего гриппа А имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с референсной последовательностью AIV H5 NA.

39. Композиция или вакцина по п. 37, отличающаяся тем, что по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид имеет идентичность последовательности по меньшей мере 85 процентов, 90 процентов, 92 процентов, 95 процентов или 99 процентов с полипептидом, имеющим заданную референсную последовательность.

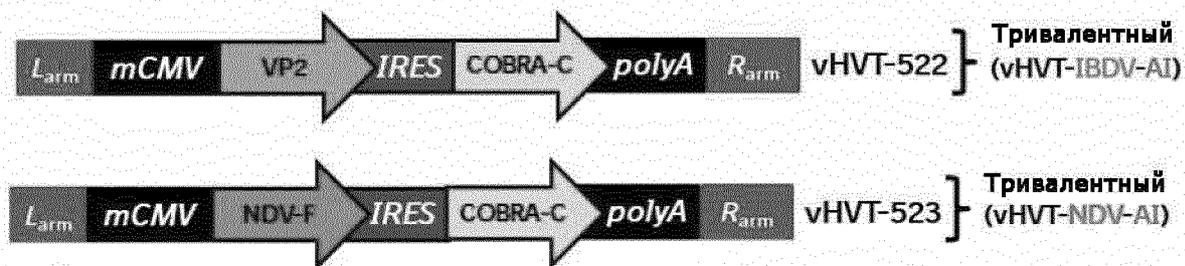
40. Композиция или вакцина по п. 37, отличающаяся тем, что синтетический белок гемагглютинин (НА) вируса птичьего гриппа А (подтип H5) кодируется аминокислотной последовательностью, имеющей идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов, с референсной последовательностью AIV; где по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид содержит гибридный белок вируса болезни Ньюкасла (NDV-F) и имеющей идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов с референсной последовательностью NDV-F; и при этом композиция или вакцина дополнительно содержат фармацевтически или ветеринарно приемлемый

носитель, эксципиент, наполнитель или адъювант.

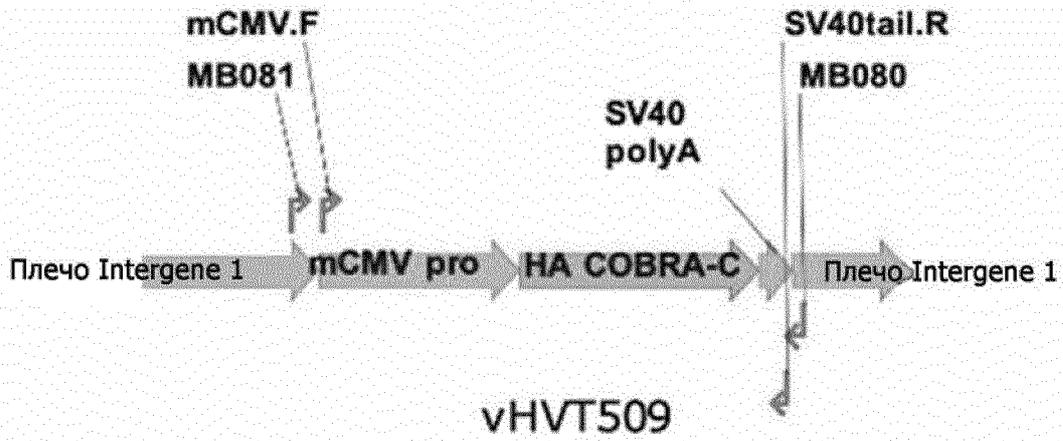
41. Композиция или вакцина по п. 37, отличающаяся тем, что синтетический белок гемагглютинин (НА) вируса птичьего гриппа А (подтип Н5) кодируется аминокислотной последовательностью, имеющей идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов с референсной последовательностью AIV; где по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид содержит белок IBDV VP2 и имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90 процентов с референсной последовательностью IBDV VP2; и при этом композиция или вакцина дополнительно содержат фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, эксципиент, наполнитель или адъювант.



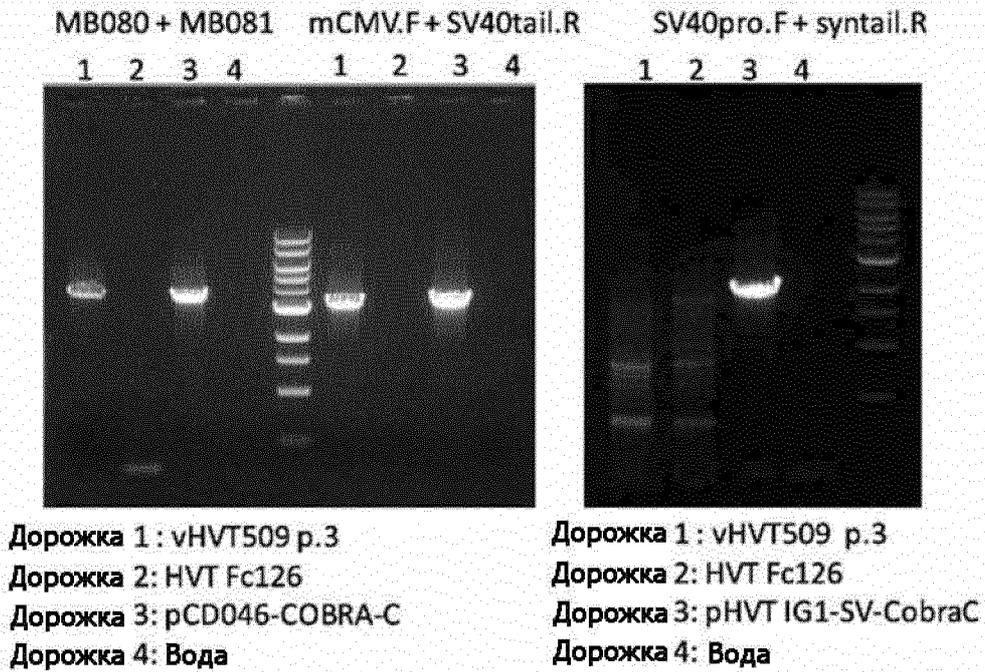
ФИГ. 1



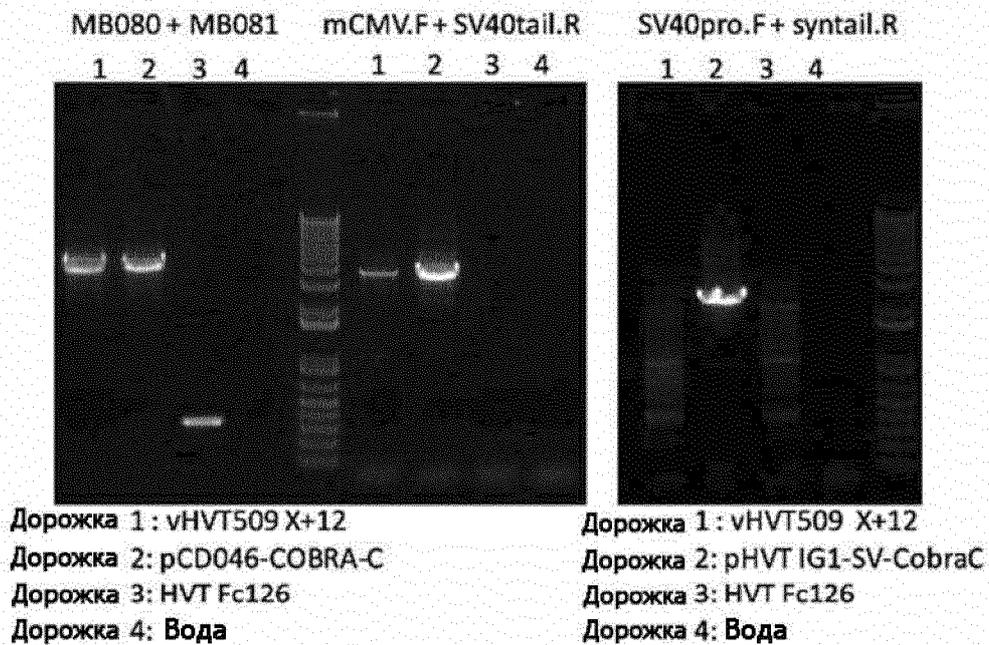
ФИГ. 2



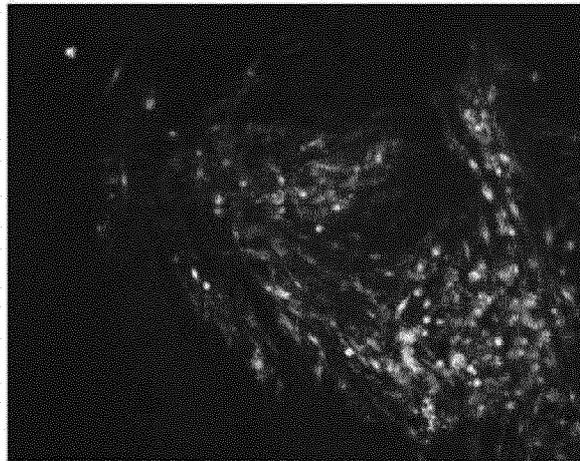
ФИГ. 3



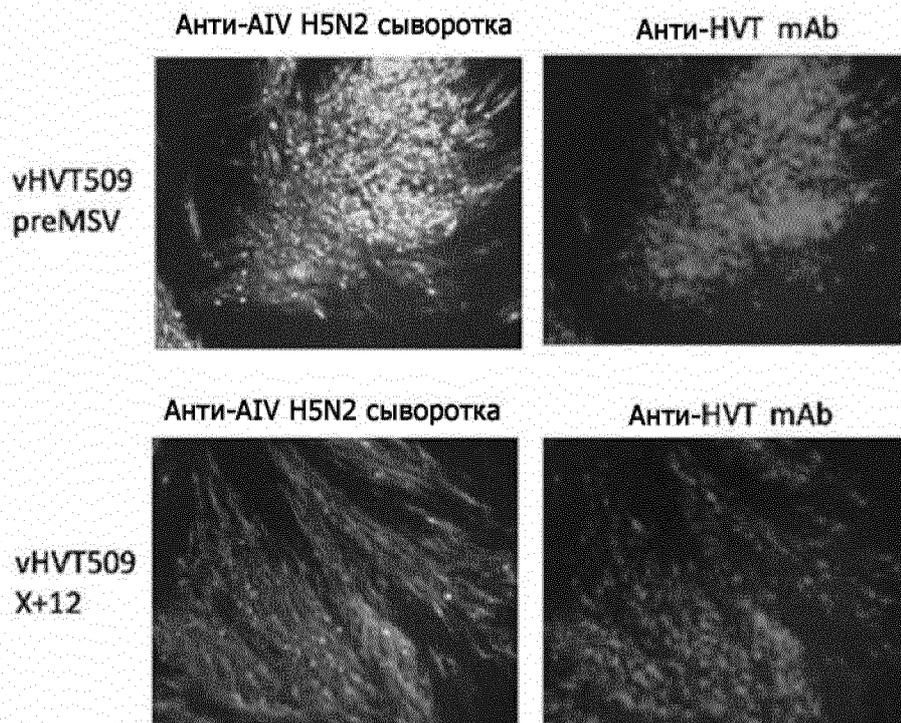
Фиг. 4



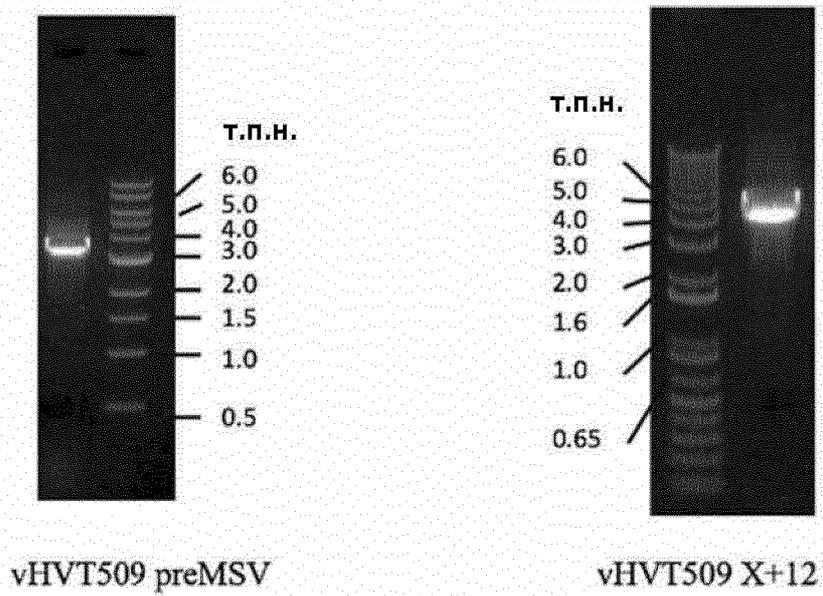
Фиг. 5



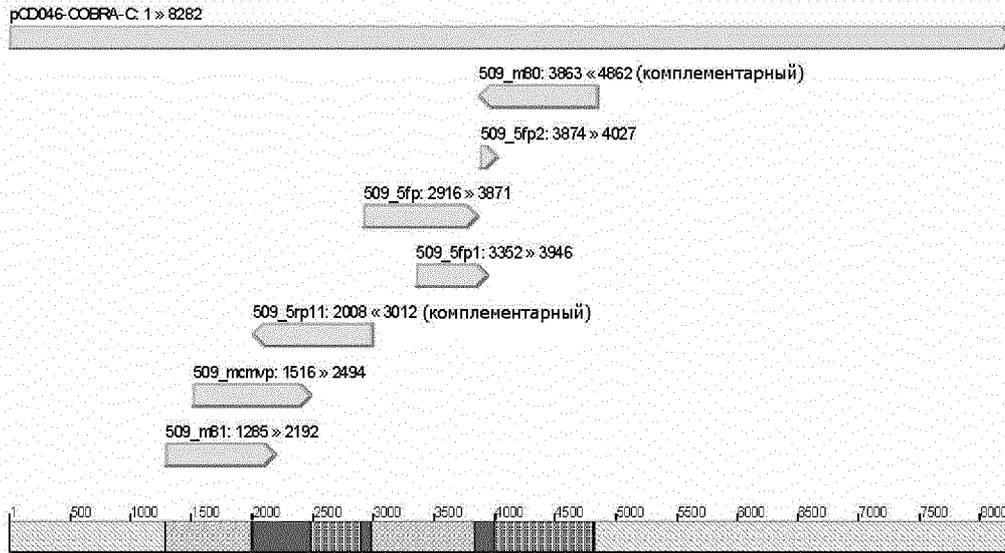
Фиг. 6



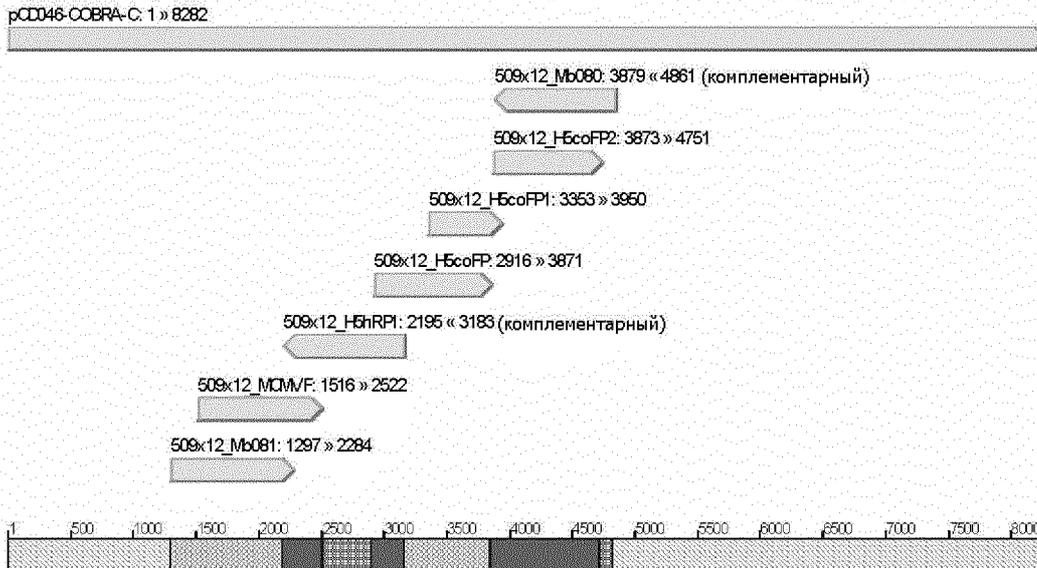
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

МВ081 (прямой)

1 ТААСТСААТ GCGAAGCGTT GCACGTCTGC GATAАСТАСG ССТАСТАТGC
51 АСАТТГТТАС ТССТГСАТСТ ТАААААТАТА ТССТГТАGТА АТТТТСАСAG
101 СААТГТСАТА АСАТСАТСТС GСТАААГААТ GАССТGGGAT TGGAGAAGTA
151 АТГААТАТТТ GСААССААТG САТТГААТАА АСТААСАТТА ААСГААТТСА

мCMV.F (прямой)

201 СТАГТGGATC CCCCААСТСС GССCGТТТТА TGAСТАGAАC СААТАGТТТТ
251 ТААТGCCAAA TGCACTGAAA ТССССТААТТ TGCAAAAGCCA AACGCCCCCT
301 АТГТGAGTAA TACGGGGACT ТТТТАСССАА ТТТСССАAGC GGAAAGCCCC
351 СТААТАСАСТ САТАТGGCAT АТГААТСАGС АCGGTCAТGC АСТСТААТGG
401 CGGCCCATAG GGACTТТССА САТАGGGGGC GTTCACCATT TCCCAGCATA
451 GGGGTGGTGA СТСААТGGCC ТТТАСССАAG TACATTGGGT СААТGGGAGG
501 ТАAGCCAATG GGТТТТТССС АТТАСТGGCA AGCACACTGA GTCAAAATGGG
551 АСТТТТССАСТ GGGТТТТGCC САAGTACATT GGGTCAATGG GAGGTGAGCC
601 ААТGGGAAA ACCCATTGCT GССАAGTACA СТGACTCAAT AGGGACTТТC
651 СААТGGGТТТ ТТССАТТGТТ GGCAAGCATA ТАAGGTCAAT GTGGGTGAGT
701 СААТАGGGAC ТТТССАТТGT АТТСТGСССА GTACATAAGG TCAАТАGGGG
751 GTGAATCAAC AGGAAAGTCC САТТGGAGCC AAGTACACTG CGTCAATAGG
801 GACTТТТССАТ TGGGTТТТGC ССАGTACATA AGGTCAATAG GGGATGAGTC
851 ААТGGGAAA ACCCATTGGA GССАAGTACA СТGACTCAAT AGGGACTТТC
901 САТТGGGТТТ TGCCCAGTAC АТАAGGTCAA TAGGGGGTGA GTCAACAGGA
951 AAGTCCCATT GGAGCCAAGT АСАТТGAGTC ААТАGGGACT ТТССААТGGG
1001 ТТТТGCCCAG TACATAAGGT СААТGGGAGG ТАAGCCAATG GGТТТТТССС
1051 АТТАСТGGCA CGTATACTGA GTCAТТАGGG АСТТТССААТ GGGТТТТGCC
1101 CAGTACATAA GGTCAATAGG GGTCAATCAA CAGGAAAGTC ССАТТGGAGC
1151 САAGTACACT GAGTCAATAG GGACTТТССА ТТGGGTТТТG СССAGTACAA
1201 AAGGTCAATA GGGGGTGAГT СААТGGGТТТ ТТСССАТТАТ TGGCACGTAC
1251 АТАAGGTCAA TAGGGGTGAG TCAТТGGGTТ ТТТССAGCCA АТТТААТТАА
1301 AACGCCATGT АСТТТСССАС САТТGACGTС ААТGGGCTAT TGAААСТААТ
1351 GCAACGTGAC СТТТАААСGG TACTТТСССА TAGCTGATTA АТGGGAAAGT
1401 ACCGTТСТCG AGCCAATACA CGTCAATGGG AAGTGAAAGG GCAGCCAAAA
1451 CGTAAACCCG CCCC GTТТТТ ССССТGGAAA ТТССАТАТТG GCACGCATTC
1501 ТАТТGGCTGA GCTGCGTТСТ АCGTGGGTAT AAGAGGCGCG ACCAGCGTCTG
1551 GTACCGTCCG AGTCTTCCGT СТGACCACCG TAGAACGCAG AGCTCCCTCGC

Н5ооFP (прямой)

