



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.17

(21) Номер заявки
201692509

(22) Дата подачи заявки
2015.06.19

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

(54) АТТЕНУИРОВАННЫЙ ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЛИХОРАДКИ СВИНЕЙ (ASF), СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, ВАКЦИНА И СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ASF

(31) 1410971.4

(32) 2014.06.19

(33) GB

(43) 2017.05.31

(86) PCT/GB2015/051798

(87) WO 2015/193685 2015.12.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ ПИРБРАЙТ ИНСТИТЮТ (GB)

(72) Изобретатель:
Абрамс Чарльз, Рис Анна-Луиза,
Нитертон Крис, Диксон Линда,
Чапмен Дэйв, Санчес-Кордон Педро
(GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) DIXON L.K. ET AL.: "Prospects for development of African swine fever virus vaccines", DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS, vol. 135, 14 May 2013 (2013-05-14), pages 147-157, XP009185752, ISSN: 1424-6074 [retrieved on 2013-05-14] page 151, line 8 - page 152, line 23

KATHERINE KING ET AL.: "Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation", VACCINE, vol. 29, no. 28, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 4593-4600, XP055116370, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.052 page 4599, right-hand column, lines 5-10; figures 1-4

D.A.G. CHAPMAN ET AL.: "Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 89, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 397-408, XP055207157, ISSN:

0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.83343-0 tables 1, 2 page 404, right-hand column, paragraph 2

FERNANDO ALONSO ET AL.: "African swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the 32 kDa immediate early protein (vp32)", Virus Research, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 123-130, XP055224804, NETHERLANDS DOI: 10.1016/S0168-1702(97)01459-7 Retrieved from the Internet: URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170297014597/pdf?md5=292ebee285b39f25115ec9155c73c9d5&pid=1-s2.0-S0168170297014597-main.pdf> [retrieved on 2015-10-30] page 124, left-hand column, paragraph 3

WO-A1-2008147799

LAURENCE PIRIOU ET AL.: "Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus", VETERINARY RESEARCH, vol. 34, no. 4, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 389-404, XP055044213, ISSN: 0928-4249, DOI: 10.1051/vetres:2003013 page 402, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1

CHARLES C. ABRAMS ET AL.: "Sequential deletion of genes from the African swine fever virus genome using the cre/loxP recombination system", VIROLOGY, vol. 433, no. 1, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 142-148, XP055110775, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/j.virol.2012.07.021 the whole document

ESCRIBANO JOSE M. ET AL.: "Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts", VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 173, no. 1, 14 November 2012 (2012-11-14), pages 101-109, XP028525465, ISSN: 0168-1702, DOI: 10.1016/J.VIRUSRES.2012.10.012 the whole document

Sonia Ventura: "Strategies of the African Swine Fever Virus to manipulate innate immunity", 1 June 2012 (2012-06-01), XP055224499, Retrieved from the Internet: URL:http://run.unl.pt/bitstream/10362/8028/1/Thesis_SoniaVentura.pdf [retrieved on 2015-10-29] page 146, lines 7-19

(57) Изобретение относится к аттенуированному вирусу африканской лихорадки свиней (ASF), в котором отсутствует функциональный вариант следующих генов: генов полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генов полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R. Изобретение, кроме того, относится к аттенуированному вирусу африканской лихорадки свиней (ASF), в котором отсутствует функциональный вариант гена DP148R. Настоящее изобретение также относится к вакцине, содержащей такой аттенуированный вирус, и к ее применению для профилактики ASF. Кроме того, изобретение относится к интраназальному введению аттенуированного вируса ASF.

Область техники

Настоящее изобретение относится к аттенуированным вирусам африканской лихорадки свиней. Сконструированные вирусы защищают свиней от последующего заражения вирулентным вирусом. Настоящее изобретение также относится к применению таких аттенуированных вирусов для лечения и/или профилактики африканской лихорадки свиней. Изобретение, кроме того, относится к интраназальному введению аттенуированных вирусов африканской лихорадки свиней.

Уровень техники

Африканская лихорадка свиней (ASF).

Африканская лихорадка свиней является изнуряющим геморрагическим заболеванием домашних свиней, вызываемым двунитевым ДНК-вирусом, вирусом африканской лихорадки свиней - вирус (ASFV). ASFV является единственным представителем семейства *Asfarviridae* и реплицируется, главным образом, в цитоплазме клеток. Вирулентные штаммы ASFV могут вызывать гибель домашних свиней в течение примерно 5-14 дней после инфекции с уровнем смертности, достигающим 100%.

ASFV может инфицировать и реплицироваться в организме бородавочников (*Phacochoerus* sp.), кустарниковых свиней (*Potamochoerus* sp.) и мягких клещей вида *Ornithodoros*, но у таких видов почти не наблюдаются какие-либо клинические признаки и могут развиваться длительно персистирующие инфекции. В настоящее время заболевание является эндемичным во многих странах, расположенных к югу от Сахары и в Европе на Сардинии. После его занесения в Грузию в регионе Закавказья в 2007 году ASFV широко распространился в соседних странах, включая Российскую Федерацию. В 2012 году сообщали о первой вспышке на Украине, а в 2013 году - о первых вспышках в Белоруссии. В 2014 сообщалось о новых вспышках у свиней на Украине и выявление среди диких кабанов в Литве и Польше.

В настоящее время лечения ASF не существует. В странах за пределами Африки на национальной основе были предприняты попытки профилактики за счет ограничений в поставках свиней и продуктов из свинины, обязательного кипячения отходов животного происхождения в соответствии с лицензией перед кормлением свиней и применения системы забоя животных при диагностировании заболевания. Профилактика в Африке основана на мерах, позволяющих не допускать к стаду бородавочников и загрязненных ими материалов.

До настоящего времени не были разработаны эффективные аттенуированные или инактивированные вакцины (смотри <http://www.thepigsite.com/pighealth/article/441/african-swine-fever-asf>).

Существует потребность в улучшенных мерах борьбы с инфекцией ASFV и предотвращения распространения заболевания.

Вирус африканской лихорадки свиней (ASFV).

Геном ASFV кодирует пять полигенных семейств (MGF 100, MGF 110, MGF 360 и MGF 505/530), расположенных в пределах терминальных варибельных областей размером 35 т.п.н. слева или 15 т.п.н. справа. MGF составляют от 17 до 25% общей кодирующей емкости генома ASFV. Они не имеют сходства с другими известными генами. Хотя функция отдельных генов MGF не известна, было показано, что семейства MGF 360 и 505 кодируют гены, имеющие важное значение для функции определения круга хозяев, в которую вовлечены стимуляция жизнеспособности инфицированных клеток и подавление ответа интерферона типа I.

Изолят OURT88/3.

OURT88/3 является непатогенным изолятом ASFV из Португалии. Показано, что предшествующая инфекция ASFV OURT88/3 защищает от заражения родственными вирулентными вирусами (Boinas et al. (2004) *J. Gen. Virol.* 85: 2177-2187; Oura et al. (2005) *J. Gen. Virol.* 86: 2445-2450).

Было показано, что Т-клетки CD8+ необходимы для защиты, индуцированной штаммом OURT88/3, так как опосредованное антителами истощение Т-клеток CD8+ отменяет защиту (Oura et al., 2005, выше).

Исследования осуществляли, используя инбредные линии свиней NIH ss и dd. В таких исследованиях контрольную группу из 3 свиней dd и контрольную группу из 6 свиней dd иммунизировали OURT88/3. В первом из таких экспериментов после иммунизации OURT88/3 у одной свиньи dd развивалась временная низкая вирусемия \log_{10} 2-3 ТЦИД 50/мл, но не было лихорадки или клинических признаков заболевания. Наблюдали, что у 3 из 6 инбредных свиней ss, иммунизированных OURT88/3, не было защиты от летального заражения изолятом OURT88/3, тогда как у всех свиней dd были индуцированы защитные реакции. Полученные результаты свидетельствуют, что генетический фон влияет на ответ на инокуляцию OURT88/3.

В последующих экспериментах 5 свиней dd и 5 свиней ss иммунизировали OURT88/3 и заражали OURT88/1 (Takamatsu et al., 2003, неопубликованные результаты). Эксперименты подтвердили, что защитные реакции были индуцированы у всех свиней dd, но не были индуцированы у всех свиней ss после иммунизации OURT88/3, и у некоторых свиней ss была индуцирована хромота.

Следующие эксперименты проводили во Франции с использованием с использованием стада SPF-свиней Anpes. В случае таких свиней, подобно наблюдениям на свиньях ss, у некоторых свиней развивались неблагоприятные реакции, включая временную лихорадку, опухание суставов и хромоту, после иммунизации OURT88/3 (неопубликованные результаты).

Хотя было показано, что OURT88/3 индуцирует защитный иммунный ответ у некоторых животных,

такой эффект, по-видимому, не является универсальным. Иммунизация OURT88/3, по-видимому, не является эффективной для защиты некоторых свиней от последующего заражения. Иммунизация также ассоциирована с индукцией у некоторых свиней неблагоприятных иммунных ответов, таких как опухание суставов.

Поэтому существует потребность в альтернативных кандидатах для вакцины ASFV с улучшенными профилями эффективности и безопасности.

Описание фигур

Фиг. 1 - схематичная диаграмма, показывающая создание рекомбинантного вируса BeninΔMGF с делецией пяти генов MGF 360: 10L, 11L, 12L, 13L, 14L и делецией трех генов MGF 505: 1R, 2R, 3R. Рекомбинантный вирус BeninΔMGF создавали, используя гомологичную рекомбинацию между геном MGF 360 9L и геном MGF 505 4R в геноме Benin 97/1 дикого типа и векторной плазмиде для переноса рΔMGFGUS, приводящую к делеции восьми генов MGF и inserции маркерного гена GUS.

Фиг. 2 - анализ делеций и inserций генов в геномной вирусной ДНК с использованием ПЦР. Вирусную ДНК экстрагировали из Benin 97/1 дикого типа и рекомбинантного вируса BeninΔMGF. Специфичные фрагменты амплифицировали в ПЦР и продукты анализировали в 1%-ном агарозном ТАЕ-геле. Использовали следующие наборы праймеров на дорожке 1 (BeninD8F и BeninD8R), дорожках 2 и 3 (BeninD8F и RGUS), дорожках 4 и 5 (BeninD8INTF и BeninD8INT). Дорожка содержит лэддер ДНК.

Фиг. 3 - анализ последовательности ДНК рекомбинантного вируса BeninΔMGF в сайте делеции/inserции в сравнении с опубликованной последовательностью Benin 97/1 дикого типа. Вирусную гДНК выделяли из клеток, инфицированных BeninΔMGF, и левую фланкирующую область делеции/inserции секвенировали с использованием праймера 9LF, а правую фланкирующую область секвенировали с использованием праймера 4RR. В левой фланкирующей последовательности BeninΔMGF наблюдается inserция последовательностей промотора $\nu p72$, loxP и 5'гена GUS и делеция восьми генов MGF и делеция первых пяти нуклеотидов гена MGF 360 9L, включая стартовый кодон ATG. В правой фланкирующей последовательности BeninΔMGF наблюдается inserция 3' гена GUS и делеция первых семи нуклеотидов гена MGF 505 4R, включая стартовый кодон ATG.

Фиг. 4 - кинетика репликации вирусов Benin 97/1 и рекомбинантного вируса BeninΔMGF. Макрофаги костного мозга свиней инфицировали с высокой множественностью инфекции исходным вирусом BeninΔ97/1 или рекомбинантным вирусом BeninΔMGF. В различных временных точках после инфекции, которые указаны в часах на x-оси, собирали суммарные вирусы и инфекционные вирусы титровали на 96-луночных планшетах, используя анализ гемадсорбции на культурах макрофагов костного мозга свиней. Титр вирусов (ГА₅₀/мл) представлен в виде среднего из трех отдельных наблюдений.

