

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046215**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.16**

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201990711**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.09.18**

---

(54) **НОВЫЙ EHV САЙТ ИНСЕРЦИИ ORF70**

---

(31) **16189776.4**

(32) **2016.09.20**

(33) **EP**

(43) **2019.09.30**

(86) **PCT/EP2017/073473**

(87) **WO 2018/054837 2018.03.29**

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

(72) Изобретатель:  
**Мундт Элис, Галлай Андреас, Ремет  
Кристина (DE)**

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

(56) **US-A1-2004109873**

S. TRAPP ET AL.: "Potential of Equine Herpesvirus 1 as a Vector for Immunization", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 79, no. 9, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 5445-5454, XP055352750, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.79.9.5445-5454.2005 figure 1

**WO-A1-0008165**

VON EINEM ET AL.: "In vitro and in vivo characterization of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) mutants devoid of the viral chemokine-binding glycoprotein G (gG)", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 362, no. 1, 25 April 2007 (2007-04-25), pages 151-162, XP022046500, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/J.VIROL.2006.12.008 page 152

HUANG J ET AL.: "Glycoprotein G deletion mutants of equine herpesvirus 1 (EHV1; equine abortion virus) and EHV4 (equine rhinopneumonitis virus)", ARCHIVES OF VIROLOGY; OFFICIAL JOURNAL OF THE VIROLOGY DIVISION OF THE INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES, SPRINGER-VERLAG, VI, vol. 150, no. 12, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 2583-2592, XP019378449, ISSN: 1432-8798, DOI: 10.1007/S00705-005-0607-9 abstract

---

(57) Изобретение относится к области (векторных) вакцин и, в частности, к новому EHV сайту инсерции ORF70. Изобретение дополнительно охватывает родственные экспрессионные кассеты и векторы, которые пригодны для экспрессии генов, представляющих интерес, в частности, антиген-кодирующих последовательностей. Вирусные векторы согласно изобретению пригодны для получения иммуногенной композиции или вакцины.

---

**B1**

**046215**

**046215 B1**

### Перечень последовательностей

Изобретение содержит перечень последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821 - 1.825. Перечень последовательностей, сопровождающий настоящее изобретение, таким образом, полностью включен в нее путем ссылки.

### Предпосылки создания изобретения

#### А. Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области (векторных) вакцин, и, в частности, к новому EHV сайту инсерции ORF70. Настоящее изобретение дополнительно охватывает родственные экспрессионные кассеты и векторы, которые пригодны для экспрессии генов, представляющих интерес, в частности, антиген-кодирующих последовательностей. Вирусные векторы согласно настоящему изобретению пригодны для получения иммуногенной композиции или вакцины.

#### Б. Предпосылки и описание предшествующего уровня техники

Патоген лошадей альфагерпесвируса лошадей 1 типа (вирусный аборт кобыл, EHV-1) относится к роду Varicellovirus в подсемействе Alphaherpesvirinae в семействе Herpesviridae в порядке Herpesvirales. Он представляет собой большой, оболочечный вирус с геномом, представленным двухцепочечной ДНК приблизительно 150 тысяч пар оснований. Другими важными представителями подрода Varicellovirus являются альфагерпесвирус человека 3 типа (вирус ветряной оспы), вирус болезни Ауески 1 (вирус псевдобешенства), альфагерпесвирус 1 типа крупного рогатого скота (вирус инфекционного бронхита), и альфагерпесвирус лошадей 4 типа (Вирус ринопневмонии лошадей, EHV-4) (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30) EHV-1 и EHV-4 являются эндемическими и поражают лошадей во всем мире. В то время как EHV-4 вызывает преимущественно умеренную инфекцию верхних дыхательных путей, EHV-1 может вызывать системную инфекцию с различными заболеваниями от респираторных симптомов до аборта и летальной миелозенцефалопатии в зависимости от штамма и иммунологического статуса хозяина. В настоящее время доступны две лицензированные модифицированные живые вакцины (MLV) против EHV-1 в США и Европе, соответственно, Rhinomune™ (Boehringer Ingelheim) и Prevaccino1™ (MSD). Обе содержат классически аттенуированный EHV-1 RacH штамм, который перевивали 256 раз в эпителиальных клетках свиней для аттенуирования (Ma и др. 2013). Механизм аттенуирования исследовали на молекулярном уровне. Osterrieder и др. (1996) показали, что в RacH отсутствуют две геномные копии *orf67* и что восстановления одной копии достаточно для восстановления вирулентности. Дополнительно, RacH несет 1283 по делецию, удаляющей более чем 90% кодирующей последовательности *orf1*, которая кодирует иммуносупрессивный вирусный белок. Другие мутации также могут оказывать влияние на аттенуирование, но до сих пор они не были подробно исследованы. Все это делает RacH чрезвычайно безопасным вакцинным штаммом, поскольку возобновление вирулентности путем перевивания у вакцинированных животных крайне маловероятно, если вообще возможна.

Известно два варианта бактериальной искусственной хромосомы *E.coli* (BAC), заякоривающий полный геном вакцинного штамма RacH альфагерпесвируса лошадей 1 типа (EHV-1): pRacH и pRacH-SE в качестве платформы для разработки векторной вакцины. BAC pRacH-SE был создан на основании pRacH, BAC изначально клонировали в лаборатории Klaus Osterrieder, FU Berlin. pRacH имеет делецию *orf71*, кодирующую гликопротеин II (*gpII*; Wellington и др., 1996). На это место интродуцировали BAC-векторные последовательности и GFP-экспрессионную кассету. Для восстановления немодифицированного EHV-1 RacH из pRacH, его необходимо котрансфектировать с применением плазмиды, содержащей полную *orf71* плюс фланкирующие участки, таким образом, во время репликации вируса части BAC-векторной последовательности и GFP-экспрессионной кассеты заменяются на *orf71* путем гомологичная рекомбинация, вследствие этого будет восстановлен исходный геном RacH. pRacH был модифицирован в настоящем изобретении таким образом, что BAC-векторные последовательности/GFP-экспрессионная кассета становятся само-усекаемыми (SE) при трансфекции в клеточных культурах (Tischer и др., 2007). Эта улучшенная BAC была обозначена как pRacH-SE. pRacH и pRacH-SE оба сами могут служить платформами для разработки векторных вакцин, только с единственным отличием, что pRacH-SE облегчает восстановление *orf71*-репарированного вируса существенным образом.

Было показано, что векторные вакцины на основании EHV-1 RacH способны вызывать иммунитет у млекопитающих некоторых видов, включая свиней, крупный рогатый скот и собак (Rosas и др. 2007, Rosas и др. 2008, Trapp и др. 2005, Said и др. 2013). Гены, кодирующие антигенные белки патогенов, можно экспрессировать с помощью рекомбинантного EHV-1 RacH. С EHV-1-RacH геномом проводят манипуляции в его BAC форме в *E.coli* и приспособливают для экспрессии дополнительных белков обычно путем инсертирования трансгенных экспрессионных кассет (Tischer и др., 2010). При трансфекции ДНК pRacH-SE ДНК в культивированные разрешенные перmissive клетки, репликация EHV-1 инициируется с помощью клеточных транскрипционных факторов. Активность вирусной ДНК-полимеразы приводит к делеции всех связанных с BAC-вектором последовательностей и восстановлению генома EHV-1 RacH до его исходного состояния. Создается патогенный вирус, который неотличим от RacH.

Если с pRacH-SE проводят манипуляции в *E. coli*, например, путем инсерции трансгенных экспрессионных кассет, то вирус, восстановленный после трансфекции в перmissive клетках, будет нести модификацию и будет экспрессировать дополнительный ген. Рекомбинантный EHV-1 RacH можно использовать в качестве векторной вакцины.

Штаммы EHV-1 дикого типа имеют три открытые рамки считывания (orf), называемые orf1, orf 2 и orf3 на одном конце длинного уникального сегмента их генома (координаты последовательности 1298-3614; фиг. 1). Orf1 и orf3 последовательно скомпонованы на одной цепи ДНК, в то время как orf 2 кодируется комплементарной цепью. Вакцинный штамм RacH имеет делецию 1283 по в этом участке, вовлекающей orf 1 и 2, указывая на то, что эти гены являются несущественными для репликации вируса. По этой причине, сайт служит как сайт инсерции трансгена. Этот сайт инсерции называют ORF1/3.

Тем не менее, размер и количество трансгенов, которые могут быть встроены в ORF1/3 сайт инсерции, обычно ограничен. Таким образом, для увеличения способностей EHV-1 вектора, существует неудовлетворенная потребность в новых и альтернативных путях инсерции и экспрессии трансгенов из EHV-1 вектора, в особенности, рекомбинантного EHV-1 RacH вектора.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Для увеличения способностей EHV-1 вектора, настоящее изобретение обеспечивает новые и альтернативные пути для инсерции и экспрессии трансгенов из каркаса EHV-1 вектора.

Настоящее изобретение обеспечивает новый, альтернативный сайт инсерции трансгена ORF70, который можно использовать для инсерции трансгенной последовательности и экспрессии трансгенного белка из EHV-1 вектора, в особенности рекомбинантного EHV-1 RacH.

Новый "ORF70 сайт инсерции" в EHV-1 векторе характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или подобным по отношению к ORF70. Полагают, что делеция полной ORF70 будет неблагоприятной для репликации вируса и, следовательно, производства и эффективности вакцины, поскольку полная делеция ORF70 будет оказывать влияние на промотор ORF71, кодирующий gpII. Новый ORF70 сайт инсерции и/или инсерция (экспрессионной кассеты) в ORF70 функционально определяется таким образом, что ORF71 остается функциональной или интактным.

В специфическом аспекте, ORF70 сайт инсерции охватывает делецию приблизительно части 801 по в пределах ORF70 для RacH (SEQ ID NO.: 20) или на 70, 80, 85, 90, 95, 99% ее гомологичной последовательности. Делетированная часть в RacH геномной последовательности представлена на SEQ ID NO.: 20 (нет доступных номеров нуклеотидов, поскольку полная RacH геномная последовательность не известна). В другом специфическом аспекте, ORF70 сайт инсерции охватывает теоретическую 801 по делецию в пределах ORF70 для EHV-1 штамма ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1). Делетированная часть расположена на геномной последовательности ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1) между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO.: 19).

В настоящем изобретении "фланкирующие участки" относится к рекомбинации экспрессионной кассеты включающий представляющую (ий) интерес последовательность или ген, предпочтительно антиген-кодирующую последовательность, в EHV-1 геноме. Эти фланкирующие участки в природе присутствуют в EHV-1. Up70 фланкирующий участок (417 по, SEQ ID NO.: 13) и Up71 фланкирующий участок (431 по, SEQ ID NO.: 14) выбраны для классической гомологичной рекомбинации для всех трансферных векторов/плазмид, используемых для ORF70 сайта. В EHV-1 штамме ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1) соответствующие последовательности расположенные на нуклеотидах 127264 - 127680 (фланкирующий участок up orf70, SEQ ID NO.: 15) и 128483 - 128913 (фланкирующий участок up orf71, SEQ ID NO.: 16). Для RED рекомбинации фланкирующие участки усечены вследствие расщепление рестриктазой XbaI. Эти усеченные фланкирующие участки являются идентичными к 3' 283 по из 417 по "классического" фланкирующего участка (Up70 фланкирующий участок, SEQ ID NO.: 13) и 5' 144 по из 431 по "классического" фланкирующего участка (Up71 фланкирующий участок, SEQ ID NO.: 14), которые описаны выше. Эти усеченные фланкирующие участки названы Up70 фланкирующий участок (283 по), включенный как SEQ ID NO.: 17 и Up71 фланкирующий участок (144 по) включенный как SEQ ID NO.: 18. Эти различные фланкирующие участки определяют один и тот же ORF70 сайт инсерции. Фланкирующие участки всегда используются парами, один "левый" фланкирующий участок, такой как SEQ ID NO.: 13, 15, 17 и один "правый" фланкирующий участок, такой как SEQ ID NO.: 14, 16, 18.

Карты плазмиды/вектора на фиг. 3 для трансферной плазмиды pU-mC70-BGH (SEQ ID NO.: 21), на фиг. 4 для трансферного вектора pU70-p455-71K71 (SEQ ID NO.: 22), и на фиг. 5 для трансферной плазмиды pU70-p455-H3-71K71 (SEQ ID NO.: 23) являются примерами векторов, содержащих экспрессионную кассету, включающую новый ORF70 сайт инсерции. Карты плазмиды/вектора на фиг. 10 для трансферного вектора pU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), и на фиг. 11 для трансферной плазмиды pU1-3-p430-Hlav-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25) являются примерами векторов, содержащих экспрессионную кассету, включающую ORF1/3 сайт инсерции.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает EHV-1 вектор, экспрессирующий два различных трансгена из одного векторного остова без связывания двух трансгенов с помощью функций, имеющих происхождение из РНК-вируса (2a пептиды, IRES сайты) под контролем а одного промотора.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает вектор альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1),

предпочтительно RasH или RasH-SE, включающий первую (ый) представляющую (ий) интерес последовательность или ген, встроенную (ый) в новый ORF70 сайт инсерции, и вторую (ой) представляющую (ий) интерес последовательность или ген, встроенную (ый) в хорошо известный сайт инсерции, такой как ORF1/3. Дополнительно, настоящее изобретение дополнительно охватывает векторы на основании других герпесвирусов, в частности, альфагерпесвирусов в частности, Varicelloviruses, включая альфагерпесвирус 3 (EHV-3), альфагерпесвирус лошадей 4 типа (EHV-4), альфагерпесвирус 8 (EHV-8), альфагерпесвирус 9 (EHV-9), Альфагерпесвирус крупного рогатого скота 1 типа (BHV-1), Альфагерпесвирус крупного рогатого скота 5 типа (BHV-5), альфагерпесвирус собак 1 типа, и альфагерпесвирус кошек 1 типа.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает клетки-хозяева млекопитающих, включающих такие векторы, и способы создания векторных вакцины, используя такие клетки-хозяева, а также иммуногенные композиции и вакцины, включающие вектор альфагерпесвируса 1 типа (EHV-1) согласно настоящему изобретению.

Следовательно, решение вышеописанной технической проблемы осуществляется с помощью описания и вариантов осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения, и изобретение в его различных аспектах реализуется в соответствии с формулой изобретения.

Эти свойства предоставляют возможность создания рекомбинантные векторные вакцины на основании EHV-1 RasH, экспрессирующие по меньшей мере один антиген из впервые описанного ORF70 сайта инсерции или по меньшей мере два различных антигена параллельно со сходной эффективностью из впервые описанного ORF70 сайта инсерции и другой сайт инсерции, такой как ORF1/3. Если мишень вакцины состоит из двух различных патогенов, то применение нового ORF70 сайта инсерции параллельно с хорошо известным сайтом инсерции, таким как ORF1/3, может существенно уменьшать стоимость товаров и представляет очевидное преимущество по сравнению с вектором, экспрессирующим только один антигенный компонент.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение решает проблемы, присутствующие в известном уровне техники, и обеспечивает значительное усовершенствование в известный уровень техники.

В общих чертах, настоящее изобретение обеспечивает экспрессионную кассету, содержащую

(I) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующую последовательность, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующая последовательность, функционально связана с промоторной последовательностью, и

(II) по меньшей мере один левый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO.: 13 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, SEQ ID NO.: 15 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, и SEQ ID NO.: 17 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, и

(III) по меньшей мере один правый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO.: 14 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, SEQ ID NO.: 16 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, и SEQ ID NO.: 18 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность.

Настоящее изобретение в дальнейшем обеспечивает герпесвирус лошадей (EHV), специфически альфагерпесвируса, такой как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически вектор альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1), наиболее специфически штамм RasH, включающий экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение обеспечивает вектор альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1), предпочтительно штамм RasH, включающий экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает герпесвирус лошадей (EHV), специфически альфагерпесвируса, такой как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-

8 и EHV-9, более специфически вектор альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1), наиболее специфически штамм RasH, включающий

(I) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующую последовательность, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующая последовательность, функционально связана с промоторной последовательностью, и

(II) по меньшей мере один левый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO.: 13 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, SEQ ID NO.: 15 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, и SEQ ID NO.: 17 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, и

(III) по меньшей мере один правый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO.: 14 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, SEQ ID NO.: 16 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность, и SEQ ID NO.: 18 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает герпесвирус лошадей (EHV), специфически альфагерпесвирус, такой как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически вектор альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1), наиболее специфически штамм RacH, включающий представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующую последовательность, встроенную в ORF70.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает герпесвирус лошадей (EHV), специфически альфагерпесвирус, такой как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически вектор альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1), наиболее специфически штамм RacH, включающий первую нуклеотидную представляющую (ий) интерес последовательность или ген, предпочтительно антиген-кодирующую последовательность, встроенную в ORF70 и вторую нуклеотидную представляющую (ий) интерес последовательность или ген, предпочтительно другую антиген-кодирующую последовательность, встроенную во второй сайт инсерции, предпочтительно ORF1/3. В специфическом аспекте указанного EHV-1 вектора согласно настоящему изобретению по меньшей мере два представляющие интерес гена функционально связаны с регуляторными последовательностями, предпочтительно промоторными последовательностями.

В специфическом аспекте вектора согласно настоящему изобретению инсерция в ORF70 характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или подобным в ORF70, при этом ORF71 остается функциональной.

В другом специфическом аспекте вектора согласно настоящему изобретению инсерция в ORF70 характеризуется делецией приблизительно части 801 по в пределах ORF70 для RacH (SEQ ID NO.: 20) или на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность.

В другом специфическом аспекте вектора согласно настоящему изобретению инсерция в ORF70 характеризуется делецией приблизительно части 801 по в пределах ORF70 для RacH (SEQ ID NO.: 20) или делецией ее на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичной и/или идентичной последовательности в любом другом штамме.

В дальнейшем специфическом аспекте вектора согласно настоящему изобретению инсерция в ORF70 характеризуется делецией приблизительно части 801 по в пределах ORF70 для EHV-1 штамма ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), таким образом deletированная часть в геномной последовательности ab4 дикого типа расположена между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO.: 19) или на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% его гомологичную и/или идентичную последовательность.

В дальнейшем специфическом аспекте вектора согласно настоящему изобретению инсерция в ORF70 характеризуется делецией приблизительно части 801 по в пределах ORF70 для EHV-1 штамма ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), таким образом deletированная часть в геномной последовательности ab4 дикого типа расположена между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO.: 19) или делецией ее на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичной и/или идентичной последовательности в любом другом штамме.

В дальнейшем специфическом аспекте вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор, специфически EHV-1 вектор, включает по меньшей мере один из фланкирующих участков, выбранных из группы, включающей: SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16, SEQ ID NO.: 17, и SEQ ID NO.: 18 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичную и/или идентичную последовательность любой из этих последовательностей.

В другом специфическом аспекте вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор, специфически EHV-1 вектор, включает (I) по меньшей мере один левый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 15, и SEQ ID NO.: 17, и (II) по меньшей мере один правый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 16, и SEQ ID NO.: 18.

В дальнейшем специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующая последовательность не встречается в природе и/или является рекомбинантной.

В другом специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность является рекомбинантной и/или гетерологичной и/или экзогенной.

В дальнейшем специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению указанная антиген-кодирующая последовательность относится к животному, инфициро-

ванному патогену, используемому для производства пищевых продуктов, такому как свиньи и/или крупный рогатый скот.

В специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению указанная антиген-кодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему свиньи. В дальнейшем специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус свиного гриппа А (IAV). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген представляет собой гемагглютининовый (НА) антиген, в особенности указанный гемагглютининовый антиген имеет происхождение из вируса гриппа А. Например, вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2)), вирус гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)), вирус гриппа А (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), и/или вирус гриппа А (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2)). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой SEQ ID NO, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO.: 26, 27, 28 и 29. В другом специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

В другом специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению указанная антиген-кодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему крупный рогатый скот. В дальнейшем специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус Шмалленберга (SBV). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген представляет собой Gc белок из SBV (SBV-Gc). В более специфическом аспекте, указанный антиген представляет собой усеченную форму SBV-Gc, такую как, например, часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-Gc. В специфическом аспекте такая часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-GC имеет происхождение из аминоконца из SBV гликопротеина Gc. В дальнейшем специфическом аспекте такая часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-GC модифицирована для обеспечения эффективного транспорта к и инсерции в плазматические мембраны инфицированных клеток (например, путем инсерции сигнального пептида в последовательность из SBV-Gc и/или путем инсерции трансмембранного якорного пептида в последовательность из SBV-Gc), и /или указанная часть из 234 аминокислот является оптимизированной по частоте использования кодона для экспрессии в EHV-1, и/или GS линкер (например, SEQ ID NO.: 30) встроен между Gc частью и сигнальным пептидом/трансмембранным якорем. В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген кодируется последовательностью, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% идентичность к нуклеотидной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 31. В другом специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой SEQ ID NO.: 31.

В специфическом аспекте вектора согласно настоящему изобретению представляющий интерес ген функционально связан с регуляторной последовательностью, предпочтительно промоторной последовательностью.

В дальнейшем специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению указанный вектор или экспрессионная кассета дополнительно содержит по меньшей мере еще одну дополнительную регуляторную последовательность, такую как терминирующий кодон или последовательность полиаденилирования.

В другом специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению указанный вектор или экспрессионная кассета дополнительно содержит дополнительные регуляторные последовательности, такие как терминирующий кодон и/или последовательность полиаденилирования.

В дальнейшем специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению указанный вектор или экспрессионная кассета дополнительно содержит по меньшей мере одну дополнительную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующую последовательность. В одном аспекте по меньшей мере одна дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующая последовательность, встроена в тот же самый сайт инсерции ORF70, например, с помощью IRES/2a пептида (ов). В другом аспекте указанный вектор или экспрессионная кассета содержат по меньшей мере одну дополнительную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антиген-кодирующая последовательность, встроена в другой сайт инсерции, предпочтительно в ORF1/3.

В специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению

по меньшей мере два представляющие интерес гена функционально связаны с регуляторными последовательностями, предпочтительно промоторными последовательностями.

В дальнейшем аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению, промоторную (ые) последовательность (и), функционально связанную (ые) с одной или двумя или более последовательностями или представляющими интерес генами, выбирают из группы, включающей: SV40 большой Т, HCMV и MCMV немедленно-ранний ген 1, промотор фактора элонгации альфа человека, бакуловирусный промотор полиэдрина, функциональный фрагмент из 4pgG600 (SEQ ID No. 1), предпочтительно указанный функциональный фрагмент представляет собой р430 (SEQ ID NO.: 3), функциональный фрагмент из комплементарной нуклеотидной последовательности 4pgG600 (SEQ ID No. 1), функциональный фрагмент из 4pMCP600 (SEQ ID No. 2), предпочтительно указанный функциональный фрагмент представляет собой р455 (SEQ ID NO.: 4), функциональный фрагмент из комплементарной нуклеотидной последовательности 4pMCP600 (SEQ ID No. 2).

В дальнейшем специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению промоторные последовательности, функционально связанные с по меньшей мере двумя представляющими интерес генами, являются различными.

В другом специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интерес геном, представляет собой р455 (SEQ ID No. 4) или ее функциональный фрагмент или производное или ее комплементарные нуклеотидные последовательности и где промоторная последовательность, функционально связанная с другим представляющим интерес геном, представляет собой р430 (SEQ ID No. 3) или ее функциональный фрагмент или производное или ее комплементарные нуклеотидные последовательности.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает плазмиду, включающую фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (обе подробно описано ниже) в специфический целевой сайт в вирусный векторный геном, предпочтительно в *orf1/3* сайт из EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически *RacH* вектор, такой как трансферная плазида рU-mC70-BGH (SEQ ID NO: 21) и/или трансферный вектор рU70-p455-71K71 (SEQ ID NO.: 22), и/или трансферная плазида рU70-p455-H3-71K71 (SEQ ID NO.: 23), и/или трансферный вектор рU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), и /или трансферная плазида рU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает плазмиду, включающую фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (обе подробно описано ниже) в специфический целевой сайт в вирусный векторный геном, предпочтительно в *orf70* сайт из EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически *RacH* вектора.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает плазмиду, включающую фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (обе подробно описано ниже) в специфический целевой сайт в вирусный векторный геном, предпочтительно в *orf1/3* сайт из EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически *RacH* вектор и регуляторную нуклеиновую кислоту, предпочтительно промотор, предпочтительно р430, такой как трансферный вектор рU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), и /или трансферная плазида рU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает плазмиду, включающую фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (обе подробно описано ниже) в специфический целевой сайт в вирусный векторный геном, предпочтительно в *orf70* сайт из EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически *RacH* вектор и регуляторную нуклеиновую кислоту, предпочтительно промотор, предпочтительно р455, такой как трансферный вектор рU70-p455-71K71 (SEQ ID NO.: 22), и/или трансферная плазида рU70-p455-H3-71K71 (SEQ ID NO.: 23).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает плазмиду, включающую фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (обе подробно описано ниже) в специфический целевой сайт в вирусный векторный геном, предпочтительно в *orf1/3* сайт из EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически *RacH* вектора и регуляторную нуклеиновую кислоту, предпочтительно промотор, предпочтительно р430, такой как трансферный вектор рU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), и /или трансферная плазида рU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает плазмиду, включающую фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (обе подробно описано ниже) в специфический целевой сайт в вирусный векторный геном, предпочтительно в *orf1/3* сайт из EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически *RacH* вектора и регуляторную нуклеотидную последовательность, предпочтительно промотор, предпочтительно р430, и вторую регуляторную нуклеиновую кислоту, предпочтительно последовательность полиаденилирования, предпочтительно BGH последовательность полиаденилирования, такой как трансферный вектор рU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), и /или трансферная плазида рU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает плазмиду, включающую фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (обе подробно описано ниже) в специфический целевой сайт в вирусный векторный геном, предпочтительно в *orf70* сайт из EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически *RacH* вектор и регуляторную нуклеотидную последовательность, предпочтительно промотор, предпочтительно *p455*, и вторую регуляторную нуклеиновую кислоту, предпочтительно последовательность полиаденилирования, предпочтительно *71pA* последовательность полиаденилирования, такой как трансферный вектор *pU70-p455-71K71* (SEQ ID NO.: 22), и/или трансферная плаزمида *pU70-p455-H3-71K71* (SEQ ID NO.: 23).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает способ получения вектора в соответствии с настоящим изобретением, включающий:

а) инсерцию первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, такого как антиген-кодирующей последовательности, в *ORF70*,

б) необязательно функциональное связывание указанного первого представляющего интерес гена с регуляторной нуклеотидной последовательностью/промоторной последовательностью, предпочтительно *p455* или *p430*,

в) необязательно функциональное связывание указанного первого представляющего интерес гена с (дополнительной) регуляторной нуклеиновой кислотой, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно *71pA* или *BGHpA*.

В специфическом аспекте способ дополнительно включает

а) инсерцию представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно второго представляющего интерес гена во второй сайт инсерции, предпочтительно *ORF1/3*,

б) необязательно функциональное связывание указанного второго представляющего интерес гена с регуляторной нуклеотидной последовательностью/промоторной последовательностью, предпочтительно *p455* или *p430*,

в) необязательно функциональное связывание указанного первого представляющего интерес гена с регуляторной нуклеиновой кислотой, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно *71pA* или *BGHpA*.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает набор, состоящий из вектора в соответствии с настоящим изобретением, необязательно реагента(ов) для трансфекции, и листка-вкладыша с инструкцией.

Настоящее изобретение также охватывает клетку-хозяина млекопитающего, отличающуюся тем, что она содержит вектор в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает способ получения клетки-хозяина, который характеризуется следующими стадиями:

а) инфицирование клетки-хозяина млекопитающего в соответствии с настоящим изобретением с помощью вектора в соответствии с настоящим изобретением,

б) культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,

в) необязательно сбор указанной клетки-хозяина.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает применение *ORF70* в векторе герпесвируса лошадей (EHV), специфически в альфагерпесвирусе лошадей, таком как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически в векторе альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1), наиболее специфически в *RacH*, в качестве сайта инсерции в указанном векторе герпесвируса лошадей (EHV), где указанный сайт инсерции способствует/облегчает экспрессию представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, такой как антиген-кодирующая последовательность, при этом указанный *ORF70* сайт инсерции включает частичную делецию, усечение, замену, модификацию или подобные в *ORF70*, и при этом *ORF71* остается функциональной.

Изобретение дополнительно охватывает применение вектора в соответствии с настоящим изобретением или клетки-хозяина млекопитающего в соответствии с настоящим изобретением для приготовления иммуногенной композиции или вакцины.

Изобретение дополнительно охватывает иммуногенную композицию, содержащую

а) вектор в соответствии с настоящим изобретением, и/или

б) полипептид, экспрессируемый вектором в соответствии с настоящим изобретением, такой как вирус, модифицированный живой вирус, вирусоподобная частица (VLP) или подобные, и

в) необязательно фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель является пригодным для перорального, внутривенного, внутримышечного или интраназального введения, предпочтительно указанная иммуногенная композиция включает вирус. В специфическом аспекте указанный вирус представляет собой патогенный вирус.

Изобретение дополнительно охватывает вакцина или фармацевтическая композиция, содержащая

а) вектор в соответствии с настоящим изобретением, и/или

б) полипептид, экспрессируемый вектором в соответствии с настоящим изобретением, такой как модифицированный живой вирус, вирусоподобная частица (VLP) или подобные, и

в) фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель, предпочтительно

указанный носитель является пригодным для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального введения, необязательно указанная вакцина дополнительно содержит адъювант.

Настоящее изобретение демонстрирует успешное вакцинирование, используя вектор или экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению в различных видах, в особенности у свиней и крупного рогатого скота. Например, было показано, что экспериментальная конструкция вакцины на основании EHV-1 RasH, экспрессирующая модифицированный антиген вируса Шмалленберга (SBV) во впервые описанном ORF70 сайте инсерции является эффективной у крупного рогатого скота (см. пример 9). Все вакцинированные животные проявили уменьшенные уровни репликации вируса после заражения вирулентным вирусом Шмалленберга, что оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Два из четырех вакцинированных животных были полностью защищены, не было обнаружено репликации вируса в течение всего периода отбора образцов. У двух других животных в этой группе была обнаружена репликация SBV гена с помощью qRT-PCR, но в более низких уровнях по сравнению с зараженной контрольной группой. (фиг. 27A). Кроме того, у невакцинированных контрольных животных не было обнаружено SBV-специфических антител с помощью реакции сыывороточной нейтрализации перед контрольным заражением. Начиная с одной или двух недель после инфицирования можно обнаружить нейтрализующие антитела у всех невакцинированных животных (фиг. 27B). В отличие от невакцинированной контрольной группы, SBV-специфические нейтрализующие антитела были обнаружены в день контрольного заражения в двух из четырех особей крупного рогатого скота, иммунизированных с применением gEHV-SBV-Gc. У оставшихся двух животных из этой группы, не было обнаружено SBV-специфических нейтрализующих антител перед контрольным заражением, но через две недели после инфицирования, присутствовали нейтрализующие антитела (фиг. 27B). SBV-специфические нейтрализующие антитела у всех четырех животных были более низкими по сравнению с зараженным контролем, указывая на значительно уменьшенную репликацию вируса после заражения.

Таким образом, в специфическом аспекте указанная иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция включает вектор или экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению, при этом указанная антиген-кодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему крупный рогатый скот. В дальнейшем специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус Шмалленберга (SBV). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген представляет собой Gc белок из SBV (SBV-Gc). В более специфическом аспекте, указанный антиген представляет собой усеченную форму SBV-Gc, такую как, например, часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-Gc. В специфическом аспекте такая часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-GC имеет происхождение из аминоконца из SBV гликопротеина Gc. В дальнейшем специфическом аспекте такая часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-GC модифицирована для обеспечения эффективного транспорта к и инсерции в плазматические мембраны инфицированных клеток (например, путем инсерции сигнального пептида в последовательность из SBV-Gc и/или путем инсерции трансмембранного якорного пептида в последовательность из SBV-Gc), и /или указанная часть из 234 аминокислот является оптимизированной по частоте использования кодона для экспрессии в EHV-1, и/или GS линкер (например, SEQ ID NO.: 30) встроены между Gc частью и сигнальным пептидом/трансмембранным якорем. В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген кодируется последовательностью, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% идентичность к нуклеотидной последовательности, как указано в SEQ ID NO.: 31. В другом специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой SEQ ID NO.: 31.

Кроме того, в другом специфическом аспекте указанная иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция включает вектор или экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению, при этом указанная антиген-кодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему свиней. В дальнейшем специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус свиного гриппа А (IAV). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген представляет собой гемагглютининовый (HA) антиген, в особенности указанный гемагглютининовый антиген имеет происхождение из вируса гриппа А. Например, вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2)), вирус гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)), вирус гриппа А (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), и/или вирус гриппа А (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2)). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой SEQ ID NO, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO.: 26, 27, 28 и 29. В другом специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

Изобретение дополнительно охватывает способ приготовления иммуногенной композиции или вакцины для уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических симптомов, связанных с или вызываемых инфекцией, включающий следующие стадии:

- а) инфицирование клетки-хозяина млекопитающего в соответствии с настоящим изобретением с применением вектора в соответствии с настоящим изобретением,
- б) культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,
- в) сбор инфицированных клеточных культур,
- г) необязательно очистку инфицированных клеточных культур со стадии в),
- д) необязательно смешивание указанной собранной инфицированной клеточной культуры с фармацевтически приемлемым носителем.

Медицинское применение.

Изобретение дополнительно охватывает иммуногенную композицию или вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения в способе уменьшения или предотвращения клинических симптомов или заболевания, вызываемого инфицированием патогеном у животного или для применения в способе лечения или предотвращения инфицирования патогеном у животного, предпочтительно указанное животное представляет собой животное, используемое для производства пищевых продуктов, такое как свиньи или крупный рогатый скот, в особенности свинью.

Изобретение дополнительно охватывает способ иммунизации животного, такого как животное, используемое для производства пищевых продуктов, включая свиней, от клинического заболевания, вызываемого патогеном в указанном животном, где указанный способ включает стадию введения животному иммуногенной композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением, при этом указанная иммуногенная композиция или вакцина не может вызывать клинические симптомы инфекции, но способна индуцировать иммунный ответ, который иммунизирует указанного животного от патогенных форм указанного патогена.

В специфическом аспекте медицинского применения согласно настоящему изобретению, описанного выше, или способа иммунизации животного, как описано выше, указанная антиген-кодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему свиньи. В дальнейшем специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус свиного гриппа А (IAV). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген представляет собой гемагглютининовый (HA) антиген, в особенности указанный гемагглютининовый антиген имеет происхождение из вируса гриппа А. Например, вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2)), вирус гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)), вирус гриппа А (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), и/или вирус гриппа А (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2)). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой SEQ ID NO, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO.: 26, 27, 28 и 29. В другом специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

В другом специфическом аспекте медицинского применения согласно настоящему изобретению, описанного выше, или способа иммунизации животного, как описано выше, указанная антиген-кодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему крупный рогатый скот. В дальнейшем специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус Шмалленберга (SBV). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген представляет собой Gc белок из SBV (SBV-Gc). В более специфическом аспекте, указанный антиген представляет собой усеченную форму SBV-Gc, такую как, например, часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-Gc. В специфическом аспекте такая часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-GC имеет происхождение из аминоконца из SBV гликопротеина Gc. В дальнейшем специфическом аспекте такая часть из 234 аминокислот кодирующего участка из SBV-GC модифицирована для обеспечения эффективного транспорта к и инсерции в плазматические мембраны инфицированных клеток (например, путем инсерции сигнального пептида в последовательность из SBV-Gc и/или путем инсерции трансмембранного якорного пептида в последовательность из SBV-Gc), и /или указанная часть из 234 аминокислот является оптимизированной по частоте использования кодона для экспрессии в ENV-1, и/или GS линкер (например, SEQ ID NO.: 30) встроен между Gc частью и сигнальным пептидом/трансмембранным якорем. В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген кодируется последовательностью, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% идентичность к нуклеотидной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 31. В другом специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, коди-

руемой SEQ ID NO.: 31.