1601 TGCAGGCGGC CGCATGGAGA АААТАGТGCT ТСТТСТТGCA АТАGТСАGTC
1651 TTGTТАААAG TGATCAGATT TGCATТGGTT ACCATGCAAA СААСТCGACA
1701 GAGCAGGTТG АСАСААТААТ GGAAAAGAAC GTTACTGTТА САСАТGCCCA
1751 AGACATACTG GAAAAGACAC АСААСGGGAA GCTCTGCGAT СТАGATGGAG
1801 TGAAGCCTCT ААТТТТGAGA GATТGТАGTG TAGCTGGATG GCTCCTCGGA
1851 AACCCSTATGT GTGACGAATT САТСААТGTG СCGGAATGGT СТТАСАТАGT
1901 GGAGAAGGCC AGTCCAGCCA АТGACCTCTG ТТАСССАGGG GATТТСААСG

Н5ооRP1 (обратный)

1951 АСТАТGAAGA АСТGAAACAC СТАТТGAGCA GAATAAACCA ТТТТGAGAAA

Н5ооFP1 (прямой)

2001 АТТСАGATCA ТССССАААAG ТТСТТGGTCC ААТСАТGAAG ССТСАТСАGG
2051 GGTGAGCTCA GCATGTCCAT ACCAGGGGAA GTCCCTCTTT ТТСАGAAATG
2101 TGGTATGGCT ТАТСААААAG ААСAGTGCAT ACCCAACAAT ААAGAGGAGC
2151 TACAATAATA ССААССААGA AGATCTТТТG GTACTGTGGG GGATТСАССА
2201 ТССТААТGAT GCGGCAGAGC AGACAAAGCT СТАТСААААС ССААССАССТ
2251 АТАТТТССGT TGGGACATCA АСАСТАААСС AGAGATТGGT ACCAAAAATA
2301 GCTACTAGAT ССААAGTAAА СGGGCAAAGT GGAAGAATGG AGТТСТТСТG

2351 GACAATTTTA AAGCCGAATG ATGCTATCAA CTTCGAGAGT AATGGAAATT
 2401 TCATTGCTCC AGAATATGCA TACAAAATTG TCAAGAAAAGG GGA CTACAGCA
 2451 ATTATGAAAA GTGAATTGGA ATATGGTAAC TGCAACACCA AATGTCAAAC
 2501 TCCAATGGGG GCGATAAACT CTAGTATGCC ATTCCACAAC ATACACCCTC
 H5coFP2 (прямой)
 2551 TCACCATCGG GGAATGCCCC AAATATGTGA AATCAAACAG ATTAGTCCTT
 2601 GCGACAGGGC TCAGAAATAG CCTTCAAAGA GAGACAAGAG GACTATTTGG
 2651 AGCTATAGCA GGTTTTATAG AGGGAGGATG GCAGGGAATG GTAGATGGTT
 2701 GGTATGGGTA CCACCATAGC AATGAGCAGG GGAGTGGATA CGCTGCAGAC
 2751 AAAGAATCCA CTCAAAAGGC AATAGATGGA GTCACCAATA AGGTCAACTC
 2801 GATCATTGAC AAAATGAACA CTCAGTTTGA GGCCGTTGGA AGGGAATTTA
 2851 ATAАCTTAGA AAGGAGAATA GAGAATTTAA ACAAGAAGAT GGAAGACCGA
 2901 TTCCTAGATG TCTGGACTTA TAATGCTGAA CTTCTGGTTC TCATGGAAAA
 2951 TGAGAGAАCT CTAGACTTCC ATGACTCAAА TGTCAAGAAC CTTTACGACA
 3001 AGGTCCGACT ACAGCTTAGG GATAATGCAA AGGAGCTGGG TAACGGTTGT
 3051 TTCGAGTTCT ATCACAАATG TGATAATGAA TGTATGGAAA GTGTAAGAAA
 3101 CGGAACGTAT GACTACCCGC AGTATTCAGA AGAAGCAAGA CTAAAGAGAG
 3151 AGGAAATAAG TGGAGTAAAА TTGGAATCAA TAGGAACTTA CCAAATACTG
 3201 TCAATTTATT CAACAGTGGC GAGTCCCTA GCACTGGCAA TCATGGTGGC
 3251 TGGTCTATCT TTATGGATGT GCTCCAATGG ATCGTTACAA TGCAGAATTT
 3301 GCATTTAAGC GGCCGCGGGG ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT
 3351 TTGGACAAAC CACAАCTAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT TATTTGTGAA
 3401 ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC ATTATAAGCT GCAATAAACA
 3451 AGTTAACAAC AACAАTTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG
 3501 TGTGGGAGGT TTTTTCGGAT CCTCTAGAGT CGACAАTTAT TTTATTTAAT
 3551 AACATATAGC CCAAAGACCT CTATGAACAT TTAGTTTCCC GTATACTCAA
 MB080 (обратный)
 3601 CGGCGCGTGT ACACACGCAT CTCTTTGCAT AGCGATGAAG TTTGTTCC

Фиг. 11

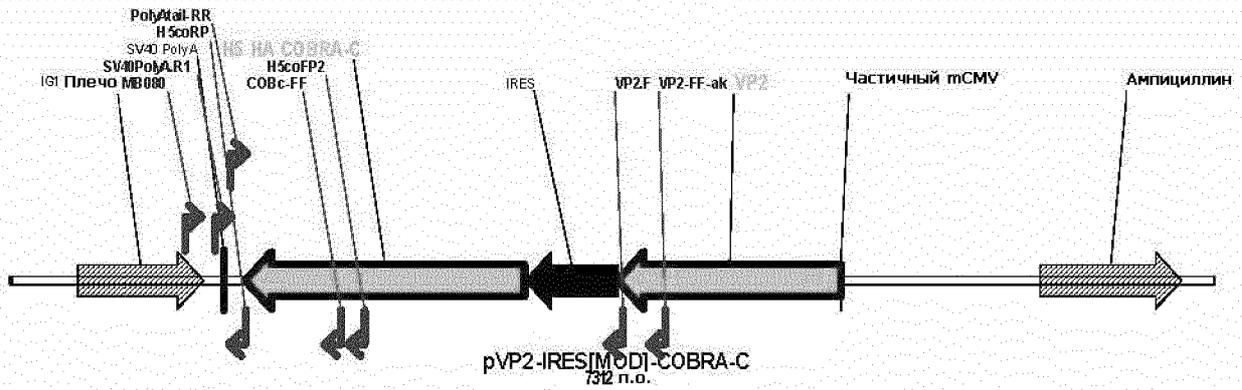
1 MEKIVLLLAИ VSLVKS DQIC IGYHANNSTE QVD TIMEK NV TVTHAQDILE
 51 KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAS
 101 PANDLCYPGD FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSN HEASSGVSSA
 151 CPYQ GKSSFE RNVVWLIKKN SAYPTIKRSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 201 AEQTKLYQNP TTYISVGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 251 PNDAINFESN GNFI APEYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
 301 INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NR LVLA TGLRNSPQRE TRGLFGAIAG
 351 FIEGGWQGMV DGWYGYHHSN EQGSGYAADK ESTQKAIDGV TNKVNSIIDK
 401 MNTQFEAVGR EFN NLERRIE NLNKKMEDGF LDVWTYNAEL LVL MENERTL
 451 DFHDSNVKNL YDKVRLQLRD NAKELGNGCF EPHYKCDNEC MESVRNGTYD
 501 YPQYSEEARL KREIISGVKL ESIGTYQILS IYSTVASSLA LAIMVAGLSL
 551 WMCSNGSLQC RICI*

Фиг. 12

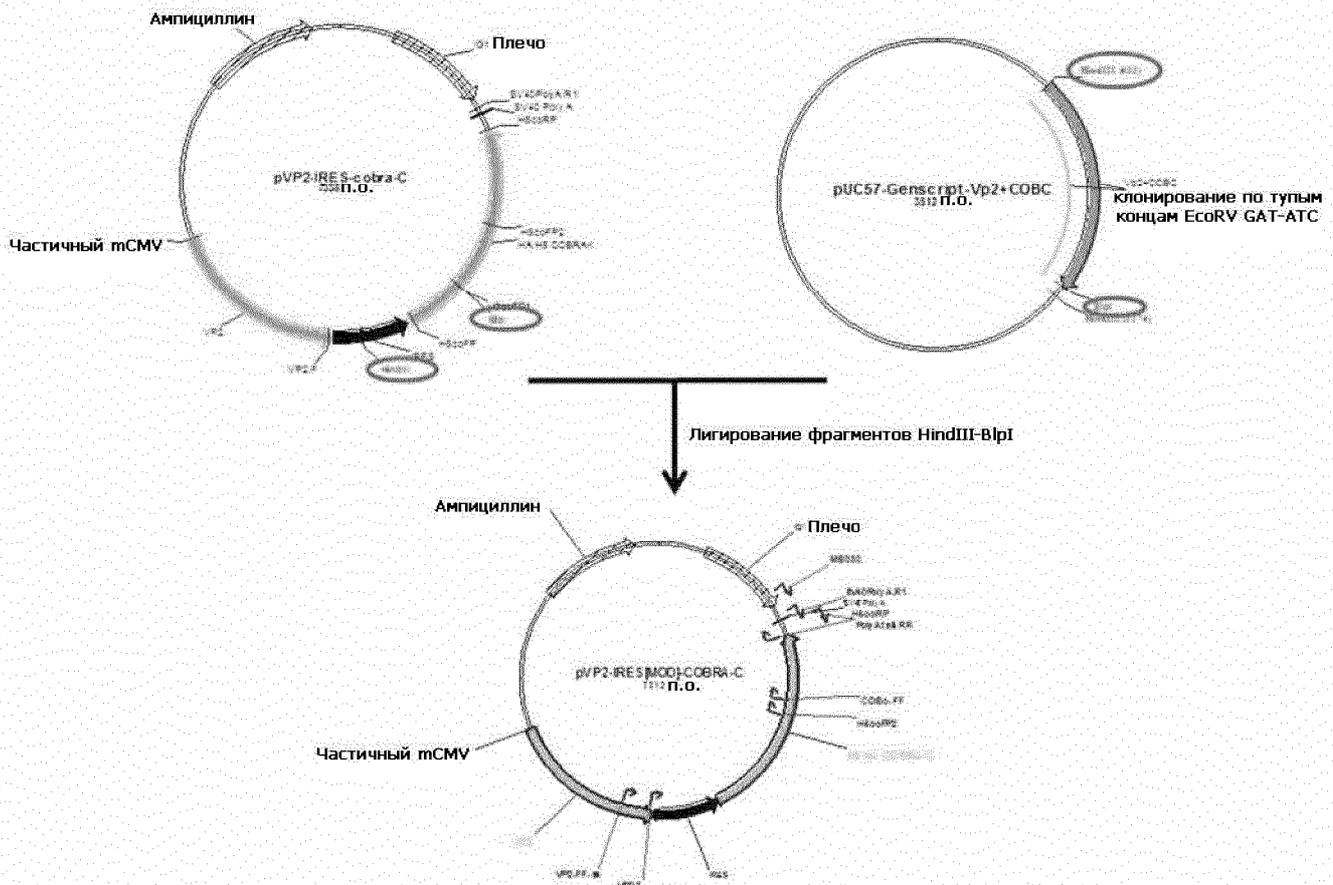
TAACTCAAATGCGAAGCGTTGCACGTCTGCGATAACTACGCCTACTATGCACATTGTT
ACTCCTGCATCTTAAAAATATATCCTGTAGTAATTTTCACAGCAATGTCATAACATCA
TCTCGCTAAAGAATGACCTGGGATTGGAGAAGTAATGAATATTTGCAACCAATGCATT
GAATAAACTAACATTAAACGAATTCAGTGGATCCCCCAACTCCGCCGTTTTATG
ACTAGAACCAATAGTTTTTAATGCCAAATGCACTGAAATCCCCTAATTTGCAAAGCCA
AACGCCCCCTATGTGAGTAATACGGGGACTTTTTACCCAATTTCCCAAGCGGAAAGCC
CCCTAATACACTCATATGGCATATGAATCAGCACGGTCATGCACTCTAATGGCGGCC
ATAGGGACTTTCCACATAGGGGGCGTTCAACATTCCCAGCATAGGGGTGGTGACTCA
ATGGCCTTTACCCAAGTACATTGGGTCAATGGGAGGTAAGCCAATGGGTTTTCCCAT
TACTGGCAAGCACACTGAGTCAAATGGGACTTTCCACTGGGTTTTGCCCAAGTACATT
GGGTCAATGGGAGGTGAGCCAATGGGAAAAACCCATTGCTGCCAAGTACACTGACTCA
ATAGGGACTTTCCAATGGGTTTTCCATTGTTGGCAAGCATATAAGGTCAATGTGGGT
GAGTCAATAGGGACTTTCCATTGTATTCTGCCAGTACATAAGGTCAATAGGGGGTGA
ATCAACAGGAAAGTCCCATTGGAGCCAAGTACACTGCGTCAATAGGGACTTTCCATTG
GGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAATAGGGGATGAGTCAATGGGAAAAACCCATTGGA
GCCAAGTACACTGACTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTC
AATAGGGGGTGGTCAACAGGAAAGTCCCATTGGAGCCAAGTACATTGAGTCAATAGG
GACTTTCCAATGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAATGGGAGGTAAAGCCAATGGGTT
TTTCCATTACTGGCACGTATACTGAGTCATTAGGGACTTTCCAATGGGTTTTGCCCA
GTACATAAGGTCAATAGGGGTGAATCAACAGGAAAGTCCCATTGGAGCCAAGTACACT
GAGTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTTGCCCAGTACAAAAGGTCAATAGGGGGTGA
GTCAATGGGTTTTTTCCATTATTGGCACGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAGTCATTG
GGTTTTTTCCAGCCAATTTAATTTAAAACGCCATGTACTTTCCCACCATTGACGTCAATG
GGCTATTGAAACTAATGCAACGTGACCTTTAAACGGTACTTTCCCATAGCTGATTAAT
GGGAAAGTACCGTTCTCGAGCCAATACACGTCAATGGGAAAGTAAAAGGGCAGCCAAAA
CGTAACACCCGCCCGGTTTTCCCCTGGAAATTCATATTTGGCACGCATTCTATTGGCT
GAGCTGCGTTCTACGTGGGTATAAGAGGCGCGACCAGCGTCCGGTACCGTCCGAGTCTT
CGGTCTGACCACCGTAGAACGCAGAGCTCCTCGCTGCAGGCGGCCGCATGGAGAAAAT
AGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTAC
CATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTA
CACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGG
AGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCCT
ATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAGTC
CAGCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAACGACTATGAAGAAGTGAACACCT
ATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTGAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCC
AATCATGAAGCCTCATCAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGGAAGTCTCCT
TTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTGCATACCCAACAATAAAGAG
GAGCTACAATAATAACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCT
AATGATGCGGCAGAGCAGACAAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTG
GGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAA
CGGGCAAAGTGGAAAGAAATGGAGTCTTCTGGACAATTTTAAAGCCGAATGATGCTATC
AACTTCGAGAGTAATGGAAATTTCAATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTTGTCAAGA
AAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAATG
TCAAACCTCAATGGGGGCATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTC
ACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCTTGGCAGAGGGC
TCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGACAAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTAT
AGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGTACCACCATAGCAATGAG

CAGGGGAGTGGATACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCA
CCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAG
GGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACCGA
TTCCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAA
CTCTAGACTTCCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTACGACAAGGTCCGACTACAGCT
TAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGAT
AATGAATGTATGGAAAGTGTAAAGAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAG
AAGCAAGACTAAAGAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTA
CCAAATACTGTCAATTTATTTCAACAGTGGCGAGTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTG
GCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTT
AAGCGGCCCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTTGATGAGTTTGGACAAACCACA
ACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTAT
TTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTAT
GTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTCGGATCCTCTAGAGTCGACAATT
ATTTTATTTAATAACATATAGCCCAAAGACCTCTATGAACATTTAGTTTCCCGTATAC
TCAACGGCGCGTGTACACACGCATCTCTTTGCATAGCGATGAAGTTTGTTCG

Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

tcggcggttcgggtagcagggtgaaaacctctgacacatgcagctccgggagacggcgcacagcttgctgtaagcggatgcccgggag
 cagacaagcccgtcagggcggtcagcgggtggtggcggtgctggggctggcctaaactatgggcatcagagcagattgactgag
 agtgcaccatatcggtgfgaaafaccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgcattcgccattcaggctgcgcaac
 tgttgggaaggggcagtcgggctcctctgctattacgccagctggcgaaagggggatgctgcaaggcgattaagtgggtaa
 cggcagggtttccagtcacgacgttgtaaaccgagggccagtgaaltcttgcctgttcttacaateggcccggagctccttcacagc
 gectcgttcacacttaaacacaaaatagctacagggctatatgggagccagactgaaactcacatatgactaatattcgggggtg
 ttagtcacgtgtagcccattgtgtgcatataacgagtgtggacgcgtcttattcgcggtgtaacttgatactatggcagcggcagc
 ggatattcctcctcgtcctcgttaacatctctacgggtcagaatgtttggcatgctcgtcagatcctttgcccacgttgcaaatfaca
 agtcgagtcgcatgaccgcgataagcctgtaccatgtggcattaggggtgacatctcagatcacaattafaaagaccaacgtgcga
 gtcttcaaaagacctgcacgccttctctcggattgtcaacgggtctcagaatctatgcccatactggcggttgagaccattgtg
 cgttfaatgaacaataaaagcggcatgcatggaaaggaggctgcagatctccatcttctcagccactatectggacgctgtag
 acgataattafaccatgaatagagggggatgtttcactgcccactgtgatgataangtttctccagattgtttggatactgca
 tctgctgcccgaacaaactcctcctcctatgcaaaagagatgcggtgtgacacggcggcttgagtatacgggaaactaaatgttcat
 agaggctcttgggctatatgttattaaataaaataatgtcagacctgcaggcttagaggatccgaaaaaacctcccacaactccc
 ctgaacctgaacataaaatgaatgcaattgttgtttaaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcacc
 acaaatctcacaataaagcatttttctcactgcaattctagttgtggtttgcccacactcacaatgtatcttateatgtctggatecc
 cggggccggcccgggatccgatgcccgccttaaatgcaaatctgcattgtaacgatccattggagcaccataaagataga
 ccagccaccatgattgcagtgctagggaaactcgccactgtgaataaattgacagatattggtaagttctattgatccaattt
 actccacttattctctctctttagtcttctctctgaaactgcccggtagtcaactgctcgtttcttcaacttccatacattcatt
 atcacattgtgatagaactcgaacaacgcttaccagctccttgcattatecctaagctgtagtcggacettgtcgtaagggt
 ctgacatttgagtcaggaagctctagagttctctcattttccatgagaaccagaagttcagcattataagtcagacatctagga
 atcgtcttccatctcttgtttaaattctctattctctcttaagtattaaattcccttccaaaggcctcaaacctgagtggtcattttg
 tcaatgatcgagttgacctattgggtgactccatctattgcccctttgagtggtattctttgctgcagcgtatccactcccctgctcattg
 ctatggtggtaccataccaaccatctaccattccctgcacctccctctataaaacctgctatagctccaaatagctctcttctct
 ctctttgagggctattctgagccctgtcgaaggactaatctgtttgattcacatattggggcattcccagatggtgagagggt
 gtatgtgtggaatggcactagagttategccccattggagttgacatttggtgtgagttaccatattcaattcaactttc
 ataattgctgagtccectttctgacaattttgatgcatattctggagcaatgaaattccattactctgaagttgatagcatcatt
 cggctttaaattgtccagaagaactccatttccactttgcccgttactttggatctagtagctatttttggtaccaatctctggtt
 tagtgtgatgctccaacggaaataggtggtgggtttgatagagcttctctgctcgcgcacattaggatggtgaaatccc
 ccacagtaacaaaagatctcttgggtggtattattgtagctcctcttattgttgggtatgcaactgttcttttgataagccataccac
 attctgaaaaaggaggacttcccctggtatggacatgctgagctcaccctgatgaggcttcatgattggaccaagaactttgg
 ggatgatcgaatttctcaaaatggttattctgctcaataggtgttccagttctcatagctgttgaateccctgggtaacagag
 gtcattggctggactggccttctcactatgtaagaccattcgggcacattgatgaattgctcacacatagggttccgaggagcc
 atccagctacactacaatctcacaattagaggcttccactccttagatcgcagagcttcccgtgtgtgtctttccagtatgct
 ttggcatgtgtaacagtaacgttcttccattattgtgcaactcgtctctgagagttgtttgcatgtaaaccaatgcaaatctgat
 cacttttaacaagactgactattgcaagaagaagcactattttccatggtattateatcgtgttttcaaaaggaaaaccagctc
 ccgtggtcggggggcctagacgttttttaacctcgaactaacacatgtaaacatgctgaccagagcccccagatcagatccc
 acaatggggtaactcttgggcatcttcagccccttggtaaacgcttgaggagagccattgactcttccacaactatccaaact
 cacaacgtggcactggggtgtgcccctttgaggggtatcttatacagctggcctttggccgagaggccactgctgcccagggtg
 ggggttccgctgctcaaaagggtcctacagacgttgttcttcaagaagcttccagaggaaactgcttctcagcagacttcc
 aacagacctgacttcttggcgagaggggaaagacccttaggaatgctcgtcagaagacagggccagggttccgggccc
 cacattgcaaaaagacggcaaatatggtggaaaataacatatagcaaaacgcacaccggccttattccaaaggccttccggccag
 taacgttaggggggggggttacctcttatagccggattatgctttgaagccaaatgctcctgcaatctcaggggagagttga
 ggtggccactctcatgaagtactcagaaaatcaggtactccttgttggcagacggcttctgatgcaaacgggctcctctc
 actcagtatcaattttgttagtctatggctcctgggtcaaatcggcgtattctgtaaccagggtcttctgtagtccaggatttgg
 atcagctcgaagttactcaccaccagcagccgtaacgacggatcctgttgcactcttctgtaggctactagtgtaggggacgga