Фиг. 5 - клинические оценки после первой инокуляции. Клинические оценки (y-ось) отдельных свиней в разные дни (x-ось) после инокуляции. Свиньям 16, 18, 19 и 20 инокулировали 10⁴ ТЦИД₅₀ вируса OURT88/3. Свиньям 21, 22, 23 инокулировали 10² ГА₅₀ вируса BeninΔMGFA2. Свиньям 24 и 25 инокулировали 10² ГА₅₀ вируса BeninΔMGFA1. Система клинической оценки, которая создана King с соавторами 2011.

Фиг. 6 - значения температуры после первой инокуляции. Температура (y-ось) у отдельных свиней в разные дни (x-ось) после инокуляции. Свиньям 16, 18, 19 и 20 инокулировали вирус OURT88/3. Свиньям 21, 22, 23 инокулировали вирус BeninΔMGFA2. Свиньям 24 и 25 инокулировали вирус BeninΔMGFA1.

Фиг. 7 - анализы ELISPOT IFN- γ . Мононуклеарные клетки периферической крови, собранные на 20 день после первой инокуляции, стимулировали *ex vivo* либо только средой, либо OURT88/3, либо BeninΔMGF. Результаты показаны в виде продукции IFN- γ на 10⁶ лимфоцитов (y-ось) и по отношению к номеру свиньи (x-ось). Пятна на 10⁶ клеток, продуцированные РВМС, очищенными на 20 день после инокуляции OURT88/3 (свиньи 16-20) или BeninΔMGF (свиньи 21-25) в ELISPOT IFN γ свиней. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение от среднего для лунок в двух повторах. Разбавление 1 содержало в два раза больше клеток, чем разбавление 2.

Фиг. 8 - клинические оценки после бустер-инокуляции. Клинические оценки (y-ось) отдельных свиней в разные дни (x-ось) после бустер-инокуляции. Свиньи 16, 18, 19 и 20 были подвергнуты бустер-инокуляции с использованием 10⁴ ТЦИД₅₀ вируса OURT88/3. Свиньи 21, 22, 23 бустер-инокуляции 10⁴ НАД₅₀ вируса BeninΔMGFA2. Свиньи 24 и 25 были подвергнуты бустер-инокуляции 10⁴ ТЦИД₅₀ вируса BeninΔMGFA1.

Фиг. 9 - значения температура после бустер-инокуляции. Температура (y-ось) отдельных свиней в разные дни (x-ось) после инокуляции. Свиньям 16, 18, 19 и 20 инокулировали 10⁴ ТЦИД₅₀ вируса OURT88/3. Свиньи 21, 22, 23 инокулировали 10⁴ НАД₅₀ вируса BeninΔMGFA2. Свиньям 24 и 25 инокулировали 10⁴ НАД₅₀ вируса BeninΔMGFA1.

Фиг. 10 - клинические оценки свиней после заражения Benin 97/1. Свиней из группы 1 (свиньи 21, 22, 23), группы 2 (свиньи 24, 25), группы 3 (свиньи 16, 18, 19, 20) и невакцинированной группы 4 (свиньи 26, 27, 28) заражали 10⁴ НАД₅₀ вируса 97/1 и регистрировали клинические оценки (y-ось) в разные дни

(х-ось) после заражения.

Фиг. 11 - значения температуры у свиней после заражения Benin 97/1. Свиней из группы 1 (свиньи 21, 22, 23), группы 2 (свиньи 24, 25), группы 3 (свиньи 16, 18, 19, 20) и невакцинированной группы 4 (свиньи 26, 27, 28) заражали 10^4 HAD₅₀ Benin вируса 97/1 и регистрировали температуру (у-ось) в разные дни (х-ось) после заражения.

Фиг. 12 - результаты оценки уровней выживаемости во всех четырех группах свиней. На оси у показан процент свиней, которые выживали после начальной инокуляции (день 0), бустер-инокуляции (день 25) и провокационного заражения (день 46) вирулентным вирусом Benin 97/1. Группы 1 и 2 - ★, группа 3 - ●, группа 4 - □.

Фиг. 13. - анализы ELISPOT IFN- γ . Мононуклеарные клетки периферической крови или клетки гомогената селезенки, выделенные на 63 день после первой инокуляции, стимулировали *ex vivo* либо только средой, либо вирусом Benin 97/1. Результаты показаны в виде продукции IFN- γ на 10^6 лимфоцитов (у-ось) и по отношению к номеру свиньи (х-ось).

Фиг. 14 - процент циркулирующих суммарных лимфоцитов в образцах периферической крови (по сравнению с днем 0), собранных в разные дни после инфекции (х-ось) от свиней, инфицированных OURT88/3 (свиньи 16-20) или Benin Δ MGF (свиньи 21-25).

Фиг. 15 - процент циркулирующих клеток CD4⁺ в образцах периферической крови (по сравнению с днем 0), собранных в разные дни после инфекции (х-ось) от свиней, инфицированных OURT88/3 (свиньи 16-20) или Benin Δ MGF (свиньи 21-25).

Фиг. 16 - процент циркулирующих суммарных клеток CD8⁺ в образцах периферической крови (по сравнению с днем 0), собранных в разные дни после инфекции (х-ось) от свиней, инфицированных OURT88/3 (свиньи 16-20) или Benin Δ MGF (свиньи 21-25).

Фиг. 17 - процент циркулирующих клеток CD8⁺CD4⁻ γ δ TCR- (только CD8) в образцах периферической крови (по сравнению с днем 0), собранных в разные дни после инфекции (х-ось) от свиней, инфицированных OURT88/3 (свиньи 16-20) или Benin Δ MGF (свиньи 21-25).

Фиг. 18 - процент циркулирующих клеток CD8⁺/CD3⁻ в образцах периферической крови (по сравнению с днем 0), собранных в разные дни после инфекции (х-ось) от свиней, инфицированных OURT88/3 (свиньи 16-20) или Benin Δ MGF (свиньи 21-25).

Фиг. 19 - процент циркулирующих клеток гамма-дельта в образцах периферической крови (по сравнению с днем 0), собранных в разные дни после инфекции (х-ось) от свиней, инфицированных OURT88/3 (свиньи 16-20) или Benin Δ MGF (свиньи 21-25).

Фиг. 20 - процент циркулирующих клеток гамма-дельта/CD8⁺ в образцах периферической крови (по сравнению с днем 0), собранных в разные дни после инфекции (х-ось) от свиней, инфицированных OURT88/3 (свиньи 16-20) или Benin Δ MGF (свиньи 21-25).

Фиг. 21 - значения температур у свиней в группах А, В, С, D, E, F в примере 6 в разные дни после иммунизации и провокационного заражения и в контрольной группе G после провокационного заражения.

Фиг. 22 - средние температуры у всех свиней в группах А-F в примере 6 после иммунизации и провокационного заражения показаны на панели А. На панели В показаны средние температуры у выживших свиней в группах А-F и на панели С показаны температуры у не выживших свиней.

Фиг. 23 - клинические оценки свиней в группах А, В, С, D, E, F в примере 6 в разные дни после иммунизации и провокационного заражения и в контрольной группе G после провокационного заражения.

Фиг. 24 - средние клинические оценки всех свиней в группах А-F в примере 6 после иммунизации и провокационного заражения показаны на панели А. На панели В показаны средние температуры у выживших свиней в группах А-F и на панели С показаны температуры у не выживших свиней.

Фиг. 25 - оценка поражений, наблюдаемых при некропсии в разных группах свиней в примере 6. Показаны средние оценки количества поражений, наблюдаемых в разных группах А-F. На панели А показаны оценки макроскопических поражений, на панели В показаны оценки поражений легких и на панели С показаны поражения кожи и поражения скелета и мышц.

Фиг. 26 - индукция мРНК IFN- β разными изолятами ASFV в первичных альвеолярных макрофагах свиней.

Фиг. 27 - серым цветом заштрихована последовательность гена DP148R, которая была делетирована из генома ASFV. Стартовый кодон и стоп-кодон показаны жирным шрифтом. Последовательности, использованные для амплификации левой и правой фланкирующих областей, подчеркнуты. Амплифицированные последовательности находятся между указанными праймерами.

Фиг. 28 - кривые роста Benin 97/1, Benin Δ DP148R и Benin Δ MGF в альвеолярных макрофагах свиней.

Фиг. 29 - температуры у свиней, иммунизированных Benin Δ MGF в дозах HAD₅₀ 10^2 (А), 10^3 (В) и 10^4 (С) с использованием в/м-пути, HAD₅₀ 10^3 с использованием интраназального пути (D) и Benin Δ DP148R в дозе а HAD₅₀ 10^3 с использованием в/м-пути (Е), в разные дни после иммунизации и

провокационного заражения и в контрольной группе (F) после провокационного заражения.

Фиг. 30 - клинические оценки свиней в группах А-Е, которые описаны для фиг. 29, в разные дни после иммунизации и провокационного заражения и в контрольной группе F после провокационного заражения.

Фиг. 31 - средние температуры у всех свиней в группах А-Е, которые описаны для фиг. 29, после иммунизации и провокационного заражения.

Фиг. 32 - средние клинические оценки всех свиней в группах А-Е, которые описаны для фиг. 29, после иммунизации и провокационного заражения.

Краткое описание аспектов изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что делеция пяти генов 10L, 11L, 12L, 13L, 14L полигенного семейства (MGF) 360 и трех генов MGF 505 1R, 2R, 3R, находящихся на левом конце генома вируса ASF, и прерывание двух дополнительных генов (MGF360 9L и MGF 505 4R) приводило к аттенуации вирулентного вируса и индукции 100% защиты от заражения исходным вирулентным вирусом ASFV.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к аттенуированному вирусу африканской лихорадки свиней (ASF), в котором отсутствует функциональная версия следующих генов:

генов 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L полигенного семейства 360 и

генов 1R, 2R, 3R и 4R полигенного семейства 505.

Следующие гены могут быть, по меньшей мере, частично (т.е. частично или полностью) делетированы:

гены 10L, 11L, 12L, 13L и 14L полигенного семейств 360 и

гены 1R, 2R и 3R полигенного семейства 505.

Следующие гены могут быть прерваны:

ген 9L полигенного семейства 360 и

ген 4R полигенного семейства 505.

Авторы изобретения также неожиданно обнаружили, что делеция только одного гена, а именно гена DP148R, из области вблизи правого конца генома вирулентного Benin97/1, приводила к аттенуации вирулентного вируса и не снижала репликацию вируса в макрофагах. В группе из 5 свиней, внутримышечно иммунизированных 10^3 единицами HAD50 BeninADP148R, развивалась временная лихорадка и потеря аппетита в течение 1 или 2 дней на 5 день после иммунизации. Не наблюдали никаких дополнительных клинических признаков после бустер-иммунизации спустя 21 день или при провокационном заражении через 42 дня после первой иммунизации. Все 5 свиней выжили при заражении.

Соответственно изобретение также относится к аттенуированному вирусу африканской лихорадки свиней (ASF), в котором отсутствует функциональный вариант гена DP148R. Ген может быть частично или полностью делетирован или прерван.

Мутация DP148R также может быть получена в комбинации с мутацией генов 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L полигенного семейства 360 и генов 1R, 2R, 3R и 4R полигенного семейства 505, которые описаны в настоящей публикации. Таким образом, в одном варианте изобретение относится к аттенуированному вирусу африканской лихорадки свиней (ASF), в котором отсутствует функциональный вариант следующих генов:

генов 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L полигенного семейства 360; и

генов 1R, 2R, 3R и 4R полигенного семейства 505; и

DP148R.

Вирус может быть получен из изолята вирулентного вируса ASFV. Другими словами, геном аттенуированного вируса согласно изобретению (отличный от генов MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генов MGF 505 1R, 2R, 3R и 4R; и/или DP148R) может соответствовать геному изолята вирулентного вируса ASFV. Аттенуированный вирус согласно изобретению может быть получен посредством делеции/прерывания генов: генов MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генов MGF 505 1R, 2R, 3R и 4R; и/или DP148R; из изолята вирулентного вируса ASFV.