Изобретение также охватывает набор для иммунизации животного, предпочтительно животного, используемого для производства пищевых продуктов, такого как свиньи или крупный рогатый скот, от заболевания, связанного с и/или уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических симптомов, связанных с или вызываемых патогеном у животного, содержащий:

- а) дозатор, способный вводить вакцину указанному животному; и
- б) иммуногенную композицию или вакцину в соответствии с настоящим изобретением, и
- в) необязательно листок-вкладыш с инструкцией.

Определения.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном изобретении, имеют то же значение, как обычно это понимается специалистом в данной области техники, к которой относится это изобретение, на момент подачи заявки. Смысл и объем терминов должен быть ясен; однако, в случае какой-либо скрытой двусмысленности, определения, представленные в данном изобретении, главенствуют над любым словарем или внешним определением. Кроме того, если иное не предусмотрено контекстом, то особые условия должны включать множества, а множественные термины будут включать единственное число. При этом использование союза "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включающий", а также других форм, таких как "включает" и "включенный" не является ограничивающим. Все патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, являются введенными в данное изобретение в качестве ссылки.

При осуществлении настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, традиционные методики вирусологии, молекулярной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК, химии белка и иммунологии, которые являются известными специалистам в данной области техники. Такие методики являются подробно описанными в литературе. Смотри, например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, тома I, II и III, 2-ое изд. (1989); *DNA Cloning*, тома I и II (D. N. Glover ред. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ред. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins ред. 1984); *Animal Cell Culture* (R. K. ред., 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL изд., 1986); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); серии, *Methods In Enzymology* (S. Colowick и N. Kaplan ред., Academic Press, Inc.); *Protein purification methods - a practical approach* (E.L.V. Harris и S. Angal ред., IRL Press at Oxford University Press); и *Handbook of Experimental Immunology*, тома I-IV (D. M. Weir и C. C. Blackwell ред., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Перед описанием настоящего изобретения более подробно следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной ДНК, полипептидом или последовательностями или параметрами процессов, которые, конечно, могут варьировать. Также следует понимать, что используемая в данном изобретении терминология предназначена только для цели описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения. Следует отметить, что, как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа "любой" или "этот" включают ссылки на множественное число, если из содержания явно не следует иное. Так, например, ссылка на "любой антиген" включает в себя смесь двух или более антигенов, ссылка на "любой наполнитель" включает смеси двух или более наполнителей и тому подобное.

Молекулярно-биологические определения.

Термин "вектор", как он известен в данной области техники, относится к полинуклеотидной конструкции, типично плазмиде или бактериальной искусственной хромосоме, используемой для передачи генетического материала в клетку-хозяин. Векторы могут представлять собой, например, бактерии, вирусы, фаги, бактериальные искусственные хромосомы, космиды или плазмиды. Вектор, как используется в настоящем изобретении, может состоять из или содержать либо ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, вектор состоит из ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой патогенный вирус. Такой вирусный вектор содержит вирусный геном, который обрабатывают таким образом, что он несет чужеродный ген, который не принимает участие ни в репликации вирусного вектора, ни в клеточной культуре, ни в животном-хозяине. В соответствии со специфическими аспектами настоящего изобретения, вектор можно использовать в различных аспектах, таких как только передача генетического материала, для трансфекции клеток-хозяев или организмов, для применения в качестве вакцины, например, ДНК вакцин или для экспрессии генов. Экспрессия гена представляет собой термин, описывающий биосинтез белка в клетке, которая управляется специфической полинуклеотидной последовательностью, называемую геном. В специфическом аспекте вектор может представлять собой "экспрессионный вектор", который представляет собой вектор, способный управлять экспрессией белка, кодируемого одним или несколькими генами, которые несет вектор, если он находится в подходящей окружающей среде.

Векторы и способы получения и/или использования векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут представлять собой или являются аналогичными способам, описанным, в частности, в: патенты США №№ 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, PCT публикации WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paolletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update," *PNAS USA* 93: 11349-11353, октябрь 1996

г.; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, октябрь 1996 г.; Smith и др., патент США № 4,745,051 (рекомбинантный бакуловирус); Richardson, C. D. (ред.), *Methods in Molecular Biology* 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith и др., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", *Molecular and Cellular Biology*, December, 1983, том 3, № 12, сс. 2156-2165; Pennock и др., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus Vector", *Molecular and Cellular Biology* март 1984 г., том 4, № 3, с. 406; EPA0 370 573; опубликованная заявка на патент США № 920,197, поданная 16 октября 1986 г.; опубликованная заявка на патент EP № 265785; патент США № 4,769,331 (рекомбинантный герпесвирус); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, октябрь 1996 г.; Andreansky и др., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, октябрь 1996 г.; Robertson и др., "Erstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, October 1996; Frolov и др., "Alphavirus-based Expression Vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, октябрь 1996 г.; Kitson и др., *J. Virol.* 65, 3068-3075, 1991; патенты США №№ 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; принятые к рассмотрению заявки на патент США сер. №№ 08/675,556, и 08/675,566 обе поданные 3 июля 1996 г. (рекомбинантный аденовирус); Grunhaus и др., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," *Seminars in Virology* (том 3) сс. 237-52, 1993; Ballay и др. *EMBO Journal*, том 4, сс. 3861-65, *Graham, Tibtech* 8, 85-87, апрель 1990 г.; Prevec и др., *J. Gen Virol.* 70, 42434; PCT WO 91/11525; Feigner и др. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561, *Science*, 259: 1745-49, 1993; и McClements и др., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, октябрь 1996; и патенты США №№ 5,591,639, 5,589,466, и 5,580,859, а также WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang и др., *Nature*, и Furth и др., *Analytical Biochemistry*, relating to DNA Expression Vectors. См. также WO 98/33510; Ju и др., *Diabetologia*, 41: 736-739, 1998 (лентивирусная экспрессионная система); Sanford и др., патент США № 4,945,050; Fischbachet и др. (Intracel); WO 90/01543; Robinson и др., *Seminars in Immunology* том 9, сс. 271-283 (1997), (ДНК векторные системы); Szoka и др., патент США № 4,394,448 (способ инсерции ДНК в живые клетки); McCormick и др., патент США № 5,677,178 (применение цитопатических вирусов); и патент США № 5,928,913 (векторы для доставки генов); а также другие документы, процитированные в настоящем изобретении.

Термин "вирусный вектор" описывает генетически модифицированный вирус, с которым можно манипулировать с помощью методик рекомбинантной ДНК таким образом, что его вход в клетку-хозяин приводит к специфической биологической активности, например, экспрессии трансгена, который переносится вектором. В специфическом аспекте, трансген представляет собой антиген. Вирусный вектор может быть способным реплицироваться или неспособным реплицироваться в целевой клетке, ткани или организме.

Создание вирусного вектора можно осуществлять, используя любые подходящие методы генетической инженерии, известные в данной области техники, включая, но не ограничиваясь только ими, стандартные методы расщепления рестрикционной эндонуклеазой, лигирования, трансформации, очистки плазмид, секвенирования ДНК, трансфекции в клеточных культурах, например, как описано в Sambrook и др. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)) или K. Maramorosch и H. Koprowski (*Methods in Virology* том VIII, Academic Press Inc. London, UK (2014)).

Вирусный вектор может включать последовательности из генома любого известного организма. Последовательности могут быть инсертированы в их нативной форме или могут быть модифицированы любым образом для получения желательной активности. Например, последовательности могут содержать инсерции, делеции или замещения.

Вирусный вектор может включать кодирующие участки для двух или более белков, представляющих интерес. Например, вирусный вектор может включать кодирующий участок для первого представляющего интерес белка и кодирующий участок для второго представляющего интерес белка. Первый представляющий интерес белок и второй представляющий интерес белок могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор может включать кодирующий (е) участок (и) для третьего или четвертого представляющего интерес белка. Третий или четвертый представляющий интерес белок могут быть одинаковыми или разными. Общая длина двух или более представляющих интерес белков, кодируемых вирусным вектором, может изменяться. Например, общая длина двух или более белков может составлять по меньшей мере приблизительно 200 аминокислот. По меньшей мере приблизительно 250 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 300 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 350 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 400 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 450 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 500 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 550 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 600 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 650 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 700 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 750 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот, или больше.

Предпочтительные вирусные векторы включают векторы герпесвирусов, такие как имеющие происхождение из EHV-1 или EHV-4 или других Varicellovirus, таких как PrV (вирус псевдобешенства) или BHV-1 (герпесвирус крупного рогатого скота 1 типа).

В соответствии со специфическими аспектами настоящего изобретения, термин "вирусный вектор" или альтернативно "вирусная конструкция" относится к рекомбинантной вирусной конструкции, имеющей происхождение из вируса, который выбран из семейств Herpesviridae, такие как EHV-1, EHV-4. Предпочтительные вирусные векторы включают векторы герпесвирусов, такие как имеющие происхождение из EHV-1 или EHV-4.

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

Термин "конструкция", как используется в настоящем изобретении, относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, такой как плаزمид, ВАС или рекомбинантный вирус, которые были созданы искусственно.

Термин "плазмид" относится к цитоплазматической ДНК, которая реплицируется независимо от бактериальной хромосомы в бактериальной клетке-хозяине. В специфическом аспекте настоящего изобретения термин "плазмид" и/или "трансферная плазмид" относится к элементу технологии рекомбинантной ДНК, используемой для конструирования, например, экспрессионной кассеты для инсерции в вирусный вектор. В другом специфическом аспекте термин "плазмид" может использоваться для указания плазмиды, пригодной для ДНК вакцинации.

Как используется в настоящем изобретении, термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" являются взаимозаменяемыми и относятся к любой нуклеиновой кислоте.

Термин "нуклеиновая кислота", "нуклеотидная последовательность", "нуклеотидная последовательность", "полинуклеотид", "полинуклеотидная последовательность", "РНК последовательность" или "ДНК последовательность", как используется в настоящем изобретении, относится к олигонуклеотиду, нуклеотиду или полинуклеотиду и их фрагментам и частям и к ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными и представлять собой смысловую или антисмысловую цепь. Последовательность может представлять собой некодирующую последовательность, кодирующую последовательность или смесь обоих. Нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению могут быть получены, используя стандартные техники, хорошо известные квалифицированному специалисту в данной области техники.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" также специфически охватывают нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличающихся от пяти биологически встречающихся оснований (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил).

Термины "регуляторная нуклеиновая кислота", "регуляторный элемент" и "элемент контроля экспрессии" используются взаимозаменяемо и относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые могут оказывать влияние на экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Эти термины используются в более широком значении и охватывают все элементы, которые промотируют или регулируют транскрипцию, включая промоторы, промоторные последовательности, ядерные элементы, необходимые для основного взаимодействия РНК-полимеразы и транскрипционные факторы, элементы, расположенные против хода транскрипции, энхансеры и элементы ответа. Типичные регуляторные элементы у прокариот включают промоторы, операторные последовательности и сайты связывания рибосом. Регуляторные элементы, которые используются в эукариотических клетках, могут включать, не ограничиваясь только ими, последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию, такие как промоторы, энхансеры, сигналы сплайсинга, сигналы полиаденилирования, терминаторы, сигналы распада белка, внутренний участок посадки рибосомы (IRES), пикорнавирусные 2A последовательности, и другие, которые обеспечиваются для и/или регулируют экспрессию кодирующей последовательности и/или продукцию кодируемого полипептида в клетке-хозяине.

"Внутренний участок посадки рибосомы" или "IRES" описывает последовательность, которая функционально способствует инициации трансляции, независимой от гена 5' IRES и предоставляет возможность трансляции двух цистронов (открытие рамки считывания) из единичного транскрипта в животной клетке. IRES обеспечивает независимый сайт посадки рибосомы для трансляции открытой рамки считывания, расположенный по ходу транскрипции сразу после нее. В отличие от бактериальной мРНК, которая может быть полицистронной, то есть кодировать несколько различных полипептидов, которые могут транслироваться последовательно из мРНК, большинство мРНК клеток животных являются моноцистронными и кодируют синтез только одного полипептида. С полицистронным транскриптом в эукариотической клетке, трансляция будет иницироваться с 5' крайнего сайта инициации трансляции, терминируясь на первом стоп-кодоне, и транскрипт будет высвобождаться с рибосомы, что будет приводить к трансляции только первого кодируемого полипептида в мРНК. В эукариотической клетке, полицистронный транскрипт, имеющий IRES, функционально связанный со второй или последующей открытой рамкой считывания в транскрипте, предоставляет возможность последовательной трансляции открытой рамки считывания, которая расположена по ходу транскрипции, для получения двух или более полипептидов, кодируемых тем же самым транскриптом. IRES может быть различной длины и из различных источников, например, вируса энцефаломиокардита (EMCV), пикорнавирусов (например, вируса ящура,

FMDV или полиовируса (PV), или вируса гепатита С (HCV). Были описаны различные IRES последовательности и их применение в векторных конструкциях и они хорошо известны в данной области техники. Кодированная последовательность по ходу транскрипции функционально связана с 3' концом IRES на любом расстоянии, которое не оказывает отрицательного влияния на экспрессию расположенного по ходу транскрипции гена. Оптимальное или допустимое расстояние между IRES и началом расположенного по ходу транскрипции гена легко может быть определено путем изменения расстояния и измерения экспрессии в зависимости от расстояния.

Термин "2a" или "2a пептид" обозначает короткие олигопептидные последовательности, описанные как 2a и '2a-подобные', которые служат в качестве линкеров, способные опосредовать котрансляционное расщепление между белками с помощью процесса, определенного как уход с рибосомы. Такие 2a и '2a-подобные' последовательности (из Picornaviridae и других вирусов или клеточных последовательностей) можно использовать для соединения в цепь последовательностей множественных генов в единственный ген, обеспечивая из ко-экспрессию в одной и той же клетке (см. Luke и Ryan, 2013).

Как используется в настоящем изобретении, термин "промотор" или "промоторная последовательность" обозначает нуклеотидную последовательность, которая разрешает связывание РНК-полимеразы и управляет транскрипцией гена. Типично, промотор расположен на 5' не-кодирующем участке гена, проксимально к сайту инициации транскрипции гена. Элементы последовательностей в пределах промоторов, которые функционируют для инициации транскрипции, часто характеризуются консенсусными нуклеотидными последовательностями. Примеры промоторов включают, но не ограничиваясь только ими, промоторы из бактерий, дрожжей, растений, вирусов и животных, таких как млекопитающие (включая лошадей, свиней, крупный рогатый скот и людей), птиц или насекомых. Промотор может быть индуцибельным, репрессируемым и/или конститутивным. Индуцибельные промоторы иницируют повышенные уровни транскрипции с ДНК под их контролем в ответ на определенное изменение в условиях культивирования, такое как изменение температуры (Ptashne, 2014). Примерами промоторов, хорошо известных квалифицированному специалисту в данной области техники, являются например, SV40 большой Т, HCMV и MCMV немедленно-ранний ген 1, промотор фактора элонгации альфа человека, бакуловирусный промотор полиэдрина.

Как используется в настоящем изобретении в контексте настоящего изобретения, термин промотор относится, в особенности, к функциональному фрагменту, например, усечению 4pgG600 (SEQ ID No. 1) или его комплементарной нуклеотидной последовательности, предпочтительно идентичность последовательность составляет (по меньшей мере) 72% относительно всей длины (или выше). Кроме того, как используется в настоящем изобретении, в контексте настоящего изобретения, термин промотор относится, в особенности, к функциональному фрагменту, например, усечению 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) или его комплементарной нуклеотидной последовательности, предпочтительно идентичность последовательности составляет (по меньшей мере) 78% относительно всей длины (или выше). Наиболее предпочтительно "промотор" относится к р430 (SEQ ID NO.: 3) или р455 (SEQ ID NO.: 4). В используется в дальнейшем в настоящем изобретении в контексте настоящего изобретения, термин промотор относится, в особенности, к функциональному производному р430 (SEQ ID NO.: 3) или р455 (SEQ ID NO.: 4) или 4pgG600 (SEQ ID No. 1) или 4pMCP600 (SEQ ID No. 2), имеющему, например, небольшую замену, мутацию или инверсию таким образом, что идентичность последовательности составляет 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичности или гомологичности.

Термины "р430", "gG 430" и "430" используются синонимично и взаимозаменяемо в описании, фигурах, перечне последовательностей и т.д. Термины "р455", "MCP 455" и "455" используются синонимично и взаимозаменяемо в описании, фигурах, перечне последовательностей и т.д.

Термин "энхансер" обозначает полинуклеотидную последовательность, которая в цис локализации оказывает влияние на активность промотора и, следовательно, стимулирует транскрипцию гена или кодирующей последовательности, функционально связанной с этим промотором. В отличие от промоторов, влияние энхансеров является независимым от положения и ориентации и, следовательно, они могут быть расположены впереди или за транскрипционной единицей, в пределах интрона или даже в пределах кодирующего участка. Энхансер может быть расположен как в непосредственной близости к транскрипционной единице, так и на значительном расстоянии от промотора. Также представляется возможным иметь физическое и функциональное перекрытие с промотором. Квалифицированный специалист в данной области техники владеет информацией относительно разных энхансеров из различных источников (и задепонированные в банках данных, таких как GenBank, например, SV40 энхансеры, CMV энхансеры, энхансеры полиомы, энхансеры аденовирусов), которые доступны в качестве независимых элементов или элементов, клонированных в пределах полинуклеотидных последовательностей (например, задепонированных в ATCC или из коммерческих и индивидуальных источников). Различные промоторные последовательности также содержат энхансерные последовательности, такие как часто используемый CMV промотор. CMV энхансер человека представляет собой один из наиболее сильных энхансеров, идентифицированных до настоящего времени. Одним из примеров индуцибельного энхансера является металлотioneиновый энхансер, которые может стимулироваться глюкокортикоидами или тяжелыми металлами.

Термин "комплементарные нуклеотидные последовательности" описывает одну цепь из двух спаренных цепей полинуклеотидов, таких как ДНК или РНК. Нуклеотидная последовательность комплементарной цепи является зеркальным отображением нуклеотидной последовательности ее спаренной цепи таким образом, что для каждого аденозина она содержит тимин (или урацил для РНК), для каждого гуанина - цитозин, и наоборот. Комплементарная нуклеотидная последовательность, например, 5'-GCATAC-3' представляет собой 3'-CGTATG-5' или для РНК 3'-CGUAUG-5'.

Термины "ген", "представляющий интерес ген", как используется в настоящем изобретении, имеют одинаковые значения и относятся к полинуклеотидной последовательности любой длины, которая кодирует представляющий интерес продукт. Ген может дополнительно содержать регуляторные последовательности, расположенные перед (5' некодирующие или нетранслируемые последовательности) и после (3' некодирующие или нетранслируемые последовательности) кодирующей последовательности. Выбранная последовательность может иметь полную длину или быть усеченной, слитым или меченым геном, и может представлять собой кДНК, геномную ДНК или ДНК фрагмент. В общих чертах подразумевается, что геномная ДНК, кодирующая полипептид, или РНК могут включать не-кодирующие участки (то есть интроны), которые сплайсированы от зрелой матричной РНК (мРНК) и, следовательно, не присутствуют в кДНК, кодирующей тот же самый полипептид или РНК. Она может представлять собой нативную последовательность, то есть встречающуюся (иногда) в природе форму (ы), или может быть мутирована, или включать последовательности, имеющие происхождение из различных источников, или модифицирована другим образом, если это является желательным. Эти модификации включают оптимизации кодонов для оптимизации частоты для оптимизации частоты использования кодонов в выбранной клетке-хозяине или мечения. Кроме того, они могут включать удаления или добавления цисдействующих сайтов, таких как (криптический) донор сплайсинга, акцепторные сайты и точки ветвления, сигналы полиаденилирования, ТАТА-боксы, *chi*-сайты, участки посадки рибосом, последовательности повтора, вторичные структуры (например, "петли-на-стебле"), связывающие сайты для транскрипционных факторов или других регуляторных факторов, сайты рестрикционных ферментов и т.д., для представления только некоторых, но не ограничивающих примеров. Выбранная последовательность может кодировать секретуемый, цитоплазматический, ядерный, мембранно-связанный полипептид или полипептид клеточной поверхности.

Термин "представляющая интерес нуклеотидная последовательность", как используется в настоящем изобретении, представляет собой более общий термин, чем представляющий интерес ген, поскольку она не обязательно содержит ген, но может содержать элементы или части гена или другую генетическую информацию, например, *ori* (начало репликации). Представляющая интерес нуклеотидная последовательность может представлять собой любую ДНК или РНК последовательность, независимо от того, будет ли она включать кодирующую последовательность или нет.

"Открытая рамка считывания" или "ORF" относится к отрезку нуклеотидной последовательности, либо ДНК или РНК, который включает сигнал начала трансляции или иницирующий кодон, такой как ATG или AUG, и терминирующий кодон и потенциально может транслироваться в полипептидную последовательность.

Термин "транскрипция" описывает биосинтез мРНК в клетке.

Термин "экспрессия", как используется в настоящем изобретении, относится к транскрипции и/или трансляции нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине. В соответствии со специфическими аспектами настоящего изобретения термин "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции гетерологичной и/или экзогенной нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине. Уровень экспрессии желательного продукта в клетке-хозяине может определяться на основании либо количества соответствующей РНК или мРНК, которая присутствует в клетке, или количества желательного полипептида, кодируемого выбранной последовательностью. Например, мРНК, транскрибируемая с выбранной последовательности, может быть количественно определена с помощью нозерн-блот гибридизации, защиты РНК рибонуклеазы, *in situ* гибридизации с клеточной РНК или с помощью RTqPCR (обратная транскрипция с последующей количественной ПЦР). Белки, экспрессируемые с выбранной последовательности, могут быть количественно определены с помощью различных методов, например, путем ELISA, вестерн-блоттинга, радиоиммуноанализов, путем иммунопреципитации, путем исследования биологической активности белка или путем иммуноокрашивания белка с последующим FACS анализом.

Термин "экспрессионная кассета" или "транскрипционная единица" или "экспрессионная единица" определяется как участок в векторе, конструкции или полинуклеотидной последовательности, который содержит один или больше транскрибируемых генов, где нуклеотидные последовательности, кодируемые транскрибируемый (е) ген (ы), а также полинуклеотидные последовательности, включающие регуляторные элементы, содержащиеся в экспрессионной кассете, функционально связаны с друг с другом. Они транскрибируются из промотора и транскрипция терминируется на по меньшей мере одном сигнале полиаденилирования. В одном специфическом аспекте, они транскрибируются из одного единичного промотора. В результате этого, различные гены являются по меньшей мере транскрипционно связанными. Может быть транскрибировано более одного белка или продукта и экспрессировано из каждой транскрипционной единицы (мультицистронная транскрипционная единица). Каждая транскрипционная еди-

ница будет содержать регуляторные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции любой из выбранных последовательностей, которые содержатся в этой единице. И каждая транскрипционная единица может содержать одинаковые или различные регуляторные элементы. Например, каждая транскрипционная единица может такой же терминатор, IRES элемент или интроны могут использоваться для функционального связывания генов в транскрипционной единице. Вектор или полинуклеотидная последовательность могут содержать больше одной транскрипционной единицы.

Термин "повышенная экспрессия", "повышенный титр или продуктивность" или "улучшенная экспрессия или продуктивность" обозначает повышение экспрессии, синтеза или секреции гетерологичной и/или экзогенной последовательности, интродуцированной в клетку-хозяин, например, гена, кодирующего терапевтический белок, путем сравнения с подходящим контролем, например, белок, кодируемый кДНК относительно белка, кодируемого интрон-содержащим геном. Присутствует повышенный титр или продуктивность, если клетку согласно изобретению культивируют согласно способу по изобретению, описанном в настоящем изобретении, и если клетка имеет по меньшей мере 1,2-кратное, 1,5-кратное, двукратное, трехкратное, четырехкратное или пятикратное повышение специфической продуктивности или титра. Также присутствует повышенный титр или продуктивность если клетку согласно изобретению культивируют согласно способу по изобретению, описанном в настоящем изобретении, и если клетка имеет по меньшей мере 1,2-кратное или по меньшей мере 1,5-кратное или по меньшей мере двукратное или по меньшей мере трехкратное повышение специфической продуктивности или титра. Также присутствует, в частности, повышенный титр или продуктивность если клетку согласно изобретению культивируют согласно способу по изобретению, описанном в настоящем изобретении, и если клетка имеет по меньшей мере 1,2-кратное - пятикратное, предпочтительно 1,5-кратное - пятикратное, более предпочтительно -двукратное - пятикратное, особенно предпочтительно трехкратное - пятикратное повышение специфической продуктивности или титра. "Повышенная экспрессия" также может обозначать, что большее количество клеток действительно экспрессируют представляющий интерес ген/ последовательность. Например, повышенная экспрессия может обозначать, что новые промоторы согласно настоящему изобретению являются активными в течение более продолжительного периода времени в течение цикла репликации вируса по сравнению с другими промоторами.

Повышенная экспрессия, титр или продуктивность могут быть получены путем использования гетерологичного вектора в соответствии с изобретением. Это можно комбинировать с другими подходами, такими как FACS-вспомогательная селекция рекомбинантных клеток-хозяев, которые содержат, в качестве дополнительного селективируемого маркера, один или несколько флуоресцентных белков (например, GFP) или маркер клеточной поверхности. Также можно использовать другие методы получения повышенной экспрессии, и комбинацию различных методов, на основании, например, применения цис-активных элементов для манипуляциями со структурой хроматина (например, LCR, UCOE, EASE, изоляторы, S/MAR, STAR элементы), применения (искусственных) транскрипционных факторов, обработки клеток природным или синтетическими агентами для активации экспрессии эндогенных или гетерологичных и/или экзогенных генов, улучшая стабильность (период полужизни) мРНК или белка, улучшая инициацию трансляции мРНК, увеличивая дозу гена путем применения эписомальных плазмид (на основании применения вирусных последовательностей в качестве точек начала репликации, например, SV40, полиома, аденовирус, EBV или BPV), применения последовательностей, способствующих амплификации, или систем амплификации *in vitro* на основании ДНК конкатемеров.

Исследование для измерения "повышенной экспрессии" представляет собой определения белка на основании ЖХ-МС /МС, такие как мониторинг множественных реакций (MRM); методы обнаружения на основании антител, такие как вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, или иммунодиффузия, и проточная цитометрия; и измерения биологической активности путем исследования гемагглютинации.

"Активность промотора" измеряют опосредованно путем количественного определения мРНК, транскрибируемого под контролем соответствующего промотора. мРНК количественно определяют с помощью RTqPCR относительно эндогенного стандарта.

Термин "титр вируса" показателем инфекционных единиц на объем вирусного препарата. Титр вируса является конечной точной биологической процедуры и определяется как разведение, при котором определенная порция тестов, осуществляемых параллельно, проявляет эффект (Reed и Muench, 1938). Специфически, полуинфицирующая доза культуры ткани на миллилитр (TCID<sub>50</sub>/мл) обеспечивает разведение вирусного препарата, при котором 50% количества клеточных культур, инокулируемые параллельно таким разведением, являются инфицированными.

"Элементы, регулирующие транскрипцию" нормально содержат промотор, расположенный против хода транскрипции последовательности экспрессируемого гена, сайтов инициации и терминации транскрипции и сигнала полиаденилирования.

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

"Терминирующий кодон" или "терминатор" или "сигнал полиаденилирования" или "polyA" или

сайт терминации транскрипции" или "элемент терминации транскрипции" представляет собой сигнальную последовательность, которая вызывает расщепление в специфическом сайте на 3' конце эукариотической мРНК и пост-транскрипционную инкорпорацию последовательности из приблизительно 100-200 адениновых нуклеотидов (polyA хвост) на отщепленном 3' конце, и, следовательно, вызывает терминацию транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой. Сигнал полиаденилирования включает последовательность ААТAAA приблизительно 10-30 нуклеотидов против хода транскрипции сайта рестрикции и последовательность, расположенную по ходу транскрипции. Известны различные элементы полиаденилирования, такие tk polyA, SV40 поздний и ранний polyA, BGH polyA (описанные, например, в патент США № 5,122,458) или polyA гормона роста хомячка (WO 2010010107).

"Регуляторные элементы трансляции" содержат сайт инициации трансляции (AUG), стоп-кодон и polyA сигнал для каждого индивидуального экспрессируемого полипептида. В некоторые конструкции может быть включен внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Для оптимизации экспрессии может быть желательным удалять, добавлять или изменять 5'- и/или 3'-нетранслируемые участки экспрессируемой нуклеотидной последовательности для элиминации любых потенциальных дополнительных неподходящих альтернативных кодонов инициации трансляции, или другие последовательности, которые могут препятствовать или уменьшать экспрессию, либо на уровне транскрипции или трансляции. Консенсусные сайты связывания рибосом (последовательность Козак) могут быть встроены сразу против хода транскрипции старт-кодона для усиления трансляции и, следовательно, экспрессии. Повышенное содержание A/U вокруг этого сайта связывания рибосомы дополнительно влияет на более эффективное связывание рибосомы.

Согласно определению, каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, встроенный в клетку-хозяин и соответствующий белок или РНК, кодируемая таким образом, обозначается как "экзогенная", "экзогенная последовательность", "экзогенный ген", "экзогенная кодирующая последовательность", по отношению к клетке-хозяину, которая имеет происхождение из отличающихся (вирусных) видов. Таким образом, промоторы на основании EHV-4 согласно настоящему изобретению являются экзогенными по отношению к EHV-1 вирусному вектору. Как используется в настоящем изобретении, по отношению к представляющей (ему) интерес последовательности или гену, такой (му) как антиген, термин "экзогенный" обозначает, что указанная (ый) представляющая (ий) интерес последовательность или ген, специфически указанный антиген, экспрессируется за пределами окружения его природных видов. Таким образом, H3 антиген из свиного IAV является одним примеров (см. пример 3) экзогенного антигена по отношению к EHV-1 вектору. Следовательно, любая (ой) нелошадиная (ый) представляющую (ий) интерес последовательность или ген, такой как нелошадиный антиген, представляет собой экзогенную (ый) представляющую (ий) интерес последовательность или ген или антиген в соответствии со специфическим аспектом настоящего изобретения.

Согласно определению, каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, встроенный в клетку-хозяин и соответствующий белок или РНК, кодируемая таким образом, обозначается как "гетерологичный", "гетерологичная последовательность", "гетерологичный ген", "гетерологичная кодирующая последовательность", "трансген" или "гетерологичный белок" по отношению к клетке-хозяину. Это применяется даже в том случае, если интродуцированная последовательность или интродуцированный ген является идентичным эндогенной последовательности или эндогенному гену клетки-хозяина. Например, EHV-4 промоторная последовательность, интродуцированная в EHV-4 вирусный вектор в другой сайт или в модифицированной форме, чем в вирусе EHV-4 дикого типа, является согласно определению гетерологичной последовательностью. Как используется в настоящем изобретении, по отношению к представляющей (ему) интерес последовательности или гену, такому как антиген, термин "гетерологичный" обозначает, что указанная (ый) представляющая (ий) интерес последовательность или ген, специфически указанный антиген, экспрессируется за пределами окружения его природных подвидов. Таким образом, любая (ой) не-EHV-1 специфическая (ий) представляющая (ий) интерес последовательность или ген, такой как антиген, например, антиген из любого альфагерпесвируса, за исключением EHV-1, например, EHV-3, EHV-8, является, следовательно, гетерологичной (ым) представляющей (им) интерес последовательностью или геном или антигеном в соответствии со специфическим аспектом настоящего изобретения.

Термин "не встречающийся в природе" обозначает любую (ой) представляющую (ий) интерес последовательность или ген, такой как антиген, которая (ый) не встречается в этом окружении природно, такая как гибридная последовательность или представляющая (ий) интерес последовательность или ген, такой как антиген из различных видов, или представляющая (ий) интерес последовательность или ген, такой как антиген, который не является природным продуктом вследствие искусственной мутации, инсерции, делеции или подобных.

Термин "рекомбинантный" используется взаимозаменяемо с терминами "не встречающийся в природе", "гетерологичный" и "экзогенный" в описании настоящего изобретения. Таким образом, "рекомбинантный" белок представляет собой белок, экспрессируемый либо из гетерологичной или экзогенной полинуклеотидной последовательности. Термин "рекомбинантный", как используется по отношению к вирусу, обозначает вирус, продуцируемый путем искусственной манипуляции вирусного генома. Вирус,

включающий гетерологичную или экзогенную последовательность, такую как экзогенная антиген-кодирующая последовательность, представляет собой рекомбинантный вирус. Термин "рекомбинантный вирус" и термин "не встречающийся в природе вирус" используются взаимозаменяемо.

Таким образом, термин "гетерологичный вектор" обозначает вектор, который включает гетерологичную или экзогенную полинуклеотидную последовательность. Термин "рекомбинантный вектор" обозначает вектор, который включает гетерологичную или рекомбинантную полинуклеотидную последовательность.

Как используется в настоящем изобретении, термин "функционально связанный" используется для описания связи между регуляторными элементами и геном или его кодирующим участком. Типично, генная экспрессия помещается под контроль одного или нескольких регуляторных элементов, например, не ограничиваясь только ими, конститутивные или индуцибельные промоторы, тканеспецифические регуляторные элементы и энхансеры. Когда указано, что ген или кодирующий участок является "функционально связанным с" или "оперативно связан с" или "функционально ассоциирован с" регуляторными элементами, то это обозначает, что или кодирующий участок управляется или находится под воздействием регуляторного элемента. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор оказывает влияние на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности.

Кроме того, в объеме настоящего описания термины "функциональное связывание", "функционально связан" или "функционально связанный" обозначают, что две или более нуклеотидных последовательностей или элементов последовательностей расположены таким образом, что разрешают их функционировать их надлежащим образом. Например, промотор/энхансер или терминатор функционально связан с кодирующей генной последовательностью, если он способен контролировать или модулировать транскрипцию связанной генной последовательности в цис положении. В общих чертах, но не обязательно необходимо, ДНК последовательности, которые функционально связаны, являются смежными и, если необходимо для соединения двух полипептидных кодирующих участков или в случае секреции сигнального пептида, смежными и в рамке считывания. Тем не менее, несмотря на то, что функционально связанный промотор обычно расположен против хода транскрипции или функционально связанный терминатор обычно расположен по ходу транскрипции кодирующей последовательности, он не всегда является смежным с ними. Энхансеры не должны быть смежными, поскольку они повышают транскрипцию кодирующей последовательности. Для этого они могут быть расположены против хода транскрипции или по ходу транскрипции кодирующей последовательности и даже на некотором расстоянии. Сайт полиаденилирования функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен на 3' конце кодирующей последовательности таким образом, что транскрипция осуществляется через кодирующую последовательность на сигнал полиаденилирования. Связывание осуществляется с помощью рекомбинантных методов, хорошо известных в данной области техники, например, путем лигирования в подходящих рестрикционных сайтах или "тупых" концов или путем использования методики ПЦР с перекрывающимися праймерами. Можно использовать синтетические олигонуклеотидные линкеры или адаптеры в соответствии с общепринятой практикой, если не присутствуют подходящие рестрикционные сайты.