gggccctggatagttgccaccatggatcgtcactgctaggctcccactgcecgaccatgacatctgatccctgectgaccacc
 acttttggaggtaactatctcagtttgatggatgtatggctgggtatctcattggttggaaatgacaagattgaatggcataag
 attgtcgggtccggccgtcagccattatctgggctacagctctgggtattaccgcagtcceatcaaagcctataaggtatg
 gtggcgcccagttacaaggcctggacgctgtttgaaacacgagctctcccgaatgctgaggctgtgatagcatcaatgttgg
 ctgagaacagtggtatttaccacacctgggtgactgtgatgagaattggtaatcatcggtcagttatgggttagactctg
 ggctgtcactgctgcatgtagctaccattttgggtcaagccctatagcgggaatggggcaccagaagcctcacataacca
 gatcatatgatgtgggtaggctgaggacagtgacccttcccctaccaggacattcccattttgtcgttgatgttggctgttcag
 acatcaaccattgtagctaacatctgtcagttcactcaggcttcttgggaaggctacggcgttatgggtccggttagtgcataaa
 cgccaccagggagtgcttgacctcactgtgagactccgactcactagtctgcagtagttgtagctggccggtaggtctgggg
 agtcaggagcactctgatcgaactgttagttccattgctctgcagtggttagtgagcaccacaattgagccagggnaaccaggg
 aaaaagacaattagccctgacctgtgtccccacagtcaaatgttaggtcgaggtctctgacctgagagtggtcttctcaggg
 tctctcgggaatggacgcccgggtgttggcatcagaaggctccgatatgaacggaacaatctgttgggtttagcttgcag
 gtttgcategctgcgacgacgagttctagagcggccggcggcgtaatcatggtcatagctgttccctgttgaaattgtatccgctcaca
 attccacacaacatacagccgggaagcataaagtgtaaagcctgggtgcccctaatgagtgagctaactcactaattgctgtcgcctca
 ctgcccgtttccagtcgggaacctgtctgcccagctgcatlaaatgaatcggccaacgcgggggagaggcgggttgcgtattgggog
 ctctccgcttccctgctcactgactcgtcggctcggctcggctcggcggagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggfta
 tccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagggaaccgtaaaaaggccgctgtct
 ggggttttccataggctcgcggccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaacccgacaggactataa
 agataccagggcttccctgggaagctccctgctgctctcctgttccgacctgcccgttaccggatactgtccgcttctcctctc
 gggaaagcgtggcgttctcctatagctcagctgttaggtatctcagttcgggtgtaggtctgtcctcaagctgggctgtgtgcaggaacco
 ccggtcagcccagccgtcgcctfatccggtaactatcgtcttgagccaaccggtaagacacgactatcggcactggcagcagcc
 actggtaacaggatagcagagcggatgtatggcgggtctacagagttcttgaagtgtggcctaactacggctacactagaagaac
 agtatttgatctcgtctctgtaagccagttaccctcggaaaaagagttgtagctcttgcggcaaacaaaccaccgctgttagc
 ggtgtttttttgttcaagcagcagattacgogcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgacttttctacggggctctgagctcag
 tggaacgaaaaactcaggttaagggtttgtcatgagattcaaaaaaggatctcactatagatccttttaaatlaaaaatgaagttttaaatc
 aatctaaagtatatatgagtaaaactgtctgacagttaccaatgcttaatoagtgggcaacctatctcagcgatctgtctatttctcatoca
 tagttgctgactcccgtctgttagataactacgatacgggagggttaccatctggcccagtgctgcaatgataccgcgagaccac
 gctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaacttaccgctccatc
 cagctatfaattgttggcgggaagctagagtaagtagttccagtaataatgttggccaacgttgttccattgctacaggcatctgtgtg
 tcacgctcgtcttggatgcttcaactcagctccgggttcccaacgatcaaggcagttacatgatccccatgttgtcaaaaaagcggf
 tagctcctcggctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagttatcactcatggtatggcagcactgcataattctctactgtc
 atgccatccgtaagatgctttctgtactggtgagtaactcaaccaagctattctgagaatagtgatcggcgaccgagttgctcttccc
 ggcgtaalacgggataalaccgcgccacatagcagaacttlaaaagtgtcalcattggaaaacgttcttccggggcgaaaactctcaag
 gatcttaccgctgttagatccagttcagatgaacccactcgtgacccaactgatcttcagcatctttacttccaccagcgttctgggtga
 gcaaaaaacagggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataaggcgcacacggaaatgttgaatactcatacttctcttttcaatatt
 gaagcattatcaggggttattgtctatgagcggatcacatattgaaatgatttagaaaaataacaataaggggtccgacatttccc
 gaaaagtgccacctgactaagaacattattatcatgacattaacctataaaaatagggctacacagggcccttctc

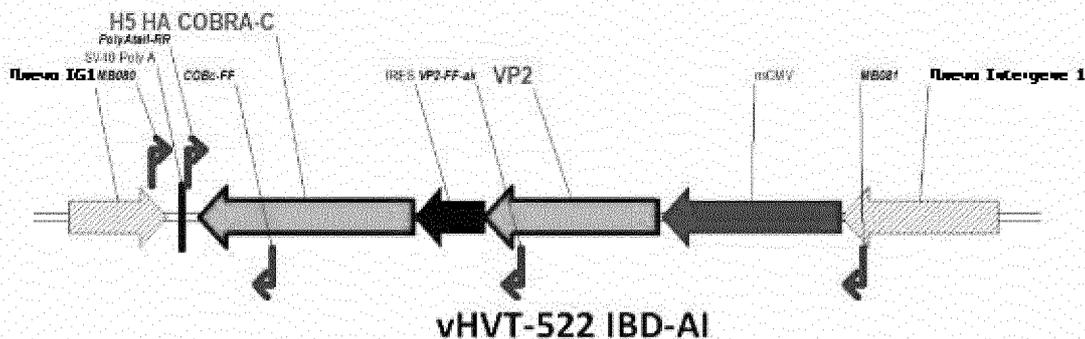
Фиг. 16

MTNLQDQTQQIVPFIRSLLMPTTGPASIPDDTLEKHTLRSETSTYNLTVGDTGSGLIVFF
 PGFPGSIVGAHYTLQSNNGNYKFDQMLLTAQNLPASYNYCRLVSRSLTVRSSTLPGGVY
 ALNGTINAVTFQGSLSLTDVSYNGLMSATANINDKIGNVLVGE GVTVLSLPTS YDLG
 YVRLGDPIAIGLDPKMVATCDSSDRPRVYTTTAADDYQFSSQYQPGGVTTITLESANID
 AITSLSIGGELVFQTSVQGLVLGATTYLI GFDTAVITRAVAADNGLTAGTDNLMPFNL
 VIPTNEITQPITSIKLEIVTSKSGGQA GDQMSWSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVA
 YERVATGSVVTVA GVSNFELIPNPELAKNLVTEYGRFDPGAMNYTKLLSERDRLGIK
 TVWPTREYTDFREYFMEVADLNSPLKIA GAFGFKDIIRAIRR

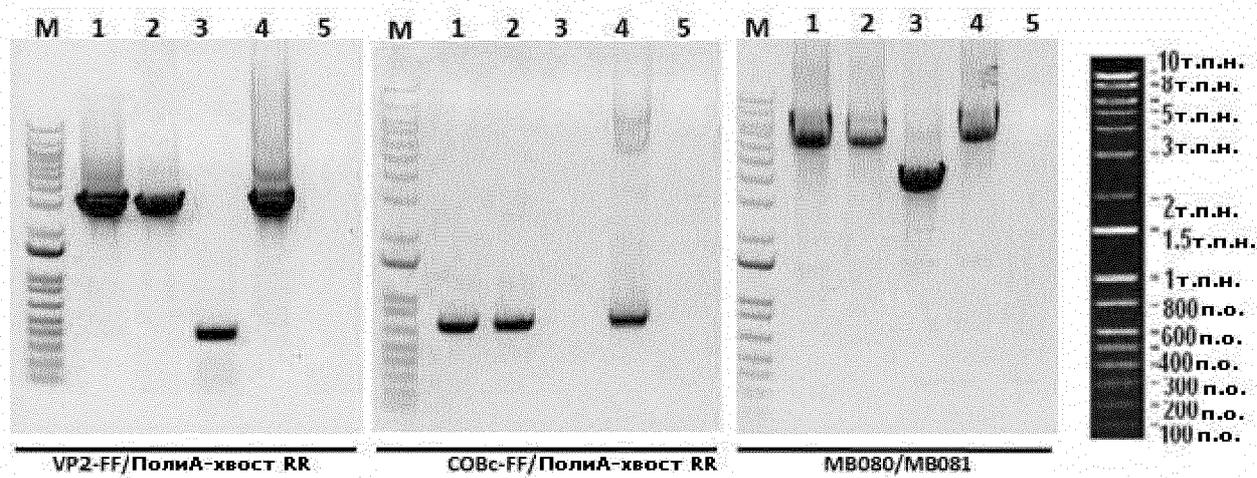
Фиг. 17

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLC
 DLDGVKPLILRDCSVA GWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKASPANDLCYPGDFNDYE
 ELKHLISRINHFEKIQIPKSSWSNHEASSGVSSACPYQKSSFFRNVVWLIKKNSA YPT
 IKRSYNNNTNOEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRS
 KVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCN
 TKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRETRGLFGAIA G
 FIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFE
 AVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYD
 KVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVK
 LESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI-

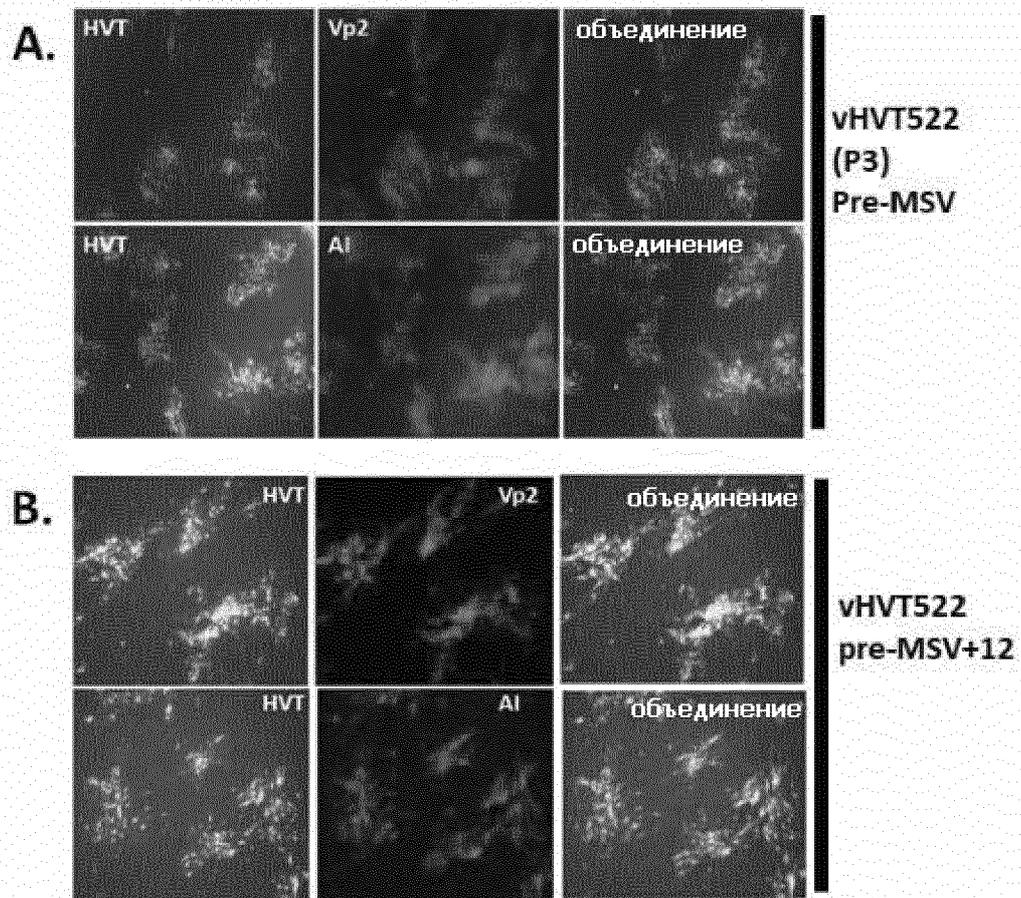
Фиг. 18



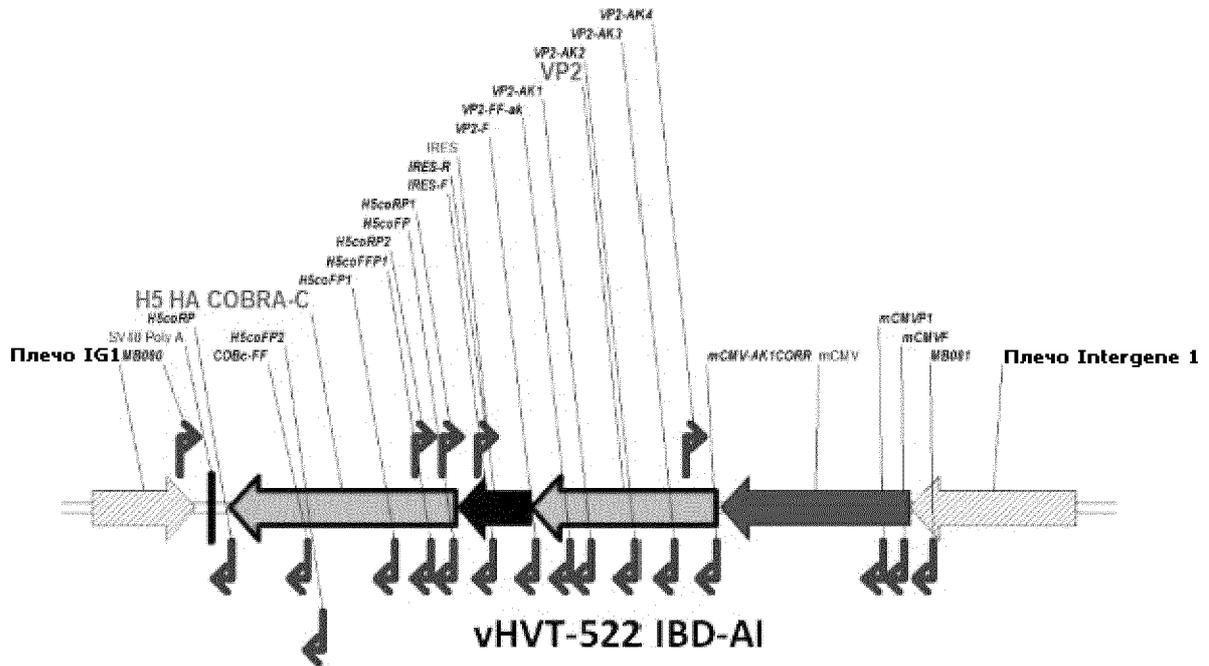
Фиг. 19



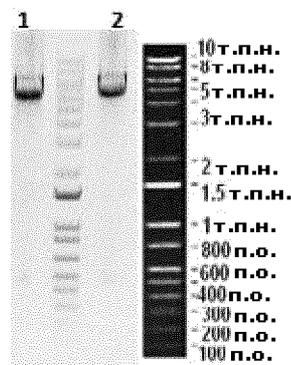
ФИГ. 20



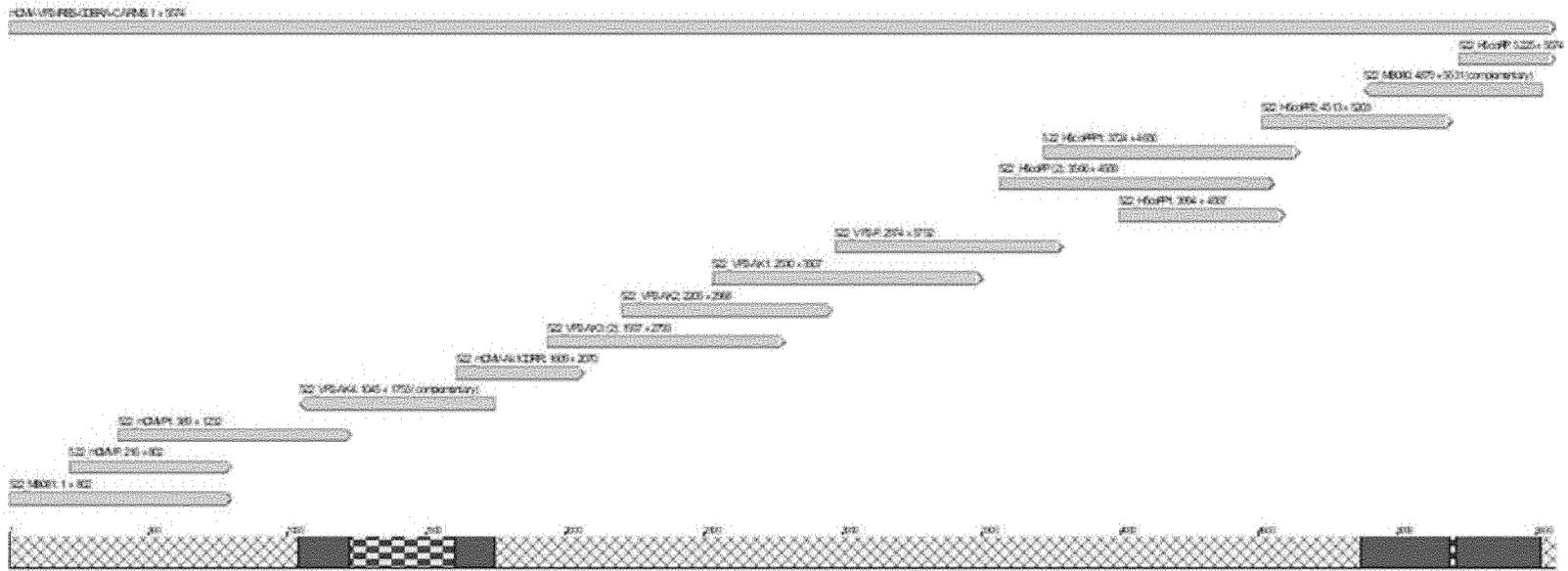
ФИГ. 21



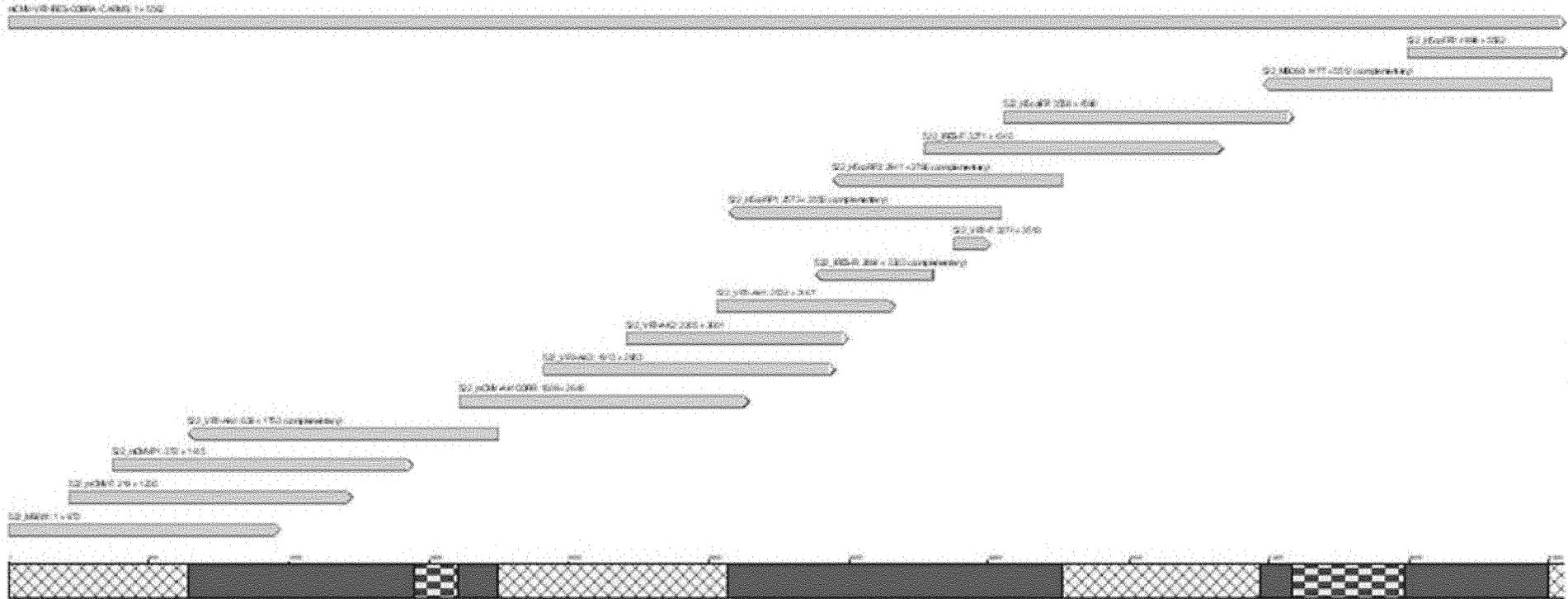
ФИГ. 22



ФИГ. 23



Фиг. 24



19/46

ФИГ. 25

1051 CGAACAAACTTCATCGCTATGCAAAGAGATGCGTGTTACACGGCCCGTTGAGTATACGGGAAAC
 MB080

1121 TAAATGTTTCATAGAGCTTTGGGCTATATGTTATTAATAAAATAAATTGTCGACCCCTGCAGGTCTAGAG
 1191 GATCCGAAAAAACCTCCCACACC~~CCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAAAC~~
 1261 TTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATTACAAATTTACAAATAAAGCATTTT
 1331 TTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGATCTTTATCATGTCTGGATCCCCCGCGGC
 1401 CGCCCCGGGATCCGATGCGGGCCGCTTAAATGGAAATTCCTCATTGTAAASATCCATTGGAGCACATCCAT
 H5coRP