Вирус может быть получен из одного из следующих изолятов вирулентных вирусов ASFV: Georgia 2007/1, Benin 97/1, Kenyan, Malawi Lil20/1, Pretorisuskop/96/4 и Tengani 62.

Вирус может быть получен из Benin 97/1.

Аттенуированный вирус ASF при введении пациенту может индуцировать иммунный ответ, который является защитным от последующего заражения вирулентным вирусом ASF.

Аттенуированный вирус ASF при введении пациенту может индуцировать пониженный опосредованный Т-клетками иммунный ответ по сравнению с иммунным ответом, индуцируемым аттенуированным вирусом OURT88/3. В иммунный ответ может быть вовлечено меньшее количество позитивных по CD8+ Т-клеток $\gamma\delta$.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей аттенуированный вирус ASF согласно первому аспекту изобретения.

Вакцина может содержать множество аттенуированных вирусов ASF с разными генотипами.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к вакцине согласно второму аспекту изобретения для применения при лечении и/или профилактике африканской лихорадки свиней.

Вакцина может индуцировать перекрестный защитный иммунный ответ против множества генотипов вирусов ASF.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу аттенуации вируса африканской лихорадки свиней (ASF), который включает стадию частичного или полного делетирования или прерывания экспрессии следующих генов:

генов полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и

генов полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R.

Следующие гены могут быть частично или полностью делетированы:

гены полигенного семейства 360 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и

гены полигенного семейства 505 1R, 2R и 3R.

Следующие гены могут быть прерваны:

ген полигенного семейства 360 9L и

ген полигенного семейства 505 4R.

Кроме того, изобретение относится к способу аттенуации вируса африканской лихорадки свиней (ASF), который включает стадию частичной или полной делеции или прерывания экспрессии гена DP148R.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения и/или профилактики африканской лихорадки свиней у пациента, который включает стадию введения пациенту эффективного количества вакцины согласно второму аспекту изобретения.

Пациентом может быть, например, домашняя свинья.

Вакцина может быть введена по схеме прайм-буст.

Сконструированный вирус Benin Δ MGF согласно настоящему изобретению имеет несколько преимуществ по сравнению с OURT88/3, например

он является эффективным в отношении индукции защитного иммунного ответа у большей части свиней, чем OURT88/3;

он имеет улучшенный профиль безопасности по сравнению с OURT88/3 и не индуцирует неблагоприятных иммунологических реакций, таких как опухание суставов;

он является более эффективным и является эффективным в более низкой дозе, чем OURT88/3;

он индуцирует "лучший" тип иммунного ответа, чем OURT88/3, так как OURT88/3 индуцирует намного более высокий IFN γ -ответ. Benin Δ MGF вызывает более низкий опосредованный T-клетками ответ, чем OURT88/3.

Сконструированный вирус Benin Δ DP148R согласно настоящему изобретению также имеет несколько преимуществ по сравнению с OURT88/3, например

он имеет улучшенный профиль безопасности по сравнению с OURT88/3, так как не наблюдали поражения легких, скелетно-мышечных поражений или макропоражений при патологоанатомическом вскрытии;

он обладает более высокой эффективностью, чем OURT88/3, так как 100% подвергнутых тестированию свиней были защищены против заражения Benin 97/1.

Кроме того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что интраназальное введение аттенуированного вируса африканской лихорадки свиней (ASF) приводит к улучшенной защите и меньшему количеству побочных эффектов по сравнению с введением внутримышечным путем и может требовать более низкой дозы для обеспечения защиты.

Соответственно в шестом аспекте настоящее изобретение относится к аттенуированному вирусу ASF для применения в лечении и/или профилактике африканской лихорадки свиней, при этом аттенуированный вирус вводят интраназально.

Изобретение, кроме того, относится к способу лечения и/или профилактики африканской лихорадки свиней у пациента, который включает стадию введения эффективного количества аттенуированного вируса ASF пациенту интраназальным путем.

Изобретение также относится к вакцине, содержащей аттенуированный вирус ASF, при этом вакцину готовят для интраназального введения.

Кроме того, изобретение относится к набору для доставки интраназального состава вакцины, содержащего:

а) вакцину на основе аттенуированного вируса ASF и

б) устройство для интраназальной доставки.

Изобретение также относится к устройству для интраназальной доставки, содержащему вакцину на основе аттенуированного вируса ASF.

Аттенуированный вирус ASF может представлять собой любой аттенуированный вирус ASF, такой как OURT88/13, Benin Δ MGF или Benin Δ DP148R.

Подробное описание

Вирус африканской лихорадки свиней (ASFV).

Вирус африканской лихорадки свиней (ASFV) является возбудителем африканской лихорадки свиней (ASF). Вирус вызывает геморрагическую лихорадку с высокой частотой смертности у свиней, но постоянно инфицирует своих природных хозяев, бородавочников, кустарниковых свиней без признаков заболевания. Он также инфицирует мягких клещей рода *Ornithodoros*, которых, как полагают, он использует в качестве переносчика.

ASFV реплицируется в цитоплазме инфицированных клеток и является единственным представителем семейства *Asfarviridae*. ASFV является эндемичным в Африке юнее Сахары и существует в природе, проходя цикл инфекции, включающий клещей и диких свиней, кустарниковых свиней и бородавочников. ASFV впервые был описан после того, как европейские колонисты завезли свиней в области, эндемичные для ASFV, и как таковой является примером "вновь возникающей инфекции".

ASFV является крупным икосаэдрическим двунитевым ДНК-вирусом с линейным геномом, состоящим по меньшей мере из 150 генов. Количество генов немного отличается в разных изолятах вируса. ASFV обладает сходствами с другими крупными ДНК-вирусами, например поксвирусом, иридовирусом и мимивирусом. Подобно другим вирусным геморрагическим лихорадкам, основными клетками-мишенями для репликации являются клетки линии моноцитов, макрофагов.

На основании вариабельности последовательности в С-концевой области гена B646L, кодирующего основной капсидный белок p72, было идентифицировано 22 генотипа ASFV (I-XXII). Все генотипы ASFV p72 циркулировали в Восточной и Южной Африке. Генотип I циркулировал в Европе, Южной Америке, странах Карибского бассейна и Западной Африке. Генотип VIII ограничен четырьмя странами Восточной Африки.

Примеры штаммов некоторых генотипов приведены ниже:

Генотип I: OURT88/3; Brazil/79; Lisbon/60; BA715; Pret; Benin 97/1; IC/1/96; IC/576; CAM/82; Madrid/62; Malta/78; ZAR85; Katange63; Togo; Dakar59; Ourt88/1; BEN/1/97; Dom_Rep; VAL/76; IC/2/96; Awoshie/99; NIG/1/99; NIG/1/98; ANG/70; BEL/85; SPEC120; Lisbon/57; ASFV-Warm; GHA/1/00; GAM/1/00; Ghana; HOL/86; NAM/1/80; NUR/90/1; CAM/4/85; ASFV-Teng; Tegani; ASFV-E75.

Генотип II: Georgia 2007/1.

Генотип III: BOT 1/99.

Генотип IV: ASFV-War; RSA/1/99/W.

Генотип VI: MOZ 94/1.

Генотип VII: VICT/90/1; ASFV-Mku; RSA/1/98.

Генотип VIII: NDA/1/90; KAL88/1; ZAM/2/84; JON89/13; KAV89/1; DEZda; AFSV-Mal; Malawi LIL 20/1.

Генотип IX: UGA/1/95.

Генотип X: BUR/1/84; BUR/2/84; BUR/90/1; UGA/3/95; TAN/Kwh12; HindeII; ASFV-Ken; вирулентный Uganda 65.

Полигенные семейства.

ASFV включает пять полигенных семейств, которые присутствуют в левой и правой вариабельных областях генома. MGF называют в соответствии со средним количеством кодонов, присутствующих в каждом гене: MGF100, 110, 300, 360 и 505/530. N-концевые области представителей MGF 300, 360 и 505/530 имеют значительное сходство друг с другом. Несколько генов в MGF360 и 505/530 определяют диапазон хозяев и вирулентность.

Пять полигенных семейств генома ASFV (MGF 100, MGF 110, MGF 360 и MGF 505/530) локализованы в пределах концевых вариабельных областей длиной 35 т.н., расположенных слева, или длиной 15 т.н., расположенных справа. MGF составляют от 17 до 25% общей кодирующей емкости генома ASFV. Они не имеют сходства с другими известными генами.

Было проведено сравнение полных геномных последовательностей изолята Benin 97/1 (высоко патогенный вирус из Западной Африки, группа 1), изолята OURT88/3 (непатогенный аттенуированный вирус из Португалии, группа 1) и изолята BA71V (адаптированный в культуре клеток Vero непатогенный вирус, группа 1) (Charman et al. (2008) *J. Gen. Virol.* 89: 397-408). Изолят OURT88/3 имеет делецию 10007 п.н. по сравнению с Benin 97/1, простирающуюся от нуклеотида с номером (н. №) 19448 до н. № 29525 в геноме Benin 97/1. В общем, пять генов MGF 360 (10L, 11L, 12L, 13L и 14L) делетированы из генома в OURT88/3. Делетированы два гена MGF 505 (1R, 2R), и ген MGF 505R 3R укорочен у геноме OURT88/3. Указанные гены присутствуют в геномах всех восьми других патогенных изолятов ASFV, которые были секвенированы.

В аттенуированном адаптированном к культуре ткани изоляте BA71V геном содержит ген MGF 505 3R, но в нем отсутствуют семь других генов MGF и, кроме того, он также имеет укороченный ген MGF 360 9L (суммарная делеция 8250 п.н.).

Ранее шесть генов MGF 360 (9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L) и два гена MGF 505 (1R и 2R) были делетированы из высокопатогенного Южно-Африканского изолята Pr4. Такая делеция заметно снижала рост вирусов в первичной культуре клеток макрофагов в 100-1000 раз (Zsak с соавторами 2001, выше) и

приводила к аттенуации вирус (результаты указаны как неопубликованные, Afonso et al. 2004 J. Virol. 78: 1858-1864). Однако не было осуществлено ни одного эксперимента по провокационному заражению выздоровевших свиней для определения того, приобрели ли они защиту. Действительно, на семинаре, посвященном вирусам африканской лихорадки свиней в Институте по исследованию биологической безопасности, Манхэттен, Канзас, в мае 2011 г., было отмечено, что мутант с делецией Pr4 был непротективным и не индуцировал хронической формы заболевания.

Также было показано, что делеция трех генов MGF 360 (12L, 13L и 14L) и четырех генов MGF 505 (1R, 2R, 3R и укорочение 4R) из патогенного вируса Malawi Δ DP71 снижает репликацию вирусов у свиней и дополнительно приводит к аттенуации вируса (Neilan et al. (2002) J. Virol. 76: 3095-3104). Однако также не сообщалось об экспериментах с целью определения того, имеют ли выздоровевшие свиньи защиту от заражения.

Аттенуированный ASFV согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения не имеет функционального варианта следующих генов: генов полигенного семейства 360: 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генов полигенного семейства 505: 1R, 2R, 3R и 4R.

Локализация указанных генов в геномах различных штаммов ASFV показана ниже (табл. 1). Также представлена идентичность последовательности каждого гена соответствующему гену Benin 97/1.