Таким образом, термин "функциональный фрагмент" или "функциональное производное" промоторной последовательности обозначает, что фрагмент или производное все еще имеет активность промотора. Функциональные исследования для оценки активности промотора хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники (Bustin 2000, Nolan и др. 2006). Примерный вариант осуществления такого функционального исследования включает, например, эксперимент кинетики промотора. Клетки, инфицированные векторными вирусами, несущими экспрессионные кассеты, где промотор или его фрагмент направляют транскрипцию репортерного трансгена, инкубируют в течение различных промежутков времени. Общую РНК, полученную из образцов, собирают в различные промежутки времени после инфицирования. После разрушения загрязняющей ДНК с помощью расщепления ДНКазой I, обратно транскрибируют РНК. Один реплицированный образец процессируют при добавлении обратной транскриптазы (RT), второй репликат процессируют без добавления RT для демонстрации успешного удаления загрязняющей ДНК из препарата РНК. Полученную кДНК очищают и используют в качестве матрицы в общепринятой ПЦР. Только образцы, процессированные с добавлением RT, будут продуцировать ПЦР продукт. Затем эти кДНК используют для количественной ПЦР с праймерами для репортерного трансгена и параллельно с праймерами для основного гена вирусного вектора (внутренний стандартный ген), транскрипция которого обеспечивает внутренний стандарт для эффективности инфицирования и репликации. Значения количественной ПЦР репортера нормализуют между различными конструкциями и временем после инфицирования, используя значения количественной ПЦР внутреннего стандартного гена. Это предоставляет возможность интерпретировать активности различных промоторов и их фрагментов.

"Гомология последовательностей", как используется в настоящем изобретении, относится к способу определения родства двух последовательностей. Для определения гомологии последовательностей, две или больше последовательностей оптимально выравнивают, и интродуцируют гэпы, если это необходи-

мо. Тем не менее, в отличии от "идентичности последовательностей", консервативные аминокислотные замены считают как совпадение при определении гомологии последовательностей.

Другими словами, для получения сопоставимого полипептида или полинуклеотида, имеющего 95% гомологию последовательностей с последовательностью сравнения, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% аминокислотных остатков или нуклеотидов в последовательности сравнения должны совпадать или содержать консервативную замену на другую аминокислоту или нуклеотид. Альтернативно, количество аминокислот или нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7, 6%, даже более предпочтительно вплоть до 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% общих аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включая консервативные замены, с последовательности сравнения могут быть инсертированы в последовательность сравнения. Предпочтительно гомологичная последовательность включает по меньшей мере протяженность 50, еще более предпочтительно 100, еще более предпочтительно 250, еще более предпочтительно 500 нуклеотидов.

"Идентичность последовательностей", как он известен в данной области техники, относится к взаимосвязи двух или более полипептидных последовательностей или двух или более полинуклеотидных последовательностей, а именно последовательностью сравнения и данной последовательностью, которую сравнивают с последовательностью сравнения. Идентичность последовательностей определяют путем сравнения данной последовательности с последовательностью сравнения после оптимального выравнивания последовательностей для получения наибольшей степени сходства последовательностей, как определяется путем совпадения между полосками таких последовательностей. При таком выравнивании, идентичность последовательностей устанавливают на основании сравнения по положениям, например, последовательности являются "идентичными" в конкретном положении, если в этом положении, нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. После этого общее число таких идентичных положений разделяют на общее количество нуклеотидов или остатков в последовательности сравнения, получая % идентичности последовательностей. Идентичность последовательностей легко может быть рассчитана с помощью известных методов, включая, но не ограничиваясь только ими, те, которые описаны в *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ред., 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., и Griffin, H. G., ред., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. и Devereux, J., ред., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., и Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), сведения из которых включены в настоящее изобретение путем ссылки. Создаются предпочтительные способы определения идентичности последовательностей для получения наибольшего совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей систематизированы в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичность последовательностей между данными последовательностями. Примеры таких включают, но не ограничиваясь только ими, пакет программ GCG (Devereux, J., и др., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). BLASTX программа является общедоступной из NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. и др., *NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894*, Altschul, S. F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)), сведения из которых включены в настоящее изобретение путем ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности, используя штрафы за открытие гэпа по умолчанию для получения наивысшего уровня идентичности последовательностей между данной и сравнительной последовательностями. В качестве иллюстрации, под полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% "идентичность последовательностей" к сравниваемой нуклеотидной последовательности, понимают, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида является идентичной последовательности сравнения за исключением того, что данная полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, даже более предпочтительно вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной последовательности сравнения. Другими словами, в полинуклеотиде, имеющем нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% идентичность по отношению к нуклеотидной последовательности сравнения, вплоть до 15%, предпочтительно 10, 9, 8, 7, 6%, даже более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% нуклеотидов в последовательности сравнения могут быть делетированы или заменены на другой нуклеотид, или количество нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно 10, 9, 8, 7, 6%, даже более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% общих нуклеотидов в последовательности сравнения могут быть инсертированы в последовательность сравнения. Эти мутации последовательности сравнения могут происходить на 5' или 3' концевых положениях нуклеотидной последовательности сравнения или в любом другом месте между этими концевыми положениями, рассеянные либо индивидуально между нуклеотидами в последовательности сравнения или в одной или нескольких смежных групп в последовательности сравнения. Аналогично этому, под полипептидом, имеющим данную аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97,

98, 99 идентичность последовательностей к аминокислотной последовательности сравнения, подразумевается, что данная аминокислотная последовательность полипептида является идентичной последовательности сравнения, за исключением того, что данная полипептидная последовательность может включать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7, 6, даже более предпочтительно вплоть до 5, 4, 3, 2, 1 аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот аминокислотной последовательности сравнения. Другими словами, для получения данной полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99 идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью сравнения, вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7, даже более предпочтительно вплоть до 5, 4, 3, 2, 1 аминокислотных остатков в последовательности сравнения могут быть делетированы или заменены на другую аминокислоту, или количество аминокислот вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7, даже более предпочтительно вплоть до 5, 4, 3, 2, 1 общего числа аминокислотных остатков в последовательности сравнения могут быть инсертированы в последовательности сравнения. Эти изменения последовательности сравнения могут происходить на амино- или карбокси-концевых положениях аминокислотной последовательности сравнения или в любом другом месте между этими концевыми положениями, рассеянные либо индивидуально между остатками в последовательности сравнения или в одной или нескольких смежных группах в последовательности сравнения. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Тем не менее, консервативные замены не включаются как совпадение при определении идентичности последовательностей.

Термины "идентичность последовательностей" или "процент идентичности" используются взаимозаменяемо в настоящем описании. Для целей настоящего изобретения, в настоящем изобретении определяется, что для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей, последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, могут быть интродуцированы гэпы в последовательность первой аминокислоты или нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). После этого сравнивают аминокислотные или нуклеотидные остатки в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным или нуклеотидным остатком, как и в соответствующем положении во второй последовательности, то эти молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (то есть, % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений (то есть перекрывающихся положений)  $\times$  100). Предпочтительно, две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей можно осуществлять для полных длин двух сравниваемых последовательностей или для фрагмент из двух последовательностей. Типично, сравнение осуществляют для полной длины двух сравниваемых последовательностей. Однако, можно определять идентичность последовательностей для участка, например, из двадцати, пятидесяти, ста или более непрерывных аминокислотных остатков.

Квалифицированный специалист в данной области техники знает, что доступно несколько различных компьютерных программ для определения гомологии между двумя последовательностями. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с применением математического алгоритма. В предпочтительном варианте осуществления, процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями определяют, используя алгоритм Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения Accelrys GCG (доступном на <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), используя либо матрицу Blosum 62 или матрицу PAM250, и штраф за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и длину штрафа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятно, что все эти различные параметры будут приводить к получению незначительно различающихся результатов, но общий процент идентичности двух последовательностей не будет существенно изменяться при использовании различных алгоритмов.

Белковые последовательности или нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению дополнительно могут использоваться в качестве "искомой последовательности" для осуществления поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации других представителей семейств или родственных последовательностей. Такие поиски можно осуществлять, используя программы BLASTN и BLASTP (версия 2.0) от Altschul, и др. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. BLAST поиски белков можно осуществлять с помощью программы BLASTP, оценка=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных к молекулам белков согласно изобретению. Для получения выравниваний с брешью для сравнений, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul и др. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST, можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTP и

BLASTN). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Определения EHV-1 и EHV-4/ рекомбинантной векторной технологии.

Термин "лошадиный" или "конский" или "непарнокопытный" обозначают или относятся к семейству лошадиных (Equidae), которое включает коней, ослов и зебр, предпочитительно коней. Дополнительно, термин "лошадиный" или "конский" или "непарнокопытный" охватывает также гибридов представителей семейства Equidae (например, мулов, лошаков, и т.д.).

"Вирус герпеса" или "вектор вируса герпеса" относится к видам в семействе Herpesviridae в порядке Herpesvirales.

Термин "вектор вируса герпеса лошадей" или "вирус герпеса лошадей" или "EHV" обозначает представителя семейства Herpesviridae, поражающих лошадей. До настоящего времени было идентифицировано восемь различных видов герпесвирусов лошадей, пять из них относятся к подсемейству Alphaherpesvirinae (EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 und EHV-9), а три к Gammaherpesvirinae. (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, июль 2015 г.; Email ratification 2016 (MSL #30).

Термин "EHV-1" обозначает альфагерпесвирус лошадей 1 типа, представитель подрода Varicellovirus в роде Alphaherpesvirinae в семействе Herpesviridae. Неограничивающей последовательностью сравнения для EHV-1 может быть, например, EHV-1 штамм ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1) или RacH (Hubert 1996).

Термин "EHV-4" обозначает альфагерпесвирус лошадей 4 типа, представитель подрода Varicellovirus в роде Alphaherpesvirinae в семействе Herpesviridae.

Термин "встроенный в ORF70" обозначает, что ДНК фрагмент был встроен в геномную ДНК в локализацию, кодирующую открытую рамку считывания 70 альфагерпесвируса лошадей 1 типа. В специфическом аспекте настоящего изобретения, инсерция относится к полученной делеции 801 5' пар основ ORF70, сохраняющей оставшиеся 423 по на 3'-конце интактными, но отменяющей экспрессию продукта гена ORF70 гликопротеина G. Было показано, что гликопротеин G нескольких альфагерпесвирусов, включая EHV-1, секретируется из инфицированных клеток и действует в качестве иммуномодулирующего белка путем связывания провоспалительных цитокинов. Отмена его экспрессии в вирусном векторе будет повышать иммуногенность вирусной инфекции по сравнению с EHV-1 дикого типа с экспрессией интактного гликопротеина G.

Термин "встроенный в ORF1/3" обозначает, что ДНК фрагмент был встроен в вирусный геном в положение, где путем случайной делеции при пассивировании во время процедуры аттенуирования вакцинного штамма EHV-1 RacH фрагмент 1283 по, включающий 90% ORF1 и всю ORF2, был потерян. Этот сайт инсерции был выбран в связи с тем, что, как предполагают, очень низкая вероятность того, что экспрессия трансгена из этой локализации будет мешать репликации вируса.

Определения вакцины.

"Иммуногенная или иммунологическая композиция" относится к композиции вещества, которая содержит, по меньшей мере, один антиген или его иммуногенную часть, которая вызывает у хозяина опосредованный клетками или антителами иммунный ответ на композицию.

Термин "антиген", который используется в настоящем изобретении, хорошо известен в данной области техники и включает вещества, которые являются иммуногенными, то есть иммуногены, а также вещества, которые индуцируют иммунологическую неответственность или анергию, то есть отсутствие реакций посредством защитных реакций организма на чужеродные вещества. Как используется в настоящем изобретении, термин "антиген" обозначает полноразмерные белки, а также их пептидные фрагменты, содержащие или включающие эпитоп.

Термин "животное, используемое для производства пищевых продуктов" обозначает животных, которые используются для потребления людьми, такие как свиньи, крупный рогатый скот, птицы, рыбы и другие, предпочтительно животное, используемое для производства пищевых продуктов, обозначает свиней и крупный рогатый скот, наиболее предпочтительно свиньи.

"Иммуногенная композиция", как используется в настоящем изобретении, может относиться к полипептиду или белку, такому как, например, вирусный поверхностный белок, который вызывает иммунный ответ, как описано в настоящем изобретении. Термин "иммуногенный фрагмент" или "иммуногенная часть" относится к фрагменту или усеченной и/или замещенной форме белка или полипептида, который включает один или несколько эпитопов и, следовательно, вызывают иммунный ответ, описанный в настоящем изобретении. В целом, такие усеченные и/или замещенные формы или фрагменты будут содержать по меньшей мере шесть последовательных аминокислот из полноразмерного белка. Такие фрагменты могут быть идентифицированы при использовании любой из ряда методик, которые используются для картирования эпитопов, которые хорошо известны в данной области техники. См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, том 66 (Glenn E. Morris, ред., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены с помощью одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, определения пептидов, соответствующих частям белковой молекулы и взаимодействия пептидов с антителами, в то время как пептиды все еще

остаются присоединенными к подложкам. Такие методики известны и описаны в данной области техники, смотри, например, патент США № 4708871; Geysen и др. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; и Geysen и др. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. Аналогично, конформационные эпитопы легко идентифицируются с помощью определения пространственной конформации аминокислот, например, путем рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. Смотри, Epitope Mapping Protocols, как описано выше. Синтетические антигены также являются включенными в определение, например, полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие рекомбинантные или синтетически полученные антигены. Смотри, например, Bergmann и др. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann и др. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol, и Cell Biol. 75:402-408; и Gardner и др., (1998) 12-ая всемирная конференция по СПИДу, Женева, Швейцария, 28 июля 1998 года. (Раскрытие и содержание которых являются включенными в данное изобретение в качестве ссылки.)

Термин "вакцина", как используется в настоящем изобретении, относится к фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере один иммунологически активный компонент, который индуцирует иммунный ответ у животного и возможно, но не обязательно, один или несколько дополнительных компонентов, которые усиливают иммунологическую активность активного компонента. Вакцина может дополнительно содержать другие компоненты, которые являются типичными для фармацевтических композиций. В качестве отличия, иммунологически активный компонент вакцины может содержать полные вирусные частицы либо в их исходной форме или в качестве аттенуированных частиц в так называемой модифицированной живой вакцине (MLV) или частицы, инактивированные с помощью подходящих методов в так называемой убитой вакцине (KV). В другой форме, иммунологически активный компонент вакцины может содержать подходящие элементы организмов (субъединичные вакцины), где эти элементы создаются либо путем разрушения цельной частицы или выращивания культур, содержащих такие частицы, и необязательно последующих стадий очистки, приводящих к получению желательной (ых) структуры (структур), или с помощью синтетических процессов, включая подходящую манипуляцию путем применения приемлемой системы на основании, например, бактерий, вирусов, млекопитающих или других видов плюс необязательно процедуры последующего выделения и очистки, или путем индукции процессов синтеза в животном, нуждающемся в вакцине, путем прямой инкорпорации генетического материала, используя подходящие фармацевтические композиции (полинуклеотидная вакцинация). Вакцина может содержать один или одновременно более одного из элементов, описанных выше. Как используется в специфических аспектах согласно настоящему изобретению, "вакцина" относится к живой вакцине или живому вирусу, также называется рекомбинантной вакциной. В другом специфическом аспекте согласно настоящему изобретению "вакцина" относится к инактивированному или убитому вирусу, включая вирусоподобные частицы (VLP). Таким образом, вакцина может представлять собой субъединичную вакцину или убитую (KV) или инактивированную вакцину.

Термин "Множественность заражения (M.O.I.)" описывает, сколько инфекционных единиц, например, TCID<sub>50</sub>, вирусного препарата используется на клетку для инфицирования клеточных культур. Например, M.O.I. 0,01 обозначает, что на каждые 100 клеток в сосуде для культивирования инокулируют одну инфекционную единицу.

Термин "ДНК вакцинация" или "полинуклеотидная вакцинация" обозначает непосредственное инокулирование генетического материала, используя подходящие фармацевтические композиции.

В данной области техники известны различные физические и химические методы инактивации. Термин "инактивированный" относится к ранее вирулентному или невирулентному вирусу или бактерии, который был облучен (ультрафиолетом (УФ), рентгеновскими лучами, электронным пучком или гамма-лучами), нагрет, или химически обработан для инактивации или убивания такого вируса или бактерии, но при этом сохраняя его иммуногенность. Подходящие инактивирующие агенты включают бета-пропиолактон, бинарный или бета- или ацетил-этиленмин, глутаральдегид, озон и формалин (формальдегид).

Для инактивации с помощью формалина или формальдегида, формальдегид типично смешивают с водой и метиловым спиртом для создания формалина. Добавление метилового спирта предотвращает разложение или перекрестную реакцию во время процесса активации. В одном варианте осуществления используют приблизительно 0,1-1% 37% раствора формальдегида для инактивации вируса или бактерии. Является очень важным скорректировать количество формалина для обеспечения инактивации материала, но не настолько много, чтобы проявлялись побочные эффекты от высокой дозы.

Более предпочтительно, термин "инактивированный" по отношению к вирусу обозначает, что вирус неспособный к репликации в условиях *in vivo* или *in vitro* и, соответственно, термин "инактивированная" по отношению к бактерии обозначает, что бактерия неспособна к репродукции в условиях *in vivo* или *in vitro*. Например, термин "инактивированный" может относиться к вирусу, который был размножен *in vitro*, и затем был инактивирован с использованием химических или физических средств таким способом, что он больше не способен к репликации. В другом примере, термин "инактивированная" может относиться к бактерии, которая была размножена, и затем инактивирована с использованием химических или физических средств, что привело к получению суспензии бактерий, фрагментов или компонентов бактерии, например, к получению бактерины, который может использоваться в качестве компонента вакцины.

Как используется в настоящем изобретении, термины "инактивированный", "убитый" или "KV" используются взаимозаменяемо.

Термин "живая вакцина" относится к вакцине, включающей либо живой организм или компетентный по репликации вирус или вирусный вектор.

"Фармацевтическая композиция" по существу состоит из одного или нескольких ингредиентов, способных модифицировать физиологические, например, иммунологические функции, организма, в который ее вводят, или организмов, живущих в ней или на организме. Термин включает, но не ограничиваясь только ими, антибиотики или противопаразитарные средства, а также другие составляющие, которые обычно используются для достижения определенных других задач, таких как, но не ограничиваясь только ими, способности к обработке, стерильность, стабильность, возможность введения композиции посредством энтерального или парентерального путей, таких как перорального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрикожного, или другого подходящего пути, переносимости после введения, или свойств контролируемого высвобождения. Один неограничивающий пример такой фармацевтической композиции, представленный только для целей демонстрации, может быть приготовлен следующим образом: супернатант клеточной культуры инфицированной клеточной культуры смешивают со стабилизатором (например, спермидином и/или бычьим сывороточным альбумином (BSA) и затем смесь лиофилизируют или дегидратируют с помощью других методов. Перед вакцинацией, смесь затем восстанавливают в водных (например, физиологический раствор, фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) или неводных растворах (например, масляная эмульсия, адъювант на основе алюминия).

Как используется в данном изобретении, термин "фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, адъюванты, стабилизирующие агенты, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты, замедляющие адсорбцию, и подобные им. В некоторых предпочтительных вариантах реализации, и особенно в тех, которые включают лиофилизированные иммуногенные композиции, стабилизирующие агенты для использования в настоящем изобретении, включают стабилизаторы для лиофилизации или сушки вымораживанием.

В некоторых воплощениях иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит адъювант. "Адъюванты", как используется в данном изобретении, могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию вода-в-масле, масло-в-воде, вода-в-масле-в-воде. Эмульсия может основываться, в частности, на легком вазелиновом масле (в соответствии с европейской фармакопеей); изопреноидном масле, таком, как сквалан или сквален; масле, полученном в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, в частности, растительное масло, этилолеат, пропиленгликоль ди-(каприлат/капрат), глицерил три-(каприлат/капрат) или пропиленгликоль диолеат; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности сложных эфирах изостеариновой кислоты. Масло используют в комбинации с эмульгаторами с образованием эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбитана, маннита (например, олеат ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимера полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности, продукты Pluronic, в частности, L121. Смотри Hunter и др., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, стр. 51-94 (1995) и Todd и др., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Типичные адъюванты представляют собой SPT эмульсию, описанную на стр. 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под ред. M. Powell и M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсию MF59, описанную на стр. 183 этого же источника.

Еще одним примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильных производных. Предпочтительные адъювантные соединения представляют собой полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые являются перекрестно связанными, в частности, с полиалкениловыми эстерами Сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения являются известными под термином карбомер (Фармакопея том 8, № 2, июнь 1996 г.). Специалисты в данной области техники могут также сослаться на патент США № 2909462, который описывает такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксилированным соединением, имеющим, по крайней мере, 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, при этом атомы водорода, по крайней мере, трех гидроксильных групп заменяются ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими, по крайней мере, 2 атома углерода. Предпочтительные радикалы представляют собой такие, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие этилен-ненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы сами по себе могут содержать другие заместители такие, как метил. Продукты, которые продаются под названием CARBOPOL®; (BF Goodrich, штат Огайо, США) являются особенно приемлемыми. Они являются перекрестно сшитыми с аллилсахарозой или пентаэритритолом. Среди них могут быть упомянуты Carbolol 974P, 934P и 971P.

Наиболее предпочтительным является использование CABOPOL® 97IP. Среди сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила следует упомянуть сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к получению кислотного раствора, который будет нейтрализован, предпочтительно до физиологического значения рН, для того, чтобы ввести раствор адьюванта, в который будет включена иммуногенная или иммунологическая вакцина.

Другие подходящие вспомогательные вещества представляют собой, но не ограничиваются такими, адьювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блок сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, адьювант Avridine на основе липид-амин, термолабильный энтеротоксин из E.coli (рекомбинантный или иной), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид, либо природные, либо рекомбинантные цитокинины или их аналоги, или стимуляторы высвобождения эндогенных цитокинов, среди прочих.

Ожидается, что адьювант может быть добавлен в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу, более предпочтительно в количестве от примерно 750 мкг до примерно 2,5 мг на дозу, а большинство предпочтительно в количестве приблизительно 1 мг на дозу. Кроме того, адьювант может находиться в концентрации приблизительно от 0,01 до 50%, предпочтительно в концентрации приблизительно от 2 до 30%, более предпочтительно в концентрации приблизительно от 5 до 25%, еще более предпочтительно в концентрации приблизительно от 7 до 22% и наиболее предпочтительно в концентрации от 10 до 20% от объема конечного продукта.

"Разбавители" могут включать воду, солевой раствор, декстрозу, этанол, глицерин и тому подобное. Изотонические агенты могут включать, в частности, хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают альбумин и щелочные соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, среди прочих.

"Изолированный" означает "измененный рукой человека" по сравнению с его естественным состоянием, то есть, если это происходит в природе, то он был изменен или удален из своей первоначальной окружающей среды или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, который естественным образом присутствует в живом организме, не является "изолированным", но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от сосуществующих с ним материалов в его естественном состоянии, является "изолированным" в том значении, как этот термин используется в данном документе.

"Аттенуирование" обозначает уменьшение вирулентности патогена. В настоящем изобретении "аттенуирование" является синонимом "авирулентности". В настоящем изобретении, аттенуированный вирус представляет собой вирус, в котором вирулентность была уменьшена так, что он не вызывает клинических признаков инфекции, но способен индуцировать иммунный ответ у целевого животного, но также может обозначать, что клинические признаки снижаются в отношении частоты или тяжести у животных, инфицированных аттенуированным вирусом, в особенности ЕНУ-1 RasH вирусным вектором, как заявляется, по сравнению с "контрольной группой" животных, инфицированных не-аттенуированным вирусом или патогеном и не получавших аттенуированного вируса. В этом контексте, термин "снижение/сниженный" обозначает уменьшение по меньшей мере на 10%, предпочтительно 25%, даже более предпочтительно 50%, еще более предпочтительно 60%, даже более предпочтительно 70%, еще более предпочтительно 80%, даже более предпочтительно 90% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с контрольной группой, как определено выше. Таким образом, аттенуированный, авирулентный патоген, такой как, например, заявляемый аттенуированный вирусный вектор, в особенности, заявляемый ЕНУ-1 (предпочтительно RasH) вирусный вектор, является подходящим для создания модифицированной живой вакцины (MLV) или модифицированной живой иммуногенной композиции.

В данном изобретении "эффективная доза" означает, но не ограничивается таковыми, как количество антигена, которое вызывает или способно вызывать иммунный ответ, который обеспечивает уменьшение клинических симптомов у животного, которому вводят антиген.

Как используется в данном изобретении, термин "эффективное количество" означает в контексте композиции количество иммуногенной композиции, способной индуцировать иммунный ответ, который уменьшает частоту или тяжесть инфекции, или частоту возникновения заболевания у животного. В частности, эффективное количество относится к колониеобразующим единицам (КОЕ) на дозу. Кроме того, в контексте терапии термин "эффективное количество" относится к количеству терапии, которое является достаточным для того, чтобы снизить или ослабить тяжесть или продолжительность заболевания или расстройства, или их одного или более симптомов, предотвратить развитие заболевания или расстройства, вызвать регрессию заболевания или расстройства, предотвратить рецидив, развитие, начало или прогрессирование одного или более симптомов, связанных с заболеванием или расстройством, или усиливать, или улучшить профилактику или лечения другой терапии или терапевтического агента.

"Иммунный ответ" или "иммунологический ответ" означает, но не ограничивается таковыми, развитие клеточного и/или опосредованного антителами иммунного ответа на (иммуногенные) композиции или вакцины, представляющие интерес. Как правило, иммунный или иммунологический ответ включает в себя, но не ограничивается таковыми, как один или более из следующих эффектов: продукция или ак-

тивация антител, В-клеток, Т-хелперов, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, непосредственно направлены на антиген или антигены, включенные в композиции или вакцины, представляющие интерес. Предпочтительно, хозяин будет демонстрировать либо терапевтический, либо защитный иммунологический (иммунологическая память) ответ так, что сопротивление новой инфекции будет усиливаться и/или клиническая тяжесть заболевания будет снижаться. Такая защита будет проявляться либо сокращением количества симптомов, тяжести симптомов, либо отсутствием одного или более симптомов, связанных с инфекцией патогеном, задержкой наступления вирусемии, снижением вирусной персистенции, снижением общей вирусной нагрузки и/или уменьшением экскреции вируса.

"Защита от болезни", "протективный иммунитет", "функциональный иммунитет", "уменьшение клинических симптомов", "индукция/продукция нейтрализующих антител и/или серологических превращений", и подобные фразы, означают частичный или полный ответ, направленный против заболевания или состояния, который вызывается путем введения одной или более терапевтических композиций в соответствии с изобретением, или их комбинации, что приводит к более сниженным вредным эффектам, чем можно было бы ожидать у неиммунизированного субъекта, который подвергся заболеванию или инфекции. То есть, тяжесть вредных эффектов инфекции уменьшается у вакцинированного субъекта. Заражение может быть снижено, замедлено или, возможно, полностью предотвращено, у вакцинированного субъекта. При этом когда подразумевается полное предотвращение инфекции, то это специально указывается. Если полное предотвращение не указано, то термин включает в себя частичное предотвращение.

В данном изобретении "снижение частоты возникновения заболевания и/или клинических признаков" или "снижение клинических симптомов" означает, но не ограничивается таковыми, уменьшение количества инфицированных субъектов в группе, уменьшение или устранение количества субъектов, которые проявляют клинические признаки инфекции, или уменьшение тяжести каких-либо клинических симптомов, которые присутствуют у одного или более субъектов, по сравнению с инфекцией дикого типа. Например, следует упомянуть любое снижение нагрузки патогена, выделения патогена, снижение передачи патогена или уменьшение любого клинического признака симптоматической инфекции малярии. Предпочтительно, когда эти клинические признаки снижаются у одного или более субъектов, получающих терапевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением, по крайней мере, на 10% по сравнению с субъектами, не получающими композицию и которые являются инфицированными. Более предпочтительно, когда клинические признаки уменьшаются у субъектов, получающих композицию в соответствии с настоящим изобретением, по крайней мере, на 20%, предпочтительно, по крайней мере, на 30%, более предпочтительно, по крайней мере, на 40%, и даже более предпочтительно, по крайней мере, на 50%.

Термин "повышенная защита" в данном документе означает, но не ограничивается таковыми, как статистически достоверное снижение одного или более клинических симптомов, которые связаны с инфицированием с помощью инфекционного агента, в группе вакцинированных субъектов против невакцинированной контрольной группы испытуемых. Термин "статистически достоверное снижение клинических симптомов" означает, но без ограничения таковым, частоту возникновения, по крайней мере, одного клинического симптома в группе вакцинированных субъектов, которая является, по крайней мере, на 10%, предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, еще более предпочтительно на 50%, и даже более предпочтительно на 70% ниже, чем в невакцинированной контрольной группе после заражения инфекционным агентом.

"Длительная защита" относится к "улучшению эффективности", которая сохраняется в течение не менее 3 недель, но более предпочтительно, по крайней мере, 3 месяца, еще более предпочтительно, по крайней мере, 6 месяцев. У крупного рогатого скота наиболее предпочтительно, когда длительная защита будет сохраняться до достижения среднего возраста, при котором животные продаются на мясо.

Термин "уменьшение вирусемии", индуцируемой вирусом, обозначает, но не ограничиваясь только ими, уменьшение вируса, проникающего в систему кровообращения животного, где уровень вирусемии, то есть количество копий вирусной ДНК или РНК на мл сыворотки крови или количество бляшкообразующих колоний на децилитр сыворотки крови, уменьшается в сыворотке крови животных, получающих композицию согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 50% по сравнению с животными, которые не получали композицию и могут инфицироваться. Более предпочтительно, уровень вирусемии уменьшается у животных, получающих композицию согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 99,9%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,99%, и даже более предпочтительно по меньшей мере на 99,999%.

Как используется в настоящем изобретении, термин "вирусемия" в особенности понимается как состояние, при котором вирусные частицы репродуцируются и/или циркулируют в системе кровообращения животного, в частности, млекопитающего, птицы или насекомого.

"Безопасность" относится к отсутствию побочных эффектов у вакцинированных животных после вакцинации, в том числе, но не ограничиваясь таковыми: потенциальное превращение вакцины на основании вируса в вирулентную, клинически значимые побочные эффекты такие, как стойкие, системные болезни или неприемлемое воспаления в месте введения вакцины.

Термины "вакцинация" или "вакцинирующий" или их варианты, как они используются в данном изобретении, означают, но не ограничиваются такими, как процесс, который включает в себя введение иммуногенной композиции в соответствии с изобретением, которая при введении в организм животного, вызывает или может вызывать - непосредственно или опосредовано - иммунный ответ у указанного животного.

"Смертность" в контексте настоящего изобретения относится к смерти, вызванной инфекцией, и включает ситуацию, когда инфекция является настолько тяжелой, что животное подвергают эвтаназии, чтобы предотвратить страдания и обеспечить гуманное окончание его жизни.

#### Препараты.

Субъект, которому вводится композиция, предпочтительно представляет собой животных, в том числе, но не ограничиваясь таковыми, как коровы, лошади, овцы, свиньи, домашняя птица (например, куры) козы, кошки, собаки, хомяки, мыши и крысы; наиболее предпочтительно, млекопитающее представляет собой свинью.

Композиции в соответствии с изобретением содержат эффективное иммунизирующее количество одной или более иммуногенных композиций и физиологически приемлемый носитель. Вакцины содержат эффективное иммунизирующее количество одной или более иммуногенных композиций и физиологически приемлемый носитель. Композиция должна быть приемлемой для способа введения.

Иммуногенная композиция, если это является желательным, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH буферирующих агентов. Иммуногенная композиция может представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетки, пилюли, капсулы, композицию замедленного высвобождения или порошок. Пероральные препараты могут включать стандартные носители такие, как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.п.

#### Способы лечения.

Предпочтительные пути введения включают, но не ограничиваясь только ими, интраназальное, пероральное, внутрикожное и внутримышечное. Желательным является введение в питьевой воде, наиболее предпочтительно в единичной дозе. Квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятным, что композиции согласно изобретению также можно вводить в одной, двух или более дозах, а также при использовании других путей введения. Например, такие другие пути включают подкожное, внутрикожное, внутривенное, внутримышечное, и в зависимости от желательной продолжительности и эффективности лечения, композиции в соответствии с изобретением могут быть введены один или несколько раз, а также периодически, например, на ежедневной основе в течение нескольких дней, недель или месяцев и в различных дозировках, таких как от приблизительно  $10^3$  до  $10^8$  TCID<sub>50</sub> (см. титр вируса выше). В специфическом аспекте настоящего изобретения, дозировка составляет приблизительно от  $10^3$  до  $10^8$  TCID<sub>50</sub>, в особенности для живого вируса/живой вакцины.

Композиции, если это является желательным, могут быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, содержать металлическую или пластиковую упаковку, такую как блистерная упаковка. Упаковка или устройство дозатора может сопровождаться инструкциями в отношении введения, предпочтительно для введения млекопитающему, в частности, свинье. Такой (ие) контейнер (ы) могут сопровождаться сведениями в форме, установленной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, где сведения отображают разрешение ведомства на производство, применение или продажу для введения людям.

#### Обзор последовательностей.

Следующие последовательности подробно изложены и таким образом раскрываются в настоящем изобретении.

Промоторы:

- SEQ ID NO: 1 ENV-4 600по ДНК последовательность 4pgG600
- SEQ ID NO: 2 ENV-4 600по ДНК последовательность 4pMCP600
- SEQ ID NO: 3 ENV-4 430по ДНК последовательность pG430
- SEQ ID NO: 4 ENV-4 449по ДНК последовательность p455
- SEQ ID NO: 5 праймер № 1130, специфический для ogf72
- SEQ ID NO: 6 праймер № 1131, специфический для ogf72
- SEQ ID NO: 7 праймер № 1079, специфический для mCherry
- SEQ ID NO: 8 праймер № 1080, специфический для mCherry

Сайт инсерции:

- SEQ ID NO: 9 Искусственная последовательность нуклеиновой кислоты ПЦР праймера 1017 для участка инсерции ogf70
- SEQ ID NO: 10 Искусственная последовательность нуклеиновой кислоты ПЦР праймера 1018 для участка инсерции ogf70

046215

|  |   |
|--|---|
| SEQ ID NO: 11                            | Искусственная последовательность нуклеиновой кислоты ПЦР праймера 1007 для участка инсерции orf1/3  |
| SEQ ID NO: 12                            | Искусственная последовательность нуклеиновой кислоты ПЦР праймера 1008 для участка инсерции orf1/3  |
| SEQ ID NO: 13                            | левый (Up70) фланкирующий участок (417 по)  |
| SEQ ID NO: 14                            | правый (Up71) фланкирующий участок (431 по)   |
| SEQ ID NO: 15                            | фланкирующий участок левый (up orf70) в EHV-1 штамме ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), расположенный на нуклеотидах 127264 – 127680           |
| SEQ ID NO: 16                            | фланкирующий участок правый (up orf71) в EHV-1 штамме ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), расположенный на нуклеотидах 128484 – 128913          |
| SEQ ID NO: 17                            | усеченный фланкирующий участок в RED системе: левый (Up70) фланкирующий участок (283 по) = идентичный к 3' 283 по "классического" фланкирующего участка 417 по  |
| SEQ ID NO: 18                            | усеченный фланкирующий участок в RED системе: правый (Up71) фланкирующий участок (144 по) = идентичный к 5' 144 по "классического" фланкирующего участка 431 по |
| SEQ ID NO: 19                            | Делетированная часть в ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1) геномная последовательность, nt 127681 - 128482                                       |
| SEQ ID NO: 20                            | Делетированная часть в RasH геномной последовательности (нет доступных nt номеров, поскольку полная геномная последовательность неизвестна)                     |
| Плазмидные/векторные последовательности: |   |
| SEQ ID NO: 21                            | Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU-mC70-BGH  |
| SEQ ID NO.: 22                           | Нуклеотидная последовательность трансферного вектора pU70-p455-71K71  |
| SEQ ID NO.: 23                           | Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU70-p455-H3-71K71   |
| SEQ ID NO.: 24                           | Нуклеотидная последовательность трансферного вектора pU-1-3-p430-BGHKBGH  |
| SEQ ID NO.: 25                           | Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH  |

## Последовательности гемагглютинаина:

|              |  |
|--------------|--|
| SEQ ID NO:26 | гемагглютинин [вирус гриппа А<br>(A/swine/Italy/116114/2010(H1N2))]<br>GenBank: ADR01746.1 H1pdm |
| SEQ ID NO:27 | гемагглютинин [вирус гриппа А<br>(A/swine/Italy/7680/2001(H3N2))]<br>GenBank: ABS50302.2 H3:     |
| SEQ ID NO:28 | гемагглютинин [вирус гриппа А<br>(A/swine/Gent/132/2005(H1N1))]<br>GenBank: AFR76623.1 H1av:     |
| SEQ ID NO:29 | гемагглютинин [вирус гриппа А<br>(A/swine/Italy/4675/2003(H1N2))]<br>GenBank: ADK98476.1* H1hu   |

\*Следует отметить, что аминокислота 531 (X, стоп-кодон, изменен

изобретателями на I):

## Последовательности SBV конструкции:

|               |  |
|---------------|--|
| SEQ ID NO:30  | GS линкерная последовательность  |
| SEQ ID NO: 31 | Синтезированная ДНК последовательность, включая сайты рестрикции для субклонирования |
| SEQ ID NO:32  | ДНК фрагмент, используемый для RED рекомбинации, для создания pRacH-SE-70-455-SBVGc  |
| SEQ ID NO:33  | up70 F праймер   |
| SEQ ID NO:34  | up71 R праймер   |
| SEQ ID NO:35  | seq455-F1 праймер  |
| SEQ ID NO:36  | SBV Gc F1 праймер  |
| SEQ ID NO:37  | SBV Gc R1 праймер  |

**Краткое описание фигур**

Последующие фигуры составляют часть настоящего описания и включены для дальнейшей демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может лучше пониматься со ссылкой на одну или более из этих фигур в комбинации с подробным описанием специфических вариантов осуществления, представленных в настоящем изобретении.