1471 AAAGATAGZCCAEECCACCATGATTGCCAGTETAGGGAACTEGGCACCTGTTGAATAAAATTGACAGTATTT
 1541 GSTAACTTCCTATTGATTCCAATTTTACTCCACTTATTTCTCTCTCTTTTNGTCTGCTTCTCTCTSAATA
 1611 GTGGGGTFAZFCATAGCTTCGGTTTCTTACACTTTCGADACATTCATTATCAATTTGIGATAGAACTGG
 1681 AAACAACCCCTTACCCAGCTTCCTTTGCATTATCCCTAAGCTTSTAGTCCGGACCTTGTCTGTAAGGTTCTTGA
 1751 CATTTGAGTCATGSAACTCTAGAGTTCTCTCATTTTCCATGAGAACCAAGATTCAGGATTAAGTCCA
 1821 GACATCTAGGAATCCGTTTCCATCTGTTCTTAAANTTCTTATTTCTCTCTTTCTAAGTTATTAATTCG
 1891 CTTCCAAACCCCTCAAACCTGAGTCTTCATTTTCTCAATGATCCAGTTGACCTTATTGTTGACTCCATCTA
 1961 TTGGCTTTTGAGTGGATTCCTTTGCTGACCGTATCCACTCCCTGGCTCATTGCTATGGTGTAGCCATA
 COBc-FF

2031 CEAACCATCTACCATTCCCTGCCATCTCCCTCTATAAAACCTGCTATAGCTCCAAATAGTCCCTCTGGGC
 2101 TCTCTTTGAGGCTATTTCCTGAGCCCTGTCCCAAGCACTAATCTGTTTGATTTACATATTTGGGGCAAT
 H5coFP2

2171 CCCCGATGGTGAGAGGCTGTATGTTTGTGAATGCCATACTAGAGTTTATCCCCCCCATTTGAGTTTGACA
 2241 TTTGGTGTTCGASTTACCATATTTCCATTTGACTTTTCATARTTCTGAGTCCCTTTCTTGACATTTTG
 2311 TATCCATATTTCTGAGCAATGAAATTTCCATTACTCTCGAAGTTGATAGCTTCATTTCCCTTTAAATTTG
 2381 TCCAGAAGCACTCCATTTCTTCCACTTTGCCGGTTTACTTTGCAATCTAGTAGCTTATTTTTGTTACCAATCT
 2451 CTGGTTTACTGTTGATGTCCEAACCGAAATATAGCTGGTTGGTTTGGATAGAGETTTGCTCTGGTCTGGC
 2521 GCATCACTAGGATGCTGAATCCCCACAGTACCAAAAGATCTCTTGGTTGATATTATTCTAGCTCTCTCT
 2591 TTATTTTGGCTATGCACTGTTCTTTTGTATAAGCCATGCTGATTTTCTGAAAAGCCAGCACTTCCGCTE
 2661 GTATGGATGCTGAGCTCACCCCTGATGAGGCTTCATGATGGACCAGCACTTTTGGGATGATCTGA
 H5coFP1

2731 ATTTTCTCAAAATGGTTTATCTGCTCAATAGATGTTTCAGTTCTTTCATAGTGGTTGAATCCCCTGGGT
 2801 AACAGAGTTCATTTGGCTGACTGGCTTTCTCCACTATGTAAGACCATTCGGGACATTCGATGAATTCGTC
 H5coRP2

2871 ACACATAGGGTTTCCGAGGAGCCATCCAGCTACACTAGCAATCTCTCAAAAATTAGAGGCTTCACTCCATCT
 2941 AEATCCGAGGCTTCCGCTTGGTGTCTTTTCCAGTATGTCCTTGGGCATGCTAACAGTAACGTTCTTTT
 H5coFFP1

3011 CCATTATTTGTTGCAACTGCTCTGCTGAGTGTCTTTGTCATGCTAAGCAATGCAAAATCTGATCACTTTTAAAC
 H5coRP1

3081 AAGACTGACTATTGGCAAGAGAACTATTTTCTCCATGGTATTATCATCGTGTTTTTCAAAAGGAAAC
 H5coFP

3151 CACGTCCCCTGGTTCCGGGGCCCTAGACGTTTTTTAAACCTCGACTAAACACATGTAAGCATGTGCACC
 3221 GAGGCCCCAGATCAGATCCCATACAATGGGGTACCTTCTGGGCATCCTTCAGCCCCCTGTTGAATACGCT
 3291 TGAGGAGAGCCATTTGACTCTTTCCACAACATCCAACCTCACAACTGGCCACTGGGGTTGTGCCGCCCTT
 IRES-R

3361 GCAGGTGTATCTTATACACGTGGCTTTTGGCCGACAGGGCACCTGTGCCAGGTGGGGGTTCCGCTGCC
 IRES-F

3431 TGCAAAGGGTGCCTACAGACGTTGTTTGTCTTCAAGAAGCTTCCAGAGGAAGCTTCTCCTTACCACATT
 3501 CAACAGACCTTGCATTCCTTTGGCGAGAGGGGAAAGACCCCTAGGAATGCTCGTCAAGAAGACAGGGCCA
 3571 GCTTTCCGGGCCCTCACATTTGCCAAAAGACGGCAATATGGTGGAAAATAACATATAGACAAACGCACACC
 3641 GGCTTTATCCAAAGCCGCTTCGGCCAGTAACGTTAGGGGGGGGGTTACCTCCTTATAGCCCCGATTATG
 3711 TCTTTGAAGCCAAATGCTCCTGCAATCTTACAGGGAGAGTTGAGGTGGGCCACCTCCATGAAGTACTCAC
 VP2-F

3781 GAAAATCAGTGTACTCCCTTGTGGCCAGACGGTCTTGATGCCAAGACGGTCCCTCTCACTCAGTATCAA
 3851 TTTTGTGTAGTTTCATGGCTCCTGGGTCAAATCGGCCGATTTCTGTAACCAGGTCTTTTGCTAGTTCAGGA
 3921 TTTGGAAATCAGCTCGAAGTTACTCACCCAGCCAGCCGTAACGACGGATCCPGTTGCCACTCTTTTCGTAGG
 3991 CTACTAGTGTGACGGGACGGAGGGCCCTGGATAGTTGCCACCATGGATCGTCACTGCTAGGCTCCCACT
 4061 TGCCGACCATGACATCTGATCCCCTGCCTGACCACCACTTTTGGAGGTCACTATCTCCAGTTTGTATGGAT
 4131 GTGATTGGCTGGGTTATCTCATTGGTTGGAATGACAAGATTGAATGGCATAAGATTGTCGGTGGCCGGCCG
 VP2-AK1

4201 TCAGCCCATTAATCTCGGGCTACAGCTCTGGTGATTACCGCAGTCCCATCAAAGCCTATAAGGTAGATGGT
 4271 GGCGCCAGTACAAGCCCTTGGACGCTTGTGTTGAAACACGAGCTCTCCCCAATGCTGAGGCTTGTGATA
 4341 GCATCAATGTTGGCTGAGAACAGTGTGATTGTTACCCACCTGGTTGGTACTGTGATGAGAATTGGTAAT
 4411 CATCGGCTGCAGTTATGGTGTAGACTCTGGCCCTGCACTGCTGTCCGATGTAGCTACCATTTTTGGGTC
 VP2-AK2

4481 AAGCCCTATAGCGGGAAATGGGGTCACCAAGCCTCACATACCCAAGATCATATGATGTGGGTAGGCTGAGG
 4551 ACAGTGACCCCTTCCCTACCAGGACATTCCCAATTTTGTGGTTGATGTTGGCTGTTGCAGACATCAACC
 4621 CATTGTAGCTAACATCTGTCACTCAGTTCACTCAGGCTTCCTTGGAAAGTCACGGCGTTTATGGTCCCGTTAG
 4691 TGCATAAACGCCACCAGGGAGTGTCTTGACCTCACTGTGAGACTCCGACTCACTAGTCTGCAGTAGTTG
 VP2-AK3
 4761 TAGCTGGCCGGTAGGTTCTGGGCAGTCAGGAGCATCTGATCGAACTTGTAGTTCCCATTTGCTCTGCAGTG
 4831 TGTAGTGAGCACCCACAATTGAGCCAGGGAATCCAGGGAAAAAGACAATTAGCCCTGACCCCTGTGTCCCC
 VP2-AK4
 4901 CACAGTCAAATTGTAGGTCGAGGTCTCTGACCTGAGAGTGTCTTCTCCAGGGTGTCTGCGGAATGGAC
 4971 GCCGGTCCGGTTGTTGGCATCAGAAGGCTCCGTATGAACGGAACAATCTGTGGGTTTGTATCTGCAGGT
 5041 TTGTCATCGCTCGGATCGACGAGTTCTAGAGCGGCCCGCTGCAGCGAGGAGCTCTGCGTCTACGGTGGT
 mCMV-AK1CORR
 5111 CAGACCGAAGACTGCGACCGGTACCGACGCTGGTCCGCCCTCTTATACCCACGTAGAACCGAGCTCAGCCA
 5181 ATAGAATGGGTGCCAATATGGAATTCAGGGGAAAACCGGGCGGTGTACGTTTTGGGTGCCCTTTCA
 5251 CTCCCATTGACGTGTATTGGCTCGAGAACGGTACTTTCCCATTAAATCAGCTATGGGAAAGTACCGTTTA
 5321 AAGGTCACGTTGCATTAGTTTCAATAGCCCATTGACGTCATGGTGGGAAAGTACATGGCGTTTTAATTA
 5391 AATTGGCTGGAAAAACCAATGACTCACCCCTATGACCTTATGTACGTGCCAATAATGGGAAAAACCA
 5461 TTGACTCACCCCTATTGACCTTTTGTACTGGGCAAAACCCCAATGGAAAGTCCCTATTGACTCAGTGTAC
 5531 TTGGCTCCAATGGGACTTTTCCTGTTGATTCACCCCTATTGACCTTATGTACTGGGCAAAACCCATTTGAA
 5601 AGTCCCTAATGACTCAGTATACGTGCCAGTAATGGGAAAAACCCATTTGGCTTACCTCCCATTTGACCTTAT
 5671 GTACTGGGCAAAACCCATTTGAAAGTCCCTATTGACTCAATGTACTTTGGCTCCAATGGGACTTTCCGT
 5741 GACTCACCCCTATTGACCTTATGTACTGGGCAAAACCCCAATGGAAAGTCCCTATTGAGTCACTGTACTT
 5811 GGCTCCAATGGGTTTTTCCCATTGACTCATCCCTATTGACCTTATGTACTGGGCAAAACCCCAATGGAAA
 5881 CTCCTATTGACGCAGTGTACTTTGGCTCCAATGGGACTTTCCGTGTTGATTCACCCCTATTGACCTTATG
 5951 TACTGGGCAGAATACAATGGAAAGTCCCTATTGACTCACCCACATTGACCTTATATGCTTGGCAACAATG
 6021 GAAAAACCCATTGGAAAGTCCCTATTGAGTCACTGTACTTTGGCAGCAATGGGTTTTTCCCATTGGCTCAC
 6091 CTCCTATTGACCCCAATGTACTTTGGGCAAAACCCAGTGGAAAGTCCCTATTGACTCAGTGTGCTTGGCAGT
 6161 AATGGGAAAAACCCATTGGCTTACCTCCCATTGACCCCAATGTACTTTGGGTAAGGCCATTGAGTCAACAC
 6231 CCTATGCTGGGAAATGGTGAACGCCCCCTATGTGGAAAGTCCCTATGGGCGCCATTAGAGTGCATGAC
 6301 CGTCTGATTCATATGCCATATGAGTGTATTAGGGGGCTTTCCGCTTGGGAAATGGGTAAAAAGTCCCC
 mCMVP1
 6371 GTATTACTCACATAGGGGGCGTTTTGGCTTTGCAAATTAGGGGATTTCACTGCATTTGGCATTAAAAACTA
 6441 TTGGTTCTAGTCATAAAACGGGCGGAGTTGGGGATCCACTAGTGAATTCGTTTAAATGTAGTTTATTC
 mCMVF
 6511 ATGCATTGGTTGCAAATATTCATTACTTCTCCCAATCCCAGGTCATTTCTTTAGCGAGATGATGTTATGACA
 6581 TTGCTGTGAAAATTACTACAGGATATATTTTTAAGATGCAGGAGTAACAATGTGCATAGTAGGGCTAGTT
 6651 ATCGCAGACGTGCAACGCTTCGCATTTGAGTTA
 MB081

Фиг. 26

cgaacaaacttcacgctatgcaagagatgctgtgtacacggcggcttgagtatacgggaaactaaatgtcatagaggctcttgggct
 atatgttataaataaataattgtcgaccctgcaggtctagaggatccgaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaat
 gaatgcaattgtgtgtaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcafcacaaatttcacaaataaagcattttttca
 ctgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttcatatgtctggatcccccgggcggccccgggctccgatgctggccgctfaa
 atgcaaatctgcattgtaacgatccattggagcacatccataaagatagaccagccaccatgattgccagtgctagggaaactcggcaact
 gttgaataaattgacagtatttggtaagttcctattgattccaaftttactccacttattctctctctttagctctgctctctgaatactgogggf
 agtcatacgttccgtttcttaccatttccatacattatcacaattgtgatagaactcgaacaaccgttaccagctcctttgcattatccct
 aagctgtagtcggaccctgtctgtaaaggttcttgacattgagtcatggaaagtctagagttctctcattttccatgagaaccagaaagtccagc
 attataagtcagacatctaggaatccgtcttccatctctgtttaaattctcttctctcttcttaagttatfaaattcccttccaacggcctcaa
 actgagtgcttatttgcataatgacaggtgaccttattgggtgactccatctattgctctttgagtggaattcttctgctgagcgtatccactcc
 ctgctcattgctatggtgtgaccataccaaccatctaccattccctgccatctctctctataaaacctgctatagctccaaatagctctctt
 gctctctttagggctatttctgagccctgtcgaaggactaactgtttgatcacaatattggggcattccccgatggtgagagggtgta
 tgtgtggaatggcactagagttatcgccccattggagttgacattgggtgtgacgttaccatattccaattcactttcataattgctga
 gtcctctttctgacaatttctatgcatattctggagcaatgaaattccattactctcgaaagttagatcattcggcctttaaattgctcag
 aagaactccattctcactttgcccgttacttggatctagtagctattttggfaccatctctggttagtgtgatgctccaaaggaaatf
 aggtggttgggtttttagatagagctttgtctctctcggcctcattagggatggtgaatccccacagtaacaaaagatctcttgggttggatt
 atttagctcctcttattgttgggtatgcaactgttcttttataagccataccacattctgaaaaaggaggacttccccctgctatggacatgc
 tgagctcaccctgatgaggctctcatgattggaccaagaacttttggggatgctgaattttcctcaaaatggttattctgctcaatagggtgt
 ctacttctcatagctgtgaaatccccctgggtaacagaggtcattggctggactggccttctcactatgtaagaccattccggcacattga
 tgaattcgtcacacataggggttccgaggagccatccagctacactacaatctctcaaaatagaggcttactccatctagatcgcagag
 ctcccggtgtgtctttccagtatgtcttgggcatgtgtaacagtaacgttctttccattattgtgtcaacctgctctgctgagttgttgeat
 ggttaaccaatgcaaatctgatcacttllaacaagactgactattgcaagaagaagcactattttctccatggtattatcactcgtgttttcaaag
 gaaaaccacgtccccgtggtcggggggccttagacgtttttaaactcgcactaaacacatgtaaagcatgtgcaccgaggccccagatc
 agateccatacaatggggfaccctctgggcatcctcagccccctgtgaataccgttggaggagaccattgactcttccacaactatcca
 actcacaacgtggcactgggggttgtgcccctttgcaggtgtatcttatacacgtggcttttggccgcagagggcaccctgtcgcaggggtg
 ggggtccgctgctgcaaaagggtcgtctacagacgttfttcttcaagaagcttccagaggaaactcttccctcagcacttcaacaga
 ccttgcattccttggcgagaggggaaagacccttaggaatgctcgtcaagaagacagggccaggttccgggcccctcaacttgcaca
 agacggcaataggtggaataaacaatagacaaacgcacaccggccttattcagaaggcttggccagtaacgttagggggggg
 gttaccctctttagcccggattatgtcttgaagccaaatgctctgcaatctcaggggagagttgaggtcggccaccctccatgaagtac
 tcacgaaaatcagtgtaactccttgttggccagacggtctttagtccaaagacggctcctctcactcagtatcaatttgtgtagtctatgctc
 ctgggtcaaatcggccgtattctgtaaccagggtcttctgctagttcaggatttggaaatcagctogaaagtactcaccacagcagcgtaacg
 accggtcctgttgcactcttctgtaggctactaggtgacgggacggaggggccccctgtagattgcccaccatggatcgtactgctagg
 ctcccacttccgaccatgacatctgatccccctgctgaccaccacttttggaggctactatctccagttttagatggtgattggtggtt
 atctcattggttgaatgacaagattgaatggcataagattgtcgtgcccggcctcagcccattatctgcccgtacagctctggtgattac
 ccagctccatcaaaagcctataaggtagatggtggcggccagtaacggccttggacgcttgttgaacacgagctctcccccaatgtc
 gaggcttgtatagcatcaatgttggctgagaacaggtgtgattgttaccacactggttggactgtgatgagaattgtaatcctggctg
 cagttatggtgtagactctggccctgcaactgctgctgcatgtagctaccatttttgggtcaagccctatagcgggaatggggctaccaag
 cctcacataccaagatcatatgatgtgggtaggtgaggacagtgacccttccccctaccaggacattcccaattttgtcgttgattgg
 ctgttgcagacatcaaccattgtatgctaactctgtcagttcactcaggcttcttggaaaggtcaccggcgtttatggtgcccgtttagtgc
 aaacgccaccaggagggtgtgcttgcactcactgtgagactccgactcactagctctgacgtagttgtagctggccggtaggttctggcag
 tcaggagcatctgatcgaactgttagttccattgctctgcaagtgttagtgagcaccacaafttagccagggaatccaggggaaaaaga
 caattagccctgacctgttccccacagfcaaafttaggtgctgaggtctctgacctgagagtgctcttccagggtgtcgtccggaat
 ggacgccggctccggttgttggcatcagaaggctccgtatgaacggaaacaatctgttgggtttagcttgcagggttctcactcgtcgcgac
 gaogagttctagagoggccctgcagcagggagctctcgtctcagggctcagaccgaagactgcgaoggtaccgacgctggctc
 gcgcctcttataccacgtagaacgcagctcagccaatagaatgctgtccaatatggaattccaggggaaaccggggcgggtttagc
 ttttgccttccacttccattgacgtgtattggctcgaacgggtacttccattaatcagctatgggaaagfaccgtttaaaggctca

cgttgacattagttcaatagcccattgacgtcaatgggtgggaaagtacatggcgttttaattaaattggctggaaaaacccaatgactcacc
 ctattgacctatgtacgtgccaataatgggaaaaacccattgactcaccctattgacctttgtactgggcaaaacccaatggaaagtc
 cctattgactcagtgacttggctccaatgggactttcctgttgattcaccctattgacctatgtactgggcaaaacccaatggaaagtc
 taatgactcagtatacgtgccagtaatgggaaaaacccattggctaccctccattgacctatgtactgggcaaaacccaatggaaagtc
 ctattgactcaatgtacttggctccaatgggactttcctgttgactcaccctattgacctatgtactgggcaaaacccaatggaaagtc
 ctattgactcagtgacttggctccaatgggactttcctgttgattcaccctattgacctatgtactgggcaaaacccaatggaaagtc
 tattgacgcagtgacttggctccaatgggactttcctgttgattcaccctattgacctatgtactgggcagaatacaatggaaagtc
 attgactcaccacattgacctatgtactggcacaatgggaaaaacccattggaaagtcctattgactcagtgacttggcagcaatgg
 gttttccattggctcaccctccattgaccaatgtacttgggcaaaacccagtgaaagtcctattgactcagtgcttggcagtaatg
 ggaaaaacccaatggctcaccctccattgaccaatgtacttgggtaaaaggccattgactcaccctccattgctgggaaatgtgaacg
 cccctatgtgaaagtcctattggcgcgcattagagtgcatgaccgtgctgattcatatgcatatgagtgattaggggcttccgct
 tgggaaatgggtaaaaagtcctgtattactcacatagggggcgttggcttgcacaataggggattcagtgacttggcattaaaaact
 attggtctagtcataaacgggcgagtggtggggatccactagtgaaatgcttattgattatgattcaatgacttggcattcaatattca
 ctctccaatcccagtgacttcttagcgagatgatgtatgacttctgtgaaattactacag gatataattttaaagatgcaggagtaaca
 tgtgcatagtaggcgtatgacgcagacgtgcaacgcttcgacttggatga