Таблица 1a

MGF 360-9L

Штамм	Номер стартового нуклеотида	Номер стоп-нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	19487	18435	100
Georgia 2007/1	25215	24163	98
BA71V	17495	17057	100
OURT88/3	20355	19937	99
Kenya 1950	29478	28424	86
Malawi-Lil/20	23685	22630	86
Mkuzi 1979	26939	25887	99
Pretorisuskop/96/4	26016	24958	85
Tengani 62	20398	19346	98
Warmbaths	25244	24186	86
Warthog	22020	20962	85
E75	18802	17750	99

Таблица 1b

MGF 360-10L

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп-нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	20677	19607	100
Georgia 2007/1	26438	25368	93
BA71V	Делетирован		
OURT88/3	Делетирован		
Kenya 1950	30628	29563	82
Malawi-Lil/20	24802	23763	91
Mkuzi 1979	28139	27069	99
Pretorisuskop/96/4	27186	26116	96
Tengani 62	21600	20530	92
Warmbaths	26361	25322	94
Warthog	23130	22091	95
E75	19981	18911	100

Таблица 1c

MGF 360-11L

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп-нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	21764	20703	100
Georgia 2007/1	27526	26465	97
BA71V	Делетирован		
OURT88/3	Делетирован		
Kenya 1950	31716	30655	84
Malawi-Lil/20	25892	24831	86
Mkuzi 1979	29225	28164	99
Pretorisuskop/96/4	28275	27214	97
Tengani 62	22688	21627	97
Warmbaths	27449	26388	97
Warthog	24218	23157	97
E75	21068	20007	100

Таблица 1d

MGF 360-12L

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп- нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	24668	23616	100
Georgia 2007/1	30434	29382	96
BA71V	Делетирован		
OURT88/3	Делетирован		
Kenya 1950	34566	33549	90
Malawi-Lil/20	28731	27682	92
Mkuzi 1979	32125	31073	97
Pretorisuskop/96/4	31150	30098	95
Tengani 62	25592	24540	96
Warmbaths	30346	29294	96
Warthog	27088	26036	96
E75	23971	22920	99

Таблица 1e

MGF 360-13L

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп- нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	25901	24840	100
Georgia 2007/1	31656	30595	97
BA71V	Делетирован		
OURT88/3	Делетирован		
Kenya 1950	35812	34757	90
Malawi-Lil/20	29980	28925	91
Mkuzi 1979	33347	32286	99
Pretorisuskop/96/4	32368	31307	95
Tengani 62	26814	25753	95
Warmbaths	31559	30498	95
Warthog	28338	27277	95
E75	25204	24143	99

Таблица 1f

MGF 360-14L

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп- нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	27146	26073	100
Georgia 2007/1	32913	31840	99
BA71V	Делетирован		
OURT88/3	Делетирован		
Kenya 1950	37194	36121	92
Malawi-Lil/20	31266	30193	92
Mkuzi 1979	34620	33547	99
Pretorisuskop/96/4	33598	32525	97
Tengani 62	28056	26983	97
Warmbaths	32820	31747	96
Warthog	29568	28495	97
E75	26449	25376	100

Таблица 1g

MGF 505-1R

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп- нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	21971	23566	100
Georgia 2007/1	27734	29329	95
BA71V	Делетирован		
OURT88/3	Делетирован		
Kenya 1950	31904	33496	91
Malawi-Lil/20	26041	27627	93
Mkuzi 1979	29425	31020	96
Pretorisuskop/96/4	28449	30044	94
Tengani 62	22891	24486	95
Warmbaths	27651	29246	95
Warthog	24387	25982	95
E75	21275	22870	100

Таблица 1h

MGF 505-2R

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп- нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	27352	28932	100
Georgia 2007/1	33119	34699	99
BA71V	17725	19304	99
OURT88/3	29532	29981	76
Kenya 1950	37419	38985	90
Malawi-Lil/20	31541	33121	93
Mkuzi 1979	34826	36406	99
Pretorisuskop/96/4	33795	35374	97
Tengani 62	28261	29830	98
Warmbaths	33029	34597	96
Warthog	29773	31352	97
E75	26655	28236	99

Таблица 1i

MGF 505-3R

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп- нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	29019	29861	100
Georgia 2007/1	34786	35625	96
BA71V	20398	21915	100
OURT88/3	20850	22367	100
Kenya 1950	40295	41815	89
Malawi-Lil/20	34322	35842	89
Mkuzi 1979	37500	39017	99
Pretorisuskop/96/4	36480	37985	89
Tengani 62	30926	32443	90
Warmbaths	35712	37232	93
Warthog	32449	33954	90
E75	29330	30847	100

Таблица 1j

MGF 505-4R

Штамм	Номер стартового кодона	Номер стоп- нуклеотида	Идентичность нуклеотидов, %
Benin 97/1	30026	31543	100
Georgia 2007/1	35796	37316	94
BA71V	20394	21915	100
OURT88/3	20850	22367	100
Kenya 1950	40295	41815	89
Malawi-Lil/20	34322	35842	89
Mkuzi 1979	37500	39017	99
Pretorisuskop/96/4	36480	37985	89
Tengani 62	30926	32443	90
Warmbaths	35712	37232	93
Warthog	32449	33954	90
E75	29330	30847	100

Продукты трансляции указанных генов приведены ниже:

SEQ ID No. 1 - трансляция 360-9L

MVLSLQTLTKKVLASQYPKCHPHFLKCCGLWVHNGPIMYHQKH
 IWTPTYFKNGTNLNAALVKAVEENNHDLELFTWEGANINYGLLSVNTHTRDLCRQLG
 AKEQLNDQEIILRFFYTLKRDLTSSNIIFCHEVFSNNPILDTINRFEVKGMIYEQLEGL
 MVETDILSEMFTKYWYAMAIEFNLKEAICYFYQRYAHLHRWRLMCALEFYNNVFDLHEL
 YAKERVRMDMELRWACRKNYNYLTIYYCCVALGADINQAMFHSIQFYINIGNIFFCI
 DLGANAFEEGKTLAHQKDNSFIASMLSLNCYSMNDSLSLKETDPEVIKRLKDYHSHN
 LSI AHKHYINDGFNDI

SEQ ID No. 2 - трансляция 360-10L

MVPSLQSF AKKVLASQHVSI DYHVILERCGLWVYKAPISLDCKH
 MLIKLPNFADGLDLNTALMLATKENNYQLIKMFTDWGADINYG LICANTPP IREFCWE
 LGAKYQVDKCKIMHIFFKLIHPNTTSNNIILCLKFFNDNPFSAVYI IREIKS CIHWKL
 KNLAEDTNVLSNISDGDMLTIYCFIVALQDNLREAISYVYQHFYKYLNTWWLTALCYN
 KLFDLHNLYEKEKIRMDMEMRIACTKDNNFLTIIYCFILGANINLAMIASIRFYNM
 DNLFFCIDLGADAFEAKALAEQQNYLISHRLSLDIYSPDSSLTLKEADPNKIYRL
 LKNYKSKMLAYLNYDINDTSL

SEQ ID No. 3 - трансляция 360-11L

MLPSLQSLTKKVLQAGQCVSDHYHILKCCGLWVHNGPIMLHIRR
NKLFIIRSTCFSSQGIELNIGLMKAVKENNHDLIKLFTEWGADINYGMIKALCENTRDLCL
KELGAKAYLEREYILKIFFDTRDKTSSNIIFCHEVFSNPNLRIDNLDLARGEIMWE
LRGLMEITFMLDHDDSFSTVLTQYWAIAVDYDLKDAIRYFYQKYPRLHRWRLMCALEF
YNNVFDLHELIEIERVRMDIDEMMHIACIQDYSYSAIYYCFIMGANINQAMLVSIQNY
NLGNLFFCIDLGANAFEEGKALAEQKENYLIHAHALSLKHYNPVISLLSNVMDPEKINY
MLKNYHSINMGIFLDYEQR

SEQ ID No. 4 - трансляция 360-12L

MLPSLQSLTKKVLQAGQCVPTNQHYLLKYDLWVYNAPITFDHNL
RLIKSSGIKEGLDNLNTALVKAVRENNYSLIKLFTEWGADINYLVSVNTEHTRDLQCE
LGAKELNEEELQIFIDLKFKHTSSNIIICHEVFSNPNILQKVNMLKRIEIFWELR
ELIEKTDLLNNEFLSTLLKYWAIAVRYSLKEAIQYFYQKYTHMNTWRLTALCFN
NVFDLHEAYEKDKIHMDIEEMRIACIKDHNLSMYYCYMLGANINQAMLTSIQYINI
ENMFFCMDLGADVFEETGALGEGYELIKNILSLKIYSPTTIPLPKSTDPETIDHALK
NYFSKNMMIFLSYDLR

SEQ ID No. 5 - трансляция 360-13L

MSPSLQSLTKKTVASQCLSIDHECILKYCGLWVHDAPLKLCM
DRGRIQIKSGFLGEDIDLVALI IAVKENNYSLIKLFTEWGANINYSLLSINTKHIRE
LCRQLGAKETLEDNDIFRIFTRIMHNKTSGSIICHEIFMNNPMLENKFVILQRLGIY
KRLWGLIEIKETDELNDLLVKYWAIAVQYVCKNAICFLDEKYTDLNEWRLKCLLYYN
KIYELHEMYHKKKQIDVHDMICLACAKDNNLLTIYYCYALGGNINQAMLSVQYVNV
GNIFFCIDLGGNAFEEGRAIAEQKGYNFLSHSLTLDIYSSDASLPLNLKDPEKISSLL
KDYKSKNLSIWEYSHNIL

SEQ ID No. 6 - трансляция 360-14L

MLSLSLQTLAKKVVACNYLSSDYDYLQRFGLWVWDLGPIHLCNNCK
QVFSYKHLQCFSEDDLCEAALVKAVKSDNLELIRLFDVWGANPEYGLIRVPAVYLKR
LCAELGGLTPVSEPRLEILKEVANLKSAGVLLGYDMFCHNPLETTRTTLDTVTY
TCSNIPLTGDTAHLTLTKFWFALALRHNFTKAIHYFYKRHNQLYWRVACSLYFNINIF
DIHELCREKEICISPNLMMKFAFLREKNYAAIYYCHRLGASLDYGMNLSIYNNTLNM
FFCIDLGAADFRAQLIAHKAYMNLNSNIFLVKQLFSRDVTLVLDVTEPQEIYDMLKT
YTSKNMKRAEYELTAHPEIIVID

SEQ ID No. 7 - трансляция 505-1R

MFSLQNLCKRKLTPDCKLPEFFDDYIILQLLGLYWHNGTIQRAGN
NCVLIQOHTLIPVNEALRIAASEENYEVGLLLAWEGNLYYAIIGALEGNRYNLIRKY
DDQIKDHHDILPFIDDPFIHFKCHIMRRCFFDCILYQAVKYSKFRVLLYFKYTLEDDL
PLVHLLIEKACEDHNYEVIKWIYENLHVCHIDTFDCAIAHKDLRLYCLGYTFIYNRI
VPYKHHLDILILSSLQLLHKVAAGYLDFILETLKYDHNIDNLDVILTQAATYNHRK
ILTYFIPQSTYAQIEQCLFVAIKTKSSKTLNLLLSHLNLSIKLIQKISQYVATFNST
NIIGILSMKRKKIYLDIILTKFVKNAIFNKFVVRMERSINPERIVKMAARINKMM
LVKKISEHVWKNHAARLKHKLHAVHTMKHKDGKNRLMNFIEHCYHYMQGEEIFSLAR
FYAIHHPKLFDFVFNCCILDITRFSKLLLDLDCSHIIGKNAHDATNINIVNKYIGNLFA
MGVLSKKEILQDYPSIYSKHYMP