Фиг. 1. Схематическая иллюстрация сравнения *orf1/3* участков EHV-1 штамма ab4 дикого типа (wt) и аттенуированного вакцинного штамма EHV-1 RacH.

Фиг. 2. Схематическое изображение ORF70 сайта инсерции UL = длинный уникальный сегмент US = короткий уникальный сегмент IR = внутренний инвертированный повтор TR = концевой инвертированный повтор gG = гликопротеин G gpII = гликопротеин II *orf* = открытая рамка считывания по = пар оснований.

Фиг. 3. Плазмидная карта и нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU-mC70-BGH.

Фиг. 4. Плазмидная карта и нуклеотидная последовательность трансферного вектора pU70-p455-71K71.

Фиг. 5. Плазмидная карта и нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды для инсерции экспрессионной кассеты p455-H3-71 в *orf70* из EHV-1 RacH.

H3 = открытая рамка считывания, кодирующая гемагглютинин H3 вирус гриппа А.

71pA = новая *polyA* последовательность, как описанная в изобретении, EM P2016-022.

I-SceI = сайт рестрикции для рестрикционной эндонуклеазы I-SceI.

промотор *arh* = прокариотический промотор устойчивого к канамицину гену.

Kan<sup>r</sup> = устойчивый к канамицину ген.

3' конец ORF70 = рекомбинационный участок по ходу транскрипции сайта инсерции.

ORI = точка начала репликации плазмиды.

AP<sub>r</sub> = устойчивый к ампициллину ген плазмиды.

против хода транскрипции *orf70* = рекомбинационный участок против хода транскрипции сайта инсерции.

p455 = новый промотор p455.

по = пар оснований.

Фиг. 6. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3с удлиненным ORF70 участком инсерции.

orf69: открытая рамка считывания номер 69 против хода транскрипции сайта инсерции в orf70; p455: новый промотор, описанный в настоящем изобретении, см., например, пример 1; H3: трансген гемагглютинаина вируса гриппа; 71pA: новая последовательность полиаденилирования; Δorf70: остаток из orf70, содержащий промотор для orf71, который кодирует структурный вирусный гликопротеин II (gpII).

Фиг. 7. Непрямой иммунофлуоресцентный анализ: Непрямой иммунофлуоресцентный анализ VERO-клеток, инфицированных гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 через 24 ч п.и. клетки фиксировали с помощью этанола и высушивали на воздухе. Используя коммерчески доступное моноклональное антитело к H3 в качестве первичного антитела и FITC-конъюгированный кроличий анти-мышинный IgG в качестве вторичного антитела, H3 присутствовал в клетках, инфицированных с применением рекомбинантного EHV-1 RacHSE-70-p455-H3 с помощью флуоресцентной микроскопии.

Фиг. 8. Вестерн-блоттинг: Вестерн-блоттинг клеток, инфицированных с применением различных пассажей гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 или контрольного гEHV-1 RacH-SE или имитационно-инфицированных. Блот слева инкубировали с моноклональным антителом Ai2G7, нацеленным на gpII из EHV-1. Реплика-блот справа инкубировали с коммерчески доступной кроличьей гипериммунной сывороткой к гемагглютинуину H3 гриппа А (PA5-34930).

Фиг. 9. Титры вирусов: на графиках представлены вирусные загрузки образцов легких вакцинированных или невакцинированных свиней после заражения

Инакт = коммерчески доступная инактивированная вакцина EHV= гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3

Фиг. 10. Плазмидная карта и нуклеотидная последовательность трансферного вектора pU-1-3-p430-BGNKBGN.

Фиг. 11. Плазмидная карта и нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды для инсерции экспрессионной кассеты p430-H1av-BGN в orf1/3 из EHV-1 RacH.

H1av = открытая рамка считывания, кодирующая гемагглютинин H1 вирус гриппа А.

BGNpA = polyA последовательность бычьего гормона роста.

Промотор arh = прокариотический промотор устойчивого к канамицину гена.

Kana = устойчивый к канамицину ген.

Фланк B = рекомбинационный участок по ходу транскрипции сайта инсерции.

Фланк A = рекомбинационный участок против хода транскрипции сайта инсерции p430 = новый промотор p430.

по = пар оснований.

Фиг. 12. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av с удлиненным orf1/3 участком инсерции.

Δorf1: оставшаяся часть открытой рамки считывания 1 против хода транскрипции сайта инсерции; p430: новый промотор, описанный в настоящем изобретении, см., например, пример 1; H1av: трансген гемагглютинаина вируса гриппа; BGNpA: последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста; orf3: открытая рамка считывания 3 по ходу транскрипции сайта инсерции.

Фиг. 13. Вестерн-блоттинг и иммунофлуоресценция клеток, инфицированных с применением гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av показали экспрессию трансгена.

H1av = гEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av

SE = гEHV-RacH-SE (контроль) иммитация = неинфицированные клетки (контроль).

Фиг. 14. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (гEHV-1-RacH-SE\_B) с двумя удлиненными участками инсерции.

Δorf1: оставшаяся часть открытой рамки считывания 1 против хода транскрипции сайта инсерции; p430: новый промотор; H1av: трансген гемагглютинаина вируса гриппа; BGNpA: последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста; orf3: открытая рамка считывания 3 по ходу транскрипции сайта инсерции.

orf69: открытая рамка считывания 69 против хода транскрипции сайта инсерции в orf70; p455: новый промотор; H3: трансген гемагглютинаина вируса гриппа; 71pA: новая последовательность полиаденилирования; Δorf70: остаток из orf70, содержащий промотор для orf71, который кодирует структурный вирусный гликопротеин II (gpII).

Фиг. 15. Вестерн-блоттинг: вестерн-блоттинг клеток, инфицированных с применением гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (B), пустой вектор гEHV-1 RacH-SE (SE), или имитационно-инфицированы (контр.). Реплика блоты инкубировали либо с коммерчески доступной кроличьей гипериммунной сывороткой к H3 (H3), коммерчески доступной кроличьей гипериммунной сывороткой (PA 34929) к H1 (H1), или моноклональное антитело Ai2G7 к EHV-1 gpII (gpII).

Фиг. 16. Среднегрупповые температуры тела до и через 1, 2 и 3 дня после заражения. "Усы" погрешностей, стандартные отклонения. Слева направо для исследуемого дня: отрицательная контрольная группа (отр. контр.), зараженная контрольная группа (контр. зараж.), животные, вакцинированные один раз с применением RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), вакцинированные два раза с применением RacH-SE-

70-p455-H3 (2x EHV-1), или дважды с применением свиной IAV вакцины (2x убитая).

Фиг. 17. Средние легочные показатели для групп через один и три дня после заражения. "Усы" погрешностей, стандартные отклонения. Отрицательная контрольная группа (отр. контр.), зараженная контрольная группа (контр. зараж.), животные, вакцинированные один раз с применением RasH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), вакцинированные два раза с применением RasH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), или дважды с применением свиной IAV вакцины (2x убитая).

Фиг. 18. Титры реципрокной сывороточной нейтрализации (SN) сывороток животных к зараженному свиным IAV H3 штамму R452-14, собранные в день заражения. 20, предел обнаружения. Отрицательная контрольная группа (отр. контр.), зараженная контрольная группа (контр. зараж.), животные, вакцинированные один раз с применением RasH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), вакцинированные два раза с применением RasH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), или дважды с применением свиной IAV вакцины (2x убитая).

Фиг. 19. Результаты из IL-1 $\beta$  из BALF, отобранные через один или два дня после заражения свиным IAV. Каждое пятно представляет собой значение, определенное на одно животное. Отрицательная контрольная группа (Отр. контр.), зараженная контрольная группа (Контр. зараж.), животные, вакцинированные один раз с применением RasH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), вакцинированные два раза с применением RasH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), или дважды с применением свиной IAV вакцины (2x убитая).

Фиг. 20. Результаты из IFN $\gamma$ -ELISpots PBMC, повторно стимулированных через 7 дней после 2ой вакцинации. (A), невакцинированная контрольная группа; (B), вакцинированные дважды с применением инактивированной свиной IAV вакцины; (C), вакцинированные один раз с применением гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3; (D), вакцинированные два раза с применением гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3. Для животных, вакцинированных только один раз с применением гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 повторная стимуляция соответствует 7 дням после 1ой вакцинации. Каждое пятно представляет собой значение, определенное на одно животное для данной временной точки и после повторной стимуляции со специфическим стимулом. Для повторной стимуляции, рекомбинантно экспрессированный HA свиного IAV, соответствующий H3 вакцинному антигену в гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 (HAV), рекомбинантно экспрессированный HA свиного IAV, соответствующий H3 зараженного штамма R452-14 (HACH), среду для разведения HAV и HACH (RPMI), пустой EHV-1 вектор RasH-SE (EHV-1 пустой), вакцина RasH-SE-70-p455-H3 (EHV-1-H3), свиной IAV H3N2 зараженный штамм R452-14 (H3N2), клеточный супернатант из неинфицированных клеток использовали для роста R452-14 (MDCK), или рекомбинантно экспрессированный свиной IAV нуклеопротеин (NP) использовали.

Фиг. 21. Схематическая карта трансферной плазмиды pU1/3-p430-H1hu-BGNKBGN.

Фиг. 22. Схематическая карта трансферной плазмиды pU70-p455-H1pdm-71K71.

Фиг. 23. Линейный двухцепочечный ДНК геном гEHV-1 RasH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm (гEHV-1 RasH-SED) с удлинёнными orf1/3 и orf70 участками инсерции

Фиг. 24. Вестерн-блоттинги клеток, инфицированных с применением гEHV-1 RasH-SE\_B, RasH-SED, RasH-SE, или неинфицированные (контр.). Реплика блоты инкубировали либо с поликлональной кроличьей гипериммунной сывороткой, нацеленной на H3 (PA5-34930), поликлональной кроличьей гипериммунной сывороткой, нацеленной на H1 (PA5-34929), или моноклональное антитело (Ai2G7) к EHV-1 гликопротеину II (gpII). Все антитела продуцировали предполагаемую картину подтвержденной экспрессии желательных антигенов H3 и H1 и сопоставимую эффективность репликации различных вирусов, как видно из очень схожего окрашивания EHV-1 gpII во всех образцах инфицированных клеток.

Фиг. 25. Результаты тестов нейтрализации вируса гриппа мышинных сывороток.

\* "Усы" погрешностей указывают среднее квадратическое отклонение.

Фиг. 26. Карта трансферной плазмиды pU70-455-SBVGc\_71K71.

Фиг. 27. А. Результаты количественной ОТ-ПЦР невакцинированного контрольного крупного рогатого скота (верхняя панель) и животных, вакцинированных два раза с применением гEHV-SBV-Gc (нижняя панель) для обнаружения вирусного генома SBV. Индивидуальных животных идентифицировали по различным типам линий и символов для каждой группы невакцинированных и вакцинированных животных, соответственно. Животное 1 представлено в виде черной линии с черными зарисованными кружками (соответствует черному столбику на фиг. 27B). Животное 2 представлено в виде пунктирной серой линии с серыми зарисованными треугольниками (соответствует светло-серому столбику на фиг. 27B). Животное 3 представлено в виде пунктирной черной линии с незаполненными квадратами (соответствует белому столбику на фиг. 27B). Животное 4 представлено в виде пунктирной серой линии с серыми зарисованными ромбами (соответствует темно-серому столбику на фиг. 27B). В) Результаты реакций сывороточной нейтрализации невакцинированного контрольного крупного рогатого скота (верхняя панель) и животных, вакцинированных два раза с применением гEHV-SBV-Gc (нижняя панель). Индивидуальных животных идентифицировали по различным цветам столбиков/заполнений (от черного до светло-серого или темно-серого до белого) для каждой группы невакцинированных и вакцинированных животных, соответственно. Животное 1 представлено в виде черного столбика (соответствует черной линии с черными зарисованными кружками на фиг. 27A). Животное 2 представлено в виде светло-серого столбика

ка (соответствует пунктирной серой линии с серыми зарисованными треугольниками на фиг. 27А). Животное 3 представлено в виде белого столбика (соответствует пунктирной черной линии с незаполненными квадратами на фиг. 27А). Животное 4 представлено в виде темно-серого столбика (соответствует пунктирной серой линии с серыми зарисованными ромбами на фиг. 27А).

Фиг. 28. Тест нейтрализации EHV. Все результаты, полученные из образцов идентичного животного в соответствующей группе, представлены в одном и том же оттенке серого: одно животное представлено в виде черного заполненного столбика, другое животное представлено в виде светло-серого заполненного столбика, третье животное представлено в виде белого столбика, и четвертое животное представлено в виде темно-серого столбика.

Фиг. 29. Титр свиного IAV в легких, определенные в виде TCID<sub>50</sub>/г легочной ткани для животных, убитых через один день после заражения, отр. контр., отрицательная контрольная группа; контр. зараж., зараженная контрольная группа; 2x IM, группа, вакцинированная два раза внутримышечно; IN+IM, группа, вакцинированная первый раз интраназально и второй раз внутримышечно; 2X IN, группа, вакцинированная два раза интраназально. Точки на графиках указывают средние значения, полученные для индивидуальных животных. Серединные горизонтальные линии указывают средние групповые значения, соответственно. Верхние и нижние горизонтальные линии указывают среднеквадратические отклонения, соответственно, р значения для попарного статистического сравнения групп представлены ниже и рассчитаны с помощью критерия Стьюдента, используя тест Манна-Уитни и GraphPad Prism® для программного обеспечения Windows 7.02, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, используя стандартные установки программного обеспечения, соответственно.

Фиг. 30. Титр свиного IAV в легких, определенные в виде TCID<sub>50</sub>/г легочной ткани для животных, убитых через три дня после заражения. отр. контр., отрицательная контрольная группа; контр. зараж., зараженная контрольная группа; 2x IM, группа, вакцинированная два раза внутримышечно; IN+IM, группа, вакцинированная первый раз интраназально и второй раз внутримышечно; 2X IN, группа, вакцинированная два раза интраназально. Точки на графиках указывают средние значения, полученные для индивидуальных животных. Серединные горизонтальные линии указывают средние групповые значения, соответственно. Верхние и нижние горизонтальные линии указывают среднеквадратические отклонения, соответственно. р значения для попарного статистического сравнения групп представлены ниже и рассчитаны с помощью критерия Стьюдента, используя тест Манна-Уитни и GraphPad Prism® для программного обеспечения Windows 7.02, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, используя стандартные установки программного обеспечения, соответственно.

Фиг. 31. Титр свиного IAV в легких, определенные в виде TCID<sub>50</sub>/г легочной ткани для животных, убитых через пять дней после заражения. отр. контр., отрицательная контрольная группа; контр. зараж., зараженная контрольная группа; 2x IM, группа, вакцинированная два раза внутримышечно; IN+IM, группа, вакцинированная первый раз интраназально и второй раз внутримышечно; 2X IN, группа, вакцинированная два раза интраназально. Точки на графиках указывают средние значения, полученные для индивидуальных животных. Серединные горизонтальные линии указывают средние групповые значения, соответственно. Верхние и нижние горизонтальные линии указывают среднеквадратические отклонения, соответственно. р значения для попарного статистического сравнения групп представлены ниже и рассчитаны с помощью критерия Стьюдента, используя тест Манна-Уитни и GraphPad Prism® для программного обеспечения Windows 7.02, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, используя стандартные установки программного обеспечения, соответственно.

Фиг. 32. Результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), специфического для свиного иммуноглобулина G (IgG), нацеленного на рекомбинантно экспрессированный свиного IAV антигена гемагглютинина H3, который является гомологичным H3, экспрессируемым вакцинным штаммом gEHV-1 RasH-SE\_B. Для этого теста, каждую лунку покрывали 100 нг рекомбинантно экспрессированного H3. Образцы измеряли попарно, средние значения для образцов рассчитывали на основании попарных измерений, и значения для групп рассчитывали на основании средних значений образцов, соответственно, контр. зараж., зараженная контрольная группа (служила в качестве отрицательного контроля); 2x IM, группа, вакцинированная два раза внутримышечно; IN+IM, группа, вакцинированная первый раз интраназально и второй раз внутримышечно; 2X IN, группа, вакцинированная два раза интраназально. "Усы" погрешностей указывают среднеквадратические отклонения. Дни исследования (SD) указывали в условных обозначениях справа на графике.

Фиг. 33. Результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), специфического для свиного иммуноглобулина G (IgG), нацеленного на рекомбинантно экспрессированный свиной IAV антиген гемагглютинина H3, который является гомологичным H3, экспрессируемым вакцинным штаммом gEHV-1 RasH-SE\_B. Для этого теста, каждую лунку покрывали 100 нг рекомбинантно экспрессированного H3. Образцы измеряли попарно, средние значения для образцов рассчитывали на основании попарных измерений, и значения для групп рассчитывали на основании средних значений образцов, соответственно, контр. зараж., зараженная контрольная группа (служила в качестве отрицательного контроля); 2x IM, группа, вакцинированная два раза внутримышечно; IN+IM, группа, вакцинированная первый раз интра-

назально и второй раз внутримышечно; 2X IN, группа, вакцинированная два раза интраназально. "Усы" погрешностей указывают среднеквадратические отклонения. Дни исследования (SD) указывали в условных обозначениях справа на графике.

Фиг. 34. Результаты гамма-интерферон специфического метода иммуноферментных пятен (IFN $\gamma$  ELISpot). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) очищали из крови, собранной у исследуемых животных в день исследования 28 (SD28). После этого PBMC повторно стимулировали либо с помощью H3N2 свиного IAV заражающего штамма R452-14 при множественности заражения 1 (H3N2 MOI 1) или с помощью рекомбинантно экспрессированного свиного IAV H3 антигена, который является гомологичным H3, экспрессируемым вакцинным штаммом gEHV-1 RasH-SE\_V при концентрации 1 мкг/мл (gH3 1 мкг/мл). Используя повторно стимулированные PBMC, осуществляли гамма-интерферон специфический метод иммуноферментных пятен (IFN $\gamma$  ELISpot), и полученные результаты нормировали к 10<sup>6</sup> клеток и рассчитывали в виде средних значений на группу, соответственно, контр. зараж., зараженная контрольная группа (служила в качестве отрицательного контроля); 2x IM, группа, вакцинированная два раза внутримышечно; IN+IM, группа, вакцинированная первый раз интраназально и второй раз внутримышечно; 2X IN, группа, вакцинированная два раза интраназально. "Усы" погрешностей указывают среднеквадратические отклонения.

Фиг. 35. Результаты гамма-интерферон специфического метода иммуноферментных пятен (IFN $\gamma$  ELISpot). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) очищали из крови, собранной у исследуемых животных в день исследования 28 (SD28). После этого PBMC повторно стимулировали либо с помощью H3N2 свиного IAV заражающего штамма R452-14 при множественности заражения 1 (H3N2 MOI 1) или с помощью рекомбинантно экспрессированного свиного IAV H3 антигена, который является гомологичным H3, экспрессируемым вакцинным штаммом gEHV-1 RasH-SE\_V при концентрации 1 мкг/мл (gH3 1 мкг/мл). Используя повторно стимулированные PBMC, осуществляли гамма-интерферон специфический метод иммуноферментных пятен (IFN $\gamma$  ELISpot), и полученные результаты нормировали к 10<sup>6</sup> клеток и рассчитывали в виде средних значений на группу, соответственно, контр. зараж., зараженная контрольная группа (служила в качестве отрицательного контроля); 2x IM, группа, вакцинированная два раза внутримышечно; IN+IM, группа, вакцинированная первый раз интраназально и второй раз внутримышечно; 2X IN, группа, вакцинированная два раза интраназально. "Усы" погрешностей указывают среднеквадратические отклонения.

### Примеры

Следующие ниже примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятным, что способы, раскрытые в примерах, представляют собой методы, раскрытые изобретателями для нормального осуществления настоящего изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы его практического применения. Тем не менее, специалистам в данной области техники должно быть очевидным в свете настоящего описания, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных вариантах, которые раскрыты, и при этом также удастся получить похожий или аналогичный результат без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

#### Пример 1.

Установление нового сайта инсерции ORF70.

Для увеличения способностей EHV-1 вектора, изобретателями был обнаружен путь экспрессии двух различных трансгенов из одного векторного остова без связывания двух трансгенов с помощью функций, имеющих происхождение из РНК-вируса под контролем а одного промотора. Изобретатели выдвинули гипотезу о том, что геном вируса герпеса будет толерантным к применению двух независимых сайтов инсерции трансгена параллельно. Для определения того, является ли EHV-1 ORF70 подходящим сайтом инсерции трансгена, 801 пар оснований на 5'конце *orf70* (1236 по) заменяли на экспрессионную кассету, кодирующую аутофлуоресцентный mCherry белок (Shaner и др. 2004) с помощью классической гомологичной рекомбинации (фиг. 2). Карта плазмиды pU-mC70-BGH представлена на фиг. 3 (ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID NO.21). ДНК фрагмент, используемый для гомологичной рекомбинации, вырезали из pU-mC70-BGH с помощью XbaI. Гель-очищенный фрагмент ко-трансфектировали с помощью вирусной геномной ДНК из EHV-1 RasH в RK13 клетки. Эффективное освобождение рекомбинантного векторного вируса и эффективная репликация в культивируемых клетках было продемонстрировано с помощью живой флуоресценции и титрований вируса (не показано). Делеция двух третей *orf70* имела дополнительное преимущество, поскольку экспрессия гликопротеина G, кодируемого *orf70*, была отменена. Было показано, что гликопротеин G из EHV-1 представляет собой неструктурный, секретлируемый хемокин-связывающий белок, противодействующий иммунной ответной реакции хозяина (Drummer и др., 1998; Вруант и др., 2003). Поскольку векторная вакцина предназначена для стимуляции иммунного ответа на вакцину, то удаление этой конкретной иммуносупрессивной функции вирусного вектора должна дополнительно улучшать платформу функционирования вирусного вектора EHV-1 RasH-SE.

#### Пример 2.

Применение нового ORF70 сайта инсерции с p455 промотором в рекомбинантном векторе EHV-1

вакцин и конструирование рекомбинантного вируса р455 промотор.

Для первого экспериментального животного, использовали гемагглютинин подтипа Н3 гриппа из вируса свиного гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(Н3N2), номер доступа GenBank.: ABS50302.2). Синтезировали его кодирующую последовательность и субклонировали в трансферном векторе рU70-р455-71K71 (фиг. 4, SEQ ID NO. 22), создавая трансферную плазмиду рU70-р455-Н3-71K71, помещая Н3 под контроль нового р455 промотора и нового 71рА сигнала полиаденилирования и вставляя в рамку кассету с участками рекомбинации для инсерции в *orf70* (фиг. 5, SEQ ID NO. 23).

С помощью мутагенеза *en-passant*, используя систему рекомбинации RED (Tischer и др. 2006) экспрессионную кассету р455-Н3-71 встраивали в *orf70* из рRacH-SE для получения рRacH-SE70-р455-Н3 (фиг. 6).

PK/WRL клетки трансфектировали с помощью рRacH-SE70-р455-Н3, рекомбинантный вирус гЕНV-1 RacH-SE70-р455-Н3 высвобождали и два раза очищали от бляшек. Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продукта участка инсерции с использованием высокоточной ПЦР с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгена в инфицированных клетках анализировали путем непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА, фиг. 7).

Восстановление *orf71*, кодирующей ЕНV-1 gpII, подтверждали с помощью ИФА (не показано) и вестерн-блоттинга (фиг. 8), используя моноклональное антитело Ai2G7 (принадлежащее В1). Появление тримеров Н3 на плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью реакции гемадсорбции, используя эритроциты цыплят (не показано). Пики титров, определенные в виде TCID<sub>50</sub>/мл в PK/WRL клетках, находились в том же самом диапазоне, что и титры родительского вируса гЕНV-1 RacH-SE, что указывает на то, что экспрессия трансгена не оказывает отрицательного влияния на репликацию вируса (не показано). Это подтверждается путем пассивирования гЕНV-1 RacH-SE70-р455-Н3 в PK/WRL клетках вплоть до пассажа 20 (P20) после высвобождения. В пассажах P5, P10, P15, и P20 вирус характеризовали путем титрования, секвенирования и вестерн-блоттинга (фиг. 8), в P10 и P20 дополнительно путем ИФА, и подтверждали НА экспрессию и генетическую стабильность инсера, которые кодирует НА вместе с промотором и *polyA* последовательностями.

Два блота, представленные на фиг. 8, являются репликами, которые инкубировали либо с моноклональным антителом Ai2G7 (слева), которое специфически обнаруживает ЕНV-1 гликопротеин II (gpII) или, или с коммерчески доступным поликлональным кроличьим антителом (РА5-34930), который вырабатывается на гемагглютинин подтипа Н3 гриппа (справа), gpII обнаруживали во всех клеточных культурах, инфицированных рекомбинантным ЕНV-1, как и ожидалось. Полноразмерный Н3 обнаруживали во всех клетках, инфицированных различными пассажами гЕНV-1 RacH-SE-70-р455-Н3, как и ожидалось. Специфичность антисыворотки к Н3 показана в том же самом вестерн-блоттинге, см. дорожку gG430mC. В данном случае только моноклональное антитело gpII продуцирует реакцию, как и ожидалось, в то время как антитело к Н3 не связывается на соответствующей дорожке реплик.

Методом двойного иммунофлуоресцентного анализа (dIFA) вирусных бляшек в клетках, инфицированных с применением P20, и используя моноклональное антитело к Н3 и лошадиную анти-ЕНV сыворотку, было подтверждено, что практически все ЕНV-1 индуцированные бляшки также экспрессируют Н3 (не показано). Все тесты подтвердили стабильность рекомбинантного ЕНV-1 RacH-SE-70-р455-Н3.

Пример 3.

Подтверждение концепции исследования животных (РОС I), используя новый ORF70 сайт инсерции и оценки серологического ответа:

тестируемые животные: критерии включения и схема эксперимента:

пять групп, состоящих из десяти поросят, рожденных от свиноматок, которые никогда не были инфицированы вирусом гриппа А, были включены в РОС-I исследование, как обобщено в табл. 2.

Таблица 2

| Группа | Обработка вакциной                           | Количество животных | Путь введения   | Доза   |
|--------|--|---------------------|-----------------|--|
| 1      | 1x NaCl;<br>1x EHV1 векторная вакцина        | 10                  | в/м             | 2 мл NaCl;<br>2 мл EHV1,<br>1,00 x 10 <sup>7</sup><br>TCID <sub>50</sub> |
| 2      | 2x EHV1 векторная вакцина                    | 10                  | в/м             | 2x 2 мл EHV1,<br>1,00 x 10 <sup>7</sup><br>TCID <sub>50</sub>            |
| 3      | 2x NaCl                                      | 10                  | в/м             | 2x 2 мл NaCl   |
| 4      | 2x<br>инактивированная вакцина               | 10                  | в/м             | 2x 2 мл IDT  |
| 5      | 2x NaCl                                      | 10                  | в/м             | 2x 2 мл NaCl   |
| Группа | Заражение                                    | Количество животных | Путь введения   | Доза   |
| 1      | Н3N2 ВИРУС ГРИППА А ОТ СВИНЕЙ                | 10                  | Интратрахеальн. | 8 мл; 1,00 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /мл                      |
| 2      | Н3N2 ВИРУС ГРИППА А ОТ СВИНЕЙ                | 10                  | Интратрахеальн. | 8 мл; 1,00 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /мл                      |
| 3      | Н3N2 ВИРУС ГРИППА А ОТ СВИНЕЙ                | 10                  | Интратрахеальн. | 8 мл; 1,00 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /мл                      |
| 4      | Н3N2 ВИРУС ГРИППА А ОТ СВИНЕЙ                | 10                  | Интратрахеальн. | 8 мл; 1,00 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /мл                      |
| 5      | культуральная среда (Отрицательный контроль) | 10                  | Интратрахеальн. | 8 мл   |

Инфекционную дозу  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> гEHV-1 RasH-70-p455-H3 (EHV-1) применяли либо один раз в возрасте пяти недель или два раза в возрасте двух и пяти недель. Для сравнения, коммерчески доступную инактивированную вакцину применяли два раза в возрасте двух и пяти недель. Все поросята не имели материнских антител, чтобы не ликвидировать влияние инактивированной вакцины (инакт). Две группы не было вакцинировано, но они получали инъекции физиологическим раствором хлорида натрия (NaCl) и являлись контролем заражения или строгим отрицательным контролем, соответственно. Через 21 день после второй вакцинации, все группы, за исключением строгой отрицательной контрольной группы, были заражены с помощью  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> гетерологичного штамма вируса гриппа А (IVA) (Н3N2 ВИРУС ГРИППА А ОТ СВИНЕЙ R452-14, изолят для заражения, принадлежащий В1). В то время как у невакцинированной зараженной контрольной группы (контр, зараж.) все свиньи имели высокие титры вируса гриппа в их легких через один и три дня после контрольного заражения, все свиньи в строгой отрицательной контрольной группе (отриц. контр.) и группе, которая была вакцинирована дважды (EHV 2x) с помощью гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3, были отрицательными по IVA в обоих днях. В группе, вакцинированной два раза инактивированной контрольной вакциной (инакт. 2x), одно из пяти животных имело низкий титр IVA на третий день после заражения. В группе, вакцинированной один раз (EHV 1x), за 21 день до заражения гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3, двое из пяти животных имели низких титры IVA в их легких через один день после контрольного заражения и одно из пяти животных через три дня после заражения (фиг. 9).

Две вакцинации при использовании  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> of гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 полностью защищали свиней от контрольного заражения с применением гетерологичного IVA, подтип Н3N2.

Было продемонстрировано, что EHV-1 вектор RasH-SE является подходящим для вакцинации свиней и что новый промотор p455 является функциональным для регуляции иммуногенной экспрессии гемагглютинаина IVA у вакцинированных свиней.

Пример 4.

Применение нового p430 промотора в рекомбинантном векторе EHV-1 вакцин и конструирование рекомбинантного вируса p430 промотор:

новый идентифицированный p430 промотор использовали для управления экспрессией другого гемагглютинаина H1N1 из вируса гриппа ((A/swine/Gent/132/2005(H1N1), номер доступа GenBank.: AFR76623.1). Поскольку ген гемагглютинаина в этом изоляте вируса имел происхождение из IAV птиц, то его обозначали как H1av. H1av синтезировали и субклонировали в трансферном векторе для участка инсерции org1/3 (фиг. 10, SEQ ID NO. 24) для получения pU1/3-p430-H1av-BGH\_K\_BGH (фиг. 11, SEQ

ID NO. 25). Экспрессию H1av размещали под контролем p430 промотора и polyA сигнала бычьего гормона роста (BGH).

С помощью мутагенеза en-passant, используя систему рекомбинации RED (Tischer и др. 2006) экспрессионную кассету p430-H1av-BGH встраивали в orf1/3 из pRacH-SE для получения pRacH-SE1/3-p430-H1av (фиг. 12).

PK/WRL клетки трансфектировали с помощью pRacH-SE1/3-p430-H1av, рекомбинантный вирус гЕНV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av высвобождали и два раза очищали от бляшек. Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продукта участка инсерции с использованием высокоточной ПЦР с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгена в инфицированных клетках анализировали путем непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) и вестерн-блоттинга, используя коммерчески доступные моноклональные и поликлональные антитела (Фиг. 13).

Восстановление orf71, кодирующей EHV-1 gpII, подтверждали с помощью ИФА и вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело Ai2G7 (принадлежащее BI), (не показано). Правильный процессинг и транспорт of H1av и локализацию на плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью реакции гемадсорбции, используя эритроциты цыплят (не показано). Пики титров, определенные в виде TCID<sub>50</sub>/мл в PK/WRL клетках, находились в том же самом диапазоне, что и титры родительского вируса RacH-SE, что указывает на то, что экспрессия трансгена не оказывает отрицательного влияния на репликацию вируса (не показано).

Специфическое определение широкой полосы, мигрирующей при 75 кДа, с помощью антитела PA-34929, согласуется с ожидаемым появлением рекомбинантного гликопротеина HA, как предсказано из его последовательности. Видимое окрашивание клеточных мембран с помощью моноклонального антитела C102 соответствует субклеточной локализации, как и ожидалось (фиг. 13).

Для проверки, будут ли экспрессируемые рекомбинантные гемагглютинины процессироваться и транспортироваться, как и ожидалось, VERO-клетки инфицировали с применением гЕНV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, гЕНV-1 RacH-SE-70-p455-H3, гЕНV-1 RacH-SE (родительский) при множественности заражения 0,01, или оставались неинфицированными. Через 24 ч п.и. живые инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали с суспензией эритроцитов цыплят в PBS, промывали PBS и окрашивали флуоресцентным Hoechst 33342 для окрашивания ядер. Поскольку эритроциты птиц содержат клеточные ядра, то они могут быть окрашены с помощью Hoechst33342 и обнаруживаются в виде миниатюрных синих пятен при флуоресцентной микроскопии. По сравнению с клетками, которые были инфицированы с применением гЕНV-1 RacH-SE, которые не экспрессируют гемагглютинин, адсорбция эритроцитов цыплят была существенно повышена для клеток, инфицированных либо с помощью гЕНV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av или гЕНV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (не показано). На основании этого можно сделать вывод о том, что гемагглютинины были транслированы, процессированы и транспортированы на плазматическую мембрану клеток, инфицированных векторным вирусом таким образом, как если бы они были продуцированы путем аутентичного инфицирования вирусом гриппа.