Фиг. 27

1	MEKIVLLAI	VSLVKSDQIC	IGYHANNSTE	QVDTIMEKNV	TVTHAQDILE
51	KTHNGKLCDL	DGVKPLILRD	CSVAGWLLGN	PMCDEFINVP	EWSYIVEKAS
101	PANDLCYPGD	FNDYEELKHL	LSRINHFEKI	QIIPKSSWSN	HEASSGVSSA
151	CPYQ GKSSFF	RNVVWLIKKN	SAYPTIKRSY	NNTNQEDLLV	LWGIHHPNDA
201	AEQTKLYQNP	TTYISVGTST	LNQRLVPKIA	TRSKVNGQSG	RMEFFWTILK
251	PNDAINFESN	GNFIAPEYAY	KIVKKGDSAI	MKSELEYGNC	NTKCQTPMGA
301	INSSMPFHNI	HPLTIGCEPK	YVKS NRLVLA	TGLRNSPQRE	TRGLFGAIAG
351	FIEGGWQGMV	DGWYGYHHSN	EQSGGYAADK	ESTQKAIDGV	TNKVNSIIDK
401	MNTQFEAVGR	EFNNLEERRIE	NLNKKMEDGF	LDVWTYNAEL	LVL MENERTL
451	DFHDSNVKNL	YDKVRLQLRD	NAKELGNGCF	EFYHKCDNEC	MESVRNGTYD
501	YPQYSEEARL	KREEISGVKL	ESIGTYQILS	IYSTVASSLA	LAIMVAGLSL
551	WMCSNGSLQC	RICI			

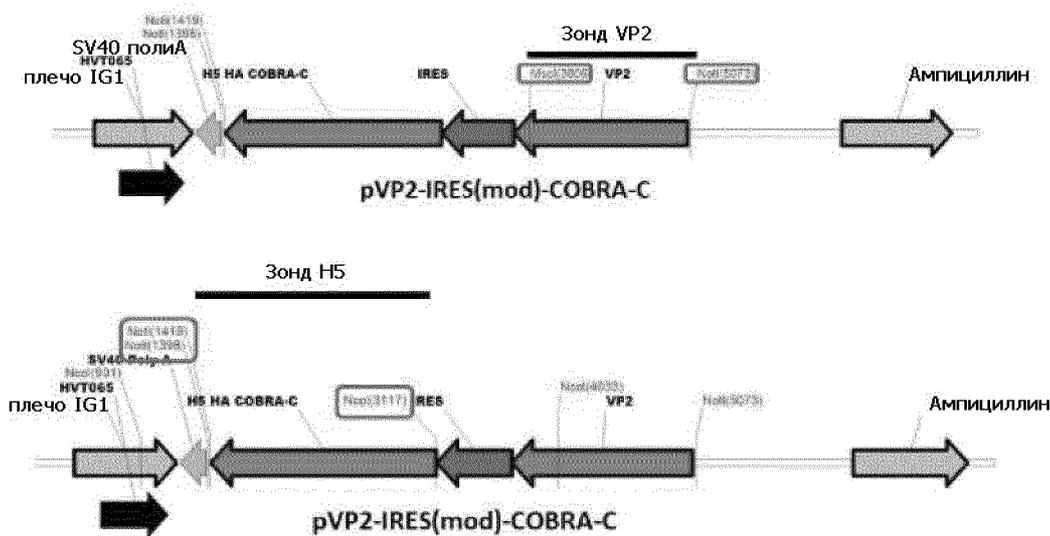
Фиг. 28

```

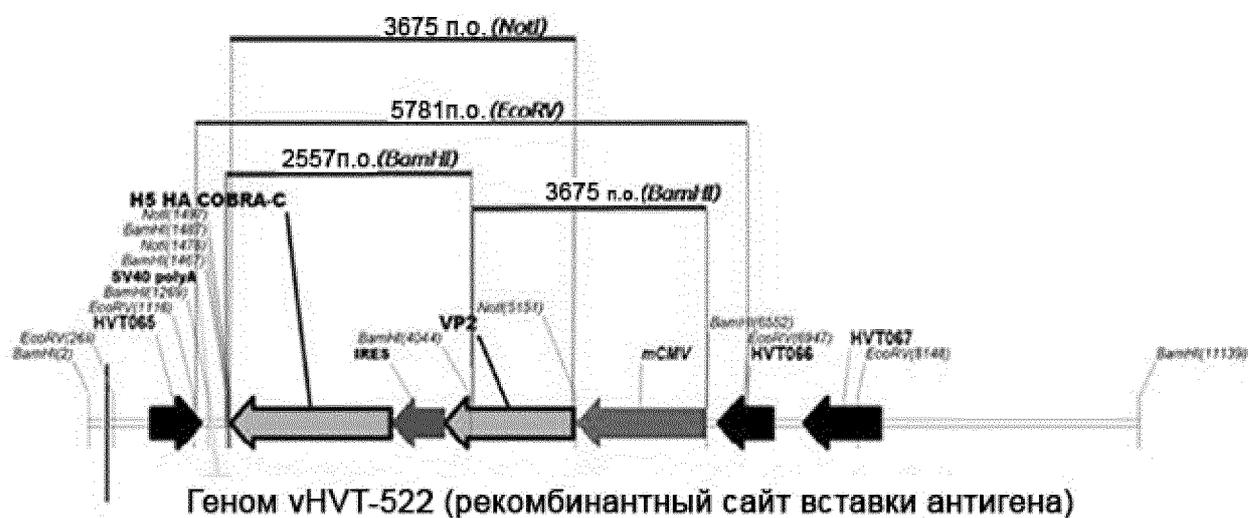
1  MTNLQDQTQQ IVPFIRSLLM PTTGPASIPD DTLEKHTLRS ETSTYNLTVG
51  DTGSGLIVFF PGFPGSIVGA HYTLQSNNGY KFDQMLLTAQ NLPASYNYCR
101 LVSRLTVRS  STLPGGVYAL NGTINAVTFQ GSLSELTDVS YNGLMSATAN
151 INDKIGNVLV GEGVTVLSLP TSYDLGYVRL GDPIPAIGLD PKMVATCDSS
201 DRPRVYTITA ADDYQFSSQY QPGGVITITLF SANIDAITSL SIGGELVFQT
251 SVQGLVLGAT IYLLIGFDGTA VITRAVAADN GLTAGTDNLM PFNLVIPTNE
301 ITQPITSIKL EIVTSKSGGQ AGDQMSWSAS GSLAVTIHGG NYPGALRPVT
351 LVAYERVATG SVVTVAGVSN FELIPNELA  KNLVTEYGRF DPGAMNYTKL
401 ILSERDRLGI KTVWPTREYT DFREYFMEVA DLNSPLKIAG AFGFKDIIRA
451 IRR

```

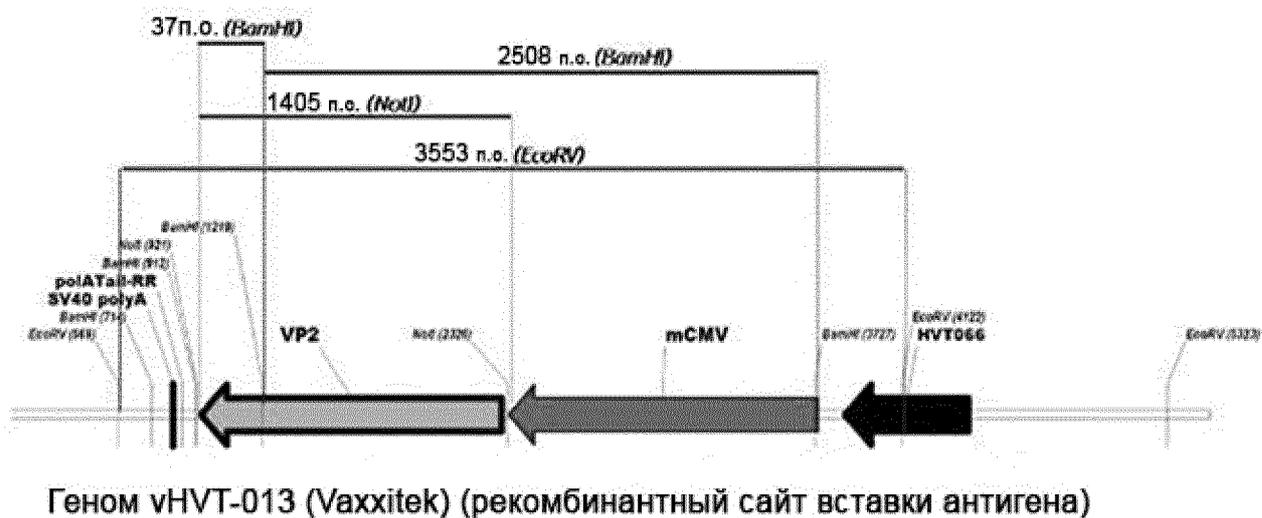
Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31

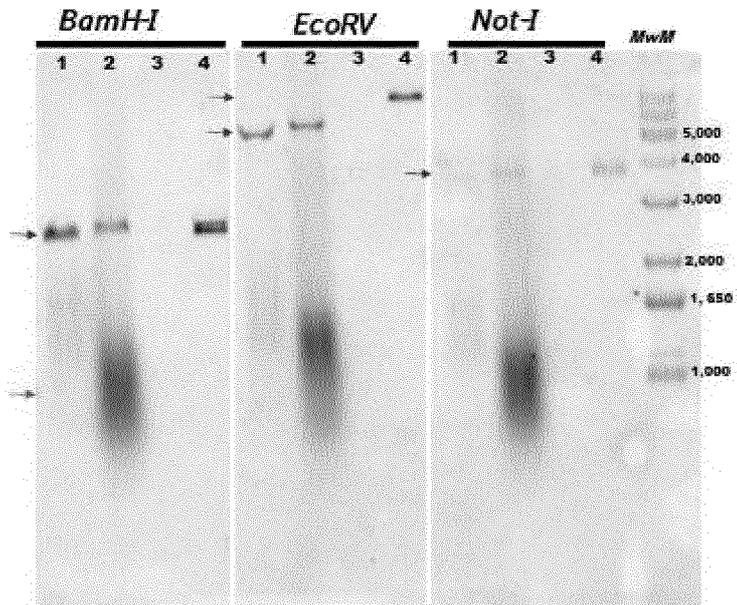


Фиг. 32

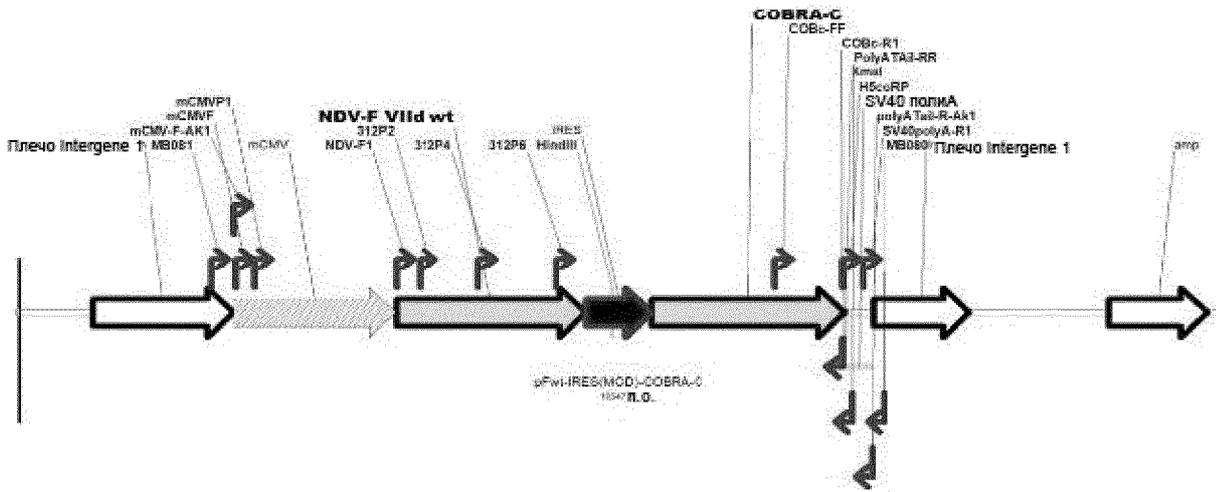
Ожидаемый размер

Зонд P5	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RV	<i>Not</i> I
vHVT-522 (P3)	2508 п.о. 2557 п.о.	5781 п.о.	3675 п.о.
vHVT-522 (X+13)	2508 п.о. 2557 п.о.	5781 п.о.	3675 п.о.
vHVT-013 (Vaxxitck)	Нет	Нет	Нет
Донорная плазмида	2557 п.о.	7312 п.о.	3654 п.о.

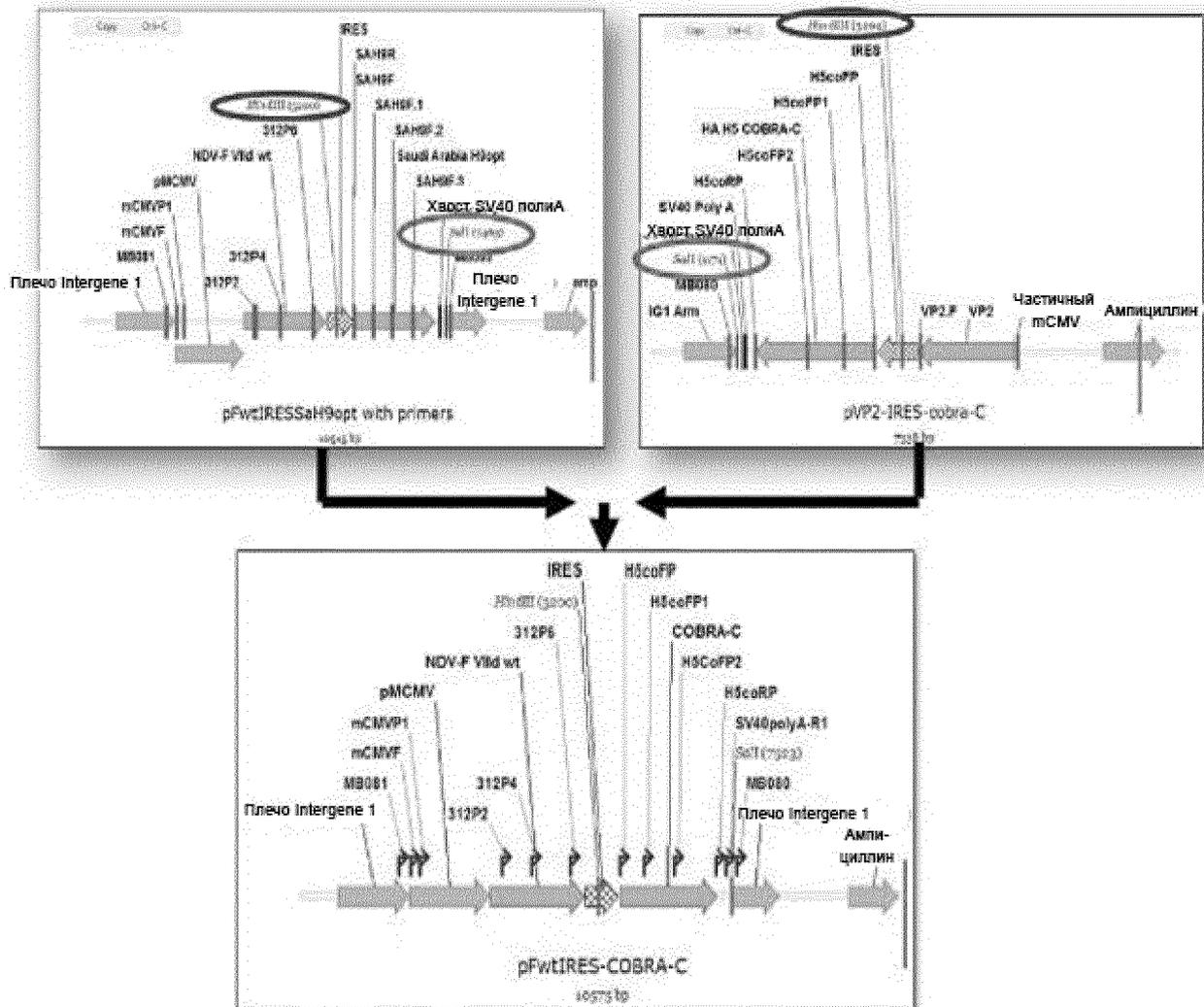
1. vHVT-522 (preMSV)
2. vHVT-522 (preMSV+13)
3. vHVT-013
4. Донорная плазмида