SEQ ID No. 8 - трансляция 505-2R

MFSLQDLCKRHLFILPDVFGHEVLRQLGLYWRCHGSLQRIGDDH
ILIRDLILSTNEALRMAGEEGNNEVVKLLLLWKGNLHYAVIGALQGDQYDLIHKYEN
QIGDFHFILPLIQDANTFEKCHALERFCGVSCLLKHATKYNMLPILQKYQEELSMRAY
LHETLFEACLWQRYDVLKWIETMHVYDLKIMFNIAISKRDLTMYSLGYIFLFDGRN
TEATLLTQHLEKTAAGLLHFVLETLKYGGNIDTVLTQAVKYNHRKLLDYFLRQLPRK
HIEKLLLLAVQEKASKTLNLLLSHLNYSVKRIKLLRYVIEYESTLVIKILLKRVN
LIDAMLEKMVRYFSATKVRTIMDELSISPERVIKMAIQMRTDIVIHTSYVWEDDLER
LTRLKNMVYTIKYEHGKMLIKVMHGIYKNLLYGEREKVMFHLAKLYVAQNAATQFRD
ICKDCYKLDVARFKPRFKQLILDCLIVTKKSCYSILEILEKHIISLFTMKVMTEEBEK
NLICLEILYKVIHYKTIQC

SEQ ID No. 9 - трансляция 505-3R

MSSSLQELCRKKLPDCILPEFFDDYVLQLLGLHWQDHGSLQRIE
 KNQILVQQEPIHINEALKVAASEGNYEIVELLLSWEADPRYAVVGALESKYDYLVYKY
 YDLVKDCHDILPLIQNPETFEKCHELNPCSLKCLFKHAVIHDMLPILQKYTYFLDGW
 EYCNQMLFELACSKKKYEMVVWIEGVLGIGKVTSLFTIAISNRDLHLYSLGHLIILER
 MQSCGQDPTFLLNHFLRDVSIKGLLPFVLKTEYGGSKETAITLAKKYQHKHILKYFE
 TGKC

SEQ ID No. 10 - трансляция 505-4R

MFSLQDTCRKYLFQLPDSFDEYTLQVLGLYWEKHGSLQRIRKDA
 VVVQRNLIISINEALRIAASEGNRNVKLLLSWEGNFHYVIIIGALEGDHYDLIHKYGS
 QIEDYHMLSSIHNTANFEKCHELSNCDMWCLIQNAIKYNMLPILQKRNILTHEGEN
 QELFEMACEEQKYDIVLWIGQTLMLNEPEFIFDIAFERIDFSLTMTGYSLLFNKMS
 IDIHDEEDLISLLTEHLEKAATKGCFFMLETCLKHGGNVMAVLSKAVEYNHRKILDY
 FIRQKCLSRKDIEKLLVAISNSASKKTLNLLSYLNHSVKNIIGKIVQSVLKNDFDT
 IIFLKKKINLVEPALIGFINYYSYCFLEQFIHEFDIRPEKMIKMAARKGKLNMI
 EFLNEKYVHKDDLGAIFKFLKNLVCTMKHKKGKETLIVLIHKIYQVIQLETKKFKLL
 RFVYMHDAIQFISMYKDCFNLAGFKPFLLECLDIAIKKNYPMIRNIETLLKCE

Полный геном патогенного изолята вируса африканской лихорадки свиней Benin 97/1 приведен в Genbank Locus: AM712239.1.

В результате исследования, описанного Чапман с соавторами (2008, выше), было определено, что полный геном изолята BA71 кодирует 151 открытую рамку считывания (ORF), изолят Benin 97/1 кодирует 157 ORF и изолят OURT88/3 кодирует 151 ORF.

Согласно другому варианту осуществления изобретение относится к аттенуированному ASFV, в котором отсутствует функциональный вариант гена DP148R.

Мутация DP148R может получена отдельно или в сочетании с мутациями генов полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генов полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R, которые описаны в настоящей публикации. Такое сочетание генных мутаций может приводить к улучшенному профилю безопасности для аттенуированного вируса.

DP148R локализован в положениях генома от 177915 до 178679 в геноме Benin 97/1. Последовательность белка:

Benin 97/1 177915-178679 - SEQ ID No. 11

MQNKIPNFNLFVFFLYRMLEIVLATLLGDLQRLRVLTPQQRAVAFFRANTKELEDFLR
 SDGQSEELSGPLLNRLLEPSCPLDILTGYHLFRQNPQKAGQLRGLEVKMLERLYDANIYNILS
 RLRPKVRNKAIELYWVFRAIHICHAPLVLDIVRYEEDFAELAFICAAAYFGEPQVMYLLYKY
 MPLTRAVLTDAIQISLESNNQVVICYAYLMGGSLKGLVSAPLRKRLRAKLSQRKKKDVLSPH
 DFLLLLQ.

Ортологичные последовательности DP148R из других геномов имеют идентичность аминокислот от 74 до 99%. Ортологичные гены DP148R из других изолятов ASFV локализованы с следующих положений:

Warthog: от 181103 до 181549 - SEQ ID No. 12

MLERLYDANIYNILSRLEKVRNKAVELYWVFRAINMCHAPLVLDIVRYEEDFAEL
 AFICAAAYFGEPQVMYLLYKYMPLTRAVLTDAIQISLESNSQVVICYAYLMGGSLKGLVRAPLR
 KRLRAKLSQRKKKDVLPHPDFLLLQ

Kenya: от 189417 до 189872 - SEQ ID No. 13

MLERLYDANIYNMLARLPELVVRDKAIELYWLFRAILMCHSPLVLEIVRHETMDFAE
 TAFICAAAYFSEPPQVMYALYKFIPIISRAVLADAIQMCLESNSEAGICYAYLMGGSLKGLVPGSLR
 KRLRASPLRQERKKKNVLPPEHFLMLHGI

Malawi LIL20/1: от 183687 до 184346 - SEQ ID No. 14

MQRAVAFFRVNTKELEDFLYDPDQSEELLPGLLNRLLEPSGPIIDILTGYHLFRENPK
 AGRLEKLEKLLERLYDANIYNMLAQIRPELVRIKAIELYWLFRAILMCHSPLVLEIVRHETM
 DFAELAFICAAAYFSEPPQVMYALYKFIPIISRAVLADAIEMSLESNSSETGICYAYLMGGSLKGLV
 PGPLRKRRLRASPLRQERKKKNVLPPEHFLMLHGI

Mkuzi: от 185751 до 186515 - SEQ ID No. 15

MQNKIPNFNLFVFFLYRMLEIVLATLLGDLQRLRVLTPQQRAVAFFRANTKELEDFLC
 SDGQSEELSGPLLNRLLEPSCPLDILTGYHLFRQNPQKAGQLRGLEVKMLERLYDANIYNILS
 RLRPKVRNKAIELYWVFRAIHICHAPLVLDIVRYEEDFAELAFICAAAYFGEPQVMYLLYKY
 MPLTRAVLTDAIRISLESNNQVVICYAYLMGGSLKGLVSAPLRKRLCAKLSQRKKKDVLSPH
 DFLLLLQ

Pretoriskup: от 185416 до 185862 - SEQ ID No. 16

MLERLYDANIYNILSRLEKVRNKAVELYWVFRAINMCHAPLVLDIVRYEEDFAEL
 AFICAAAYFGEPQVMYLLYKYMPLSRVLTDAIQISLESNSQVVICYAYLMGGSLKGLVRAPLR
 KRLRAKLSQRKKKDVLPHPDFLLLQ

Tengani: от 180112 до 180558 - SEQ ID No. 17

MLERLYDANIYNILSRLRPEKVRNKAVELYWVFRAINMCHAPLVLDIVRNEELDFAEL
AFICAAYFGEPQVMYLLYKYMPLTRAVLTDAIQISLESNSQVIGICYAYLMGGSLKGLVRAPLR
KRLRAKLRQRKKKDVLPSPHDFLLLLQ

Warmbaths: от 184606 до 185052 - SEQ ID No. 18

MLERLYDANIYNILSRLRPEKVRNKAEELYWVFRAIHICHAPLVLDIVRYEEDFAEL
AFICAAYFGEPQVMYLLYKYMPLTRAVLTDAIRISLESNNQVIGICYAYLMGGSLKGLVSAPLR
KRLRAKLRQRKKKDVLPSPHDFLLLLQ

OURT88/3: от 169146 до 169592 - SEQ ID No. 19

MLERLYDANIYNILSRLRPEKVRNKAEELYWVFRAIHICHAPLVLDIVRYEEDFAEL
AFICAAYFGEPQVMYLLYKYMPLTRAVLTDAIQISLESNNQVIGICYAYLMGGSLKGLVSAPLR
KRLRAKLRQRKKKDVLPSPHDFLLLLQ

Изоляты вируса ASF.

Аттенуированный ASF вирус согласно настоящему изобретению может быть получен из изолята вируса ASF дикого типа, но содержит мутацию в своем геноме, так что следующие гены полностью или частично делетированы или иным образом сделаны нефункциональными: гены MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и гены MGF 505 1R, 2R, 3R и 4R; и/или ген DP148R.

Термин "дикий тип" указывает, что вирус существовал (в определенный период времени) в природе и был выделен из природного хозяина, такого как домашняя свинья, клещ или бородавочник. В табл. 2 ниже перечисленные известные изоляты вирусов ASF.

Структура генома ASFV известна в данной области и подробно описана Чарпан с соавторами (2008), J. Gen. Virol. 89:397-408.

Термин "соответствует" означает, что остальная часть генома такая же или, по существу, такая же, как и у штамма дикого типа. Таким образом, геном аттенуированного вируса согласно настоящему изобретению может содержать гены штамма дикого типа, отличные от генов MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генов MGF 505 1R, 2R, 3R и 4R; и/или гена DP148R.

Геном аттенуированного вируса может содержать ORF, консервативные во всех доступных 10 геномных последовательностях, и полностью или частично делетированные или иным образом сделанные нефункциональными: гены MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и гены MGF 505 1R, 2R, 3R и 4R; и/или ген DP148R.

Геном аттенуированного рекомбинантного вируса ASF согласно изобретению может соответствовать геному вирулентного штамма вируса ASF (с исключенными генами MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генами MGF 505 1R, 2R, 3R и 4R; и/или геном DP148R).

Изоляты вирусов африканской лихорадки свиней, описанные до настоящего времени, суммированы в табл. 2, вместе с указанием их номеров доступа в Genbank.

Известные вирулентные штаммы вирусов ASF включают Georgia 2007/1, Benin 97/1, Kenyan, Malawi Lil20/1, Pretorisuskop/96/4 и Tengani 62.

Таблица 2

Изолят	Страна	Хозяин	Год	Вирулентность	№ доступа в GenBank
Georgia 2007/1	Грузия	Домашняя свинья	2007	Высокая	FR862468
BA71qqV	Испания	Домашняя свинья	1971	Адаптированный в культуре ткани	U18466
Benin 97/1	Испания	Домашняя свинья	1997	Высокая	AM712239
OURT88/3	Португалия	Клещ	1988	Низкая	AM712240
Kenya	Кения	Домашняя свинья	1950	Высокая	AY261360
Malawi Lil20/1	Малави	Клещ	1983	Высокая	AY261361
Mkuzi	Намибия	Клещ	1978	Неизвестная	AY261362
Pretorisuskop/96/4	Южная Африка	Клещ	1996	Высокая	AY261363
Tangani 62	Малави	Домашняя свинья	1962	Высокая	AY261364
Warmbaths	Южная Африка	Клещ	1987	Неизвестная	AY261365
Warthog	Намибия	Бородавочник	1980	Неизвестная	AY261366

Геном аттенуированного рекомбинантного вируса ASF согласно изобретению (с исключенными генами MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генами MGF 505 1R, 2R, 3R и 4R; и/или геном DP148R)

может соответствовать геному изолята Benin 97/1 изолят.

Геном аттенуированного рекомбинантного вируса ASF согласно изобретению (с исключенными генами MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генами MGF 505 1R, 2R, 3R и 4R, и/или DP148R) может соответствовать геному штамма вируса ASF, вирулентность которого в настоящее время неизвестна, например Mkuzi, Warmbaths и Warthog.

Настоящее изобретение также относится к композиции вакцины, которая содержит множество аттенуированных вирусов ASF. Множество аттенуированных вирусов ASF может соответствовать множеству разных изолятов, например разных изолятов с высокой или неизвестной вирулентностью.