Четкий фенотип гемадсорбции инфицированных клеток подтверждает результаты вестерн-блоттингов и иммунофлуоресцентных анализов, которые показывают эффективную экспрессию трансгенных белков и предполагают образование функциональных тримеров HA на клеточной поверхности клеток, инфицированных вектором EHV-1.

Пример 5.

Применение нового ORF70 сайта инсерции и ORF1/3 сайта инсерции в вакцинах на основании рекомбинантного вектора EHV-1 параллельно.

Для демонстрации того, что два новых промотора можно использовать параллельно, создавали рекомбинантный EHV-1 RacH, экспрессирующий два различных гемагглютинина двух различных подтипов вируса гриппа А.

Специфичность и отсутствие перекрестной реакционной способности поликлональных коммерчески доступных антител к H3 (PA5-34930) и H1 (PA5-34929) подтверждали с помощью вестерн-блоттингов инфицированных клеток, инфицированных однократно инсертированными вирусами гЕНV-1 RacH-SE-70-p455-H3 и гЕНV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av (не показано).

Синтезировали открытую рамку считывания, кодирующую гемагглютинин вирус гриппа А (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), и клонировали в трансферном векторе pU1-3-p430-BGHKBGH (фиг. 10), что обеспечивало получение pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (Фиг. 11). Используя в качестве исходного рекомбинантный ВАС pRacH-SE-70-p455-H3, экспрессионную кассету p430-H1av-BGH, которую собирали в pU1/3-p430-H1av-BGHKBGH (фиг. 11, SEQ ID NO. 25), встраивали в orf1/3 сайт инсерции путем двухэтапной RED рекомбинации для получения pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. PK/WRL клетки трансфектировали с помощью pRacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, и рекомбинантный вирус гЕНV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 высвобождали и два раза очищали от бляшек (Фиг. 12).

Коротким обозначением этого рекомбинантного вируса является гЕНV-1 RacH-SE\_B. Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продуктов высокоточной ПЦР с корректирующей экзонуклеазной активностью участков инсерции вместе с фланкирующими последова-

тельность. Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали путем непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА, не показано) и Вестерн-блоттинга, используя коммерчески доступные моноклональные и поликлональные антитела (фиг. 13). Восстановление *orf71*, кодирующей EHV-1 gpII, подтверждали с помощью ИФА (не показано) и вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело Ai2G7 (принадлежащее VI), (фиг. 13).

Как показано на фиг. 13, оба трансгена H3 и H1av экспрессировались параллельно в клеточных культурах, инфицированных двойным рекомбинантным инсертом гEHV-1 RasH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (B). Экспрессия трансгена была стабильной и не ухудшала вирусные титры, тестируемые до пассажа 11 в PK/WRL клетках (не показано).

Было показано, что два новых промотора p430 и p455 являются функциональными в контексте репликации гEHV-1-RasH в клеточных культурах. Уровни активности во время цикла репликации вируса оказались очень сходными, как выведено на основании исследований кинетики промотора *in vitro*. Эти свойства предоставляют возможность создавать рекомбинантные векторные вакцины на основании EHV-1 RasH или других векторных платформ, экспрессирующих два различных антигена параллельно со сходной эффективностью. Если целевая вакцина состоит из двух различных патогенов, то применение двух новых промоторов в двух сайтах инсерции в сочетании с двумя последовательностями полиаденилирования может существенно снизить стоимость товаров и представляет собой очевидное преимущество по сравнению с вектором, экспрессирующим только один антигенный компонент.

Пример 6.

Создание, характеристика IN VITRO и тестирование IN VIVO моновалентной вакцины против вируса гриппа А свиней на основании вектора EHV-1 (H3 вакцина).

Гемагглютинин вируса гриппа свиней IAV серотипа H3 (SEQ ID NO 27) (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), номер доступа GenBank.: ABS50302.2) выбирали в качестве антигена для исследования вакцинации у свиней. Эта новая вакцина к IAV свиней обеспечивает характерный признак DIVA, например, обнаружение антител к белкам NP или NA свиного IAV у животных, которые были инфицированы полевыми штаммами IAV свиней, но не у животных, вакцинированных только вакциной, описанной в настоящем изобретении, поскольку она экспрессирует только один белок NA свиного IAV. Синтезировали его кодирующую последовательность и субклонировали с получением трансферного вектора pU70-p455-H3-71K71, помещая H3 под контроль нового p455 промотора и нового 71pA сигнала полиаденилирования и вставляя в рамку кассету с участками рекомбинации для инсерции в *orf70* (фиг. 2).

С помощью мутагенеза *en-passant*, используя систему рекомбинации RED, экспрессионную кассету p455-H3-71 встраивали в *orf70* из pRasH-SE для получения pRasH-SE70-p455-H3 (фиг. 6).

PK/WRL клетки трансфектировали с помощью pRasH-SE70-p455-H3, рекомбинантный вирус гEHV-1 RasH-SE70-p455-H3 высвобождали и два раза очищали от бляшек.

Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продукта участка инсерции с использованием высокоточной ПЦП с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгена в инфицированных клетках анализировали путем непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА, фиг. 7) и Вестерн-блоттинга (фиг. 8), используя коммерчески доступные моноклональные и поликлональные антитела.

Восстановление *orf71*, кодирующей EHV-1 gpII, подтверждали с помощью ИФА (не показано) и вестерн-блоттинга (фиг. 8), используя моноклональное антитело Ai2G7 (принадлежащее VI). Появление тримеров H3 на плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью реакции гемадсорбции, используя эритроциты цыплят (не показано). Пики титров, определенные в виде TCID<sub>50</sub>/мл в PK/WRL клетках, находились в том же самом диапазоне, что и титры родительского вируса RasH-SE, что указывает на то, что экспрессия трансгена не оказывает отрицательного влияния на репликацию вируса (не показано). Это подтверждается путем пассивирования гEHV-1 RasH-SE70-p455-H3 в PK/WRL клетках вплоть до пассажа 20 (P20) после высвобождения. В пассажах P5, P10, P15, и P20 вирус характеризовали путем титрования, секвенирования и вестерн-блоттинга (фиг. 8), в P10 и P20 дополнительно путем ИФА, и подтверждали HA экспрессию и генетическую стабильность инсера, которые кодирует HA вместе с промотором и *polyA* последовательностями.

Два блота, представленные на фиг. 9, являются репликами, которые инкубировали либо с моноклональным антителом Ai2G7 (слева), которое специфически обнаруживает EHV-1 гликопротеин II (gpII) или, или с коммерчески доступным поликлональным кроличьим антителом (PA5-34930), который вырабатывается на гемагглютинин подтипа H3 гриппа (справа), gpII обнаруживали во всех клеточных культурах, инфицированных рекомбинантным EHV-1, как и ожидалось. Полноразмерный H3 обнаруживали во всех клетках, инфицированных различными пассажами гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3, как и ожидалось. Специфичность антисыворотки к H3 также показывали с помощью вестерн-блоттингов клеток, инфицированных с применением других рекомбинантных EHV-1 RasH-SE, экспрессирующих гемагглютинины гриппа из H1 подтипов вирусов, см. ниже, фиг. 15.

Методом двойного иммунофлуоресцентного анализа (dIFA) вирусных бляшек в клетках, инфицированных с применением P20, и используя моноклональное антитело к H3 и лошадиную анти-EHV сыворотку, было подтверждено, что практически все EHV-1 индуцированные бляшки также экспрессируют

H3 (не показано). Все тесты подтвердили стабильность рекомбинантного EHV-1 RasH-SE-70-p455-H3.

Для исследования ее свойств в качестве векторной вакцины у молодых поросят, rEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 тестировали в исследовании вакцинация-заражение. Более подробно, поросят без материнского иммунитета к IAV свиней (без материнских антител) вакцинировали два раза с применением супернатанта клеточной культуры, содержащего RasH-SE-70-p455-H3 в дозе  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> внутримышечно в возрасте двух и пяти недель (двукратная вакцинация,  $2 \times$  EHV-1), или только в возрасте пяти недель (однократная вакцинация,  $1 \times$  EHV-1). Невакцинированная группа служила в качестве отрицательного контроля, а группа животных, которых вакцинировали в возрасте двух и пяти недель, а с помощью коммерчески доступной инактивированной вакцины IAV свиней в соответствии с инструкциями производителя (но в моменты времени вакцинации) являлась положительным контролем (убитая). В возрасте 8 недель, все животные, но не отрицательный контроль, были заражены интратрахеально применяемой дозой  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> H3N2 штаммом IAV свиней для заражения (Европейский изолят полевого вируса R452-14, H3 которого является гетерологичным H3 вакцинного антигена, используемого в RasH-SE-70-p455-H3). Невакцинированные и незараженные животные служили в качестве отрицательного контроля, в то время как невакцинированные, но зараженные животные служили в качестве контроля заражения. При вакцинации и после вакцинации, а также перед и после заражения, измеряли температуру тела и отбирали образцы крови в различные моменты времени. Через один день после заражения, половину животных на группу убивали и легкие оценивали относительно наличия поражений, типичных для IAV инфекции свиней, три образца легких левого и правого легкого отбирали у каждого животного, соответственно, для определения инфекционных титров IAV свиней в гомогенатах легких, а также брали образцы бронхоальвеолярных смывов (BALF). Аналогичную процедуру проводили с оставшейся половиной животных на группу через три дня после заражения.

При исследовании повышения температуры тела после применения для заражения вируса IAV свиней, невакцинированные животные показали повышение температуры тела приблизительно на  $1^\circ\text{C}$  через 1 день после заражения. Это повышение температуры тела через 1 день после заражения было предотвращено для группы животных, вакцинированных два раза с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины (Фиг. 16).

Оценка показателей легких у животных, убитых через 1 или 3 дня после заражением вирусом IAV свиней обнаружила, что отрицательный контроль не проявил поражений в легких, типичных для IAV инфекции свиней, контроль заражения проявил среднее значение поражений в легких в диапазоне 6-7%, и что относительно средних значений группы показатели поражения легких были значительно уменьшены от одного до 4% для группы животных, вакцинированных два раза с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины (фиг. 17).

Средние значения титров IAV свиней в легких животных, убитых через 1 или 3 дня после заражением вирусом IAV свиней, показали, что отрицательный контроль не обнаружил IAV свиней в образцах легких, в то время как контроль заражения проявил титры вирусов на г легочной ткани в диапазоне от больше 5 (день 3) до больше 7 log (день 1). При кардинальном отличии, средние значения группы были сильно снижены до приблизительно двух log или меньше для группы, вакцинированной один раз с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины, и уменьшены до необнаруживаемых уровней для группы животных, вакцинированных два раза с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины (фиг. 9).

При тестировании индукции нейтрализующих антител IAV свиней после вакцинации, сыворотки животных, вакцинированных один раз с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины, проявили титры реципрокной нейтрализации в диапазоне приблизительно 160 через три недели после первой вакцинации, и сыворотки животных, вакцинированных два раза с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины, проявили титры нейтрализации приблизительно 2560 через три недели после второй вакцинации, в то время как сыворотки от невакцинированных групп не имели обнаруживаемых уровней нейтрализующих антител к IAV свиней (фиг. 18).

При определении количества провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  в BALF от животных через 1 или 3 дня после заражения IAV свиней, уровни IL-1 $\beta$  больше 100 пг/мл вплоть до 900 пг/мл были обнаружены у трех из четырех животных, протестированных в день 1, в то время как эти уровни были уменьшены до 100-300 пг/мл IL-1 $\beta$  для BALF от животных, вакцинированных один раз с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины, и даже дополнительно уменьшались до уровней 0 до меньше чем 100 пг/мл IL-1 $\beta$  для всех животных, вакцинированных два раза с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины (фиг. 19). Это указывает на то, что вакцинация с применением RasH-SE-70-p455-H3 вакцины эффективно предотвратила индукцию провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  после инфицирования IAV свиней.

При тестировании повторной стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), отобранных в день исследования 28 и с использованием различных стимулов, стимуляция PBMC от невакцинированных животных проявила менее, чем  $75/1 \times 10^6$  единиц в IFN $\gamma$ -ELISpot независимо от используемых стимулов (фиг. 20A). PBMC, полученные от животных, которые получили инактивированную вакцину дважды (убитая), показали приблизительно  $150/1 \times 10^6$  единиц, когда они были повторно стимулированы рекомбинантным нуклеопротеином NP свиного IAV и приблизительно  $3000/1 \times 10^6$  единиц в

IFN $\gamma$ -ELISpot, когда они были повторно стимулированы H3N2 зараженного штамма R452-14 свиного IAV, но не обнаружили повторной стимуляции РВМС (уровни 75/1 $\times$ 10<sup>6</sup> единиц или меньше) при использовании рекомбинантных НА свиного IAV или EHV-1 вирусов (фиг. 20B). В отличие от этого, животные, вакцинированные один раз или два раза с применением RacH-SE-70-p455-H3 вакцины, также проявили приблизительно 200 (1 $\times$  EHV-1) до 300 (2 $\times$  EHV-1)/1 $\times$ 10<sup>6</sup> единиц IFN $\gamma$ -ELISpot, когда они были повторно стимулированы с помощью H3N2 зараженный штамм R452-14 свиного IAV, но не продемонстрировали повторной стимуляции РВМС (уровни 75/1 $\times$ 10<sup>6</sup> единиц или ниже) при использовании рекомбинантного NP свиного IAV (фиг. 20C и D). Когда вирусы EHV-1 использовали для повторной стимуляции, то животные, вакцинированные один раз или два раза с применением RacH-SE-70-p455-H3 вакцины, проявили приблизительно 300/1 $\times$ 10<sup>6</sup> единиц в IFN $\gamma$ -ELISpot, когда они были повторно стимулированы с помощью пустой EHV-1 вакцины RacH-SE, и это значение дополнительно повышалось до более чем 400/1 $\times$ 10<sup>6</sup> единиц, при использовании вакцины RacH-SE-70-p455-H3, экспрессирующей H3 IAV свиней, соответственно (фиг. 20C и D). Таким образом, если рекомбинантный НА IAV свиней использовали для повторной стимуляции, то только животные, вакцинированные один раз или два раза вакциной RacH-SE-70-p455-H3, проявили приблизительно 100-150 (1 $\times$ EHV-1) до 150-200 (2 $\times$  EHV-1)/1 $\times$ 10<sup>6</sup> единиц в IFN $\gamma$ -ELISpot (фиг. 20C и D).

Пример 7.

Создание. Характеристика IN VITRO и тестирование IN VIVO тетравалентной EHV-1 векторной вакциной вируса гриппа А для свиней.

Как описано ниже, в представленном изобретении четыре вышеописанных антигена гемагглютини-на (НА) IAV свиней, полученных из птичьих H1N2, H3N2, H1N1, и H1N1 пандемичных под-/серотипов IAV свиней, экспрессировали два рекомбинантных вируса на основании EHV-1 вектора. Эта новая тетравалентная вакцина против IAV свиней обеспечивает характерную особенность DIVA, например, путем обнаружения антител против белков NP или NA IAV свиней у животных, которые инфицировали полевыми штаммами IAV свиней, но только не у животных, вакцинированных вакциной, описанной в настоящем изобретении, поскольку только она экспрессирует НА белки IAV свиней.

Новая тетравалентная вакцина IAV свиней была охарактеризована in vitro и тестировалась in vivo для ее определения эффективности против IAV свиней.

Новый идентифицированный p430 промотор использовали для управления экспрессией H1N1 IAV свиней ((A/swine/Gent/132/2005(H1N1), номер доступа GenBank.: AFR76623.1). Поскольку ген гемагглютинина в этом изоляте вируса имел происхождение из IAV птиц, то его обозначали как H1av. H1av синтезировали и субклонировали в трансферном векторе для участка инсерции *orf1/3* для получения pU1/3-p430-H1av-BGH\_K\_BGH. Экспрессию H1av размещали под контролем p430 промотора и polyA сигнала бычьего гормона роста (BGH) и вставляли в рамку с рекомбинантными участками для инсерции в *orf1/3* (фиг. 11, SEQ ID NO. 25).

С помощью мутагенеза *en-passant*, используя систему рекомбинации RED экспрессионную кассету p430-H1av-BGH встраивали в *orf1/3* pRacH-SE для получения pRacH-SE1/3-p430-H1av (фиг. 12). PK/WRL клетки трансфектировали с помощью pRacH-SE1/3-p430-H1av, рекомбинантный вирус гEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av высвобождали и два раза очищали от бляшек. Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продукта участка инсерции с использованием высокоточной ПЦП с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгена в инфицированных клетках анализировали путем непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) и вестерн-блоттинга, используя коммерчески доступные моноклональные и поликлональные антитела (фиг. 13). Восстановление *orf1*, кодирующей EHV-1 gpII, подтверждали с помощью ИФА и вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело Ai2G7 (принадлежащее BI), (не показано). Правильный процессинг и транспорт H1av и локализацию на плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью реакции гемадсорбции, используя эритроциты цыплят (не показано). Пики титров, определенные в виде TCID50/мл в PK/WRL клетках, находились в том же самом диапазоне, что и титры родительского вируса RacH-SE, что указывает на то, что экспрессия трансгена не оказывает отрицательного влияния на репликацию вируса (не показано).

Специфическое определение широкой полосы, мигрирующей при 75 кДа, с помощью антитела RA-34929, согласуется с ожидаемым появлением рекомбинантного гликопротеина НА, как предсказано из его последовательности. Видимое окрашивание клеточных мембран с помощью моноклонального антитела C102 соответствует субклеточной локализации, как и ожидалось.

Для проверки, будут ли экспрессируемые рекомбинантные гемагглютинины процессироваться и транспортироваться, как и ожидалось, VERO-клетки инфицировали с применением гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, гEHV-1 RacH-SE (родительский) при множественности заражения 0,01, или оставались неинфицированными. Через 24 ч п.и. живые инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали с суспензией эритроцитов цыплят в PBS, промывали PBS и окрашивали флуоресцентным Hoechst 33342 для окрашивания ядер. Поскольку эритроциты птиц содержат клеточные ядра, то они могут быть окрашены с помощью Hoechst33342 и обнаруживаются в виде миниатюрных

синих пятен при флуоресцентной микроскопии, по сравнению с клетками, которые были инфицированы с применением гEHV-1 RacH-SE, которые не экспрессируют гемагглютинин, адсорбция эритроцитов цыплят была существенно повышена для клеток, инфицированных либо с помощью гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av или гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (не показано). На основании этого можно сделать вывод о том, что гемагглютинины были транслированы, процессированы и транспортированы на плазматическую мембрану клеток, инфицированных векторным вирусом таким образом, как и в том случае, если бы они были продуцированы аутентичной репликацией вируса гриппа.

Фенотип гемадсорбции инфицированных клеток подтверждает результаты вестерн-блоттингов и иммунофлуоресцентных анализов (для H1av, фиг. 13), которые показывают эффективную экспрессию трансгенных белков и предполагают образование функциональных тримеров HA на клеточной поверхности клеток, инфицированных вектором EHV-1.

Специфичность и отсутствие перекрестной реакционной способности поликлональных коммерчески доступных антител к H3 (PA5-34930) и H1 (PA5-34929) подтверждали с помощью вестерн-блоттингов инфицированных клеток, инфицированных однократно инсертированными вирусами гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 и гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av (не показано).

Затем, создавали рекомбинантный EHV-1 RacH-SE, экспрессирующий два различных гемагглютинина двух различных под-/серотипов вируса А.

Используя в качестве исходного рекомбинантный ВАС pRacH-SE-70-p455-H3, экспрессионную кассету p430-H1av-BGH, которую собирали в трансферном векторе pU1/3-p430-H1av-BGH\_K\_BGH (фиг. 12), встраивали в *orf1/3* сайт инсерции путем двухэтапной RED рекомбинации для получения pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. PK/WRL клетки трансфектировали с помощью pRacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, и рекомбинантный вирус гEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 высвобождали и два раза очищали от бляшек. Коротким обозначением этого рекомбинантного вируса является гEHV-1 RacH-SEB (фиг. 14). Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продуктов высокоточной ПЦР с корректирующей экзонуклеазной активностью участков инсерции вместе с фланкирующими последовательностями.

Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали путем непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА, не показано) и Вестерн-блоттинга, используя коммерчески доступные моноклональные и поликлональные антитела (фиг. 15). Восстановление *orf71*, кодирующей EHV-1 gpII, подтверждали с помощью ИФА (не показано) и вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело Ai2G7 (принадлежащее BI), (фиг. 15).

Оба трансгена H3 и H1av экспрессировались параллельно в клеточных культурах, инфицированных двойным рекомбинантным инсертом гEHV-1 RacH-SE\_B. Экспрессия трансгена была стабильной и не ухудшалась вирусные титры, тестируемые до пассажа 11 в PK/WRL клетках.

Было показано, что усовершенствованный вектор EHV-1 с двумя сайтами инсерции и двумя новыми промоторами экспрессирует два гемагглютинина вируса гриппа параллельно. Субклеточная локализация, как определено с помощью ИФА, и подвижность в SDS-PAGE, как определено Вестерн-блоттингом, соответствовала аутентичным гемагглютинином, которые экспрессируются в инфицированных вирусом гриппа А клетках, известных из литературы.

После этого, получали второй гEHV-1 RacH с двойной инсерцией, экспрессирующий гемагглютинины H1hu, SEQ ID NO: 29, (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2); номер доступа GenBank. ADK98476.1) и H1pdm, SEQ ID NO: 26, (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2); номер доступа GenBank. ADR01746.1).

Кодирующую последовательность H1hu синтезировали и субклонировали в трансферном векторе для участка инсерции *orf1/3* для получения pU1/3-p430-H1hu-BGHKBGH. Экспрессию H1hu размещали под контролем p430 промотора и polyA сигнала бычьего гормона роста (BGH) и вставляли в рамку с рекомбинантными участками для инсерции в *orf1/3* (фиг. 21).

Синтезировали кодирующую последовательность H1pdm и субклонировали с получением трансферного вектора pU70-p455-H1pdm-71K71, помещая H1pdm под контролем нового p455 промотора и нового 71pA сигнала полиаденилирования и вставляя в рамку кассету с участками рекомбинации для инсерции в *orf70* (фиг. 22).

После этого, экспрессионные кассеты p430-H1av-BGH и p455-H1pdm-71 встраивали в pRacH-SE с помощью мутагенеза *en-passant*, используя систему рекомбинации RED, сначала получая pRacH-SE-1/3-p430-H1hu. Используя этот модифицированный ВАС в качестве мишени, p455-H1pdm-71 встраивали с помощью мутагенеза *en-passant*, используя систему рекомбинации RED, получая pRacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm. pRacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm трансфектировали в PK/WRL клетки и гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm высвобождали и три раза очищали помощью бляшек. Коротким обозначением для нового рекомбинантного векторного вируса является гEHV-1 RacH-SE\_D (фиг. 23).

Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали путем непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА, не показано) и Вестерн-блоттинга, используя коммерчески доступные моноклональные и поликлональные антитела (фиг. 24). Восстановление *orf71*, кодирующей EHV-1 gpII, подтверждали с помощью ИФА (не показано) и вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело

Ai2G7 (принадлежащее В1), (фиг. 24).

Генетические и фенотипические стабильности рекомбинантного гЕНV-1 были продемонстрированы путем пассивирования в клеточной культуре, определяя титры вируса каждые 5 пассажей. Последовательности участков инсерции подтверждали каждые десять пассажей а также экспрессию трансгена с помощью вестерн-блоттинга (не показано). Точность экспрессии оценивали с помощью двойного ИФА бляшек под верхним шаром метилцеллюлозы, подсчитывая бляшки, окрашенные с помощью анти-ЕНV-антител и трансген-специфических антител (не показано).

Для исследования ее свойств в качестве векторной вакцины у молодых поросят, тетравалентную вакцину IAV свиней, состоящую из гЕНV-1 RacH-SE\_B и гЕНV-1 RacH-SE\_D, тестировали в исследовании вакцинация-заражение. Более подробно, поросят с материнским иммунитетом к IAV свиней (положительные по материнским антителам) вакцинировали два раза с применением гЕНV-1 RacH-SE\_B и гЕНV-1 RacH-SE\_D в дозе  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> на вакцинный штамм внутримышечно в возрасте одна и четыре недели (двукратная вакцинация,  $2 \times$  ENV-1) или только в возрасте четыре недели (однократная вакцинация,  $1 \times$  ENV-1). Невакцинированная группа служила в качестве отрицательного контроля. В возрасте 11 недель, всех животных, за исключением отрицательного контроля, заражали интратрахеально применяемой дозой  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> H3N2 штаммом IAV свиней для заражения (Европейский изолят полевого вируса R452-14, H3 которого является гетерологичным H3 вакцинного антигена, используемого в гЕНV-1 RacH-SE\_B). Невакцинированные и незараженные животные служили в качестве отрицательного контроля, в то время как невакцинированные, но зараженные животные, служили в качестве контроля заражения. При вакцинации и после вакцинации, а также перед и после заражения, измеряли температуру тела и отбирали образцы крови в различные моменты времени. Через один день после заражения, половину животных в группе убивали и легкие оценивали относительно наличия поражений, типичных для IAV инфекции свиней, три образца легких левого и правого легкого отбирали у каждого животного, соответственно, для определения инфекционных титров IAV свиней в гомогенатах легких, и брали образцы бронхоальвеолярного смыва (BALF). Аналогичную процедуру осуществляли с оставшейся половиной животных на группу через три дня после заражения. Материал образца и собранные данные анализировали для определения, в частности, изменений температуры тела после заражения, клинических симптомов после инфицирования IAV свиней, оценки легких, титров свиного IAV в легких, гистологических изменений в ткани легкого, титров сывороточной нейтрализации IAV свиней, уровня цитокинов в BALF, повторной стимуляции PBMC, что измеряли с помощью IFN $\gamma$ -ELISpot, и активации В-клеток.

Пример 8.

Индукция ответа нейтрализующих антител против двух антиген у мышей, вакцинированных с применением бивалентной векторной вакцины на основании гЕНV-1 RacH гЕНV-1 RacH SE\_B (гЕНV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-7-p455-H3 см. фиг. 14) использовали для иммунизации мышей Balb/c для того, чтобы продемонстрировать, что экспрессируемые трансгены являются иммуногенными в других видах, отличающихся от свиней, и что нейтрализующие антитела индуцировались против одного из двух антигенов путем интраназального применения.

Более подробно, три группы из пяти мышей Balb/c на группу, в возрасте 3-5 недель, интраназально инокулировали в дни исследования 0 и 21 либо 40 мкл гЕНV-1 RacH SE\_B (гЕНV-1 RacH-SE-1/3-430-H1av-7-455-H3, группа 1), или 40 мкл пустого вектора (гЕНV-1 RacH-SE, группа 2, векторный контроль), или 40 мкл среды для культуры ткани (группа 3 отрицательный контроль), соответственно. Для групп 1 и 2, дозирование рекомбинантного ENV-1 составляли  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/40 мкл, соответственно. У мышей брали образцы крови в дни исследования 0 (перед 1-ой инокуляцией), 7, 14, 21 (перед 2-ой инокуляцией), 28, и 35. Сыворотку приготавливали из образцов крови и хранили замороженной при -80°C.

Имунофлуоресцентный анализ для обнаружения антител к векторному вирусу.

AI-ST клетки инфицировали при множественности заражения (MOI) 0,001 с помощью гЕНV-1 RacH-SE1212, вирус освобождали из пустого вектора BAC pRacH-SE1.2. Через 24 ч п.и. наблюдали четкие бляшки и клетки обрабатывали для непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА). Тестировали сыворотки со всех трех групп конечного забора крови (полученных через 14 дней после второй вакцинации), разведенные 1:50 в PBS. В качестве положительного контроля, использовали сыворотку вакцинированной ENV-1 лошади в разведении 1:500. Вторичными антителами были коммерчески доступный FITC-конъюгированный кроличий анти-мышинный IgG для сывороток мышей и Cy5-конъюгированный козий анти-лошадиный IgG для сыворотки лошадей и использовали при разведении 1:200. Связывание антител оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. У всех вакцинированных мышей развивались антитела, реактивные в ИФА с клетками, инфицированными гЕНV-1 RacH-SE. Неинфицированные клетки не связывались с любой из тестируемых сывороток. Сыворотки из отрицательной контрольной группы мышей не проявляли никакого специфического связывания ни с инфицированными, ни с неинфицированными клетками. Данные обобщены в таблице ниже.

Таблица 3

## Результаты флуоресцентной микроскопии ИФА для анти-EHV-1 антител

| Обработка                            | Номер мыши               | Идент. номер эксперимента | Разведение | Неинфицированные клетки | Инфицированные клетки |
|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|------------|-------------------------|-----------------------|
| Группа 3<br>(Отрицательный контроль) | 1                        | 1                         | 1:50       | отриц.                  | отриц.                |
|                                      | 2                        | 2                         | 1:50       | отриц.                  | отриц.                |
|                                      | 3                        | 3                         | 1:50       | отриц.                  | отриц.                |
|                                      | 4                        | 4                         | 1:50       | отриц.                  | отриц.                |
|                                      | 5                        | 5                         | 1:50       | отриц.                  | отриц.                |
| Группа 2<br>(Пустой вектор)          | 1                        | 6                         | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
|                                      | 2                        | 7                         | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
|                                      | 3                        | 8                         | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
|                                      | 4                        | 9                         | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
|                                      | 5                        | 10                        | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
| Группа 1<br>(гEHV-1<br>RacH SE B)    | 1                        | 11                        | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
|                                      | 2                        | 12                        | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
|                                      | 3                        | 13                        | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
|                                      | 4                        | 14                        | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
|                                      | 5                        | 15                        | 1:50       | отриц.                  | полож.                |
| <b>Контроль-ное антитело</b>         | <b>Специфические для</b> |                           |            |                         |                       |
| Лошадиная сыворотка                  | EHV-1                    | 22                        | 1:500      | отриц.                  | полож.                |
| <b>Вторичные антитела</b>            | <b>Специфические для</b> |                           |            |                         |                       |
| FITC- козье анти-                    | мышей                    | 23                        | 1:200      | отриц.                  | отриц.                |
| Су5 козье анти-                      | лошади                   | 24                        | 1:200      | отриц.                  | отриц.                |

Из этого можно сделать вывод о том, что инокуляция гEHV-1 в ноздри мышей приводит к инфицированию и репликации вируса, таким образом, что иммунные системы мышей были стимулированы для продукции антител к EHV-1.

Тесты на нейтрализацию вируса (VNT).

Для того чтобы показать индукцию защитного иммунитета против экспрессированных трансгенов, имеющих происхождение либо из вируса гриппа А (IAV) (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)) или (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), сыворотки мышей тестировали относительно нейтрализации активности против соответствующих вирусов (Allwin и др. 2010; Trombetta и др. 2014). IAV, который использовался для тестов нейтрализации, представлял собой изоляты, полученные от свиней в Германии с 2014 г., специфически A/swine/Germany/AR452/2014 (H3N2) и A/swine/Germany/AR1181/2014 (H1N1). Поскольку они являются гетерологичными по отношению к штаммам, из которых имеют происхождение исследуемые вакцины, то любая нейтрализация этих вирусов мышиными сыворотками будет указывать на широкую и эффективную индукцию защитного иммунитета путем вакцинации гEHV-1.

В качестве сыворотки отрицательного контроля, использовали сыворотку свиньи, которая была продемонстрирована как отрицательная относительно антител к вирусу гриппа.

Тесты на нейтрализацию вируса гриппа А.

Клетки MDCK для нейтрализации вируса, а также обратное титрование в планшетах на 96 лунок инкубировали в течение двух дней при 37°C/5% CO<sub>2</sub> перед использованием. Соответствующие IAV запасы H3N2 и H1avN1 размораживали на льду и разводили в MEM, содержащей гентамицин и двойную концентрацию трипсина (MEM/Genta/2× трипсин).

Исследуемые сыворотки получали из последнего забора крови группы 1 (гEHV-1 RacH SE B), группы 2 (пустой вектор), положительный контроль (сыворотка от свиньи, вакцинированной инактивированной мультивалентной IAV вакциной, и отрицательный контроль).

Сыворотки инактивировали нагреванием и в двух и трех независимых экспериментах, соответственно, серийно разводили 1:2, начиная с 1:16 вплоть до 1:4096. IAV разводили приблизительно до 100 TCID<sub>50</sub>/реакционная смесь для реакции нейтрализации. Реакционные смеси для реакции нейтрализации инкубировали в течение 2 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Обратное титрование используемого вируса осуществляли в четырехкратном повторе. Ростовую среду удаляли и MDCK-клетки промывали средой, содержащей

гентамицин и трипсин перед добавлением реакционных смесей для реакции нейтрализации или разведений вирусов обратных титрований. VNT и планшеты для титрования инкубировали при 37°C /5% CO<sub>2</sub> в течение 1 ч после добавления реакционной смеси для реакции нейтрализации или разведений вируса к MDCK-клеткам, соответственно. После этого инокуляты удаляли и на клетки наносили свежую среду, содержащую гентамицин и трипсин. Через пять дней п.и. мониторили и документировали CPE. Фактически используемый титр вируса в анализе был рассчитан как TCID<sub>50</sub>/мл в соответствии с Reed и Munch, и разведения, при которых тестируемые сыворотки предотвращали индукцию типичного для вируса группа CPE, были зарегистрированы, см. таблицы ниже.

Таблица 4

## Результаты VNT вируса гриппа H1avN1

| H1avN1                       | VNT#1                                 |             | VNT#2                                 |             | VNT#3                                 |             | Среднее значение способности к нейтрализации | SD (среднеквадратическое отклонение) |
|------------------------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|--|--------------------------------------|
|                              | 146 TCID <sub>50</sub> /лунку         | способность | 32 TCID <sub>50</sub> /лунку          | способность | 181 TCID <sub>50</sub> /лунку         | способность |  |                                      |
| мышинный                     | Реципрокное нейтрализующее разведение |             | Реципрокное нейтрализующее разведение |             | Реципрокное нейтрализующее разведение |             |  |                                      |
| rEHV-1<br>RacH SE B<br>-1    | 32                                    | 4672        | 128                                   | 4096        | 32                                    | 5792        | 4853   | 862                                  |
| rEHV-1<br>RacH SE B<br>-2    | 16                                    | 2336        | 64                                    | 2048        | отриц.                                |             | 2192   | 204                                  |
| rEHV-1<br>RacH SE B<br>-3    | 32                                    | 4672        | 128                                   | 4096        | 16                                    | 2896        | 3888   | 906                                  |
| rEHV-1<br>RacH SE B<br>-4    | 128                                   | 18688       | 512                                   | 16384       | 64                                    | 11584       | 15552  | 3624                                 |
| rEHV-1<br>RacH SE B<br>-5    | 32                                    | 4672        | 256                                   | 8192        | 16                                    | 2896        | 5253   | 2695                                 |
| Пустой вектор-1              | н.о.                                  | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | н.д.   | н.д.                                 |
| Пустой вектор-2              | н.о.                                  | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | н.д.   | н.д.                                 |
| Пустой вектор-3              | н.о.                                  | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | н.д.   | н.д.                                 |
| Пустой вектор-4              | отриц.                                | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | н.д.   | н.д.                                 |
| Пустой вектор-5              | н.о.                                  | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | отриц.                                | н.д.        | н.д.   | н.д.                                 |
| Сыворотка свиной пол. контр. | 32                                    | н.д.        | н.д.                                  | н.д.        | н.д.                                  | н.д.        | н.д.   | н.д.                                 |

Таблица 5

## Результаты VNT вируса гриппа H3N2

| H3N2                      | VNT#1                                 |             | VNT#2                                 |             | VNT#3                                 |             | Среднее значение способности к нейтрализации | SD (среднеквадратическое отклонение) |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|--|--------------------------------------|
|                           | 16 TCID <sub>50</sub> /лунку          | способность | 24 TCID <sub>50</sub> /лунку          | способность | 15 TCID <sub>50</sub> /лунку          | способность |  |                                      |
| мышинный                  | Реципрокное нейтрализующее разведение |             | Реципрокное нейтрализующее разведение |             | Реципрокное нейтрализующее разведение |             |  |                                      |
| rEHV-1<br>RacH SE<br>B -1 | 4096                                  | 65536       | 1024                                  | 24576       | 2048                                  | 30720       | 40277  | 22089                                |
| rEHV-1<br>RacH SE<br>B -2 | 1024                                  | 16384       | 512                                   | 12288       | 128                                   | 1920        | 10197  | 7455                                 |

|                           |        |       |        |       |        |      |       |      |
|---------------------------|--------|-------|--------|-------|--------|------|-------|------|
| гEHV-1<br>RacH SE<br>B -3 | 1024   | 16384 | 512    | 12288 | 256    | 3840 | 10837 | 6397 |
| гEHV-1<br>RacH SE<br>B -4 | 256    | 4096  | 256    | 6144  | 64     | 960  | 3733  | 2611 |
| гEHV-1<br>RacH SE<br>B -5 | 256    | 4096  | 128    | 3072  | 64     | 960  | 2709  | 1599 |
| Пустой<br>вектор-1        | отриц. | н.д.  | отриц. | н.д.  | отриц. | н.д. | н.д.  | н.д. |
| Пустой<br>вектор-2        | отриц. | н.д.  | отриц. | н.д.  | отриц. | н.д. | н.д.  | н.д. |
| Пустой<br>вектор-3        | отриц. | н.д.  | отриц. | н.д.  | отриц. | н.д. | н.д.  | н.д. |

Для сравнения результатов независимых тестов нейтрализующую способность рассчитывали путем умножения реципрокного разведения сыворотки на соответствующий титр, который был нейтрализован ей же. Затем средние значения трех тестов делили на 100 для отображения нейтрализацией 100 TCID<sub>50</sub> (Таблицы 3, 4, и 5). Данные обобщены и представлены графически на фиг. 25.