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37

ctaaattgaagcgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatattttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctt
 ataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtggtgtccagtttggaaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaa
 agggcgaaaaaccgtctatcaggcggatggcccactacgtgaaccataccetaateagtttttggggctcgagggtgcccgtaaagcac
 taaatcgggaacctaaagggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagc
 gaaaggagcggggcgttagggcgtggcaagtgtagcggtcacgctgcgctgaaccaccacaccgcccgttaatgcccgtac
 agggcgcgtccattcgcattcaggctgcgcaactgtgggaaggcgcgacgggtgcggccctctctcctattacgccagctggcgaa
 agggggatgtctgcaaggcgalltaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgagcgcgcg
 taatcagactcactataggggcaattggagctcagggtatgatactcagctgttattgtggccgaccaggaggactccaatgcttag
 cattcataagaacgctagagatgctatttaacgatgtgctgctcetaaagaattttgtgcatttagcctttaaattgtaaaaccaatg
 acgcattcactacgctcgtgctgcaatttctgggcccaggggtatgcatattccataacagaaatcgacacttgagaaggaggatct
 gactgtttgggataaaaggtcgtttgggtctgctcctagcgatataatttatatgacgatatacattaaacatctgtgtgcaactta
 ggtattfaatcatgctgatgaaatggtatgtgtaaatatcggacaatatagataacgggacgctgctattgtaacgtgcgcccgc
 gcgctagtgtgactaataagtgtggatgatgatacagfatatacaaacggaaatgatacgtataaaattatgtaactcttattgat
 ttataaaaaacatacatgcaagtgtgctatgtcacataattagcctcgcctctacgctcactgaagataatgggctcccgtgtt
 caaaaaaatcagcgtcgtcgataagactttgggtgacgtctctcggggctcgaatttagatttccgcaatggagggtatctggg
 gatttttgcacatgctggagcgcagactgtacgattcgtcccatcgggatctagcagaccaatgatggtgacacacatcggccat
 gcatgtacggacggctctattgcgcgagtttgtattttcgaaggacaagatggaaagtgtataggaaccgacaataatgttagttt
 gcatttcttagggcgggaatctacatgatatttccaagcggggtatgagccagagagatgtgatggtcataaagggtaaattt
 tttagatctgaaataacgcagttgcccnaacaacgatcgcgattaaanaaaaaatcggatggttcaattaggacatgcatggat
 tctgtgcgataaaaccataacgcagcactgtttgggcactcggtaactcaaatgcgaagcgttgcaactcgcgataactacgc
 ctactatgcaattgttactcctgcatcttaaaaatatactctgtagtaattttcaagcaatgtcataacatcctcgtctaaagaa
 tgacctgggattggagaaataatgaataatttcaaccaatgcattgaataaactaacattaaaagaattcactagtggatcccc
 aactcggcccgtttatgactagaaccaatagttttaattgccaaatgcaactgaaatcccctaatttgcanaagcccaacgcccct
 atgtgagtaatacggggactttttacccaatftcccaagcggaaagccccctaatacactcatatggcatatgaatcagcaggt
 catgcacttaatggcggcccatagggaactttccacataggggcggttaccatttccagcatagggggtggtgactcaatggcc
 ttacccaagtacattgggtcaatgggaggttaagccaatgggttttcccattactggcaagcactgagtcaaatgggacttcc
 caetgggttttgcacagtacattgggtcaatgggaggtgagccaatgggaaaaaccattgctgccaagtacactgactcaat
 agggactttccaatgggttttccattgttggcaagcatataaggtcaatgtgggtgagcaatagggaacttccattgtattctgc
 ccagtaataaggtaatagggggtgaatcaacagaaagtcaccattggagccaagtaactgctcaatagggaacttccatt
 ggggtttgcccagtaataaggtaataggggatgagcaatgggaaaaaccattggagccaagtaactgactcaataggg
 acttccattgggttttgcacagtaataaggtaatagggggtgagcaacagaaagtcaccattggagccaagtaactgaggt
 caatagggaacttccaatgggttttcccagtaataaggtaatgggaggttaagccaatgggttttccattactggcagctat
 actgagtcattagggaacttccaatgggttttcccagtaataaggtaatagggggtgaatcaacagaaagtcaccattggagc
 caagtaactgagtaatagggaacttccattgggttttcccagtaacaaaaggtaatagggggtgagtaatgggttttccca
 ttattggcagctacataaggtaatagggggtgagcaatgggttttccagccaatttaattaaaaagccatgtaacttcccacat
 tgacgtcaatgggctattgaaactaatgcaacgtgacctttaaaggtaacttccatagctgattaatgggaaagtaecgtctc
 gagccaatacagctcaatgggaagtgaaggggcagccaaaacgtaacaccgcccgggtttcccctggaaattccatattggc
 acgcattctattggctgagctcgttctacgtgggtataagaggcgcgaccagcgtcggfaccgtcgcagctctgggtctgacca
 ccgtagaacgcagagctcctcgtcagggcggccgcatgggctccaaaaccttctacagggateccagcaectctgatgctgate
 acccggattatgctgatattgggctgtatecgtccgacaagctctcttgaaggcaggcctcttgcagctgcagggaattgtagtaac
 agggagataaggcagctcaatgtatacactcgtctcagacaggggtcaatcagtaagttgctcccgaatatgccaggggataa
 ggagcgcgtgtgcaaaaagcccattagaggcatataacagaaactgactactttgctcactcctcttggcgaactccatccgcaag
 atccaagggtctgtgccaacatctggaggaggcaagcaaggccgectgatagggtctgttattggcaggttagctcttgggggtg
 caacagcggcagataacagcagctcgggcccataatacagccaaccagaatgcgcgcaacatcctccggcttaaggagag
 cattgctgcaaccaatgaagctgtcatgaagtaaccgacggattatcaaacatcaatggcaggtgggaaagtgcagcaggtt
 tgtcaatgaccagtttaataatacggcgcgagaattggactgtataaaaaacacacacaggttgggtgtagaactcaacctatac

ctactgaattgactacagtattcgggccaagatcaacctcccctcaftaaactcagctgaccatccaggcacttlataaatttagct
 ggtggcaatatggattacttattaactaagttaggtatagggaaacaatcaactcagctcgttaattgtagcggcctgatactgg
 ttacctatactgtatgactcacagactcaactcttgggcatacaagtggaatttaccctcagtcgggaacttaataatgctg
 ccacctatttggagaccttatctgtaagtaacaacaaaggatagcctcagcacttgtccgaaaagtgtgacacaaagtcggtc
 cgtgatagaagagcttgacaectcactgtatagagtcctgactctggatttataattgactagaatagtgacattcccctgctccc
 aggtatttattcctgtttgagcggcaacaacacagcttgcattgattcaagactgaaggcgcactcactacgcccgtatggccc
 ttaaaggctcagttattgccaatgttaaaataacaacatgtatgtagacagccctcctggtatcatatcgcaaaattatggaga
 agctgtatccctgatagatagacattcgtgcaatgtcttattcattagacgggataactctaaggctcagtggggaattttagtgc
 ctatcaaaagaaactcaataactagattctcaagtcactgtgacaggcaactcttgatatacaactgaaactggaaaactgcaac
 aatcaatcagcaatgecttggataggttggcagaaaagcaacagcaagctagaaaaagtcactgacactaaccagcacate
 tgetctcattacctatattgttetaactgctattctctagtttctgggtgacttagtctgggtttagcgtgttactctgatgtacaaca
 gaaggcacaacaanaagacttctatggcttgggaataataccctcagatcagatgagagccactacaagagcatgagcggcc
 ccccccccccaactgactggcgaagcggcttggaaataaggccgggtgtgcttctctatatttccaccatattgccc
 gcttttggcaatgtgagggccggaaacctggcctctcttcttggacgagcattcctaggggtcttcccctctcgcaaaaggaa
 gcaaggctctgtgaatgtcgtgaaggaaagcagttcctctggaaacttctgaagacaacaactctgttagcggcccttgcagg
 cagcggaaacccccactggcgacaggtgctctcgggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaaggcggcacaac
 ccaagtccacggttgtgagttggatagttgtggaaaagagtcaaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaaggatg
 cccagaaggtaacccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgcttcaatgtgtttagtcgaggttaaaaaactc
 taggccccgaaccaeggggagctggtttcttgaaaaaacagatgataataccatggagaaaatagctctctcttgc
 tagtcaactgtttaaagtgatcagatttgcattggttaccatgcaaaacaactcgacagagcaggttgacacaataatggaaaa
 gaacgttactgttacacatgcccagacatactgaaaaagacacacaacggggaagctctcgatctagatggagtgaagcctc
 taattttagagattgtatgttagctggatggctcctcggaaacctatgtgtgacgaattcacaatgtgcccgaatggcttacc
 atagttggagaaggccagtcagccaatgacctctgttaeccaggggatttcaacgactatgaagaaactgaacaactattgagc
 agaataaacattttgagaaaattcagatcaccccaaaagttcttggccaatcatgaagcctcaccaggggtgagctcagcat
 gtccataccaggggaagtcctctcttttcagaaaatgtggtatggcttcaaaaaagacagtcatacccaacaataaagagga
 gctacaataataccaaccaagaagacttggtaactgtgggggattcaccatcctaatgatggggcagagcagacaagaactct
 atcaaaaaccaaccaactataattccttgggacatcaacactaaaacagagattggtaaaaaaatagctactagatccaaag
 taaaacgggcaaatgtgaaagaatggagttctctggacaattttaaagccgaatgatgctatcaactcagagataatggaaatt
 cattgctcagaatattgcatacaaaaattgtcaagaaaagggaactcagcaattatgaaaaagtgaattggaatattgtaactgca
 caaaaatgtcaaacctcaatggggggcagataaactctagtatgcattecaacaatacaccctctcaccatcgggggaatgccc
 caaatatgtgaaatcaaacagattagctcttgcgacagggctcagaaatagccctcaaaagagagacaagaggactattggag
 ctatagcaggtttatagagggaggatggcaggggaatggtagatggttggatgggtaccatagcaatgagcaggggaggt
 ggatacgtcagacaanaagaatccactcaaaaggcaatagatggagtcaccaataagggtcaactcagatcattgacaaaatga
 aactcagtttggggcgttggaaagggaatttaataactagaaaaggagaatagagaatttaacaagaagatggaaagcggg
 attcctagatgtctggacttataatgctgaactctggttctcatggaaaatgagagaaactctagacttccatgactcaaatgtca
 gaaectttagacaaggctcagactacagettaggataatgcaaaaggagctgggtaacgggtgttccaggttetatcaaaatgt
 gataatgaatgtatggaaagtgaagaaacggaacgtatgactaccgcagttatcagaagaagcaagactaaagagagag
 gaaataaaggtagtaaaaattggaatcaataggaaacttaccaaaatactgtcaatttattcaacagtgccgagttccctagcactgg
 caatcatgtgctggtctatctttatggatgtctcacaatggatcgttacaatgcaagaatttgcatttaagcggccgcatcggatc
 cggggcgccgcggggatccagacatgataagatacattgatgagttggcaaaaccacaactagaatgcaagtgaaaaaaa
 tctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataaagetgcaataaaacaaagttaacaacaacaattgactca
 tttatgttccaggttcagggggaggtgtgggaggtttttcggatcctctagacctcagagggtcagacaattttttatitaataacata
 tagcccaaaagacctctatgaacatttagttcccgtatactcaacggcggctgtacacacgcactcttctgcatagcgatgaagtt
 gttcggcagcagaaaatgcagatatecaacaactctggagaaaacttatecaacagtgccagttggaacataccccctctat
 tcatggfataattatgctcancgctcagggatagtgccgtgagaaaatggagatctgcagccctcttccatggcatgcccgt
 ttattgttcaataacgcacaatggtctcaacgccaatgagatgggcaatagattctgaagaacccgttgacaatcgaagaagaag

g c g t g c a g g t c t t t g g a a g a c t e g c a c g t t g g t e t t a t a a t g t a t g a t e g a g a t g t c a c c e t a a t g e c a c a t g g t a c a g g c t t a t e
g c g g t c a t g g c g a t c g g a c t t g t a a t t t g c a a c g a t g g g c a a a g g a t c g a c g a c a t g c a a a c a t t c t g a a c c e g t a g a g a t g t
t a a c g a t g a c g a g g a t g a a t a t c c c a t g c t e g c t g c c a t a g t a t c a a g t a c a c e g c g a a t a a g g a c e g t c e a a c a t e g t t a t a
t g c a c a c a a t g g g c t a c a c g t g a c t a a c a c e c c c g a a t a t t a g t c a t a t g t g a g t t c a g t c t g g c t c c e a t a t a g c c t g t a g a c t
a t t t g t e g t t a a g t g t g a a c g a g g c g c t g t g a a c g a g a c t e g g g c c g a t t g t a a g a a c a a g c a a a t g c a c t t c e a t t a a c a a
g a a g t g t a g a g a g a a t a c t c a a c c t c t t g g a t g t a t e c t e g a g g g g g g c c c g g t a c c c a g c t t t t g t t c c t t a g t g a g g g t a a t
t g c g e g c t t g g c g t a a t c a t g g t c a t a g c t g t t c c t g t g t g a a a t t g t a t e c e t c a c a a t t c c a c a c a c a t a c g a g c e g g a a g c a t a a
a g t g t a a a g c c t g g g t g c c t a a t g a g t g a g c t a a c t c a c a t t a a t t g c g t t c g c t c a c t g c c c c g t t c c a g t c g g g a a a c c t g t c g t g
c c a g c t g c a t t a a t g a a t e g g c c a a c g e c g c g g g g a g a g g c g g t t g c g t a t t g g g e g c t e t t e g c t t c t e g e t c a c t g a c t c g e t g e g
c t e g g t e g t t e g g e t g e g g c g a g c g g t a c a g t c a c t c a a a g g c g g t a a t a c g g t a t c c a c a g a a t c a g g g g a t a a c g a g g a a a g
a a c a t g t g a g c a a a a g g c c a g c a a a a g g c c a g g a a c c g t a a a a a g g c e g c g t t g t g g c g t t t t c a t a g g t e c g e c c c c c t g a c g
a g c a t e c a a a a a t e g a c g e t c a a g t c a g a g g t g g c g a a a c c c g a c a g g a c t a t a a a g a t a c c a g g e g t t c c c c c t g g a a g t c c c t
c g t g e g c t c t c t g t t c c g a c c c t g c c g c t t a c c g g a t a c c t g t c e g c e t t t e t e c e f t e g g g a a g e g t g g e g c t t t e c a t a g t c a c g e t
g t a g g t a t c t c a g t t e g g t g t a g g t e g t e g t c c a a g c t g g g c t g t g t g c a c g a a c c e c c e g t t c a g c c c g a c c e g t g e c c t a t c e g
g t a a c t a t e t t t g a g t c c a c c c g g t a a g a c a c a g a c t a t e g c a c t g g c a g c a g c c a c t g g t a a c a g g a t a g c a g a g c g a g g t a t
g t a g g c g g t g c t a c a g a g t t t g a a g t g g t g g c c t a a c t a c g g c t a c a c t a g a a g g a c a g t a t t t g g t a t c t g e g c t c t g e t g a a g e c a
g t a c c t t c g g a a a a a g a g t t g g t a g c t e t t g a t c c g g c a a a c a a a c c a c c g c t g g t a g c g g t g t t t t t g t t g c a a g c a g c a g a t t a c
g c g c a g a a a a a a g g a t c t c a a g a a g a t c e t t t g a t e t t t t a c g g g g t e t g a c g e t c a g t g g a a c g a a a a c t e a c g t t a a g g g a t t t g
g t c a t g a g a t t a c a a a a g g a t t c a c c t a g a t c e t t t a a a t t a a a a t g a a g t t t a a a t c a a t c t a a a g t a t a t a t a g t a a a c t t g g t c t
g a c a g t t a c c a a t g c t t a a t c a g t g a g g c a c c t a t c t c a g c g a t e t g t c t a t t t e g t t c a t c c a t a g t t c c t g a c t e c c c g t e g t g t a g a a
c t a c g a t a c g g g a g g g c t t a c c a t c t g g e c c c a g t g e t g e a a t g a t a c c g c g a g a c c c a c g e t c a c e g g e t c c a g a t t a t c a g c a a t a
a a c c a g c c a g c e g g a a g g g c g a g c g c a g a a g t g g t c e t g c a a c t t a t e c g e t c e a t e c a g t e t a t t a a t t g t t g c c g g a a g c t a g
a g t a a g t a g t t e g c c a g t a a t a g t t t g e g a a c g t t g t g c a t t g e t a c a g g e a t e g t g g t g t c a c g e t e g t e g t t t g g t a t g g c t t a t t e
a g e t e c g g t t c c a a c g a t c a a g g e g a g t a c a t g a t e c c c a t g t t g t g c a a a a a g e g g t a g e t c e t t e g g t c e t e g a t c g t t g t e a
g a a g t a a g t t g g c c g c a g t g t t a c t e a t g g t t a t g g c a g c a c t g c a t a a t t e t c t t a c t g t c a t g c c a t e c g t a a g a t g e t t t t e t g t g a c t
g g t g a g t a c t c a a c c a a g t c a f t e t g a g a a t a g t g t a t g c g g c g a c c g a g t t g e t e t t g c c c g g e g t c a a t a c g g g a t a a l a c c g e g c c a
c a t a g c a g a a c t t a a a a g t g e t c a t e a t t g g a a a c g t t e t t e g g g g e g a a a a c t e t c a a g g a t e t t a c e g e t g t t g a g a t c c a g t t e g a t
g t a e c c e a c t e g t g c a c c c a a c t g a t e t t e a g e a t e t t t a c t t t c a c c a g e g t t t e t g g g t g a g c a a a a c a g g a a g g c a a a a t g c e g c a
a a a a a g g g a a t a a g g g c g a c a c g g a a a t g t t g a a t a c t a t a c t e t t c c t t t t e a a t a t t a t t g a a g c a t t a t c a g g g t a t t g t e c a t g a g
c g g a t a c a t a t t g a a t g t a t t a g a a a a t a a c a a a t a g g g g t t e c g e g c a c a f t t c c c c g a a a a g t g c c a c

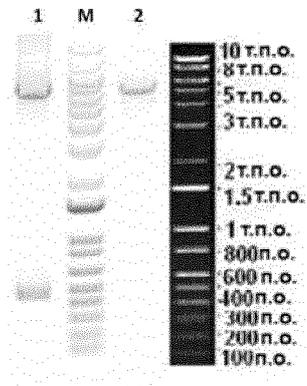
Фиг. 38

MGSKPSTRIPAPLMLITRIMLILGCIRPTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTSSQTGS
 IIVKLLPNMPRDKEACA KAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGSVSTSGGGKQGRIG-
 AVIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLSV
 AVGKMQQFVNDQFNNTARELDCIKITQQVGVELNLYLTELTTVFGPQITSPALTQLTI
 QALYNLAGGNMDYLLTKLGIGNNQLSSLIGSGLITGYPILYDSQTQLLGIQVNLPSVGN
 LNNMRATYLETLSVSTTKGYASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIESDLDLYCTRIVTF
 PMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMALKGSVIANCKITTCRCTDPPGIISQNY
 GEAVSLIDRHSCNVLSLDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNN
 SISNALDRLAESNSKLEKVVNRLTSTSA LITYIVLTVISLVFGALS LVLACYL MYKQKA
 QOKTLLWLGNN TLDQMRATRA-

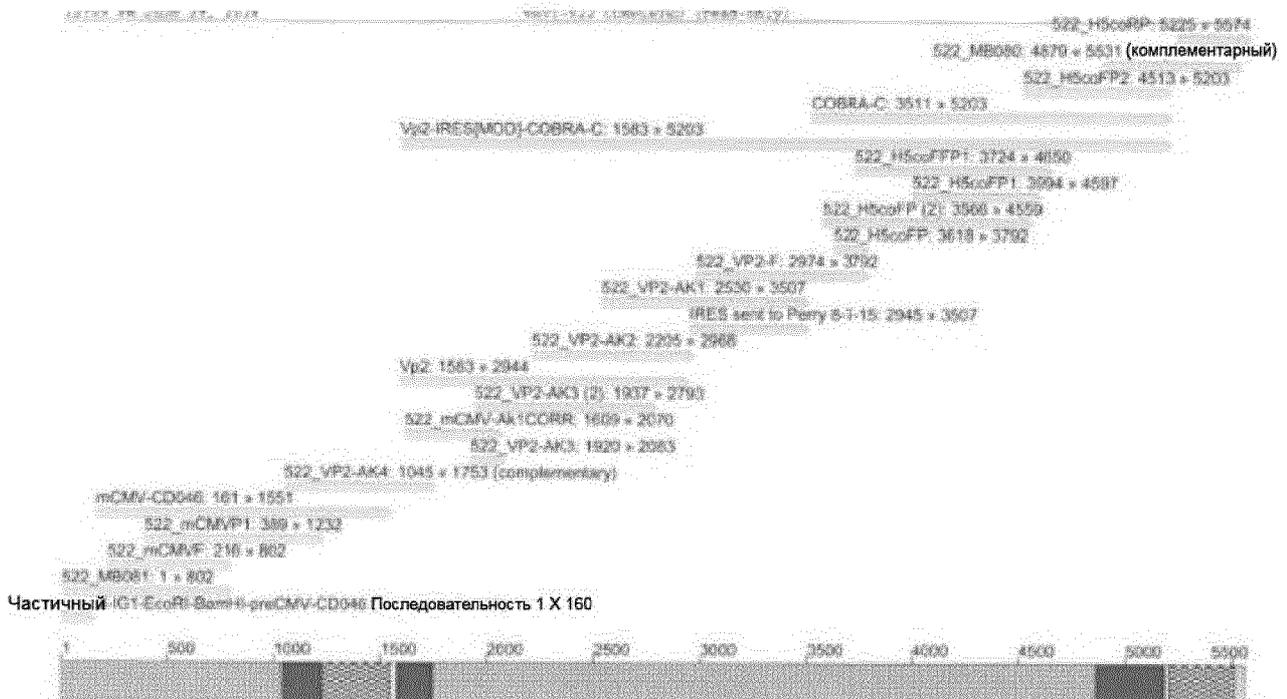
Фиг. 39

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLC
 DLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKASPANDLCYPGDFNDYE
 ELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSNHEASSGVSSACPYQGKSSFFRN VVWLIKKN SAYPT
 IKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRS
 KVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAP EYAYKIVKKGDS AIMKSELEYGNCN
 TKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQRETRGLFGAIAG
 FIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFE
 AVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVW TYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYD
 KVRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVK
 LESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI-