Такая композиция вакцины может вызывать перекрестный защитный иммунный ответ на несколько или, по существу, на все вирусы ASF.

Делеции.

Аттенуированный вирус африканской лихорадки свиней (ASF) согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения не имеет функционального варианта следующих генов:

генов полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и

генов полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R.

Гены могут быть, например, полностью или частично делетированы.

В частности, следующие гены могут быть, по меньшей мере, частично делетированы:

гены полигенного семейства 360 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и

гены полигенного семейства 505 1R, 2R и 3R.

В другом варианте настоящее изобретение относится к аттенуированному ASFV, который не имеет функционального варианта DP148R. Ген может быть полностью или частично делетирован.

Делеция может быть непрерывной или может включать в себя множество участков последовательности. Делеция должна удалять достаточное количество нуклеотидной последовательности, так чтобы ген больше не кодировал функциональный белок. Делеция может, например, удалять по меньшей мере 50, 60, 70, 80 или 90% кодирующей части гена.

Делеция может быть полной, и в таком случае отсутствует 100% кодирующей части гена по сравнению с соответствующим геномом изолята дикого типа.

Прерывания.

В аттенуированном вирусе африканской лихорадки свиней (ASF) согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения один или несколько следующих генов могут быть прерваны:

гены полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и

гены полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R.

В частности, могут быть прерваны следующие гены:

ген полигенного семейства 360 9L и

ген полигенного семейства 505 4R.

В другом варианте настоящее изобретение относится к аттенуированному вирусу ASF, в котором ген DP148R прерван.

Ген может быть прерван, например, в результате делеции или иной модификации стартового кодона ATG гена.

Геном может содержать одно или несколько изменений нуклеотидов, которые исключают экспрессию гена. Например, экспрессия гена может быть исключена в результате сдвига рамки или введения одного или нескольких стоп-кодонов в открытую рамку считывания гена или в результате модификации стартового сайта трансляции.

Прерывание может вызывать эффект, когда ген не транскрибируется и/или не транслируется.

Функциональные гены.

Как указано выше, была определена полная геномная последовательность аттенуированного штамма ASFV OURT88/3, и проведено ее сравнение с геномной последовательностью вирулентных вирусов (Charman с соавторами, 2008, выше). В дополнение к вышеупомянутым делециям штамм OURT88/3 также имеет прерывания в 3 других генах: EP402R, EP153R и DP148R (ранее называемый MGF360 18R).

EP402R кодирует белок CD2v, который включается в наружный слой вируса и может играть роль в проникновении и распространении вируса. Он также может быть мишенью антител, которые подавляют инфекцию. EP153R является лектином С-типа. DP148R ингибирует интерферон типа I.

Геном аттенуированного вируса согласно настоящему изобретению может содержать полные, непрерывные и функциональные варианты одного или нескольких генов EP402R и EP 153R. В аттенуированном вирусе согласно настоящему изобретению оба указанных гена могут быть полными, непрерывными и функциональными.

Вакцина/фармацевтическая композиция.

Настоящее изобретение также относится к вакцине, содержащей аттенуированный вирус ASF согласно изобретению.

Термин "вакцина", который использован в настоящем описании, относится к препарату, который при введении пациенту индуцирует или стимулирует защитный иммунный ответ. Вакцина может придавать организму иммунитет к конкретному заболеванию, в данном случае к ASF. Таким образом, вакцина

согласно настоящему изобретению индуцирует иммунный ответ у пациента, который обеспечивает защиту от последующего заражения вирусом ASF.

Вакцина может содержать множество аттенуированных вирусов ASF с разными генотипами. Такая вакцина может быть способна индуцировать перекрестный защитный иммунный ответ против множества генотипов вирусов ASF.

Вакцина может быть использована для профилактики африканской лихорадки свиней.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит один или несколько аттенуированных вирусов ASF согласно изобретению. Фармацевтическую композицию можно использовать для лечения африканской лихорадки свиней.

Вакцина или фармацевтическая композиция может содержать один или несколько аттенуированных вирусов ASF согласно изобретению и необязательно один или несколько адъювантов, эксципиентов, носителей и разбавителей.

Иммунизация с использованием OURT88/3 индуцирует высокий ответ IFN γ , что свидетельствует о том, что он опосредован Т-клетками. Аттенуированный вирус согласно настоящему изобретению, по-видимому, индуцирует пониженный опосредованный Т-клетками ответ (см. фиг. 7 и 13). Таким образом, аттенуированный вирус согласно настоящему изобретению, по-видимому, индуцирует более "полезный" (т.е. в большей степени защищающий) клеточный иммунный ответ, чем OURT88/3.

Аттенуированный вирус согласно настоящему изобретению может индуцировать пониженный опосредованный Т-клетками ответ по сравнению с OURT88/3. Способы анализа и сравнения опосредованных Т-клетками ответов известны в данной области, например, с использованием анализа пролиферации Т-клеток в ответ на антиген (например, количество клеток, включение тимидина или включение BrdU), анализа секреции цитокинов и/или экспрессии в ответ на антиген (например, ELISA, ELISPOT, проточная цитометрия) или определение субпопуляций лимфоцитов, имеющих после инокуляции вируса пациенту (например, с использованием проточной цитометрии).

Аттенуированный вирус согласно настоящему изобретению может индуцировать иммунный ответ, включающий меньший процент циркулирующих клеток гамма-дельта/CD8+, и/или меньший процент CD8+/CD4- $\gamma\delta$ TCR- (только CD8-клетки), и/или меньший процент клеток CD8+/CD3- (NK) по сравнению с OURT88/3.

Способы профилактики/лечения.

Настоящее изобретение также относится к способу профилактики и/или лечения ASF у пациента путем введения эффективного количества аттенуированного вируса, вакцины или фармацевтической композиции согласно изобретению.

Подразумевается, что термин "профилактики" относится к предотвращению, задержке, воспрепятствованию или затруднению возникновения ASF. Вакцина может, например, предотвращать или уменьшать вероятность проникновения инфекционного ASFV в клетку.

Подразумевается, что термин "лечение" относится к уменьшению или облегчению по меньшей мере одного симптома существующей инфекции ASF.

Пациентом может быть любое животное, которое чувствительно к инфекции ASF. Чувствительные к ASF животные включают домашних свиней, бородавочников, кустарниковых свиней и клещей.

Пациентом, вакцинируемым согласно настоящему изобретению, может быть домашняя свинья.

Введение

Вакцина согласно изобретению может быть введена любым подходящим путем, таким как внутримышечная инъекция. Другие подходящие пути введения включают интраназальное, пероральное, подкожное, трансдермальное и вагинальное (например, во время искусственного осеменения). В одном варианте пероральное введение включает добавление вакцины в корм животных или питьевую воду. В другом варианте вакцина может быть добавлена в приманку для дикого животного, например в приманку, подходящую для кабанов, диких свиней, кустарниковых свиней или бородавочников.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что аттенуированный вирус Benin Δ MGF согласно изобретению является эффективным при более низкой дозе, чем OURT88/3. Например, в примере 3, свиньи получали 10^2 HAD Benin Δ MGF, что было сравнимо с дозой 10^4 ТЦИД $_{50}$ вируса OURT88/3.

Таким образом, доза для иммунизации свиней может быть меньше чем 10^4 HAD $_{50}$ или ТЦИД $_{50}$ на свинью. Например, доза может составлять 10^2 - 10^3 HAD $_{50}$ или ТЦИД $_{50}$. Доза может составлять примерно 10^2 HAD $_{50}$ или ТЦИД $_{50}$ на свинью.

Вакцину можно вводить, следуя схеме прайм-буст. Например, после первой инокуляции пациенты могут получать второе бустерное введение спустя некоторое время (например, примерно 7, 14, 21 или 28 дней). Обычно при бустерном введении используют более высокую дозу, чем при примиряющем введении.

Бустерная доза может составлять примерно 10^2 , 10^3 или 10^4 HAD $_{50}$ или ТЦИД $_{50}$ рекомбинантного аттенуированного вируса на свинью.

Способ получения аттенуированного вируса.

Настоящее изобретение также относится к способу аттенуации вируса африканской лихорадки сви-

ней (ASF), который включает стадию осуществления, по меньшей мере, частичной делеции или прерывания экспрессии следующих генов:

генов полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и

генов полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R.

Следующие гены могут быть частично или полностью делетированы:

гены полигенного семейства 360 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и

гены полигенного семейства 505 1R, 2R и 3R.

Следующие гены могут быть прерваны:

ген полигенного семейства 360 9L и

ген полигенного семейства 505 4R.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу аттенуации вируса африканской лихорадки свиней (ASF), который включает стадию осуществления частичной или полной делеции или прерывания экспрессии гена DP148R.

Мутация DP148R также может быть получена в комбинации с мутациями генов полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генов полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R, которые описаны в настоящей публикации.

Способы делеции вирусных генов известны в данной области. Например, может быть использована гомологичная рекомбинация, при которой создают вектор-переносчик, в котором соответствующий ген(гены) отсутствует, и используют для трансфекции инфицированных вирусом клеток. Затем могут быть отобраны рекомбинантные вирусы, экспрессирующие новую часть последовательности. Сходные способы можно использовать для прерывания экспрессии генов, например, посредством делеции стартового кодона ATG.

Интраназальное введение.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что интраназальное введение аттенуированного вируса африканской лихорадки свиней (ASF) приводит к лучшей защите и меньшим побочным эффектам по сравнению с введением внутримышечным путем, и может требовать более низкой дозы для получения защиты. В частности, при интраназальном введении аттенуированного штамма OURT88/3 наблюдали полную защиту (100%) от заражения исходным вирулентным вирусом ASFV, что представляет собой значительное улучшение по сравнению с уровнями выживаемости при использовании такого же аттенуированного вируса, вводимого внутримышечным путем.

Соответственно в одном варианте осуществления изобретение относится к аттенуированному вирусу ASF для применения в лечении и/или профилактике африканской лихорадки свиней, при этом аттенуированный вирус вводят интраназально.

Изобретение, кроме того, относится к способу лечения и/или профилактики африканской лихорадки свиней у пациента, который включает стадию введения эффективного количества аттенуированного вируса ASF пациенту интраназальным путем.

Изобретение также относится к вакцине, содержащей аттенуированный вирус ASF, при этом вакцина приготовлена для интраназального введения.

Кроме того, изобретение относится к набору для доставки состава интраназальной вакцины, содержащему:

а) вакцину на основе аттенуированного вируса ASF и

б) устройство для интраназальной доставки.

Изобретение также относится к устройству для интраназальной доставки, содержащему вакцину аттенуированного вируса ASF. Подходящие устройства для интраназального введения вакцины хорошо известны в данной области, например шприц или капельница, аэрозольное устройство (например, Omron, Philips respironics InnoSpire Deluxe, маска/распылитель Devilbiss и компрессор BreathEazy), распылительное устройство для мукозального введения (например, LMA MAD Nasal™, Teleflex VaxInator™), пульверизатор для однократной или многократных доз, дозатор стандартных доз порошка или дозатор двойных доз порошка.

Аттенуированным вирусом ASF может быть любой подходящий аттенуированный вирус ASF. В одном варианте аттенуированным вирусом ASF может быть вирус, который не считается подходящим для применения при профилактике или лечении африканской лихорадки свиней при введении с использованием другого пути введения, такого как внутримышечный путь, например, вследствие неприемлемого профиля безопасности или низкой эффективности. В частности, аттенуированным вирусом ASF может быть OURT88/3. Альтернативно аттенуированным вирусом ASF может быть аттенуированный вирус ASF, в котором отсутствует функциональный вариант генов полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и генов полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R, и/или отсутствует функциональный вариант DP148R. Аттенуированным вирусом ASF может быть любой подходящий аттенуированный вирус ASF, который описан в настоящей публикации, такой как BeninΔMGF или BeninΔDP148R.