Все мыши, вакцинированные с помощью гEHV-1 RacH SE B, развивали нейтрализующие антитела против соответствующих IAV, гетерологичных штаммов подтипов H3N2 и H1avN1. Таким образом, двукратное интраназальное применение гEHV-1 RacH-SE, которые экспрессируют гемагглютинины IAV из *orf70* сайта инсерции под контролем *p455* промотора (H3) и параллельно из *orf1/3* сайта инсерции под контролем *p430* промотора (H1av), успешно стимулировали защитный иммунный ответ у мышей BALB/c.

Можно сделать вывод о том, что вектор гEHV-1 RacH-SE можно использовать для параллельной экспрессии двух различных трансгенов для стимуляции иммунного ответа после интраназальной вакцинации.

#### Пример 9.

Создание. Характеристика IN VITRO и тестирование IN VIVO вакцины против вируса Шмалленберга (SBV) на основании вектора EHV-1 для крупного рогатого скота.

Одним из перспективных буньявирусов является вирус Шмалленберга (SBV), первый европейский вирус серогруппы Симбу (Simbu) (род Orthobunyavirus), который может вызывать аборт, мертворождение и тяжелые внутриутробные пороки развития, если беременные животные инфицируются в критической фазе гестации и поэтому на настоящий момент он все больше и больше используется в качестве модельного вируса для исследования ортобуньявирусов (Bilk и др., 2012). Поскольку вирусы Симбу передаются векторами насекомых и возможности лечения недоступны, основным компонентом борьбы с заболеванием является вакцинация. Против SBV и других вирусов Симбу, таких как вирус Akabane (AKAV) или вирус Aino, доступны инактивированные цельновирусные вакцины и живые аттенуированные вакцины против SBV (Anonymous, 2013, 2015; Kraatz и др., 2015; Wernike и др., 2013b), однако, ни одна из этих вакцин не предоставляет возможности дифференциации между инфицированными полевыми и вакцинированными животными (DIVA принцип). Только недавно, тестировались DIVA-субъединичные вакцины на основании 234 аминокислот (ак) из амино-конца SBV гликопротеина Gc, на летальной модели заражения мелких животных и у крупного рогатого скота (Wernike и др., 2017). При доставке в качестве экспрессионных плазмид или экспрессии в системе культивирования клеток млекопитающих, Gc домен обеспечивает защиту вплоть до 66% животных, в то время как все животные, иммунизированные с применением Gc домена SBV, связанного с соответствующим доменом родственного AKAV, являются полностью защищенными (Wernike и др., 2017). Для исследования применения гEHV-1 RacH-SE в качестве векторной вакцины у крупного рогатого скота, 234 аминокислотные ак SBV-Gc встраивали в *orf70* (US4) сайт инсерции и экспрессировали под контролем нового *p455* промотора и 71pA poly A сигнала и тестировали в исследовании вакцинация-заражения у крупного рогатого скота.

Создание рекомбинантного EHV-1, экспрессирующего антиген, имеющий происхождение из гликопротеина с (Gc) вируса Шмалленберга (SBV).

Часть из 234 аминокислот кодирующего участка из гликопротеина с (Gc) вируса Шмалленберга (SBV) оптимизировали для частоты использования кодона для экспрессии в EHV-1 и дополнительно модифицировали для обеспечения эффективного транспорта и инсерции в плазматические мембраны инфицированных клеток. Для этого, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, имеющий происхождение из подтипа H1N2 гемагглютинина (HA) вируса гриппа А (IAV) (A/swine/Italy/116114/2010 (H1N2), номер доступа GenBank. ADR01746.1) а также трансмембранный якорь (TM) и цитоплазматический С-конец из такого HA, присоединяли на 5' и 3' концы, соответственно. Дополнительно, GS линкер NMGGSGGGSGGGSGGGT (SEQ ID NO: 30) инсертировали между Gc частью и HA-TM-доменом. Синтезировали ДНК (SEQ ID NO: 31) и субклонировали в NotI/KpnI сайты pU70-455-71K71, трансферный вектор для инсерции экспрессионных кассет трансгена в *orf70* (US4) из EHV-1 с помощью RED-опосредованной рекомбинации BAC pRacH-SE. Полученную плазмиду pU70-455-SBVGc\_71K71 (фиг. 26) разрезали с помощью XbaI для высвобождения ДНК фрагмента 3056 по (SEQ ID NO: 32), который

трансформировали в E.coli K12 GS1783, несущий pRacH-SE.

SEQ ID NO: 31: Синтезированная ДНК последовательность, включая сайты рестрикции для субклонирования

GCGGCCGCATGAAGGCGATCCTGGTTGTGCTGCTGTACACSTTTGCCAC  
CGCCAACGCCGATACGCTGATCAACTGCAAGAACATCCAGAGCACCCAGCT  
GACAATCGAGCACCTGAGCAAGTGCATGGCCTTCTACCAGAACAAGACCAG  
CAGCCCCGTCGTGATCAACGAGATCATCTCCGACGCCAGCGTGGACGAACA  
GGAAGTGAATTAAGTCTCTGAACCTGAACTGCAACGTGATCGACCGGTTTCATC  
AGCGAGTCCAGCGTGTGATCGAGACACAGGTGTACTACGAGTATATCAAGAGC  
CAGCTGTGTCCACTGCAAGTGCACGATATCTTACCATCAACAGCGCCAGCA  
ACATCCAGTGGAAGGCCCTGGCCCCGAGCTTTACCCTGGGCGTGTGCAACAC  
CAACCCCCACAAGCACATCTGCCGGTGCCTGGAATCCATGCAGATGTGTACC  
AGCACCAAGACCCGACCACGCCAGAGAGATGAGCATCTACTACGACGGCCAC  
CCCGACAGATTCGAGCACGACATGAAGATTATCCTGAATATCATGCGGTACA  
TCGTGCCCGGCCCTGGGCAGAGTGTGCTGGACCAGATCAAGCAGACCAAGG  
ACTACCAGGCCCTGAGACACATCCAGGGCAAGCTGAGCCCCAAGTCCCAGA  
GCAACCTGCAGCTGAAGGGCTTCTGGAATTCGTGGACTTCATCCTGGGCGC  
CAACGTGACCATTGAGAAAACCCCCAGACCCTGACCACCCTGAGCCTGATT  
CATATGGGAGGTTCCGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGT  
GGCACCATACTGGCCATTTACAGCACAGTTGCGAGCAGCCTGGTCCTGATCG  
TGAGCCTGGGTGCTATATCATTCTGGATGTGCAGCAACGGCTCTCTCCAGTG  
CCGCATCTGTATCTGAGGTACC

SEQ ID NO: 32: ДНК фрагмент, используемый для RED рекомбинации, для создания pRacH-SE-70-455-SBVGc.

Положения расщепления рестрикционным ферментом обозначены звездочкой (\*).

T\*CTAGACTCGAGCGCAAGCCCTACACGCGCTACCCCTGCTTTCAACGC  
GTCAACCTGCACATTGACGGGGAGTTTCTGGTTCACAAGATGCTAGCGTTCA  
ATGCCGCGATGCGCCATCGGCCGAGGAGCTGCTGTCATACCCAATGTTTGC  
TCAACTTTAGGATGACTAACCTGTTTCTGGGAGGAGACAGCGTGGGCGACGG  
TGTATAAAGTTGGTCTGCTTTCAAGCCCTGCCACTGCGCTACAGTGCCACCA  
ACTGTAAAGCGGTAGTAAGCTGCAGTGGTGCAGTGGTGGTAGCATATACTAC  
CTTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTCAGCATGCTAGCACCCAACGCCGAGC  
GAGAGTATATAACTCCCATCATTGCCACAAGCTTATGCCACTTATTAGCGT  
CCGCTCTGCCGTTTGCTTAGTCATAATATCTACCGCCGTTACGCAGCAGACG  
CTATCTGCGACACAATTGGATTTGCGATACCGCGCATGTGGATGTGTATTTT  
AATGAGATCAACCTCCATGAAGCGTAACTAGGGGGCCTCCCACTGAGGCACT  
ACCGGCTTAGCAGCTGACTAACACAGTATAAAACGTGAGAAGAAATCAGTC  
TCATGCGCCATTAGCGCTAGGCTAGTTAGCGTGGAGGACCGGAGCGCTACCG  
CCAGCAGTTTCATCCGCCTGGTTACGGGTTTGTTAACACCTACCGGTGTTTTA  
CCGCTACCATAGGATCCGATCCATGGGCGGCCGCATGAAGGCGATCCTGGTT  
GTGCTGCTGTACACCTTTGCCACCGCCAACGCCGATACGCTGATCAACTGCA  
AGAACATCCAGAGCACCCAGCTGACAATCGAGCACCTGAGCAAGTGCATGG  
CCTTCTACCAGAACAAGACCAGCAGCCCCGTCGTGATCAACGAGATCATCTC  
CGACGCCAGCGTGGACGAACAGGAAGTATTAAGTCTCTGAACCTGAACTG  
CAACGTGATCGACCGGTTTCATCAGCGAGTCCAGCGTATCGAGACACAGGT  
GTACTACGAGTATATCAAGAGCCAGCTGTGTCCACTGCAAGTGCACGATATC  
TTCACCATCAACAGCGCCAGCAACATCCAGTGGAAAGGCCCTGGCCCCGAGCT  
TTACCCTGGGCGTGTGCAACACCAACCCCCACAAGCACATCTGCCGGTGCCT  
GGAATCCATGCAGATGTGTACCAGCACCAAGACCGACCACGCCAGAGAGAT  
GAGCATCTACTACGACGGCCACCCGACAGATTCGAGCACGACATGAAGAT  
TATCCTGAATATCATGCGGTACATCGTGCCCGGCCTGGGCAGAGTGCTGCTG  
GACCAGATCAAGCAGACCAAGGACTACCAGGCCCTGAGACACATCCAGGGC  
AAGCTGAGCCCCAAGTCCCAGAGCAACCTGCAGCTGAAGGGCTTCTGGAA  
TTCGTGGACTTCATCCTGGGCGCCAACGTGACCATTGAGAAAACCCCCAGA  
CCCTGACCACCCTGAGCCTGATTCATATGGGAGGTTCCGGAGGTGGAGGTTT

CGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCACCATACTGGCCATTTACAGCACAGTT  
 GCGAGCAGCCTGGTCCGTGATCGTGAGCCTGGGTGCTATATCATTCTGGATGT  
 GCAGCAACGGCTCTCTCCAGTGCCGCATCTGTATCTGAGGTACCAATAAACG  
 CGGTATGTCTACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTTGGTGTTCGCGGCT  
 ATTATAACGCTCTTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAATTACA  
 GGCGTGTGGTTCGGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATCGATTTATTCAACAA  
 AGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATA  
 TATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGG  
 TGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGCCGCGATTAAAT  
 TCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCCG  
 GGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAG  
 AGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGA  
 GATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAG  
 CATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCCGG  
 GAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATT  
 GTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTGCATTTCGATTCCTGTTTGTA  
 TTGTCCTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCGCTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAA  
 TGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTG  
 GCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCG  
 GATTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGA  
 GGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCG  
 ATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCAT  
 TACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAA  
 ATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAAATAAACGCGGTATGT  
 CTACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTTGGTGTTCGCGCTATTATAAC  
 GCTCTTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAATTACAGGCGTGTG  
 GTTCGGGATCCGACCCTGTTGGTGGGTGCGGTTGGACTCAGAATCTTGCGCG  
 AGGCATGGAAGTTTGTGCGGTGACGAAACATACGACACCATCCGCGCAGAAG  
 CAAAGAATTTAGAGACCCACGTACCCTCAAGTGTGCAGAGTCGT\*CTAGA

Приготавливали рекомбинантную ДНК pRacH-SE-70-455-SBVGc и правильную инсерцию экспрессионной кассеты и идентичность последовательностей подтверждали путем ПЦР с высокой точностью, используя Herculanase™ и Sanger секвенирования ПЦР продуктов. Относительно используемых праймеров см. табл. 6, SEQ ID NO: 33 - SEQ ID NO: 37.

Таблица 6

## Праймеры, используемые для ПЦР и секвенирования

| №            | название  | последовательность        | применение           |
|--------------|-----------|---------------------------|----------------------|
| SEQ ID NO:33 | up70_F    | 5'-CGTGCGCGGATACATCG-3'   | ПЦР и секвенирование |
| SEQ ID NO:34 | up71_R    | 5'-CGCTTCGCAGGTGGGC-3'    | ПЦР и секвенирование |
| SEQ ID NO:35 | seq455-F1 | 5'-GACTGGTGGTAGCATATAC-3' | секвенирование       |
| SEQ ID NO:36 | SBV Gc F1 | 5'-GATCAACGAGATCATCTCC-3' | секвенирование       |
| SEQ ID NO:37 | SBV Gc R1 | 5'-CTGGAGAGAGCCGTTGC-3'   | секвенирование       |

Высвобождение и характеристика рекомбинантного EHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc  
 ДНК ВАС приготавливали из четырех различных клонов pRacH-SE-70-455-SBVGc. AI-ST клетки (клеточная линия яичек свиней, являющаяся собственностью Boehringer-Ingelheim) высевали в планшеты на 6 лунок (Corning Incorporated - Life Sciences, One Becton Circle, Durham, NC 27712, USA; REF 353046)

при плотности  $10^5$  клеток/лунку в MEM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, SAFC62892-1000M3056), содержащей 10% FBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, SAFC, Cat 12003C-1000 ml). Когда клетки достигали 60-70% слияния, обычно на следующий день, их трансфектировали с помощью 2 мг ДНК ВАС, используя Mirus™ набор для мРНК трансфекции (Mirus Bio LLC, 545 Science Drive, Madison, WI 53711 USA) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 200 мл среды Optimem™ (Thermo Fisher Scientific) добавляли в полистироловые пробирки объемом 5 мл. ДНК добавляли и смешивали. Затем добавляли 3 мл реагента Boost и смешивали путем вращения с последующим добавлением аналогичного объема реагента для трансфекции и снова смешивали путем вращения. Смеси инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре и затем по каплям добавляли непосредственно в клеточные культуры. Клетки инкубировали при 37°C/5%CO<sub>2</sub> в течение пяти дней. Клетки промывали в среде и собирали для хранения при -80°C.

Приготавливали серийные разведения 1:10 высвобожденных вирусов в MEM и высевали на слитые монослои клеток AI-ST в планшеты на 6 лунок. После адсорбции в течение 1 ч при 37°C/5%CO<sub>2</sub>, инокуляты удаляли и клетки покрывали полутвердой средой, содержащей 0,5% Methocel (метилцеллюлоза Европейской фармакопеи, Fluka 64632-500G) и 5% FBS (MEM-Methocel). После инкубирования при 37°C/5%CO<sub>2</sub> в течение двух-трех дней (пассаж 1), индивидуальные пятна, расположенные настолько удаленно от соседних пятен, насколько это возможно, отсасывали в объеме 10 мл и инокулировали в новых AI-ST клеточных культурах в планшетах на 6-лунок. Инфицированные клетки инкубировали в течение двух-трех дней до тех пор, пока не наблюдали массивное СРЕ (пассаж 2). Клетки промывали в среде и собирали для хранения при -80°C. Эту процедуру очистки пятен повторяли два раза. AI-ST клетки, инфицированные три раза вирусами, очищенными от пятен, процессировали для анализа методом непрямой иммунофлуоресценции (IFA) или Вестерн-блоттинга, соответственно.

Вирусную ДНК, приготовленную из инфицированных клеток, использовали в качестве матрица для ПЦР с высокой точностью, используя HerculaSe™. Полученные ПЦР-продукты анализировали с помощью Sanger секвенирования и подтверждали идентичность участка инсерции с теоретической последовательностью и последовательностью соответствующего ПЦР-продукта ВАС.

Непрямой иммунофлуоресцентный анализ.

AI-ST клетки в планшетах на 24 лунки (Corning Incorporated - Life Sciences, One Becton Circle, Durham, NC 27712, USA; REF 353047) инфицировали с применением три раза очищенного с помощью бляшек вируса, серийно разведенного в MEM. Из ростовой среды клетки отсасывали и клетки покрывали 250 мкл разведенного вируса (разведения от  $10^{-2}$  до  $10^{-7}$ ). Клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C/5%CO<sub>2</sub> для адсорбции вируса, после этого инокулят удаляли и клетки покрывали 1000 мкл MEM-Methocel/лунку и инкубировали при 37°C/5%CO<sub>2</sub> в течение двух дней. Когда образование бляшек наблюдали микроскопически, клетки обрабатывали для ИФА. Среду отсасывали и клетки промывали один раз с помощью 1 мл PBS (Gibco Life Technologies, Paisley PA49RF, UK, DPBS (1×) REF 14190-136) /лунку. PBS удаляли и клетки фиксировали путем добавления 1 мл/лунку - 20°C холодного этанола (Carl Roth GmbH, Schoemperlenstr. 3-5, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 5054.1) и инкубировали в течение 30 мин при КТ. Этанол отсасывали и клетки высушивали на воздухе. После регидратации клеток с помощью 1 мл/лунку PBS в течение 10 мин при КТ, добавляли первичные антитела, разведенные в PBS (150 мл/лунку) и инкубировали в течение 1 ч при КТ. Первичные антитела удаляли и клетки промывали три раза в течение 2 мин с применением 1 мл PBS/лунку перед добавлением разведений вторичного антитела (150 мл/лунку). После инкубирования в течение 1 ч при КТ в защищенном от света месте, разведения вторичных антител удаляли и клетки три раза промывали в течение 2 мин с помощью 1 мл PBS/лунку и в завершение покрывали 500 мл PBS/лунку для анализа путем флуоресцентной микроскопии. Применяемые антитела перечислены в табл. 7.

Таблица 7

| Антитело   | разведение |
|--|------------|
| Лошадиная анти-EHV-1 гипериммунная сыворотка (собственность Boehringer Ingelheim Veterinary Research Centre) | 1:400      |
| Анти SBV-Gc моноклональное антитело (Wernike и др., 2015a)   | 1:50       |
| FITC- конъюгированный козий анти-мышинный IgG Jackson Immuno Research кат. № 115-095-003                     | 1:200      |
| Cy <sup>TM</sup> 5- конъюгированный козий анти-лошадиный IgG Jackson Immuno Research кат. № 108-175-003      | 1:200      |

Вестерн-блоттинг.

1. Инфицирование: три лунки каждой из слившихся монослоев AI-ST клеток в планшетах на 6 лунок инфицировали при множественности заражения приблизительно 1 с помощью двух различных изолятов бляшек гEHV-1 RacH-SE-455-SBVGc (#121.131 P6 и #121.232 P6) и изолята бляшек гEHV-1 RacH-SE1212 P9 (освобожденного от родительского пустого ВАС pRacH-SE1.2) путем прямого добавления 50 мл и 10 мл, соответственно, размороженных запасов вирусу в ростовую среду. Три лунки оставались неинфицированными. Инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали в течение двух дней и

затем обрабатывали для Вестерн-блоттинга.

2. Приготовление лизатов: RIPA буфер, дополненный коктейлем ингибитора протеазы (RIPA+PI), приготавливали следующим образом: 0,7 мл 10× RIPA лизирующего буфера Millipore кат. №20-188 добавляли к 6,3 мл H<sub>2</sub>O, Fisher Scientific кат. № BP2470-1, и 1 таблетку Complete™ Mini Protease коктейля ингибиторов (Roche кат. №11 836 153 001) растворяли в 7 мл 1×RIPA буфера. Неинфицированные контроли соскабливали в среду и суспензии из лунок в трех повторах объединяли в центрифужных пробирках объемом 15 мл и помещали на лед. Инфицированные клетки отмывали от среды и суспензии из лунок в трех повторах объединяли в центрифужных пробирках объемом 15 мл и помещали на лед. Клетки осаждали путем центрифугирования при 1000×g 4°C в течение 5 мин. Супернатанты осторожно аспирировали и осадок клеток после центрифугирования ресуспендировали в RIPA +PI (Неинфицированные клетки в 300 мл, инфицированные клетки в 150 мл). Суспензии инкубировали на льду в течение 30 мин и встряхивали каждые 10 мин. Суспензии переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и нерастворенный материал осаждали путем центрифугирования при 15000 об./мин, 4°C, в течение 10 мин в микроцентрифуге. Прозрачные супернатанты переносили в новые микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и хранили при -80°C до использования.

3. SDS-PAGE и перенос на нейлоновые мембраны: материалы: BioRad Criterion TGX Stain Free Pre-cast Gels, 4-20%, 26 well кат. № 567-8095; Bio Rad Precision Plus Dual Colour Marker, кат. №161-0374; Bio Rad Precision Plus All Blue Marker, кат. № 161-0373; Bio Rad Trans Blot Turbo набор для переноса, Midi format кат. № 170-4159; Bio Rad 4x Laemmli Sample Buffer (Cat no. 161-0747) (Bio Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 München); TGS буфер для прогона (Sambrook и др.), блокирующий раствор 1: 5% FBS в PBST (Sambrook и др.); PBST.

Образцы приготавливали без добавления восстановителя. Образцы размораживали на льду и смешивали с 1 объемом 4x буфера Laemmli, кипятили в течение 6 мин при 96°C, и выдерживали при КТ до загрузки на гель. Гель прогоняли в течение 30 мин при 230 мА и затем собирали для электроблоттинга, используя систему BioRad Trans Blot Turbo. Перенос устанавливали на 2,5 А 25 В 10 мин. Мембрану промывали в стерильной дистиллированной H<sub>2</sub>O и инкубировали с 25 мл блокирующего раствора 5% FBS в PBST в течение 30 мин при 4°C.

Инкубирование и обнаружение антител.

Материалы: Immun-Star WesternC Chemiluminescent Kit (Bio Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 München) кат. №170-5070 первичные антитела:

А: моноклональное антитело, специфическое к SBV-Gc-белку (Wernike и др., 2015a) 1:20 В: мышечное моноклональное антитело Ai2G7 к EHV-1 gpII (собственность Boehringer Ingelheim) Вторичное антитело: Конъюгированное с пероксидазой козье анти-мышечное, (Jackson Immune Research №115-035-146) 1:5000.

Все инкубации осуществляли в достаточном объеме при постоянном перемешивании. Антитела разводили в 5%FBS/TBST. Первичные антитела инкубировали в течение ночи при 4°C. Раствор антител удаляли и блоты промывали три раза с помощью TBST в течение 5-10 мин. Разведенное вторичное антитело инкубировали с блотами в течение 1 ч при КТ, удаляли и блоты промывали три раза с помощью TBST в течение 5-10 мин. Блоты помещали на прозрачный пластиковый защитный лист. Растворы пероксида и Люмино/Энхансера смешивали 1 мл +1 мл (всего 2 мл для каждого блота), пипетировали на блоты и инкубировали в течение 3-5 мин. После этого мембраны помещали в систему для визуализации Chemi-DocXRS (Bio Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 München) и сигналы записывали, используя программное обеспечение Image Lab.

Титрования вируса.

AI-ST клетки высевали в планшеты на 96 лунок (Corning Incorporated -Life Sciences, One Becton Circle, Durham, NC 27712, USA; REF 353072) в количестве 2×10<sup>4</sup> клеток/лунку в MEM, дополненной 10% FBS за один день до инфицирования. Запасы вирусов быстро размораживали и помещали на лед. Приготавливали десять серийных разведений 1:10 в MEM в объеме 1,2 мл на разведение. Разведения вирусов в количестве 100 мл/лунку добавляли к клеткам, 8 лунок в одном вертикальном ряду на разведение. Вертикальные ряды 11 и 12 каждого планшета служили в качестве контрольной среды путем добавления 100 мл/лунку MEM. Титрования осуществляли в трех повторах и клетки инкубировали в течение 5 дней при 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Клеточные культуры анализировали микроскопически и записывали лунки, в которых наблюдали EHV-1 RasH типичный CPE. Титры рассчитывали в виде TCID<sub>50</sub>/мл согласно методу Reed и Muench (1938).

Характеристика рекомбинантного EHV-1, используемого для вакцинации.

Экспрессия модифицированного SBV Gc234 в инфицированных клетках показана с помощью вестерн-блоттинга и двойного иммунофлуоресцентного анализа (DIFA) для изолята бляшек гEHV-1 RasH-SE-70-455-SBVGc 121.232. DIFA с поликлональной лошадиной-анти-EHV-антисывороткой и моноклональным анти-SBV антителом подтверждало экспрессию трансгена в практически 100% клеток, инфицированных гEHV-1. Когда осуществляли DIFA клеток, инфицированных с применением гEHV-1 RasH-SE-70-455-SBVGc 121.232, то EHV-1 антиген-положительные клетки, которые были окрашены с помощью

лошадиной анти-EHV антисыворотки (пурпурные) также связывали моноклональное антитело к SBV Gc. Вестерн-блоттинги, которые прогоняли в невозстанавливающих условиях, подтверждали экспрессию модифицированного SBVGc234 в клетках, инфицированных рекомбинантным EHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc. Осуществляли вестерн-блоттинги лизатов инфицированных или неинфицированных клеток, зондированных с помощью моноклонального антитела к SBV Gc или моноклонального антитела к EHV-1 gpII. В то время как EHV-1 gpII экспрессировался во всех инфицированных клетках, SBV Gc экспрессировался только в клетках, инфицированных гEHV-1RacH-SE-70-455-SBVGc, но не в тех клетках, которые были инфицированы пустым вектором гEHV-1 RacH-SE1212. Вирусного белка не обнаруживали в лизатах иммитационно-инфицированных клеток. Инкубирование параллельных блотов с моноклональным антителом к gpII из EHV-1 подтверждало восстановлениеorf71 (US5) путем процедуры самоэксцизии во время высвобождения рекомбинантного вируса после трансфекции. Запасы вируса P7 возрасли в три раза для очищенного от бляшек изолята гEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc\_121.232, реплицированного до очень высокого титра  $1,85 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/мл в AI-ST клетках, указывая на то, что экспрессия трансгена не нарушает репликацию EHV в этой клеточной линии. Среднее значение шести титрований гEHV-1RacH-SE-70-455-SBVGc\_121.232 в виде TCID<sub>50</sub>/мл приводило к  $1,85 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/мл со среднеквадратическим отклонением  $1,28 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/мл.

Животные и схема эксперимента.

4 животных крупного рогатого скота немецких домашних пород вакцинировали два раза с интервалом три недели с применением  $10^8$  TCID<sub>50</sub> гEHV-SBV-Gc; 4 животных крупного рогатого скота содержали в качестве невакцинированных контролей. Через три недели после второй иммунизации всем животным инокулировали подкожного  $2 \times 0,5$  мл полевого штамма SBV, который пассивировали только на крупном рогатом скоте (Wernike и др., 2012). Во время всего исследования, ежедневно ректально измеряли температуру тела и животных исследовали ветеринары для определения клинических симптомов. Ежедневно отбирали сыворотку и анализировали с помощью коммерчески доступного N-основанного ELISA (ID Screen® Schmallenberg virus Competition, ID vet, France) и с помощью теста микронеutralизации против SBV изолята BH80/11, как было описано ранее (Wernike и др., 2013a). Оценку осуществляли путем определения цитопатического эффекта через 3 дня; все образцы тестировали в четырех повторах и титры антител рассчитывали в виде ND<sub>50</sub> согласно Behrens и Kaerber. Сыворотки, отобранные в дни иммунизации, контрольного заражения и при окончании исследования, соответственно, дополнительно анализировали с помощью тестов микронеutralизации против EHV штамма RacH (группа гEHV-SBV-Gc и невакцинированные контрольные животные).

В течение первых 10 дней после контрольного заражения, ежедневно дополнительно отбирали образцы крови. Из этих образцов, экстрагировали вирусную РНК, используя King Fisher 96 Flex (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) в комбинации с MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen, Hilden, Germany) в соответствии с инструкциями производителя и тестировали с помощью ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени на основании S-сегмента (Bilk и др., 2012).

Экспериментальный протокол пересматривали для соответствия требованиям государственного комитета по вопросам этики и получали разрешение компетентного органа (State Office for Agriculture, Food Safety and Fisheries of Mecklenburg-Vorpommern, Rostock, Germany, ref. LALLF M-VTSD/7221.3-1.1-004/12).

Клиническое наблюдение и обнаружение вирусной РНК.

Ни одно из животных не проявило каких-либо релевантных клинических симптомов, специфических для SBV, во время всего исследования и температура тела оставалась в пределах нормального диапазона для всех животных, при измерении ректально.

Начиная с первого дня или двух последующих контрольных заражений, вирусную РНК обнаруживали в образцах сыворотки каждого невакцинированного контрольного животного в течение четырех последовательных дней. Все вакцинированные животные из группы гEHV-SBV-Gc проявили уменьшенные концентрации вирусной РНК согласно количественного ПЦР с обратной транскрипцией (фиг. 27А) в течение всего периода отбора образцов. Двое животных в группе гEHV-SBV-Gc по результатам теста были полностью отрицательными согласно количественной ПЦР с обратной транскрипцией (фиг. 27А) в течение всего периода отбора образцов. У двух животных, иммунизированных гEHV-SBV-Gc, SBV генном обнаруживали в уменьшенных уровнях в течение трех или пяти дней, соответственно.

Выработка антител.

У невакцинированных контрольных животных не было обнаружено SBV-специфических антител с помощью реакции сывороточной нейтрализации перед контрольным заражением. Начиная с одной или двух недель после инфицирования, обнаруживали высокие титры нейтрализующих антител у всех невакцинированных животных (фиг. 27В).

В отличие от невакцинированной контрольной группы, SBV-специфические нейтрализующие антитела были обнаружены в день контрольного заражения в двух из четырех особей крупного рогатого скота, иммунизированных с применением гEHV-SBV-Gc. У оставшихся двух животных из этой группы, не было обнаружено SBV-специфических нейтрализующих антител перед контрольным заражением, но

через две недели после инфицирования, присутствовали нейтрализующие антитела (Фиг. 27В). Титры SBV-специфических нейтрализующих антител у всех четырех вакцинированных животных были более низкими по сравнению с такими в контрольном заражении, указывая на менее эффективную репликацию вируса зараженных вирусом, и это подтверждается данными количественной ПЦР с обратной транскрипцией.

#### Тест нейтрализации EHV.

Приготавливали двукратные разведения сыворотки в MEM, начиная с 1:5. Пятьдесят мл MEM, содержащей 100 TCID<sub>50</sub> SBV и 50 мл разведенной сыворотки инкубировали в планшетах для культивирования клеток на 96 лунок в течение 2 ч. После этого добавляли 100 мл свежеприготовленной суспензии ВНК-клеток (в MEM, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку) и культуральные планшеты инкубировали в течение 3-4 дней при 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Цитопатические эффекты оценивали с помощью световой микроскопии. Все сыворотки тестировали в двух повторах и титр антител рассчитывали в виде ND50 согласно Kaerber (1931), как модифицировано Behrens (личная коммуникация). Результаты, представленные на фиг. 28, указывают на то, что вакцинация крупного рогатого скота с помощью гEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc приводит к репликации векторного вируса, достаточно эффективной для того, чтобы индуцировать специфическую иммунную реакцию. У одного из четырех животных EHV-1 чрезвычайно низкий титр нейтрализующих антител (1:4) был обнаружен через три недели после первичной вакцинации. После двух вакцинации, три недели после второго применения, все четыре животных крупного рогатого скота продуцировали нейтрализующие антитела при титре 1:128. На основании этого результата можно сделать вывод о том, что EHV-1 RacH также должен быть функциональным в качестве вакцинного вектора у крупного рогатого скота.

#### Пример 10.

Эффективность тетравалентной вакцины IAV свиней, состоящей из гEHV-1 RacH-SE\_B и гEHV-1 RacH-SE\_D против заражения поросят H3N2 IAV свиней.

Для исследования ее свойств в качестве векторной вакцины у молодых поросят, тетравалентную вакцину IAV свиней, состоящую из гEHV-1 RacH-SE\_B (гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 см. фиг. 14) и гEHV-1 RacH-SE\_D (гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm см. фиг. 23) тестировали во втором эксперименте вакцинация-заражения.

В этом втором исследовании, поросят от невакцинированных свиноматок, которые были определены в результате анализа как серологически отрицательные на специфичные для свиного IAV антитела путем применения ELISA, специфичного для H3 (Фиг. 32), и путем теста на вирусную нейтрализацию (данные не показаны) во время первой вакцинации, вакцинировали два раза с применением тетравалентной вакцины, состоящей из гEHV-1 RacH-SE\_B и гEHV-1 RacH-SE\_D. Животных вакцинировали первый раз в первую неделю их жизни (день исследования 0, SD0) и второй раз в возрасте четырех недель (день исследования 21, SD21), соответственно, либо внутримышечно, а затем внутримышечно (2X IM), или первый раз интраназально, а затем внутримышечно (IN+IM), или два раза интраназально (2X IN), в дозе 1×10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> в дозе 2 мл на вакцинный штамм, животное и вакцинацию, соответственно. Невакцинированная группа служила в качестве отрицательного контроля, а другая невакцинированная группа служила в качестве контроля заражения на одиннадцатой неделе жизни (дни исследования 69 или 70, SD42/43), все животные, но не отрицательный контроль, были заражены интратрахеально применяемой дозой 2×10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> H3N2 штаммом IAV свиней для заражения (Европейский изолят полевого вируса R452-14, H3 которого является гетерологичным H3 вакцинного антигена, используемого в гEHV-1 RacH-SE\_B). Невакцинированные и незараженные животные служили в качестве отрицательного контроля (отр. контр.), в то время как невакцинированные, но зараженные животные служили в качестве контроля заражения (контр. зараж.). При вакцинации и после вакцинации и перед заражением, отбирали образцы крови в различные моменты времени.