Фиг. 40



Фиг. 45



Фиг. 46

1681 TAAC TCAAATGCGAAGCGTTGCACGTCTGCGATAACTACGGCTACTATGC
 MB081
 1751 ACATTGTTACTCCTGCATCTTAAAAATATATCCTGTAGTAATTTTCACAGCAATGTGATAACATCATCTC
 1821 GCTAAAGAAATGACCTGGGATTGGAGAAGTAATGAATATTTGCAAGCAATGCATTGAATAAACTAACATTA
 1891 AACGAATTCAGTAGTGGATCCCCAACTCCGCCCTTTTATGACTAGAACCAATAGTTTAAATGCCAAA
 mCMVF
 1961 TGGACTGAAATCCCCTAATTTGCAAAGCCAAAGCCCGCTATGTGAGTAATACGGGGACTTTTACCCAA
 2031 TTTCCCAAGCGGAAAGCCCCCTAATACACTCATATGGCATATGAATCAGCACGGTCATGCACTCTAATGG
 mCMVP1
 2101 CGGCCCCATAGGGACTTCCACATAGGGGGGTTCCACCATTTCCCGAGCATAGGGGTGGTGACTCAATGGCC
 2171 TTTACCCCAAGTACATTGGGTCAATGGGAGGTAAGCCAAATGGGTTTTCGCCATTACTGGCAAGCACACTGA
 2241 GTCAAATGGGACTTTCCACTGGGTTTGGCCCAAGTACATTGGGTCAATGGGAGGTGAGCCAAATGGGAAAA
 2314 ACCCATGGCTGCCAAGTACACTGACTCAATAGGGACTTTCCAATGGGTTTTCATTGTGGCAAGCATA
 2381 TAAGGTCAATGTGGGTGAGTCAATAGGGACTTCCATTGTATCTGCCAGTACATAAGGTCAATAGGGG
 2451 GTGAATCAACAGGAAAGTCCCATTTGGAGCCAAGTACACTGCGTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTGGC
 2521 CCAGTACATAAGGTCAATAGGGGATGAGTCAATGGGAAAAACCATTGGAGCCAAGTACACTGACTCAAT
 2591 AGGGACTTTCATTGGGTTTGGCCAGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAGTCAACAGGAAAGTCCCAT
 2661 GGAGCCAAGTACATTGAGTCAATAGGGACTTTCCAATGGGTTTGGCCAGTACATAAGGTCAATGGGAGG
 2731 TAAGCCAAATGGGTTTTCATTACTGGCACGTTACTGAGTCAATAGGGACTTTCCAATGGGTTTGGC
 2801 CAGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAATCAACAGGAAAGTCCCATTTGGAGCCAAGTACACTGAGTCAATAG
 2871 GGACTTTCCATTGGGTTTGGCCAGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAGTCAATGGGTTTTCATTAT
 2941 TGGCAGGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAGTCAATGGGTTTTCAGGCCAATTTAATTAAGAGGCCATGT
 3011 ACTTTCCACCATTGACGTCAATGGGCTATTGAAACTAATGCACAGTACCTTTAAACGGTACTTTCCCA
 3081 TAGCTGATTAATGGGAAAGTACCGTTCTCGAGCCAATACAGGTCAATGGGAGGTGAAGGGCAGCCAAA
 3151 CGTAACACCGCCCCGGTTTCCCTGGAAATTCATATTGGCACCGCATTCTATTGGCTGAGCTCGCTTCT
 CMV-FF
 3221 ACGTGGGTATAAGAGGCGCGACCAGCGTGGTACCGTCCGAGTCTTCGGTCTGACCACCGTAGAACCCAG
 3291 AGCTCGCTCGCTGCAGGCGGCCGCATCGCTCCAAACCTTCTACAGGATCCCAATACCTCTGATGCTCAT
 NDV-F1
 3361 CACCCGGATTATGCTGATATTGSGCTGTATCCGTCCGACAAGCTCTCTTGCAGCCAGGCTCTTGCAGCT
 3431 GCAGSAAATGTACTAACAGGAGATAAGCCAGTCAATGTATACACTTGGTCTGACAGAGGGTCAATCATAG
 NDVF-R
 3501 TCAAAGTTCCTCCGAAATATGCCCAGGCATAAGGAGCCCTGTGCAAAAGCCCGATTACAGGCATATAAGAG
 312P2
 3571 AACACTGACTACTTTGCTCACTCCCTTTGGGGAATCCATCCGCAASATCCAGGGTCTGTGTGCCAATCT
 3641 GGAGGAGGCTAGCCAGGCGGCTGTATAGGTGCTGTATTGTCAGTGTACTCTTTGGGGTTGCCACAGCCG
 3711 CAGAGATAACAGCAGCTGGGCCCCAATACAGAGCCAGCAGAGANTGCCGCCAAGCATCCCTGGGCTTAAGCA
 3781 GAGCATTGCTGCCAACCAATSAAGCTGTGCACTGAGCTCAGCCAGGGATTATCACAACCTATCAGTGGCAGT
 3851 GCGAAGATGCAGCAGTTTGTCAATGAGCCAGTTTAAATAACGCGCCAGARTTGGACTGTATAAAAATG
 3921 CACAACAGCTTGGTGTAGAACTCAACCTATACCTTAAGTGAATGACTACAGTATTGGGGCCACAGATCAG
 3991 CTCCCTGCATTAACTGAGTGAACATCCAGGCACTTTATAAATTTAGCTGCTGSCAATATGGATTACTTA
 312P4
 4061 TTAACATAAGTTAGGTATAGGCAACCAATCAACTCAGCTCGTTAATTGGTAGCGGCTGATCACTGGTTACC
 4131 CTATACTGATGACTCAGCAGACTCAACTCTTGGGCATAGAGTGAATTTACCCCTCAGTCCGGAACTTAAA
 4201 TAATATGCTGCCCCACCTATTTGGAGACCTTATCTGTAGTACAAACAAAGGATATGCCCTCAGCACTTCTC
 4271 CCGAAGTACTGACAGAAATCCGTTCCCTCATAGAGAGCTTCAGACCTCATACTGATAGAGTCCCATG
 4341 TGGATTTATATGTACTGCAATAGTGCATTTCCCATGTCGCCAGSTATTATTTCCCTGTTGAGCGGCAA
 4411 CAGATCAGCTTCCATGATTTCAAAGACTCAAGGCGCACTCACTAGCCGCTATATGGCCCTTAAAGGCTCA
 4481 GTTATTGCCAATTTGAAATTAACAACATGTAGAGTACAGACCTCTCTGCTATCATATCCCAAATTAAG
 4551 GAGAAGCTGATCCCTGATAGATAGACATTCGTGCAATGTCTTATCATTAGACGGGATAAUCTAAGGCT
 4621 CACTGGGGAAATTTGATCCAACTTATCAAAAGAACAATCTCAATACTAGATTCTCAAGTCACTGGTACAGCC
 4691 ATCTTGTATATATCAACTGAACTTGGAAAGCTCAACAATTCATCAGCAATGCCCTTGGATAGGTTGGCAG
 312P6
 4761 AAAGCAACAGCAAGCTAGAAAAGTCAATGTGAGACTAACCAGCACATCTCCTCTCATTACCTAATTTCT
 4831 TCTAACCTGTCATTTCTCAGTTTTTGGGTCACCTAGTCTGGTGTAGCGGTGTTACCTGATGTACAAACAG
 4901 AAGGCACAACAAAGACCTTGTCTATGGCTTGGGAATAATAACCTCCATCAGATGAGAGCCACTACAAGAG
 4971 CATGAGCGGCCCCCCCCCCCCCTAAGCTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG
 5041 TCTATATGTTATTTTCCACCATATGGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGGCCGGAAACCTGGCCCTGTCTT
 5111 CTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCTGTGAAG
 5181 GAAGCAGTTCTCTGGAGCTTCTTGAAGACAAACAACCTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACC
 5251 CCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTCGCGCCAAAAGCCAGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACA
 5321 ACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAC
 IRES-R

taactcaaatgccaagcgtgcacgtctgcgataactacgectactatgcacattgttactctgcatttataaaatatactctgtagtaatftt
 cacagcaatgtcataacatcatctcgttaaagaatgacctgggattggagaagtaatgaatatttgaaccaatgcaatgaataaaactaaca
 ttaacgaaltactagtggatecccccaactcegecgtttatgactagaaccaatagttttaaagccaatgcaatgaaatccccetaatftt
 gcaaagccaaaceccccctatgtgagtaaacggggaacttttacecaatftcccaagcggaaagcccccaatacactcatatggcaat
 gaaacagcacgggtcatgactcctaatggcggcccatagggactftccacatagggggcgttaccatttccagcataggggtggtgact
 caatggcctttacccaagtaacattgggtcaatgggaggtaaaccaatgggttttccattactggcaagcacactgagtcfaatgggact
 tccactgggtttgcccagtaacattgggtcaatgggaggtgagccaatgggaaaaaccattgctgccaagtacactgactcaatagg
 gactttcaatgggttttccattggtgcaagcatataaggtaatgtgggtgagtcfaatagggactftccattgtattctgccagtaacata
 ggtcaatagggggtgaaacaggaagtcceattggagccaagtaactgcgtcaatagggactftccattgggtttgcccagtaaca
 taaggtaacataggggatgagtcfaatgggaaaaaccattggagccaagtaactgactcaatagggactftccattgggtttgcccagta
 cataaggtcaatagggggtgagtcacaaggaagtcceattggagccaagtaactgagtcfaatagggactftccattgggtttgcccag
 gtacataaggtcaatagggggtgaaacaggaagtcceattggagccaagtaactgagtcfaatagggactftccattgggtttgcccag
 gtacataaggtcaatagggggtgaaacaggaagtcceattggagccaagtaactgagtcfaatagggactftccattgggtttgcccag
 gtacataaggtcaatagggggtgagtcfaatgggttttccattattggcaggtacataaggtcaatagggggtgagtcfaatgggttttcc
 agccaatttaattaaaacgccatgactftccaccattgagtcfaatgggtattgaaactaatgcaactgactfttaacgggtactfttcc
 atagctgattaatgggaaagtaccgttctcagccaatacagtcfaatgggaaagtgaaggcagccaaaacgtaacaccgccccgggt
 tttccctggaattccatattggcagcactctattgggtgagctgcgttctacgtgggtataagagcgcgaccagcgtcggtaaccgtc
 gcagcttccgtctgaccaccgtagaacgcagagctctcctcgtgcaggcggccgcatgggtccaaacctctaccaggatcccagca
 cctctgagctgacaccggattatgctgataatgggtctgacccctcgcagaactctcttgcaggcaggcctcttgcagctgcaggaat
 ttagtaaacaggagataaggcagtcfaatgatacactcgtctcagacagggtcaatcatagtcfaatgtctcccgaatgcccagggat
 aaggagcgtgtgcaaaaagccccattagaggcatataacagaactgactacttgcactctcttggcactccatccgcaagatc
 caagggtctgttccacatctggaggaggcaagcaaggccgcctgataaggtgctgttattggcagtgtagctcttggggttgcaacagc
 ggcacagataacagcagctgcggcccaataacaagccaaccagaatgccccaacatcctccggttaaggagagcattgctgcaac
 caatgaagctgtgcatgaagtcaccgagcagattacacaactatcagtcgagttgggaaagatgcagcagtttgcfaatgaccagttfaat
 aatacggcgcgagaattggactgtataaaaatcacacaacaggttggtgtagaactcaactatacctaactgaattgactacagtattcc
 ggccacagatcaccctcccctgcaatcaactcagctgaccatccaggcactftataatttagctgggtgcaataggaactattataactaagtt
 aggtatagggaacaactcaactcagctcgttaattggtagcggcctgateactggttaccctatactgtatgactcacagactcaactcttgg
 geatacaagtgaaatfaccctcagtcgggaacttaataatgctgcccactatttggagacctatctgtaagtacaaccaaggat
 gccctcagcacttgcggaaagtgtgacacaagtcgggtccgtgatagaagagctgacacctatactgtatagagtcctgctggatt
 atattgactagaatagtgacattccccatgtccccaggtatttctctgtttagcggcaacacatcagcttgcattcaaaagactgaa
 ggcgcaactcactacgccgtataggccctaaaggctcagttattgccaattgtaaaataacaacatgtagatgtacagacctcctggtat
 catatgcaaaattatggagaagctgtatccctgatagatagacattcgtcaatgtcttatecattagacgggataactcaaggctcagtg
 gggaaattgatgcaactatcaaaaagaacatcfaataactagattctcaagtcagctgacagggcaacttggatatacaactgaacttggaa
 acgtcaacaattcaatcagcaatgecttggatagggttggcagaagcaacagcaagctagaaaaaagtcfaatgacagactaacagcaca
 tetgctctcattacatataattgttcaactgctattctctagtttleggtgcaactagctggtgttagcgtgtacctgatgtacaacagaagg
 caaacaanaagacttgcattggttgggaataataccctcagtcagatgagagccactacaagagcagatgagcggcccccccccccc
 ctaacgttactggccgaagccgcttggataaaggccggtgtgctgttctatatttccaccatattgccccttttggcaatgtgag
 ggccccgaaacctggccctgtcttctgacgagcactcctaggggtcttccccctctcgaaggaatgcaaggctctgtgaaatgctgtg
 aaggagcagttcctctggaagctcttgaagacaacaacgtctgtagcagcccttgcaggcagcgggaacccccccacctggcgaca
 ggtgctctgcggccaaaagccagctgtataagatacactgcaagggcgcacaaccccagtgccacgtgtgagttggatagttgtg
 gaaaagagtcfaatgctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaaggtgcccagaaggtaccccattgatgggatctgatctggg
 gccctgggtgcacatgctttacatgtgttagctgaggttaaaaaactctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcccttgaaaaa
 cacgatgataataccatggagaaaatagtcctctcttcaataatgctcagctcttgaanaagtgatcagattgcaattggttaccatgcaaca
 actcagacagagcaggtgacacaataatggaaaagacgttactgttacacatgcccagaacatactggaaaagacacacaacgggaa
 gctctgcgatctagatggagtgaaacctcaattttagagatgtgagtgagctggatggctctcggaaaacctatgtgtgacgaattcaat
 caatgtcccgaatggcttaccatagtgagaaaggccagtcceagccaatgacctctgttaccaggggatttcaacgactatgaagaact

gaaacacctattgagcagaataaaccatfttgagaaaattcagatcaccceaaaagtfttggccaatcatgaagcctcatcaggggtg
 agctcageatgfcataccaggggaagtcctcctfttcagaaatgtggatggcttatacaaaaagaacagtgcataccecaacaataaaga
 ggagctacaataafaccaaccaagaagatcttttggactgtgggggattcaccatectaataatgatgaggcagagcagacaaagctctate
 aaaaccecaaccactatatttccgttgggacatcaacactaaaccagagatfggtaceaaaaatagctactagatcacaagtaaacgggc
 aaagtggagaatggagttcttctggacaattftaaagccgaatgatgctatcaactcagagataatggaaattcattgctccagaatag
 catacaaaattgtcaagaaaggggactcagcaattatgaaaagtgaattggaaatggtaactgcaacaccaaagtcaaaactccaatgg
 ggcgataaaactctagatgccattccacaacatacaccctcaccatcgggggaatgccccaaatgtgaaatcaaacagattagctct
 fgcgacagggctcagaataagccctcaaaagagagacaagaggactatftggagctatagcagggtttatagaggggagatggcagggg
 atggtagatggttggatgggtaccaccatagcaatgagcaggggagtgatagcctgcagacaaagaatccactcaaaaggcaatag
 atggagtcaccaataaggtcaactcagatcattgacaaaatgaacactcagtttgaggccgttgaagggaafttaataacttagaaagga
 gaatagagaatttaacaagaagatggaagacggatcctagatgctggactataatgctgaactctggttctcatggaaaatgagag
 aactetagacttccatgactcaaatgtcaagaacctftacgacaaggctcagactacagcttagggataatgcaaggagctgggtaacgg
 ttgttcgagttctatcacaatgtgataatgaatgtatggaaagtgaagaaacggaacgtatgactaceccgcagttcagaagaagcaa
 gactaaagagagagggaaataagtgagtaaaattggaatcaataggaacttaccataactgtcaatttattcaacagtggcgagttccct
 agcactggcaatcattggtgctggtctatctttatggatgtgctcaatggatggtacaatgcagaattgcafttaagcggccgcatcgg
 atccccggggcggccgggggatccagacatgataagatacattgatgatttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgc
 tttattgtgaaatttggatgctattgctttattgtaaccattataagctgcaataaacaagftaacaacaacaattgcattctttatgttccag
 gttcagggggaggtgtgggaggtttttggatcctctagacctgcagggtgacaaatttttttaataacatatageccaaagacctct
 atgaacatttagttccctactcaacggcgcgtgtacacacgcactcttttgcatagcgatgaagtttggc

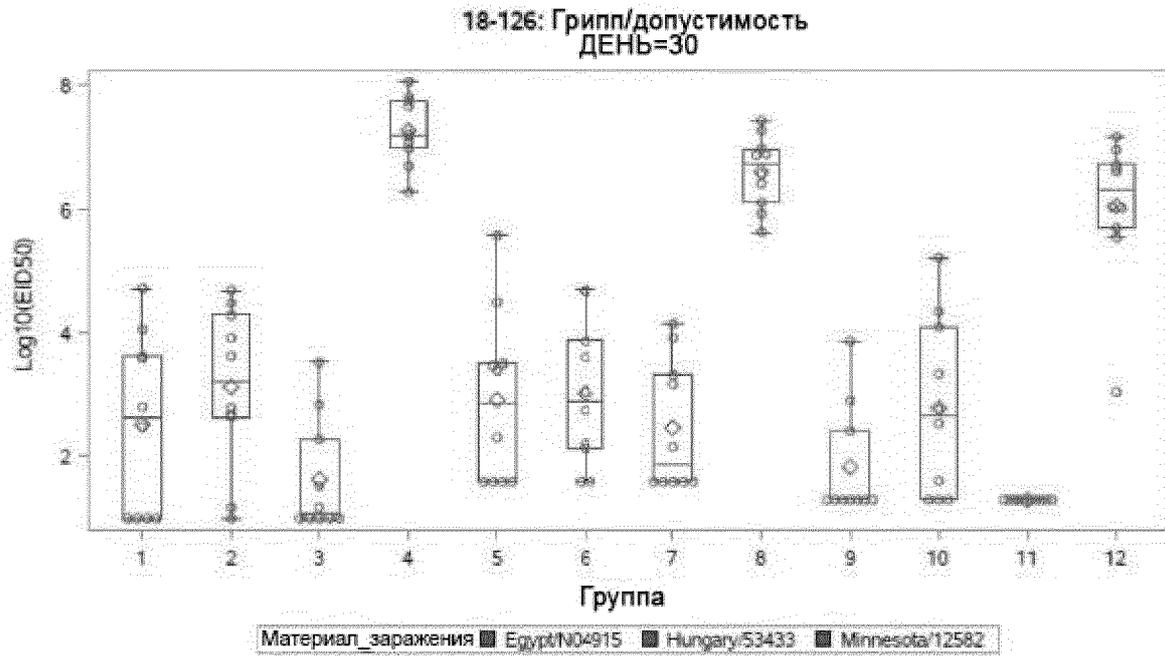
Фиг. 48

1	MEKIVLLLAI	VSLVKSDQIC	IGYHANNSTE	QVDTIMEKNV	TVTHAQDILE
51	KTHNGKLCDL	DGVKPLILRD	CSVAGWLLGN	PMCDEFINVP	ESWYIVEKAS
101	PANDLCYPGD	FNDYEELKHL	LSRINHFEKI	QIIPKSSWSN	HEASSGVSSA
151	CPYQKSSFF	RNVVWLIKKN	SAYPTIKRSY	NNTNQEDLLV	LWGIHHPNDA
201	AEQTKLYQNP	TTYISVGTST	LNQRLVPKIA	TRSKVNGQSG	RMEFFWTILK
251	PNDAINFESN	GNFIAPEYAY	KIVKKGDSAI	MKSELEYGNC	NTKCQTPMGA
301	INSSMPFHNI	HPLTIGCEPK	YVKS NRLVLA	TGLRNSPQRE	TRGLEFGAIAG
351	FIEGGWQGMV	DGWYGYHHSN	EQSGGYAADK	ESTQKAI DGV	TNKNVSIIDK
401	MNTQFEAVGR	EFNNLERRIE	NLNKKMEDGF	LDVWTYNAEL	LVL MENERTL
451	DEHDSNVKNL	YDKVRLQLRD	NAKELGNGCF	EYHKCDNEC	MESVRNGTYD
501	YPQYSEEARL	KREEISGVKL	ESIGTYQILS	IYSTVASSLA	LAIMVAGLSL
551	WMCSNGSLQC	RICI			