Интраназальное введение согласно изобретению может быть в форме капель, спрея или сухого порошка или может быть в виде распыляемого или аэрозольного препарата вакцины. Доза обычно имеет

объем 2 мл, вводимый по 1 мл в каждую ноздрю.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что интраназальное введение аттенуированного вируса ASF является эффективным при более низкой дозе по сравнению с внутримышечным введением. Например, в примере 6 свиньи, иммунизированные интраназально с использованием 10^3 или 10^4 OURT883, имели полную (100%) защиту от летального заражения по сравнению с намного более низкими уровнями выживаемости у свиней, иммунизированных такими же дозами с использованием внутримышечного пути.

Таким образом, доза для интраназальной иммунизации может составлять 10^4 HAD₅₀ или ТЦИД₅₀ или меньше на свинью. Например, доза может составлять 10^2 - 10^3 HAD₅₀ или ТЦИД₅₀. Доза может составлять примерно 10^2 HAD₅₀ или ТЦИД₅₀ на свинью.

Вакцину можно вводить, следуя схеме прайм-буст. Например, после первой инокуляции пациенты могут получать второе бустерное введение спустя некоторое время (например, примерно 7, 14, 21 или 28 дней). Обычно при бустерном введении используют более высокую дозу, чем при примиряющем введении. Бустерная доза может составлять примерно 10^2 , 10^3 или 10^4 HAD₅₀ или ТЦИД₅₀ рекомбинантного аттенуированного вируса на свинью.

Изобретение далее будет описано на примерах, которые предназначены для того, чтобы помочь специалисту в данной области осуществить изобретение, и не никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Выделение рекомбинантного вируса BeninΔMGF.

Гены MGF 360 10L, 11L, 12L, 13L, 14L и гены MGF 505 1R, 2R, 3R были делетированы из изолята ASFV Benin 97/1. Дополнительно были делетированы кодоны ATG MGF 360 9L и MGF 505 4R, чтобы прервать экспрессию указанных генов. Делетированные гены были заменены геном GUS под контролем промотора p72 ASFV. Замена была достигнута в результате гомологичной рекомбинации между плазмидой pΔMGFGUS и геномом вируса (смотри раздел "Материалы и способы" и фиг. 1). Рекомбинантные вирусы идентифицировали по экспрессии гена GUS и очищали путем инфекции с лимитирующим разведением.

Два независимых BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1 были выделены с использованием такого способа, чтобы уменьшить вероятность того, что фенотип генной делеции ассоциирован с мутациями, которые могли возникнуть в других частях генома.

Рекомбинантный вирус BeninΔMGFA2 был дополнительно охарактеризован. Геномная ДНК была выделена из Benin 97/1 дикого типа и BeninΔMGFA2 и проанализирована в ПЦР, чтобы проверить инсерцию маркерного гена GUS и делецию восьми генов MGF (фиг. 2). Были сконструированы праймеры BeninD8F и BeninD8R для отжига в пределах гена MGF 360 9L и гена MGF360 4R, которые фланкируют сайт инсерции. В ПЦР с применением таких праймеров амплифицировали фрагмент длиной 2046 п.н., используя гДНК рекомбинантного вируса BeninΔMGFA2 в качестве матрицы (фиг. 2, дорожка 1).

Размер такой полосы соответствует размеру продукта ПЦР, в котором восемь генов MGF были делетированы и заменены маркерным геном GUS под контролем промотора p72 ASFV. Чтобы подтвердить, что рекомбинантный вирус BeninΔMGFA2 содержит ген GUS, осуществляли ПЦР, используя внутренний праймер для гена GUS, RGUS и праймер BeninΔ8F. В такой ПЦР амплифицировали фрагмент, соответствующий ожидаемому размеру 1552 п.н. (фиг. 2 дорожка 2), когда в качестве матрицы использовали ДНК из BeninΔMGFA2. Как и ожидалось, не обнаружено ПЦР-фрагмента при использовании таких праймеров и гДНК Benin 97/1 дикого типа в качестве матрицы (фиг. 2 дорожка 3). Чтобы подтвердить, что рекомбинантный вирус BeninΔMGFA2 не содержит гена MGF 360 10L, осуществляли ПЦР-реакции, используя праймеры BeninΔ8INTF и BeninΔ8INTR, локализованные в положениях 19613 и 20110 в гене MGF 360 10L. Не было выделено ПЦР-фрагмента с использованием в качестве матрицы гДНК рекомбинантного вируса BeninΔMGFA2 (фиг. 2, дорожка 3), но как и ожидалось, был выделен фрагмент длиной 498 п.н. при использовании в качестве матрицы гДНК Benin 97/1 дикого типа (фиг. 2, дорожка 4). Вместе взятые данные ПЦР показали, что рекомбинантный вирус BeninΔMGFA2 содержит ген GUS вместо восьми генов MGF. Чтобы дополнительно подтвердить, что восемь генов MGF были делетированы, выделяли гДНК из вируса BeninΔMGFA2 и секвенировали место соединения в сайте делеции/инсерции, используя праймеры X и Y. Анализ последовательности показал, что восемь генов MGF были делетированы и был встроены маркерный ген GUS (фиг. 3). Первые пять п.н. фланкирующего гена MGF 360 9L и первые семь п.н. фланкирующего гена MGF 505 4R также были делетированы. Поскольку каждая из дополнительных делетированных последовательностей включала стартовый кодон ATG, был сделан вывод, что гены MGF 360 9L и MGF 505 4R не экспрессируются рекомбинантным вирусом BeninΔMGFA2.

Пример 2. Характеристики роста рекомбинантного вируса BeninΔMGFA2.

Чтобы исследовать, влияет ли делеция восьми генов MGF на репликацию вирусов, рост BeninΔMGFA2 сравнивали с ростом исходного вируса Benin 97/1 в первичных макрофагах костного мозга свиней. Клетки инфицировали при высокой множественности инфекции (10 HAD₅₀/клетку) (m.o.i.) и суммарные вирусы собирали в разных временных точках после инфекции. На фиг. 4 показано, что не

было значимых различий в титрах вирусов Benin 97/1 дикого типа и BeninΔMGFA2, извлеченных в разных временных точках для измерения. Результаты показывают, что делеция восьми генов MGF значимо не влияет на репликацию BeninΔMGFA2 в первичных макрофагах костного мозга свиней.

Пример 3. Инокуляция свиней рекомбинантным вирусом BeninΔMGF и аттенуированным вирусом OURT88/3.

Одну группу из трех свиней (группу 1) иммунизировали внутримышечно 10^2 HAD делеционного вируса BeninΔMGFA2, второй группе их двух свиней (группе 2) инокулировали 10^2 HAD делеционного вируса BeninΔMGFA1, и третьей группе из четырех свиней (группе 3) инокулировали 10^4 ТЦИД₅₀ аттенуированного вируса OURT88/3. Клинические оценки и температуры для каждой свиньи регистрировали каждый день, и каждые семь дней брали образцы крови. Результаты регистрации показаны на фиг. 5 и 6, и видно, что ни у одной из свиней не было клинической оценки выше 3 ни в один из дней после инокуляции. Четыре свиньи (группа 1 - свиньи 21 и 22, группа 2 - свиньи 23 и 25) имели температуру выше 40°C, но она держалась только в течение одного или двух дней.

На 20 день после инокуляции брали 20 мл крови от каждой свиньи, очищали РВМС и клетки группы 1 и 2 стимулировали вирусами BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1 соответственно. РВМС, выделенные в группе свиней 3, стимулировали изолятом вирусов OURT88/3 и количество клеток, продуцирующих IFN γ , для всех трех групп измеряли с использованием ELISpot. Результаты показывают, что три из четырех свиней в группе 3 имели высокие IFN γ -ответы на OURT88/3, тогда как ни у одной из свиней в группах 1 и 2 не было высокого IFN γ -ответа на BeninΔMGF или OURT88/3 (фиг. 7).

На 21 день после первой инокуляции свиней в группах 1 и 2 подвергали бустер-иммунизации внутримышечно, используя 10^4 HAD вирусов BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1 соответственно, а свиней в группе 3 с использованием 10^4 ТЦИД₅₀ или OURT88/3. Клинические наблюдения показали, что только одна свинья (группа 3, свинья 19) имела клиническую оценку выше 2 баллов (фиг. 8), и что только одна свинья (группа 3, свинья 19) имела температуру выше 40°C в течение 1 суток (фиг. 9).

Пример 4. Заражение всех свиней вирулентным Benin 97/1.

На 46 день после начальной инокуляции (21 день после бустер-инокуляции) все три группы свиней (группы 1, 2 и 3) заражали внутримышечно 10^4 HAD вирулентного вируса Benin 97/1. Кроме того, контрольную группу из трех неинокулированных свиней (группа 4) также заражали 10^4 HAD вирулентного вируса Benin 97/1. У всех трех свиней из группы 4 и одной свиньи (свинья 19) из группы 3 развивалась высокая температура и были высокие клинические оценки (выше 4 баллов), и они были умерщвлены на пятый день после заражения вследствие достижения гуманной конечной точки согласно разрешению на работу с животными (фиг. 10 и 11). Все пять свиней из групп 1 и 2 и остальные три свиньи из группы 3 были защищены от заражения вирулентным вирусом Benin 97/1 и оставались здоровыми вплоть до 63 дня, когда эксперимент был закончен (фиг. 12).

На 63 день после начальной инокуляции выделяли РВМС из крови и клетки, выделенные из селезенки и полученные клетки стимулировали вирусными штаммами и определяли количества продуцирующих IFN γ клеток в анализе ELISpot. Результаты показали, что у всех трех свиней из группы 3 наблюдались высокие IFN γ -ответы как в клетках крови, так и в клетках селезенки, тогда как только у одной свиньи (свинья 24, группа 2) из групп 1 и 2 наблюдали высокие IFN γ -ответы в крови и селезенке (фиг. 13).

Пример 5. Характеристика иммунного ответа, генерируемого BeninΔMGF.

Было показано, что инфекция BeninΔMGF снижает количество циркулирующих Т-клеток гамма-дельта CD8+ уже на 10 день после инфекции. Более высокие количества циркулирующих клеток CD8+CD4- γ TCR- (только CD8) и CD8+CD3- (NK-клетки) наблюдали у свиней, инфицированных OURT88/3 в более поздние дни после инфекции (дни 53 и 63). Никаких других значимых различий между животными, инфицированными OURT88/3 и BeninΔMGF, не наблюдали в отношении других исследованных популяций клеток (суммарные CD4+, CD4+CD8+ и суммарные гамма-дельта Т-клетки) (смотри фиг. 14-20).

Заключение.

Инокуляция свиней BeninΔMGF демонстрирует, что вирусы являются аттенуированными.

Свиньям группы 1 и 2 инокулировали 10^2 HAD независимо выделенных рекомбинантных вирусов BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1. Ни у одной из свиней не наблюдали клиническую оценку выше 3 баллов и ни у одной из свиней не было температуры выше 40,5°C. Результат показал, что делеционные вирусы BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1 были аттенуированными, и кратковременная лихорадка (1 или 2 суток) была выявлена у 4 из 5 свиней, но не выявлено никаких других клинических признаков, ассоциированных с инфекцией ASFV.

Свиней в группах 1 и 2 подвергали бустер-инокуляции внутримышечно, используя 10^4 HAD вирусов BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1. Ни у одной из свиней не наблюдали клинической оценки выше 2 баллов и ни у одной из свиней не наблюдали температуру выше 40,1°C. Сходные результаты наблюдали после бустер-инокуляции свиней в группе 3 с использованием аттенуированного штамма OURT88/3.

Заражение свиней, иммунизированных BeninΔMGF, летальной дозой Benin 97/1 демонстрирует 100% защиту.