Через один день после заражения, половину животных на группу убивали и отбирали по три образца легких с левого и правого легкого у каждого животного, соответственно. После этого для каждого животного определяли инфекционные титры IAV свиней на грамм гомогената легкого в качестве среднего значения для левого и правого легкого на одно животное, каждое из полученных из гомогенатов является объединением трех образцов для левого или правого легкого и которые были нормализованы к общему весу трех образцов левого или правого легкого, соответственно. Аналогичную процедуру проводили с оставшейся половиной животных на группу через три дня после заражения. Для всех вакцинированных групп, средние значения титров инфекционного IAV свиней, полученные от отдельных животных в группе, были статистически достоверно снижены для образцов, отобранных через один день после заражения (CH+1), по сравнению с зараженной контрольной группой, в то время как все животные из отрицательной контрольной группы не обнаруживали инфекционных титров вирусов IAV свиней в их гомогенатах легких (фиг. 29). Кроме того, для всех вакцинированных групп, средние значения титров инфекционного IAV свиней, полученные от отдельных животных в группе, были статистически достоверно снижены для образцов, отобранных в день 3 после заражения (CH+3), по сравнению с зараженной контрольной группой, в то время как все животные из отрицательной контрольной группы не обнаруживали

инфекционных титров вирусов IAV свиней в их гомогенатах легких (фиг. 30). Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящей из гЕНВ-1 RacH-SE\_B и гЕНВ-1 RacH-SE\_D, статистически достоверно снижает нагрузку IAV свиней на легкие через один и три дня после заражения гетерологичным H3N2 штаммом IAV свиней у поросят, соответственно. В соответствии с этим, вакцина, описанная в настоящем изобретении, является эффективной против свиного IAV у свиней.

Кроме того, сыворотку, взятую у исследуемых животных в день исследования 0 (SD0, перед первой вакцинацией), в день исследования 21 (SD21, перед второй вакцинацией), и в дни исследования 42 или 43 (SD42/43, перед применением материала для заражения) анализировали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), специфического для свиного иммуноглобулина G (IgG), нацеленного на рекомбинантно экспрессированный свиной IAV H3 антиген, который является гомологичным H3, экспрессируемым вакцинным штаммом гЕНВ-1 RacH-SE\_B. В то время как средние значения ОП сыворотки из отрицательной контрольной группы давали только очень низкие значения для всех временных точек измерения, сыворотка из вакцинированных групп продемонстрировала значительное повышение значений ОП после двух внутримышечных применений (2X IM; SD21 и SD42/43), после первого интраназального, а затем внутримышечного введения (IN+IM; SD42/43), и после двух интраназальных введений (2X IN; SD42/43); фиг. 32. Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящей из гЕНВ-1 RacH-SE\_B и гЕНВ-1 RacH-SE\_D, вызывала серологическую иммунную реакцию у поросят против гемагглютинаина H3 свиного IAV, экспрессируемого вакцинным штаммом гЕНВ-1 RacH-SE\_B, соответственно.

Дополнительно мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) очищали из крови, собранной у исследуемых животных в день исследования 28 (SD28). После этого PBMC повторно стимулировали либо с помощью H3N2 свиного IAV заражающего штамма R452-14 при множественности заражения 1 (H3N2 MOI 1) или с помощью рекомбинантно экспрессированного свиного IAV H3 антигена, который является гомологичным H3, экспрессируемым вакцинным штаммом гЕНВ-1 RacH-SE\_B при концентрации 1 мкг/мл (гH3 1 мкг/мл). Используя повторно стимулированные PBMC, осуществляли гамма-интерферон специфический метод иммуноферментных пятен (IFN $\gamma$  ELISpot), и полученные результаты нормировали к 10 клеток и рассчитывали в виде средних значений на группу, соответственно (фиг. 34). Несмотря на то, что повторно стимулированные PBMC из зараженной контрольной группы (служили в качестве отрицательного контроля для этого анализа, животные не были вакцинированы) показали средние значения пятен на группу ниже 45 после любой повторной стимуляции, повторно стимулированные PBMC из вакцинированных животных показали средние значения пятен на группу выше 85 после двух внутримышечных применений, больше 100 пятен после первого интраназального, а затем внутримышечного введения (IN+IM), и больше 150 пятен после двух интраназальных введений (2X IN), после любой повторной стимуляции, соответственно (фиг. 34). Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящей из гЕНВ-1 RacH-SE\_B и гЕНВ-1 RacH-SE\_D, вызывала клеточный иммунный ответ у поросят как против гемагглютинаина H3 свиного IAV, экспрессируемого вакцинным штаммом гЕНВ-1 RacH-SE\_B, так и против H3N2 свиного IAV R452-14, используемого для гетерологичного заражения вирусной инфекцией, соответственно.

Таким образом, вакцинация поросят тетравалентной вакциной свиного IAV, состоящей из гЕНВ-1 RacH-SE\_B и гЕНВ-1 RacH-SE\_D, индуцировала обнаруживаемый серологический и клеточный иммунный ответ у поросят и продемонстрировала эффективность вакцины путем статистически достоверного снижения нагрузки IAV свиней в гомогенатах легких через один и через три дня после заражения гетерологичным IAV свиней.

Пример 11.

Эффективность тетравалентной вакцины IAV свиней, состоящей из гЕНВ-1 RacH-SE\_B и гЕНВ-1 RacH-SE\_D против заражения H3N2 IAV свиней у поросят с материнскими антителами.

Для исследования ее свойств в качестве векторной вакцины у молодых поросят, тетравалентную вакцину IAV свиней, состоящую из гЕНВ-1 RacH-SE\_B и гЕНВ-1 RacH-SE\_D, тестировали в третьем исследовании вакцинация-заражение.

В этом третьем исследовании использовали поросят, которые были рождены и вскармливались молозивом и молоком свиноматок, которые были дважды вакцинированы во время беременности с помощью коммерчески доступной инактивированной вакцины против IAV свиней. Поросят определяли в качестве серологически положительных на специфические к IAV свиней антитела путем применения специфического для H3 ELISA (фиг. 33) и путем применения коммерчески доступного ELISA, специфического для антитела к IAV свиней (IDEXX Influenza A (Virus Antibody Test) ®; IDEXX, Westbrook, Maine 04092, USA) в соответствии с инструкциями производителя относительно тестирования (данные не показаны) во время первой вакцинации вакцинировали два раза с применением тетравалентной вакцины, состоящей из гЕНВ-1 RacH-SE\_B и гЕНВ-1 RacH-SE\_D. Животных вакцинировали первый раз в их первую неделю жизни (день исследования 0, SD0) и второй раз в возрасте четырех недель (день исследования 21, SD21), соответственно, либо внутримышечно, а затем еще раз внутримышечно (2X IM), или первый раз интраназально, а затем внутримышечно (IN+IM), или два раза интраназально (2X IN), в дозе  $1 \times 10^7$  TCID50 в

дозе 2 мл на вакцинный штамм, животное и вакцинацию, соответственно. Невакцинированная группа служила в качестве отрицательного контроля, а другая невакцинированная группа служила в качестве контроля заражения. На одиннадцатую неделю жизни (дни исследования 69 или 70, SD69/70), все животные, но не отрицательный контроль, были заражены интратрахеально применяемой дозой  $2 \times 10^7$  TCID50 H3N2 штаммом IAV свиней для заражения (Европейский изолят полевого вируса R452-14, H3 которого является гетерологичным H3 вакцинного антигена, используемого в гEHV-1 RasH-SE\_B). Невакцинированные и незараженные животные служили в качестве отрицательного контроля (отр. контр.), в то время как невакцинированные, но зараженные животные служили в качестве контроля заражения (контр. зараж.). В момент вакцинации и после вакцинации и перед заражением, отбирали образцы крови в различные моменты времени.

Через пять дней после заражения животных убивали и отбирали по три образца легких с левого и правого легкого у каждого животного, соответственно. После этого для каждого животного определяли инфекционные титры IAV свиней на грамм гомогената легкого в качестве среднего значения для левого и правого легкого на одно животное, каждое из полученных из гомогенатов является объединением трех образцов для левого или правого легкого и которые были нормализованы к общему весу трех образцов левого или правого легкого, соответственно. Для всех вакцинированных групп, средние значения титров инфекционного IAV свиней, полученные от отдельных животных в группе, были статистически достоверно снижены для образцов, отобранных на пятый день после заражения (CH+5), по сравнению с зараженной контрольной группой, в то время как все животные из отрицательной контрольной группы не обнаруживали инфекционных титров вирусов IAV свиней в их гомогенатах легких (фиг. 31). Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящей из гEHV-1 RasH-SE\_B и гEHV-1 RasH-SE\_D, статистически достоверно снижает нагрузку IAV свиней на легкие через пять дней после заражения гетерологичным H3N2 штаммом IAV свиней у поросят, соответственно. В соответствии с этим, вакцина, описанная в настоящем изобретении, является эффективной против свиного IAV у свиней.

Кроме того, сыворотку, взятую у исследуемых животных в день исследования 0 (SD0, перед первой вакцинацией), в день исследования 21 (SD21, перед второй вакцинацией), и в день исследования 35 (SD35, две недели после второй вакцинации) анализировали с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA), специфического для свиного иммуноглобулина G (IgG), нацеленного на рекомбинантно экспрессированный свиной IAV H3 антиген, который является гомологичным H3, экспрессируемым вакцинным штаммом гEHV-1 RasH-SE\_B. В то время как средние значения ОП сыворотки из отрицательной контрольной группы давали только очень низкие значения для SD21 и SD35, сыворотка из вакцинированных групп продемонстрировала значительное повышение значений ОП после двух внутримышечных применений (2X IM; SD35), после первого интраназального, а затем внутримышечного введения (IN+IM; SD35), и после двух интраназальных введений (2X IN; SD35); фиг. 33. Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящей из гEHV-1 RasH-SE\_B и гEHV-1 RasH-SE\_D, вызывала серологическую иммунную реакцию у поросят против гемагглютинаина H3 свиного IAV, экспрессируемого вакцинным штаммом гEHV-1 RasH-SE\_B, соответственно.

Дополнительно мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) очищали из крови, собранной у исследуемых животных в день исследования 28 (SD28). После этого PBMC повторно стимулировали либо с помощью H3N2 свиного IAV заражающего штамма R452-14 при множественности заражения 1 (H3N2 MOI 1) или с помощью рекомбинантно экспрессированного свиного IAV H3 антигена, который является гомологичным H3, экспрессируемым вакцинным штаммом гEHV-1 RasH-SE\_B при концентрации 1 мкг/мл (гH3 1 мкг/мл). Используя повторно стимулированные PBMC, осуществляли гамма-интерферон специфический метод иммуоферментных пятен (IFN $\gamma$  ELISpot), и полученные результаты нормировали к 10 клеток и рассчитывали в виде средних значений на группу, соответственно (фиг. 35). Несмотря на то, что повторно стимулированные PBMC из зараженной контрольной группы (служили в качестве отрицательного контроля для этого анализа, животные не были вакцинированы) показали средние значения пятен на группу ниже 15 после любой повторной стимуляции, повторно стимулированные PBMC из вакцинированных животных показали средние значения пятен на группу выше 30 после двух внутримышечных применений, больше 55 пятен после первого интраназального, а затем внутримышечного введения (IN+IM), и больше 65 пятен после двух интраназальных введений (2X IN), после любой повторной стимуляции, соответственно (фиг. 35). Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящей из гEHV-1 RasH-SE\_B и гEHV-1 RasH-SE\_D, вызывала клеточный иммунный ответ у поросят как против гемагглютинаина H3 свиного IAV, экспрессируемого вакцинным штаммом гEHV-1 RasH-SE\_B, так и против H3N2 свиного IAV R452-14, используемого для гетерологичного заражения вирусной инфекцией, соответственно.

Таким образом, вакцинация поросят тетравалентной вакциной свиного IAV, состоящей из гEHV-1 RasH-SE\_B и гEHV-1 RasH-SE\_D, индуцировала обнаруживаемый серологический и клеточный иммунный ответ у поросят и продемонстрировала эффективность вакцины путем статистически достоверного снижения нагрузки IAV свиней в гомогенатах легких через пять дней после заражения гетерологичным

IAV свиней.

Все композиции и способы, раскрытые и заявленные в данном изобретении, могут быть получены и осуществлены без излишних экспериментов в свете настоящего описания. Хотя композиции и способы в соответствии с данным изобретением были описаны в контексте предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидным, что в композиции и способы могут быть внесены изменения, а также в этапы или в последовательности этапов описанного в данном изобретении способа без отступления от концепции и объема настоящего изобретения. Более конкретно, будет очевидным, что определенные агенты, которые являются как химически, так и физиологически, родственными, могут быть заменены на агенты, описанные в данном изобретении в то время как будут достигнуты те же или аналогичные результаты. Все такие подобные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, подразумеваются как такие, которые соответствуют объему и концепции изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

#### Ссылки

Следующие ссылки в той степени, в которой они обеспечивают иллюстративные или другие детали, дополнительные к тем, которые изложены в данном описании, специально включены в данное изобретение в качестве ссылки.

1. Allwinn R, Geiler J, Berger A, Cinatl J, Doerr HW. **2010**. Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunofluorescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? *Med Microbiol Immunol.* 199(2):117-21. doi: 10.1007/s00430-010-0143-4. Epub 2010 Feb 17.
2. **Anonymous** (2013). VMD authorizes SBV vaccine for use in the UK. *The Veterinary record* 172, 543
3. **Anonymous** (2015). Schmallenberg virus vaccine. *The Veterinary record* 177, 321
4. **Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B** (2012). Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Veterinary microbiology* 159, 236-238
5. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. **1985**. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2):521-30.
6. Bryant, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., and Alcamí, A. **2003**. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *The EMBO Journal* Vol. 22 ( 4): 833-846.
7. Bustin, S. **2000**. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**(2): 169-193.
8. Charoensawan, V., Wilson, D., Teichmann, S.A. **2010**. Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 38(21):7364-77
9. Colle, C.F. 3rd, O'Callaghan, D.J. **1995**. Transcriptional analyses of the unique short segment of EHV-1 strain Kentucky A. *Virus Genes*;9(3):257-68.
10. Dorsch-Häsler, K., Keil, G.M., Weber, F., Jasin, M. Schaffner, W., and Koszinowski, U.H. **1985**. A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *PNAS* Vol. 82: 8325-8329.
11. Drummer, H.E., Studdert, M.J., Crabb, B.S. **1998**. Equine herpesvirus-4 glycoprotein G is secreted as a disulphide-linked homodimer and is present as two homodimeric species in the virion. *J. Gen. Virol.* 79: 1205-1213
12. **von Einem J, Smith PM, Van de Walle GR, O'Callaghan DJ, Osterrieder N** (2007). In vitro and in vivo characterization of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) mutants devoid of the viral chemokine-binding glycoprotein G (gG). *Virology* 362, (1) 151–162
13. Goodwin, E.C. & Rottman, F.M. **1992**. The 3' flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J.Biol.Chem.* 267: 16330-16334.

14. Hübner, P. H., Birkenmaier, S., Rziha, H.-J. and Osterrieder, N. **1996**, Alterations in the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain RacH During Attenuation. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 43: 1–14. doi:10.1111/j.1439-0450.1996.tb00282.x
15. **Kärber**, G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f experiment Pathol u Pharmakol.*;162:480–483
16. **Kraatz** F, Wernike K, Hechinger S, König P, Granzow H, Reimann I, Beer, M (2015). Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J Virol* 89, 1825-1837
17. Luke, GA and Ryan, MD. **2013**. The protein coexpression problem in biotechnology and biomedicine: virus 2A and 2A-like sequences provide a solution. *Future Virology*, Vol. 8, No. 10, Pages 983-996.
18. Ma, G., Eschbaumer, M., Said, A., Hoffmann, B., Beer, M., Osterrieder, N. **2012**. An equine herpesvirus type 1 (EHV-1) expressing VP2 and VP5 of serotype 8 bluetongue virus (BTV-8) induces protection in a murine infection model. *PLoS One*. 2012;7(4):e34425. doi: 10.1371/journal.pone.0034425. Epub 2012 Apr 12.
19. Ma, G., Azab, W., Osterrieder, N. **2013**. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet Microbiol.* 167(1-2):123-34.
20. Nolan, T. Rebecca E Hands, R.E., and Bustin S.A. **2006**. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR *Nature Protocols* 1: 1559-1582
21. Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Kaaden, O.R., and O'Callaghan, D.J. **1996**. The equine herpesvirus 1 IR6 protein influences virus growth at elevated temperature and is a major determinant of virulence. *Virology* 226:243-251.
22. Ptashne, M. **2014**. *The Chemistry of Regulation of Genes and Other Things* The Journal of Biological Chemistry Vol. 289, ( 9) 5417–5435. Reed, L.J., and Muench, H. **1938**. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* (27) 3; 493-497.
23. **Reed** LJ and Muench H (1938). A simple method estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27(3) 493-497
24. Rosas, C.T., König, P., Beer, M., Dubovi, E.J., Tischer, B.K., Osterrieder, N., **2007a**. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhoea virus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 88 (3), 748–757.
25. Rosas, C.T., B.K. Tischer, G.A. Perkins, B. Wagner, L.B. Goodman, N. Osterrieder. **2007b** . Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV) *Virus Research*, 125 , pp. 69–78.
26. Rosas, C.T., Van de Walle, G.R., Metzger, S.M., Loelzer, K., Dubovi, E.J., Kim, S.G., Parrish, C.R., Osterrieder, N., **2008**. Evaluation of a vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza. *Vaccine* 26 (19), 2335–3234.
27. Said, A., Elke Lange, E., Beer, M. Damiani, A., Osterrieder, N. **2013**. Recombinant equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine protects pigs against challenge with influenza A(H1N1)pmd09 *Virus Research* 173: 371– 376
28. **Sambrook** J and Russell DW (2001). *Molecular Cloning*, 3rd ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; ISBN 978-087969-577-4

29. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. **2004**. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* Dec;22(12):1567-72. Epub 2004 Nov 21.
30. Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., Osterrieder, N., **2006**. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Tech.* 40, 191–197.
31. Tischer, B.K., Kaufer, B.B., Sommer, M., Wussow, F., Arvin, A., and Osterrieder, N. A Self-Excisable Infectious Bacterial Artificial Chromosome Clone of Varicella-Zoster Virus Allows Analysis of the Essential Tegument Protein Encoded by *ORF9*. *J. Virol.* 81 (23), **2007**, 13200–13208.
32. Tischer, B.K., Smith, G.A., and Osterrieder, N. in: Jeff Braman (ed.), *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition*, Methods in Molecular Biology, vol. 634, DOI 10.1007/978-1-60761-652-8\_30, © Springer Science+Business Media, LLC **2010**, Chapter 30: *En Passant* Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System.
33. Thompson, S.R. **2012**. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol.* Nov;20(11):558-66.
34. Trapp, S., von Einem, J., Hofmann, H., Kostler, J., Wild, J., Wagner, R., Beer, M., Osterrieder, N., **2005**. Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *J. Virol.* 79, 5445–5454.
35. Trombetta CM, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E. **2014**. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. *Vaccines (Basel)* 13;2(4):707-34. doi: 10.3390/vaccines2040707.
36. Wellington, J.E., Allen, G.P., Gooley, A.A., Love, D.N., Packer, N.H., Yan, J.X., Whalley, J.M. **1996**. The highly O-glycosylated glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 is encoded by gene 71. *J Virol.* 70(11):8195-8.
37. **Wernike** K, Aebischer A, Roman-Sosa G, Beer M, (2017). The N-terminal domain of Schmallenberg virus envelope protein Gc is highly immunogenic and can provide protection from infection. *Scientific reports.* 2017 Feb 13;7:42500.
38. **Wernike** K, Eschbaumer M, Breithaupt A, Hoffmann B, Beer M (2012). Schmallenberg virus challenge models in cattle: infectious serum or culture-grown virus? *Veterinary research* 43, 84
39. **Wernike** K, Eschbaumer M, Schirrmeier H, Blohm U, Breithaupt A, Hoffmann B, Beer M, (2013a). Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle. *Veterinary microbiology* 165, 155-159
40. **Wernike** K, Nikolin VM, Hechinger S, Hoffmann B, Beer M (2013b). Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. *Vaccine* 31, 3558-3563

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экспрессионная кассета, содержащая
  - (I) по меньшей мере один левый ORF70 фланкирующий участок выбран из группы, включающей: SEQ ID NO: 13 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность, SEQ ID NO: 15 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность и SEQ ID NO: 17 по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность, и
  - (II) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, которая функционально связана с промоторной последовательностью, и
  - (III) по меньшей мере один правый ORF70 фланкирующий участок выбран из группы, включающей: SEQ ID NO: 14 и по меньшей мере на 95% его гомологичную и/или идентичную последовательность, SEQ ID NO: 16 и по меньшей мере на 95% его гомологичную и/или идентичную последовательность и SEQ ID NO: 18 и по меньшей мере на 95% его гомологичную и/или идентичную последовательность.
2. Экспрессионная кассета по п.1, где экзогенная нуклеотидная последовательность представляет собой антигенкодирующую последовательность.
3. Вектор штамма *RacH* альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1) для иммунизации, включающий экспрессионную кассету по п.1 или 2.
4. Вектор штамма *RacH* альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1), включающий
  - (I) по меньшей мере один левый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 13 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последователь-

ность, SEQ ID NO: 15 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность и SEQ ID NO: 17 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность, и

(II) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, которая функционально связана с промоторной последовательностью, и

(III) по меньшей мере один правый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 14 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность, SEQ ID NO: 16 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность и SEQ ID NO: 18 и по меньшей мере на 95% его гомологичную и/или идентичную ей последовательность.

5. Вектор штамма RasH альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1) по п.4, в котором последовательностью является представляющий интерес ген или антигенкодирующая последовательность.

6. Вектор штамма RasH альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1), включающий первую нуклеотидную представляющую (ий) интерес последовательность, встроенную в ORF70, и вторую нуклеотидную представляющую (ий) интерес последовательность или ген, где

(I) по меньшей мере один левый ORF70 фланкирующий участок выбран из группы, включающей: SEQ ID NO: 13 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность, SEQ ID NO: 15 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность, и SEQ ID NO: 17 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность, и

(II) по меньшей мере один правый ORF70 фланкирующий участок выбран из группы, включающей: SEQ ID NO: 14 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность, SEQ ID NO: 16 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность и SEQ ID NO: 18 и по меньшей мере на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность.

7. Вектор штамма RasH альфагерпесвируса 1 лошадей (EHV-1) по п.6, в котором представляющий интерес последовательностью является первая антигенкодирующая последовательность и вторая предпочтительно другая антигенкодирующая последовательность.

8. EHV-1 вектор по пп.3-7, где инсерция в ORF70 характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или подобным в ORF70, при этом ORF71 остается функциональной.

9. EHV-1 вектор по пп.3-8, где инсерция в ORF70 характеризуется делецией приблизительно части 801 п.о. в пределах ORF70 для RasH (SEQ ID NO: 20) или на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичной и/или идентичной ей последовательности.

10. EHV-1 вектор по пп.3-9, который включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и на 95% гомологичную и/или идентичную ей последовательность любой из этих последовательностей.

11. EHV-1 вектор по пп.3-10, который включает (I) по меньшей мере один левый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17, и (II) по меньшей мере один правый ORF70 фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 18.

12. EHV-1 вектор по пп.3-11 или экспрессионная кассета по п.1, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность не встречается в природе и/или является рекомбинантной.

13. EHV-1 вектор по пп.3-12 или экспрессионная кассета по п.1 или 2, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность является рекомбинантной, и/или гетерологичной, и/или экзогенной.

14. EHV-1 вектор по пп.8-13 или экспрессионная кассета по п.2, где антигенкодирующая область относится к патогену, который инфицирует свинью или крупный рогатый скот, используемых для производства пищевых продуктов.

15. EHV-1 вектор по пп.3-14 или экспрессионная кассета по п.1 или 2, включающий (ая) дополнительные регуляторные последовательности, такие как терминирующий кодон или последовательность полиаденилирования.

16. EHV-1 вектор по пп.3-15, включающий по меньшей мере одну дополнительную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность.

17. EHV-1 вектор по п.16 дополнительно включает антигенкодирующую последовательность, встроенную в другой сайт инсерции, такой как ORF1/3.

18. EHV-1 вектор по пп.6-17 или экспрессионная кассета по п.1, где промоторная (ые) последовательность (и) функционально связана (ы) с одной или двумя или более последовательностями, которую выбирают из группы, включающей: SV40 большой T, HCMV и MCMV немедленно-ранний ген 1, промотор фактора элонгации альфа человека, бакуловирусный промотор полиэдрина, функциональный фрагмент из 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), предпочтительно указанный функциональный фрагмент представляет собой р430 (SEQ ID NO: 3), функциональный фрагмент из комплементарной нуклеотидной последовательности 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), функциональный фрагмент из 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), предпоч-

тительно указанный функциональный фрагмент представляет собой р455 (SEQ ID NO: 4), функциональный фрагмент из комплементарной нуклеотидной последовательности 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2).

19. EHV-1 вектор по п.18, где различные промоторные последовательности функционально связаны с по меньшей мере двумя последовательностями, которыми являются представляющие интерес гены.

20. EHV-1 вектор по п.19, где промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интерес геном, представляет собой р455 (SEQ ID NO: 4) или ее функциональный фрагмент или его комплементарные нуклеотидные последовательности и где промоторная последовательность, функционально связанная с другим представляющим интерес геном, представляет собой р430 (SEQ ID NO: 3) или ее функциональный фрагмент или его комплементарные нуклеотидные последовательности.

21. Клетка-хозяин млекопитающего, отличающаяся тем, что она содержит вектор по пп.3-20.

22. Применение вектора по пп.3-20 для приготовления иммуногенной композиции или вакцины.

23. Применение клетки-хозяина млекопитающего по п.21 для приготовления иммуногенной композиции или вакцины.

24. Иммуногенная композиция для уменьшения или предотвращения клинических симптомов или заболевания, вызываемого инфицированием патогеном, содержащая

а) вектор по пп.3-20 и

б) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

25. Вакцина для уменьшения или предотвращения клинических симптомов или заболевания, вызываемого инфицированием патогеном, содержащая

а) вектор по пп.3-20 и

б) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

26. Способ приготовления иммуногенной композиции или вакцины для уменьшения или предотвращения клинических симптомов или заболевания, вызываемого инфицированием патогеном, включающий следующие стадии:

а) инфицирование клетки-хозяина млекопитающего по п.21 с помощью вектора по пп.3-20,

б) культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,

в) сбор инфицированных клеточных культур,

г) очистку супернатанта инфицированных клеточных культур со стадии в),

д) смешивание указанного собранного супернатанта инфицированной клеточной культуры с фармацевтически приемлемым носителем.

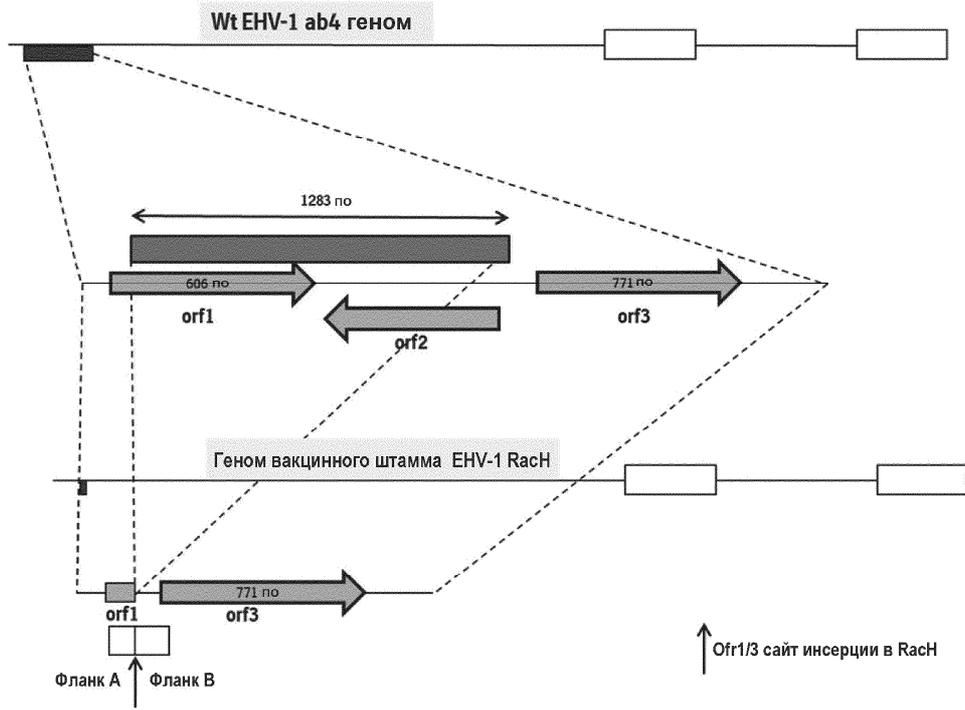
27. Способ иммунизации свиньи или крупного рогатого скота, от клинического заболевания, вызываемого патогеном в указанном животном, где указанный способ включает стадию введения животному иммуногенной композиции по п.24 или вакцины по п.25, при этом указанная иммуногенная композиция или вакцина не может вызывать клинические симптомы инфекции, но способна индуцировать иммунный ответ, который иммунизирует указанного животного от патогенных форм указанного патогена.

28. Набор для иммунизации свиньи или крупного рогатого скота от заболевания, вызываемого патогеном у указанного животного, и/или для уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических симптомов, связанных с или вызываемых патогеном у животного, содержащий:

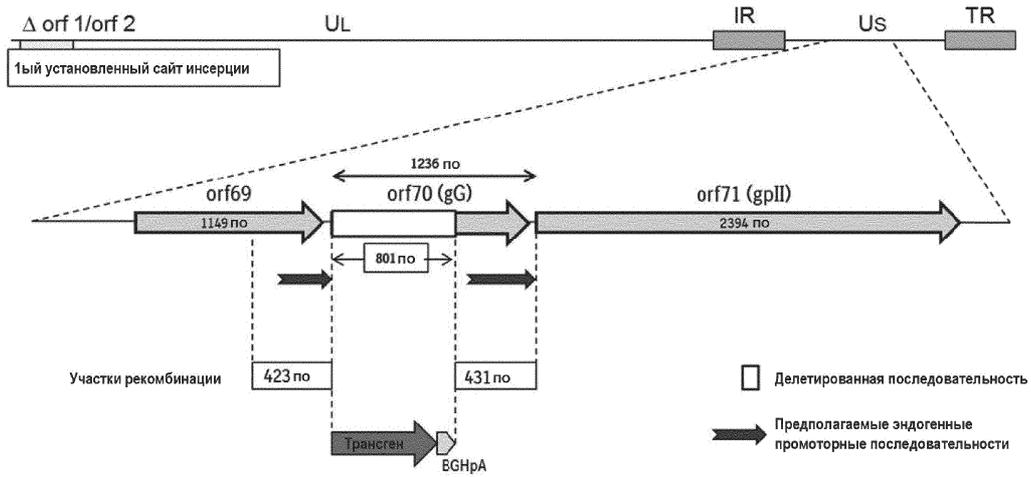
а) дозатор, для введения вакцины указанному животному, и

б) иммуногенную композицию по п.24 или вакцину по п.25, и

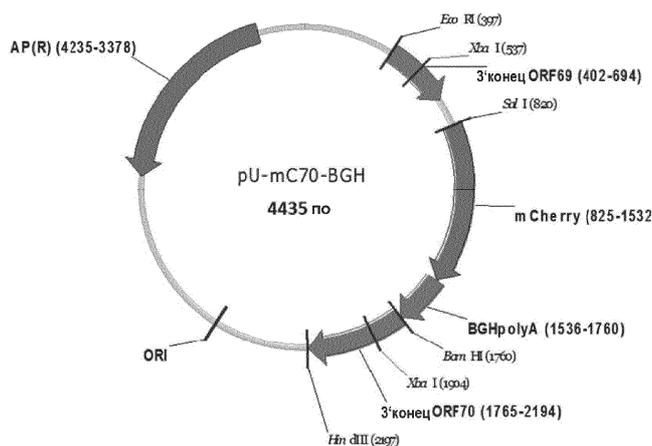
в) листок-вкладыш с инструкцией.