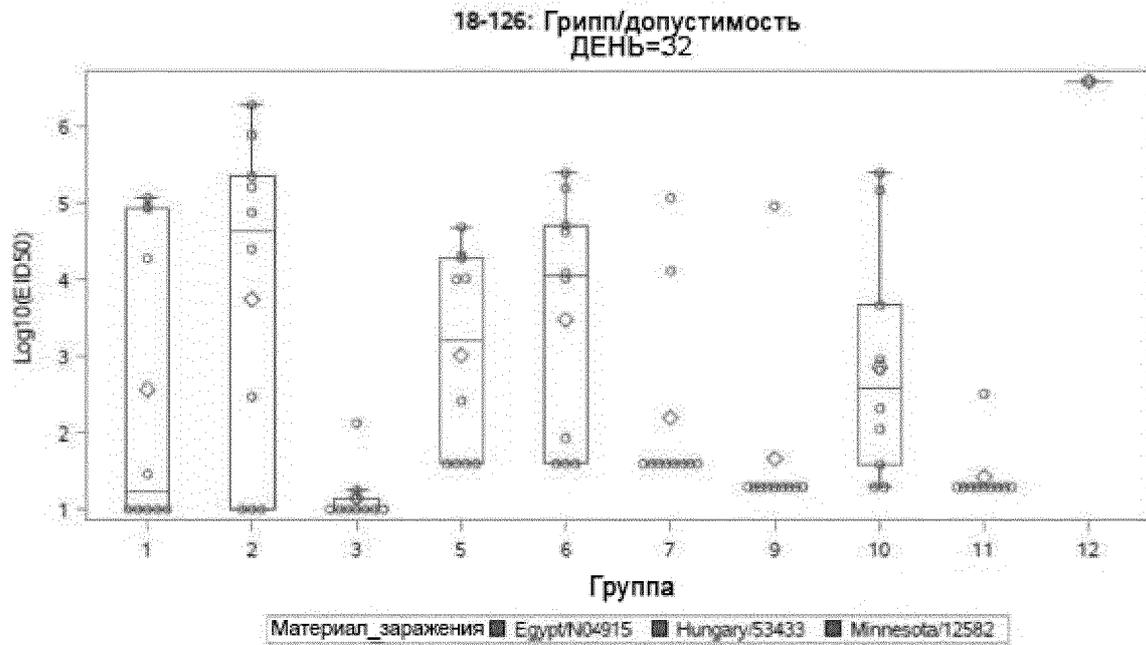
Фиг. 49

```
1      MGSKPSTRIP APLMLITRIM LILGCIRPTS SLDGRPLAAA GIVVTGDKAV
51     NVYTSSQTGS IIVKLLPNMP RDKEACAKAP LEAYNRTLTT LLTPLGDSIR
101    KIQGSVSTSG GKGQGRLLGA VIGSVALGVA TAAQITAAAA LIQANQNAAN
151    ILRLKESIAA TNEAVHEVTD GLSQLSVAVG KMQQFVNDQF NNTARELDCI
201    KITQQVGVEL NLYLTELTTV EGPQITSPAL TQLTIQALYN LAGGNMDYLL
251    TKLGIGNNQL SSLIGSGLIT GYPILYDSQT QLLGIQVNLP SVGNLNNMRA
301    TYLETLSVST TKGYASALVP KVVTVQGSVI EELDTSYCIE SLDLYCTRI
351    VTFPMSPGIY SCLSGNTSAC MYSKTEGALT TPYMALKGSV IANCKITTCR
401    CTDPEGIISQ NYGEAVSLID RHSCNVLSLD GITLRLSGEE DATYQKNISI
451    LDSQVIVTGN LDISTELGNV NNSISNALDR LAESNSKLEK VNVRLTSTSA
501    LITYIIVLTVI SLVFGALSLV LACYLMYKQK AQQKTLLWLG NNTLDQMRAT
551    TRA
```

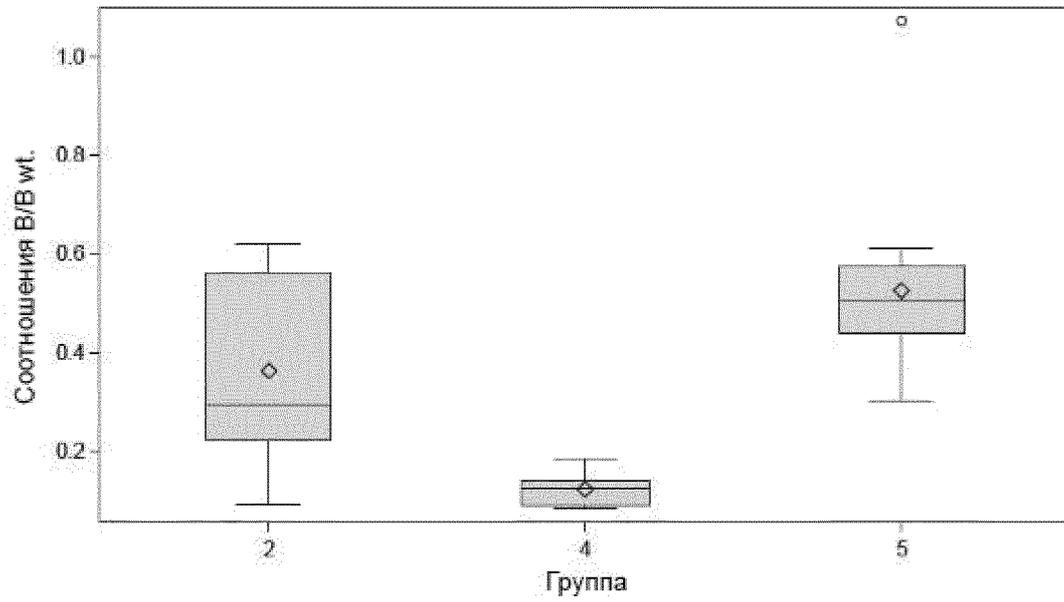
Фиг. 50



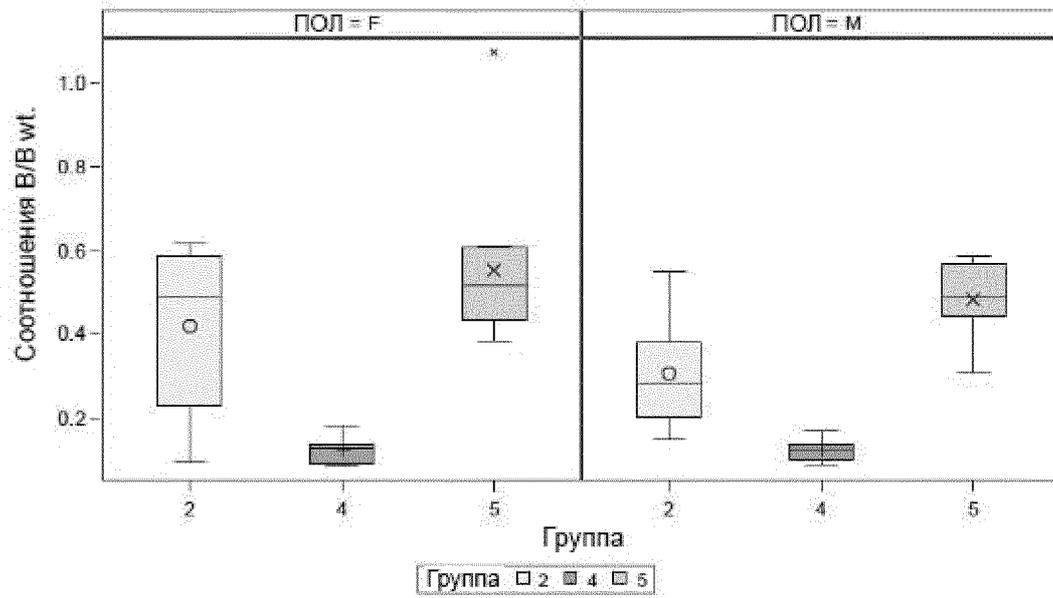
Фиг. 51



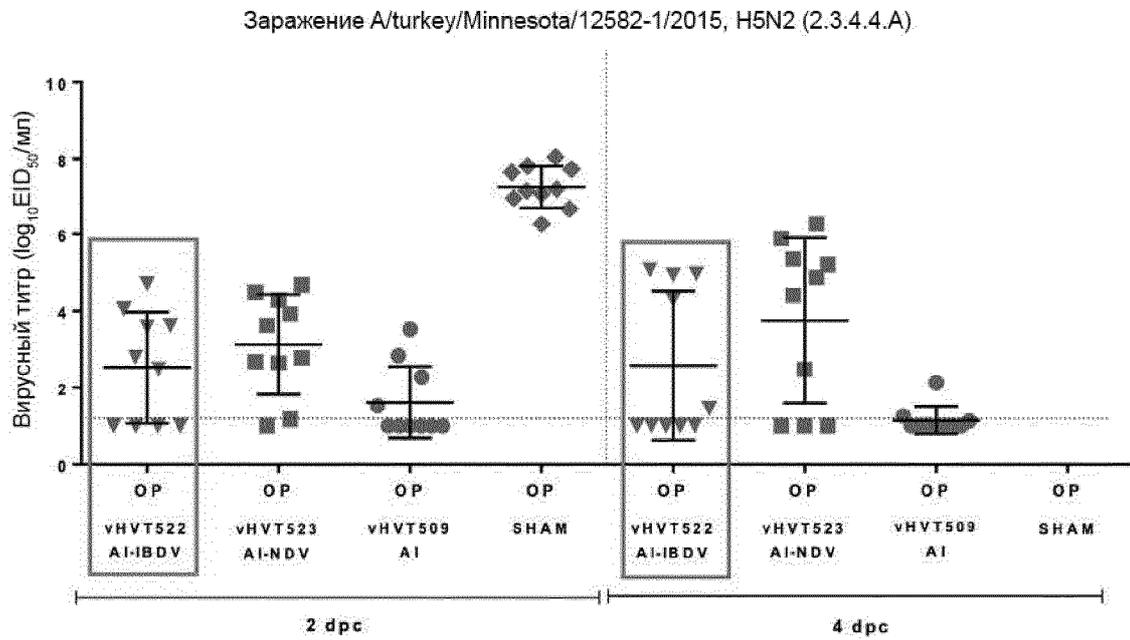
Фиг. 52



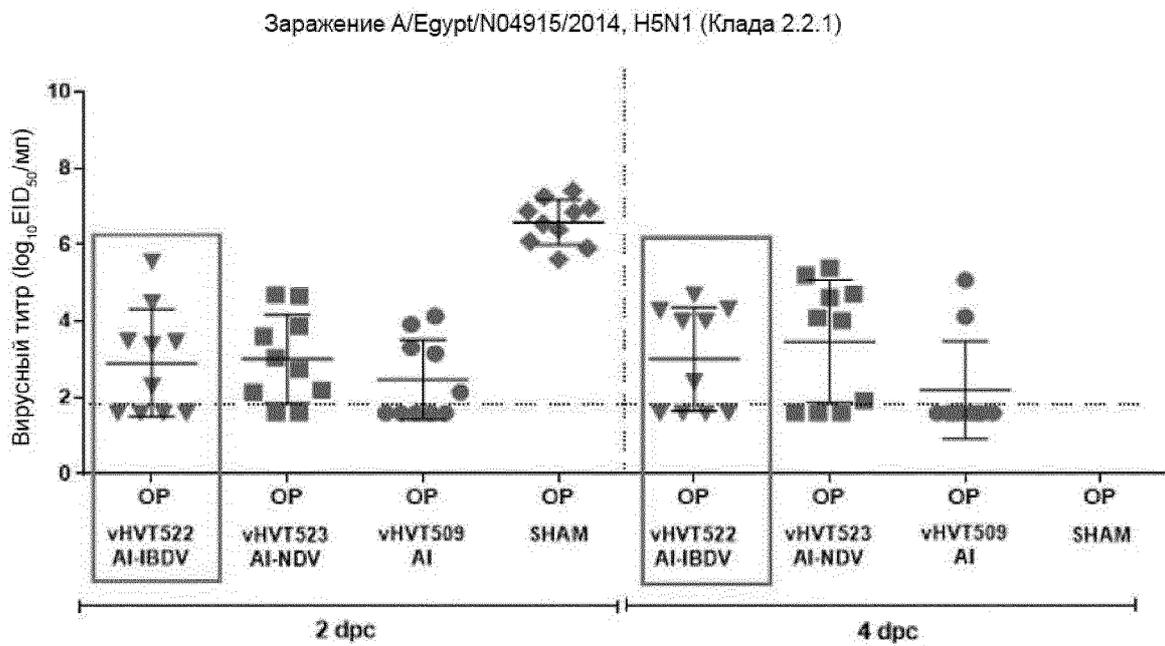
Фиг. 53



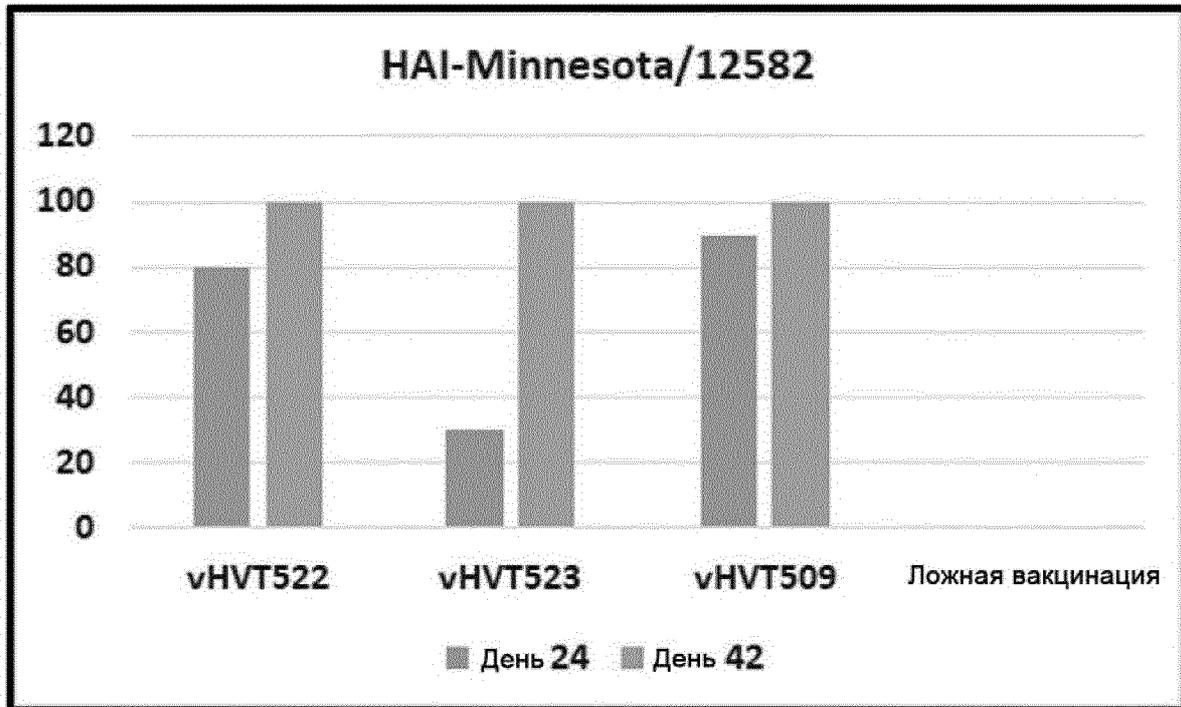
Фиг. 54



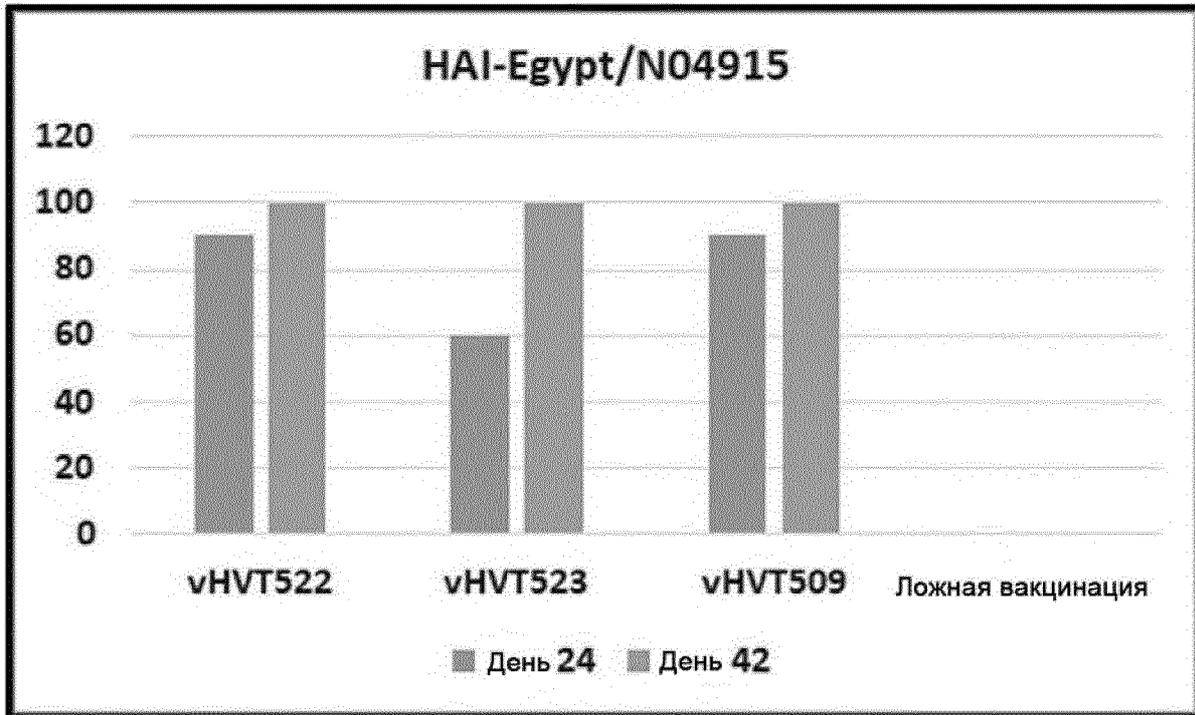
Фиг. 55



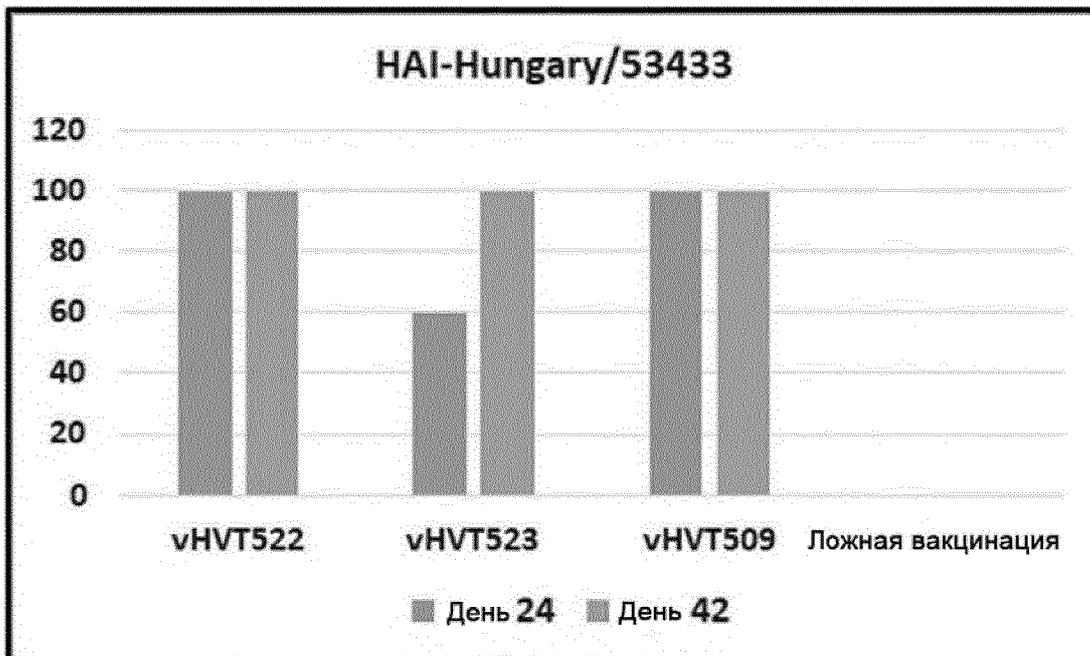
Фиг. 56



Фиг. 58



Фиг. 59



Фиг. 60