Фиг. 1

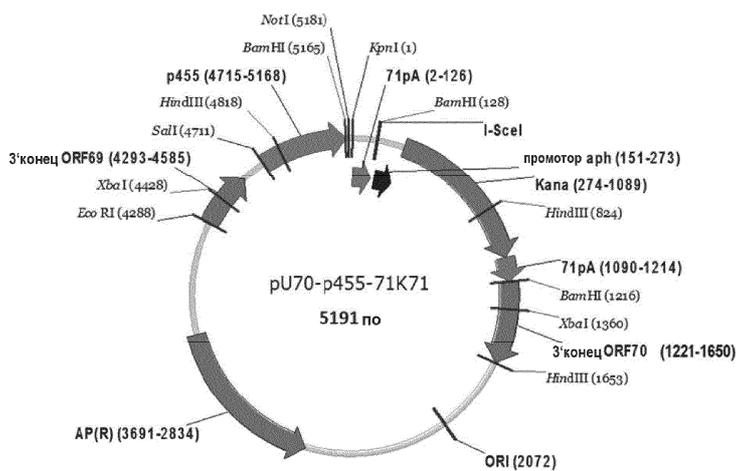


Фиг. 2



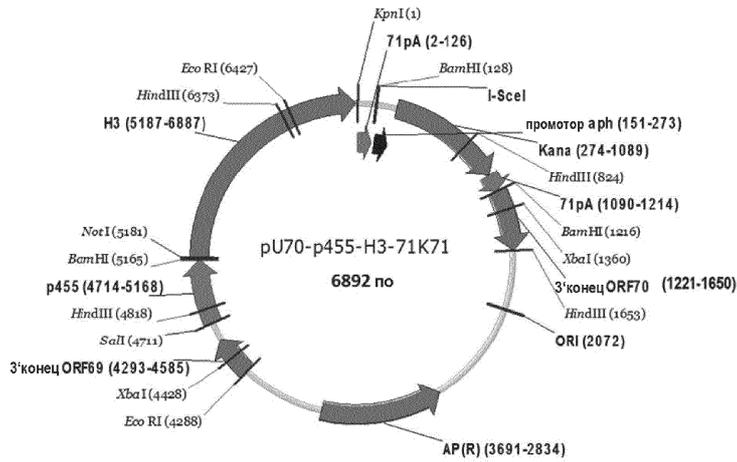
- 3'конец ORF69** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания против хода транскрипции
- 3'конец ORF70** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания по ходу транскрипции
- BGHpolyA** последовательность полиаденилирования
- Ori** точка начала репликации плазмидного вектора
- Apr** устойчивый к ампициллину ген бета-лактамазы
- BamHI, EcoRI, HindIII, Sall, XbaI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 3



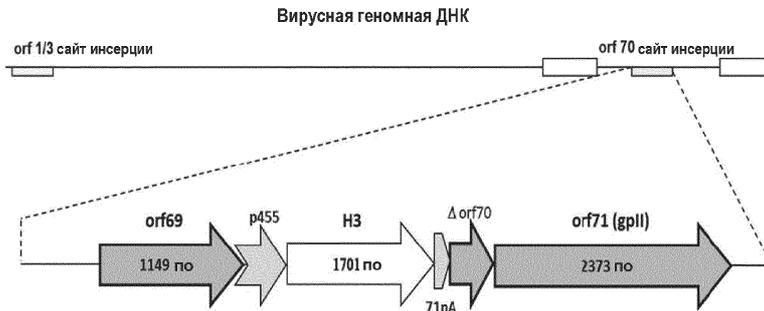
- 3'конец ORF69** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания против хода транскрипции
- 3'конец ORF70** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания по ходу транскрипции
- p455** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- 71pA** последовательность полиаденилирования
- I-SceI** сайт расщепления для I-SceI
- промотор aph** запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
- Kana** Устойчивая к канамицину *orf*
- Ori** точка начала репликации плазмидного вектора
- Apr** Устойчивый к ампициллину ген
- EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 4

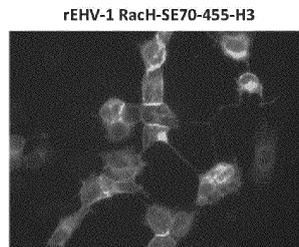


- 3'конец ORF69** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания против хода транскрипции
- 3'конец ORF70** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания по ходу транскрипции
- p455** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- H3** трансген (IAV гемагглютинин)
- 71pA** последовательность полиаденилирования
- I-SceI** сайт расщепления для I-SceI
- промотор aph** запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
- Kana** Устойчивая к канамицину *orf*
- ORI** точка начала репликации плазмидного вектора
- APr** Устойчивый к ампициллину ген
- EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 5

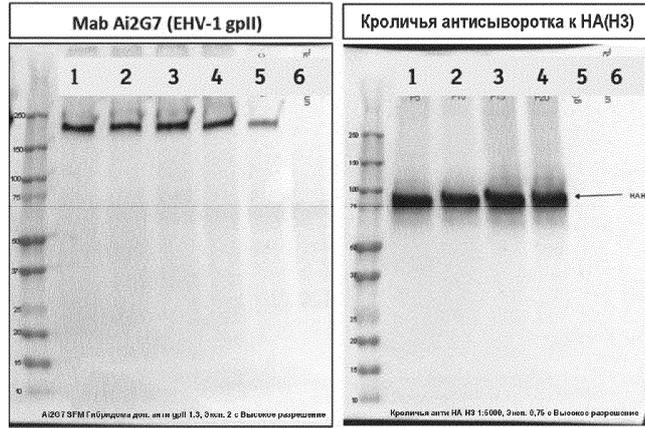


Фиг. 6



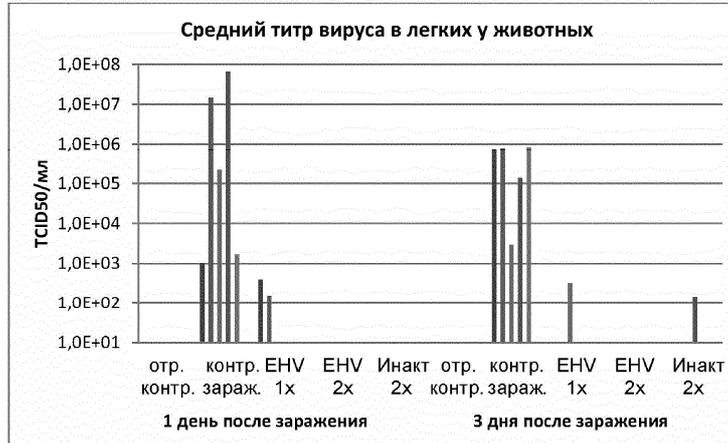
Моноклональное антитело к H3

Фиг. 7

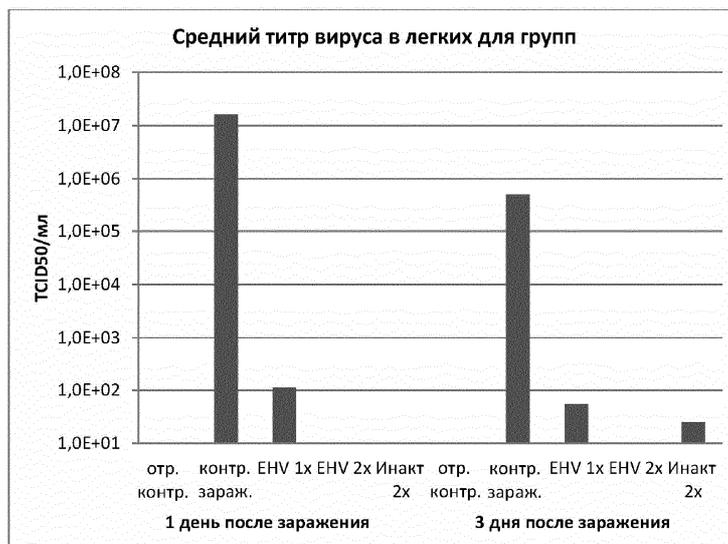


- 1: rEHV-1 RaCh-SE-70-p455-H3 P5 инфицированные клетки
- 2: rEHV-1 RaCh-SE-70-p455-H3 P10 инфицированные клетки
- 3: rEHV-1 RaCh-SE-70-p455-H3 P15 инфицированные клетки
- 4: rEHV-1 RaCh-SE-70-p455-H3 P20 инфицированные клетки
- 5: rEHV-1 RaCh-mC70 инфицированные клетки
- 6: неинфицированные клетки

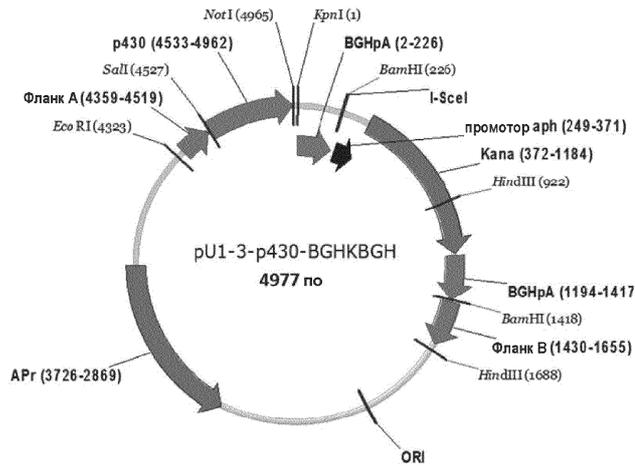
Фиг. 8



Фиг. 9А

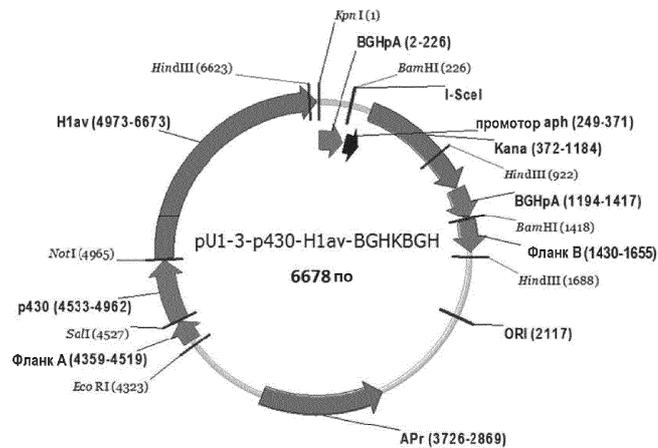


Фиг. 9В



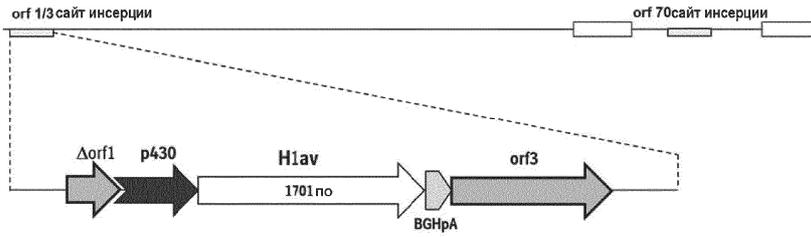
- Фланк А** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания против хода транскрипции
- Фланк В** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания по ходу транскрипции
- p430** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- BGHrA** последовательность полиаденилирования
- I-Sce1** сайт расщепления для I-Sce1
- промотор aph** запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
- Kana** Устойчивая к канамицину *orf*
- Ori** точка начала репликации плазмидного вектора
- Apr** Устойчивый к ампициллину ген
- EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 10

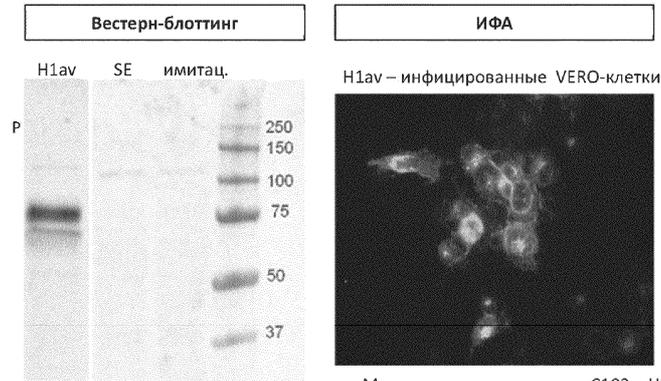


- Фланк А** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания против хода транскрипции
- Фланк В** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания по ходу транскрипции
- p430** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- H1av** трансген (IAV гемагглютинин)
- BGHrA** последовательность полиаденилирования
- I-Sce1** сайт расщепления для I-Sce1
- промотор aph** запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
- Kana** Устойчивая к канамицину *orf*
- Ori** точка начала репликации плазмидного вектора
- Apr** Устойчивый к ампициллину ген
- EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 11

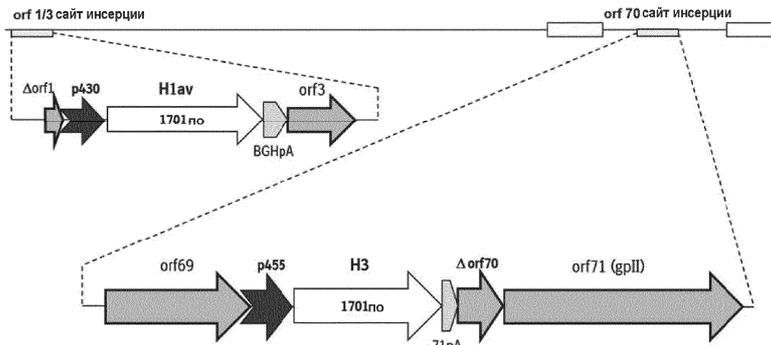


Фиг. 12

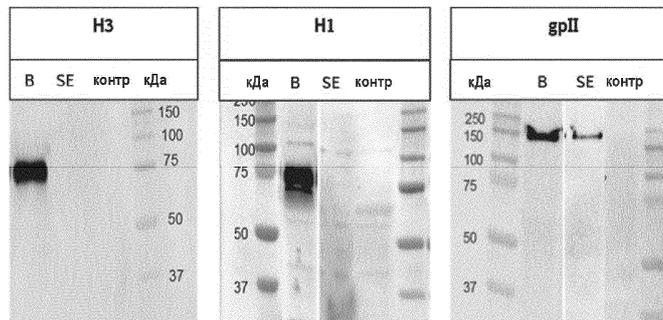


Моноклональное антитело С102 к H1  
 Поликлональное антитело РА-34929 к H1  
 H1av = rEHV-1 RacH-SE1/3-430-H1av  
 SE = rEHV-RacH-SE (контроль)  
 имитац. = неинфицированные клетки (контроль)

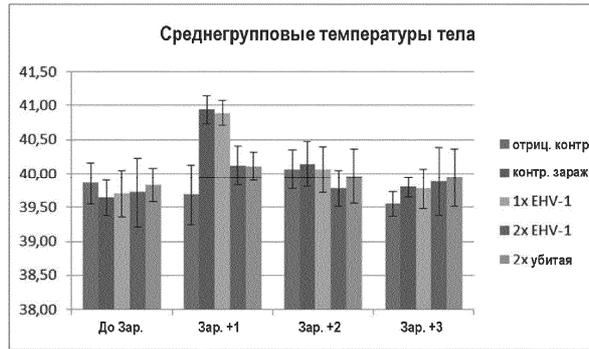
Фиг. 13



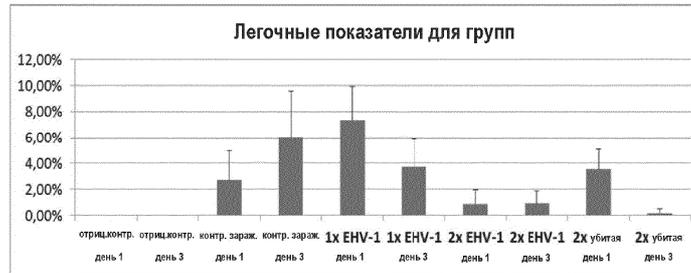
Фиг. 14



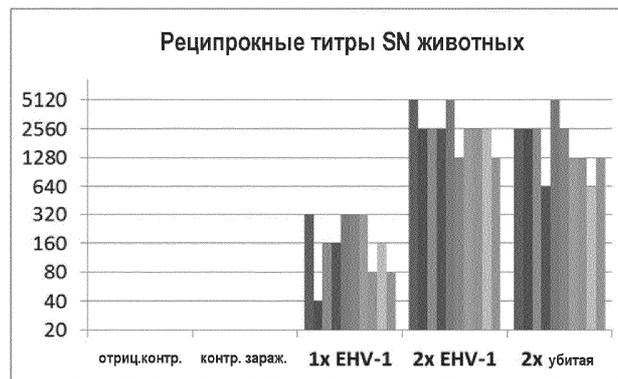
Фиг. 15



Фиг. 16

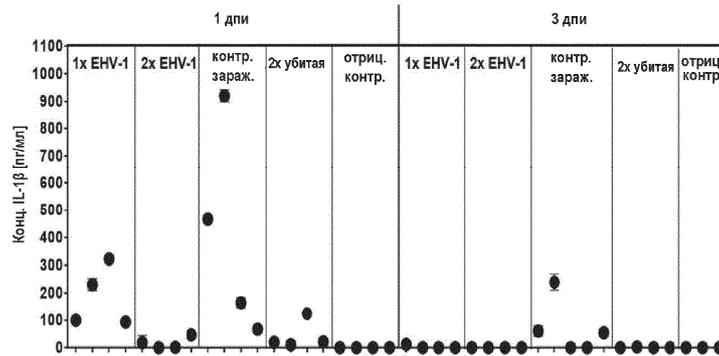


Фиг. 17

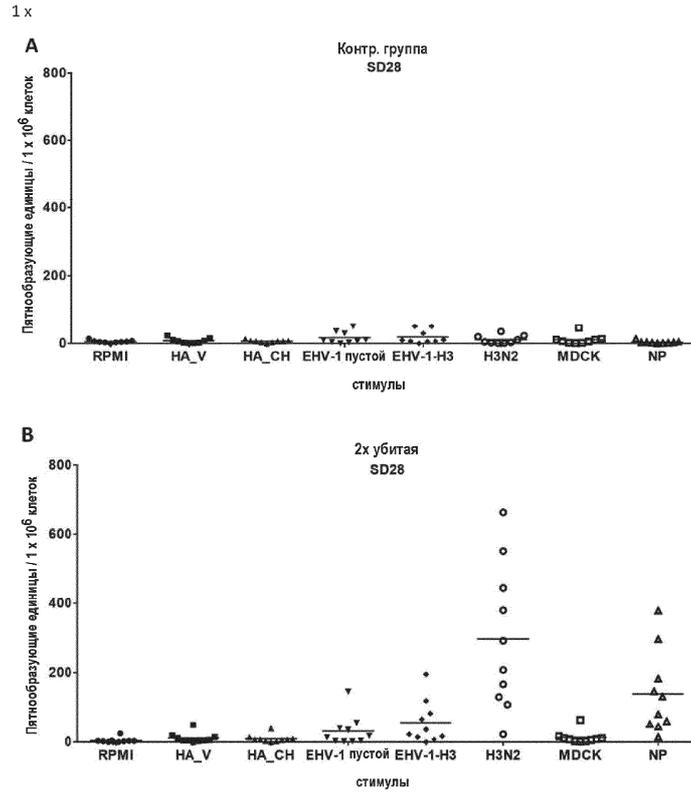


Фиг. 18

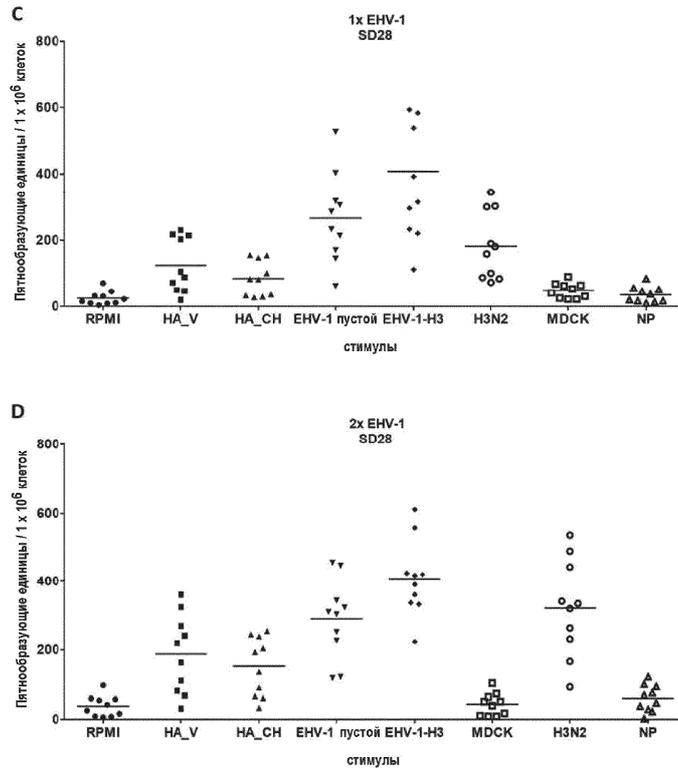
IL-1β-ELISA ИЗ BALF



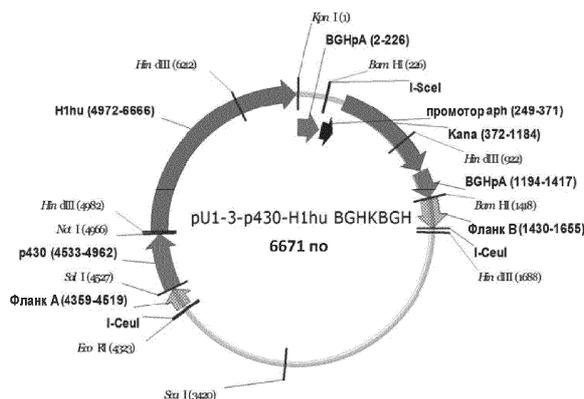
Фиг. 19



Фиг. 20

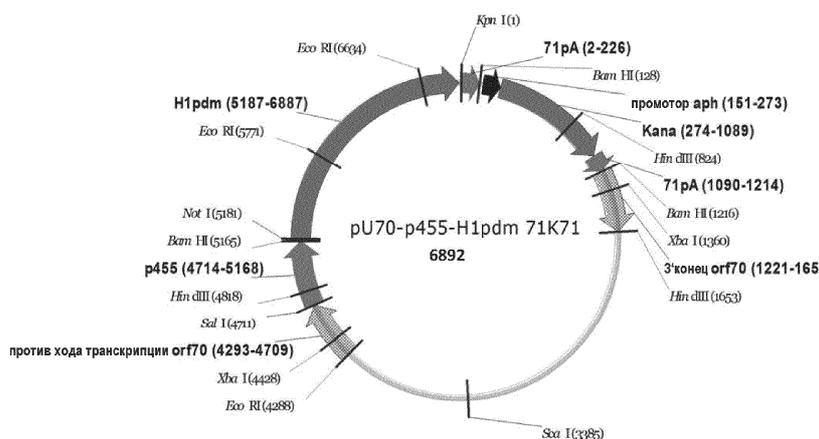


Фиг. 21



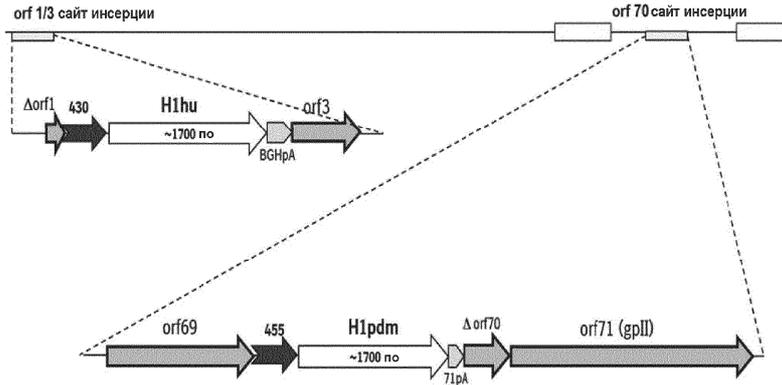
- Фланк А** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания против хода транскрипции
- Фланк В** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания по ходу транскрипции
- p430** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- H1hu** трансген (IAV гемагглютинин)
- BGHrA** последовательность полиаденилирования
- I-Sce1** сайт расщепления для I-Sce1
- I-SceI 1** сайт расщепления для I-SceI
- промотор aph** запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
- Kana** Устойчивая к канамицину *orf*
- Scal, EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 21 (продолжение)

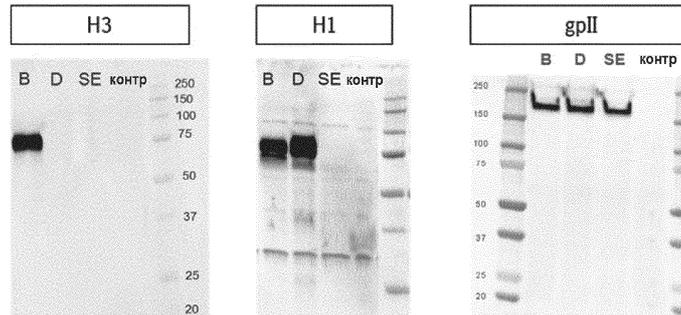


- 3'конец ORF69** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания против хода транскрипции
- 3'конец ORF70** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт встраивания по ходу транскрипции
- p455** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- H1pdm** трансген (IAV гемагглютинин)
- 71pA** последовательность полиаденилирования
- I-Sce1** сайт расщепления для I-Sce1
- промотор aph** запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
- Kana** Устойчивая к канамицину *orf*
- Scal, EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 22



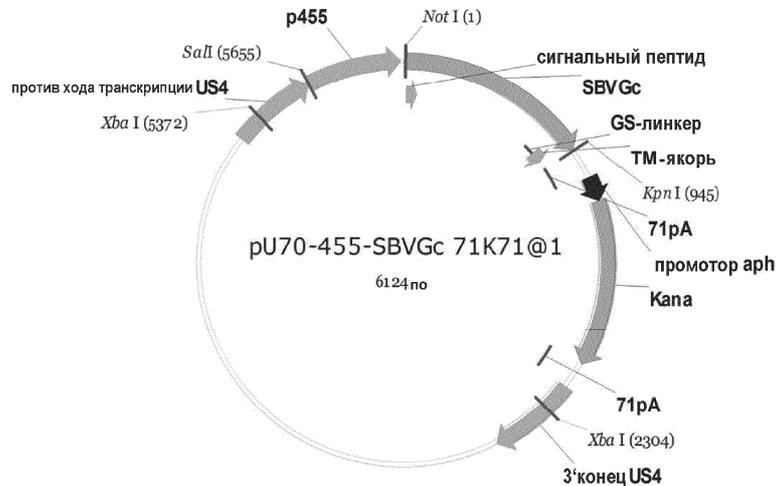
Фиг. 23



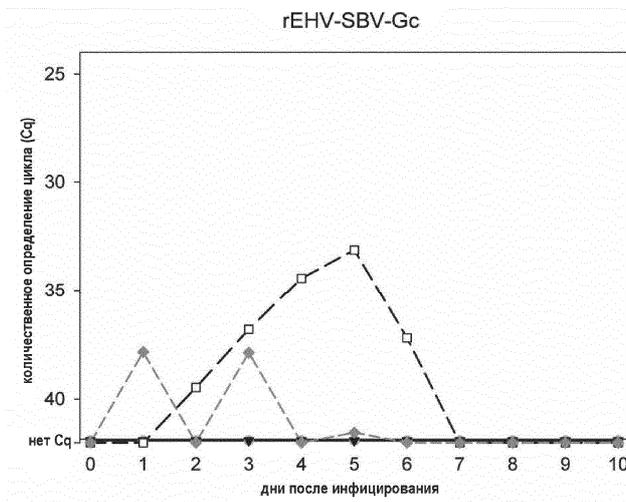
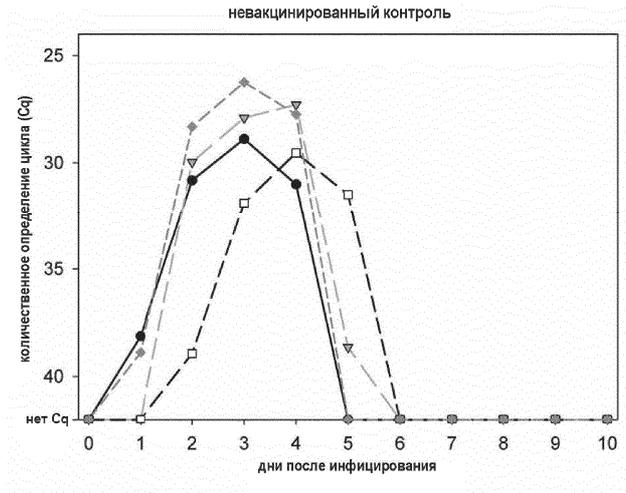
Фиг. 24



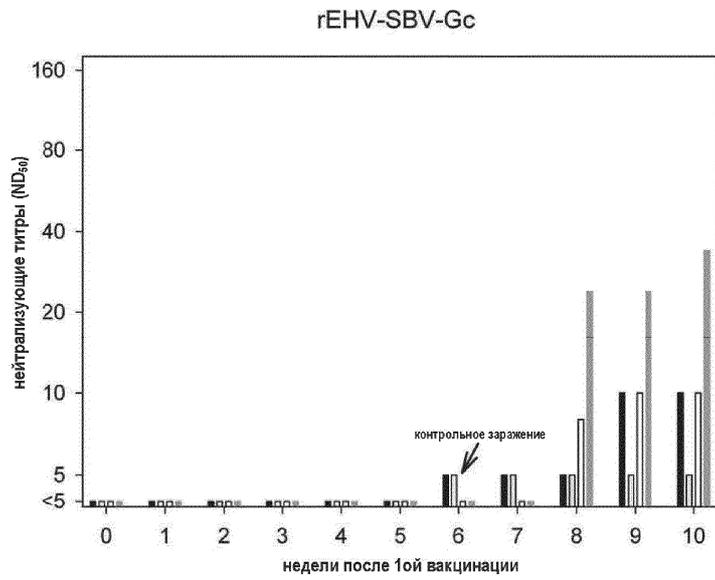
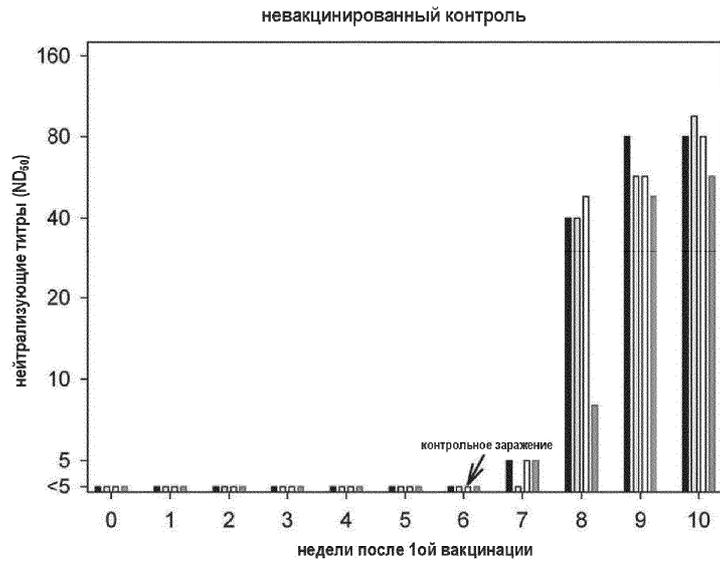
Фиг. 25



Фиг. 26

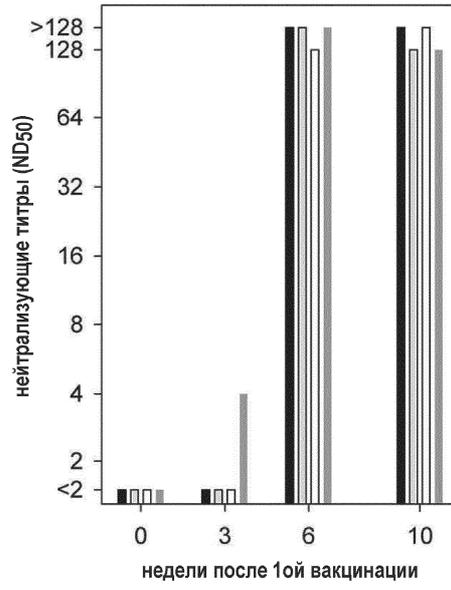


Фиг. 27А



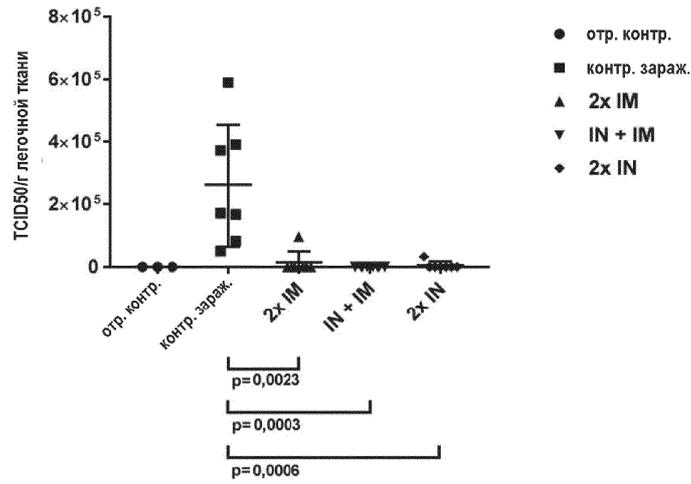
Фиг. 27В

rEHV-SBV-Gc



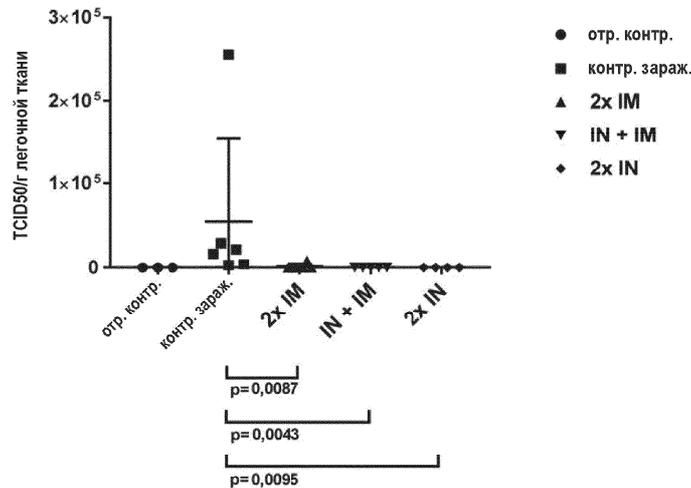
Фиг. 28

Титры вируса в легких СН+1



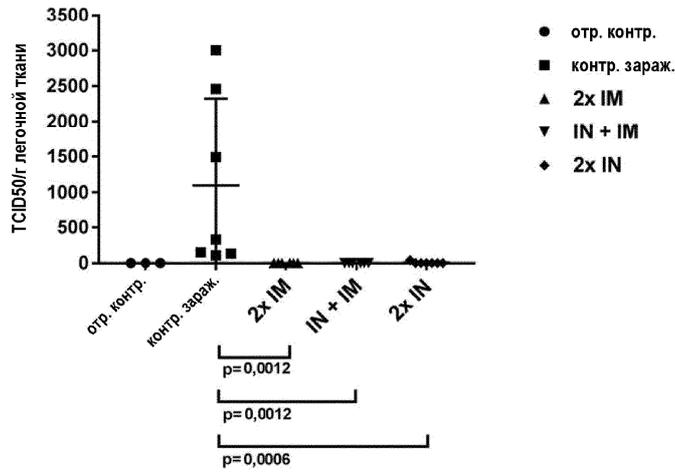
Фиг. 29

Титры вируса в легких СН+3



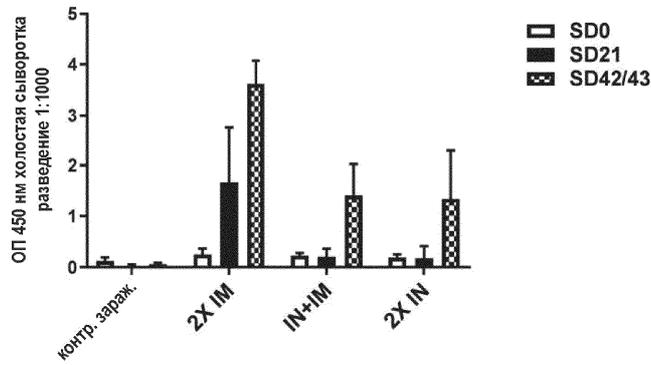
Фиг. 30

Титры вируса в легких СН+5



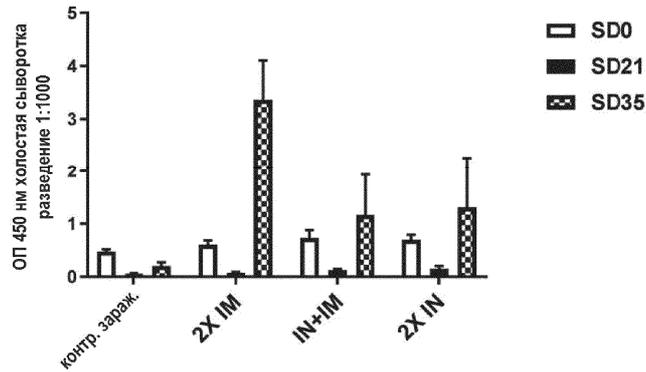
Фиг. 31

Уровни Н3-специфических IgG

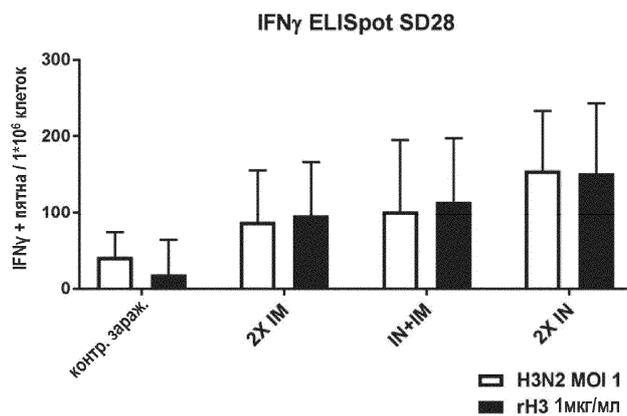


Фиг. 32

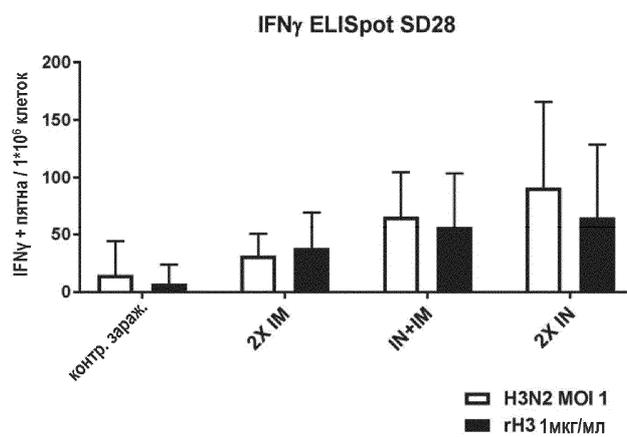
Уровни Н3-специфических IgG



Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35