Свиней из групп 1, 2 и 3 и трех не подвергнутых инокуляции контрольных свиней заражали 10^4 HAD изолята вирулентного вируса Benin 97/1. Все пять свиней (100%) из групп 1 и 2 (BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1) были защищены от заражения вирулентным вирусом.

75% свиней в группе 3 и 0% свиней в группе 4 были защищены от вирулентного Benin 97/1 (фиг. 12). После провокационного заражения Benin 97/1 у свиней в группах 1 и 2 не наблюдали температуру выше $39,6^{\circ}\text{C}$, и свиньи не имели клинической оценки выше 2 баллов. Напротив, у всех свиней в группе 4 наблюдали температуру выше $40,8^{\circ}\text{C}$, и они имели клинические оценки выше 8 баллов.

Делеционные вирусы BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1 давали лучший уровень защиты (100%) по сравнению с аттенуированным штаммом OURT88/3 (75%) против заражения вирулентным Benin 97/1.

Материалы и способы

Клетки и вирусы.

Невирулентный негемадсорбирующий изолят ASFV OUR T88/3 получали из Ourique в Португалии. Вирулентный гемадсорбирующий изолят Benin 97/1 был описан ранее. Оба OUR T88/3 и Benin 97/1 являются вирусами p72 генотипа I, вирусы выращивали в культурах первичных макрофагов, полученных из костного мозга. Титры вируса определяли в виде количества вирусов, вызывающего гемадсорбцию (для HAD-изолятов) или цитопатические эффекты (для не-HAD-изолятов) в 50% инфицированных культур ($\text{HAD}_{50}/\text{мл}$ или $\text{ТЦИД}_{50}/\text{мл}$).

Конструирование плазмидного вектора для переноса pDMGFGUS.

Плазмидный вектор pΔMGFGUS конструировали с целью облегчения делеции восьми генов MGF (MGF 360 10L, 11L, 12L, 13L, 14L и MGF 505 1R, 2R, 3R) из генома Benin 97/1. Используя геномную ДНК Benin 97/1 в качестве матрицы, амплифицировали фрагмент 479 п.н. (Flank L), локализованный на 3'-конце гена MGF 360 9L в положении 19004-19482, непосредственно выше гена MGF 360 10L, используя праймеры FlankLF (ACGTTGCAAAGCTTCCATTAATCCCTCCAGTTGTTT) и FlankLR (ACGTTGCAGGTACCCCTCTCTCTGCAGACTCTCACC). Используя в качестве матрицы геномную ДНК Benin 97/1, амплифицировали фрагмент 501 п.н. (Flank R), локализованный на 5'-конце гена MGF 505 4R в положении 30033-30533, непосредственно ниже гена MGF 505 3R, используя праймер FlankRF (ACGTTGCAGCGGCCCGCTCTCCAAGACATCTGTCGG) и праймер FlankRR (ACGTACGTCTCGAGCCTCATGCCATCTCAAACAATTCC). Фрагмент FlankL расщепляли HindIII и KpnI и лигировали в вектор pP72loxPGUS, который был также расщеплен HindIII и KpnI, получая плазмиду pFlankL-GUS. Фрагмент FlankR расщепляли ферментами NotI и XhoI и лигировали в вектор pFlankL-GUS, расщепленный такими же ферментами, получая вектор для переноса pDMGFGUS. Плазида pDMGFGUS содержит маркерный ген GUS, фланкированный с левой стороны 3'-концевым участком гена MGF 360 9L ген, последовательность промотора $\nu\text{p72 ASFV}$ и последовательность loxP. С правой стороны гена GUS локализована 5'-концевая последовательность гена MGF 505 4R (фиг. 1).

Конструирование и выделение рекомбинантного вируса BeninΔMGF.

Первичные альвеолярные макрофаги свиней (35-мм чашка, 10^6 клеток) инфицировали Benin 97/3 при множественности инфекции (m.o.i) 10 и инкубировали при 37°C в течение 5 ч и затем промывали раствором солей Эрла (10%-ная сыворотка свиней, пенициллин/стрептомицин $10000 \text{ мг}^{-1}\text{мл}^{-1}$). Смесь для трансфекции, содержащую 250 мкл Optimem (Gibco-Life Technologies), 5 мкг pDMGFGUS и 7,5 мкл реагента для трансфекции TRANS-IT LT-1 (Mirus) инкубировали при 20°C в течение 20 мин перед ее добавлением к инфицированным клеткам. Инкубации осуществляли при 37°C в течение 4 ч, затем добавляли 1 мл раствора солей Эрла и продолжали инкубацию при 37°C . Вирус собирали из инфицированных и трансфицированных клеток через 72 ч после инфекции и обломки клеток удаляли центрифугированием. Аликвоты содержащего вирусы надосадка использовали для инфицирования макрофагов костного мозга в 96-луночных планшетах. Через 90 ч после инфекции добавляли раствор солей Эрла, содержащий 100 мкг/мл 5-бром-4-хлор-1Н-индол-3-ил-β-D-глюкопиранозидуроной кислоты (X-Gluc), и собирали материал из лунок, которые выглядели "голубыми", содержащих рекомбинантные вирусы, экспрессирующие GUS. Затем осуществляли инфекции с использованием лимитирующего разведения на макрофагах костного мозга свиней, содержащих X-Gluc, вплоть до момента, когда была только одна синяя лунка в 96-луночном планшете, показывающая инфекцию рекомбинантным делеционным вирусом. Не наблюдали свидетельств вирусной инфекции (цитопатический эффект (cpe)) в других 95 лунках. Таким способом были выделены два независимых рекомбинантных вируса (BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1). Стоки рекомбинантных вирусов BeninΔMGFA2 и BeninΔMGFA1 с высокими титрами выращивали на макрофагах костного мозга свиней.

Ростовые характеристики рекомбинантного вируса BeninΔMGFA2.

Рост BeninΔMGFA2 сравнивали с исходным вирусом Benin 97/1 в первичных макрофагах костного мозга свиней. Клетки инфицировали при высокой ($10 \text{ HAD}_{50}/\text{клетку}$) множественности инфекции (m.o.i.) и суммарные вирусы собирали из надосадков в разных временных точках после инфекции.

Очистка вирусной геномной ДНК и ПЦР.

Вирусную геномную ДНК из собранных вирусов BeninΔMGF и Benin 97/1 очищали из 300 мкл надосадка инфицированных клеток макрофагов костного мозга свиней, используя набор GE Healthcare Illustra Genomic Prep Mini Spin. Анализ вирусной геномной ДНК осуществляли в ПЦР, используя специфичные ПЦР-праймеры BeninD8F (GGTGAGAGTCTGCAGAGAGAGG), BeninD8R (GCCCTAGCACTTGTAACG), RGUS (CCTTCTCTGCCGTTTCCAAATCGCCGC), BeninD8INTF (CGATGTATCATTTGATGTC), BeninD8INTR (GGATAATCTTAGGGAGGCC).

Секвенирование рекомбинантного вируса BeninΔMGFA2.

Вирусную гДНК выделяли из собранных инфицированных BeninDMGF клеток и секвенировали, используя следующие праймеры 9LF (ATGACGCATTAACCGGCG) и 4RR (CAGTATAGCCCTAGCACTTG).

ELISpot.

ELISpot IFN-g осуществляли как описано ранее (Gerner et al. 2006 *Virus Res.* 121: 223-228).

Инокуляция и заражение свиней.

Используемые свиньи были гибридами крупной белой × ландрас со средней массой 15 кг при первой инокуляции. Всех свиней содержали в течение всего периода в специальных высокобезопасных помещениях SAPO4, и эксперимент проводили по официальному разрешению Министерства внутренних дел PPL 70/7198-. Одной группе из трех свиней (группа 1, свиньи 21, 22 и 23) внутримышечно инокулировали 10^2 HAD₅₀ рекомбинантного вируса BeninDMGFA2. Второй группе из двух свиней (группа 2, свиньи 24 и 25) внутримышечно инокулировали 10^2 HAD₅₀ рекомбинантного вируса BeninΔMGFA1. Третьей группе из четырех свиней (группа 3, свиньи 16, 18, 19 и 20) инокулировали 10^4 ТЦИД₅₀ аттенуированного штамма OURT88/3. Авторы изобретения ранее определили, что доза 10^4 ТЦИД₅₀ OURT88/3 необходима для индукции защиты, и что доза 10^3 была менее эффективной.

Спустя три недели для повышения ASFV-специфичных адаптивных иммунных ответов свиньям в группах 1 и 2 инокулировали 10^4 HAD₅₀ рекомбинантных вирусов BeninDMGFA2 и BeninDMGFA1 соответственно, а группу свиней 3 иммунизировали, используя 10^4 ТЦИД₅₀ OURT88/3. Через три недели после бустер-инокуляции группы 1, 2, 3 и четвертую группу из трех свиней (группа 4, свиньи 26, 27 и 28), в которую входили три неиммунизированные свиньи, заражали внутримышечно 10^4 HAD₅₀ вирулентного изолята ASFV Benin 97/1. Наблюдение за ASFV-инокулированными и зараженными свиньями проводили ежедневно в отношении температуры тела и клинических признаков, которые оценивали как описано King с соавторами, 2011. Всех свиней обследовали после смерти при умерщвлении и собирали ткани селезенки и лимфатические ткани.

Характеристика субпопуляций Т-клеток.

Образцы крови собирали от инфицированных свиней в разных временных точках после инфекции и разные популяции Т-клеток идентифицировали, используя следующие меченые антитела Zenon (Invitrogen): мышиний IgG1 против CD3 свиньи (Alexa Fluor 405), мышиний IgG2b против CD4 свиньи (Alexa Fluor 647), мышиний IgG2a против CD8α свиньи (R-PE) и мышиний IgG2b против гамма-дельта TCR свиньи (Alexa Fluor 488). Кратко, 100 мкл цельной крови инкубировали с 5 мкл каждого конъюгированного антитела в течение 20 мин при комнатной температуре. Эритроциты лизировали, добавляя 4 мл 1-кратного лизирующего раствора BD FACS (BD Biosciences), и встряхивали. Клетки осаждали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 7 мин и надосадок удаляли. Затем клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 30 мин, дважды промывали PBS и наконец анализировали, используя проточную цитометрию (MACSQuant, Miltenyi Biotec). Подгруппы лимфоцитов пропускали на основе окрашивания маркеров клеточной поверхности, используя компьютерную программу FCS express.

Пример 6. Иммунизация OUR T88/3 различными путями.

Эксперименты осуществляли в помещениях с условиями биоизоляции уровня 3 (BSL-3) в Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA, Barcelona, Spain). Все эксперименты на животных осуществляли на основании официального разрешения Министерства внутренних дел Великобритании с номером 70/7198 и при одобрении Комитета по этике проведения экспериментов на животных Автономного университета Барселона (No. 1189R5) и Регионального правительства Каталонии, Испания (№ 5796), и полностью выполняли процедуры, регламентированные законом о животных (научные методики) 1986 года.

Материалы и способы.

Использовали здоровых самцов поросят 7-недельного возраста, являющихся гибридами между породами крупной белой и Пьетрен, вакцинированных против цирковируса свиней типа 2 и *Mycoplasma hyorheumoniae* со средней массой 15 кг из стада с высоким уровнем здоровья, имеющего негативные показатели при тестировании в отношении репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRS) и болезни Ауески. После 5-дневного периода акклиматизации три группы по шесть свиней в каждой иммунизировали внутримышечно (в/м), используя 1 мл, содержащий 10^3 (группа А), 10^4 (группа С) и 10^5 (группа Е) ТЦИД₅₀/мл низко вирулентного изолята ASFV OUR T88/3 соответственно. Три дополнительные группы по шесть свиней в каждой иммунизировали интраназально (и/н), используя распылительное устройство для мукозального введения и используя объем по 1 мл на ноздрю, содержащий 10^3 (группа В), 10^4 (группа D) и 10^5 (группа F) ТЦИД₅₀/мл низко вирулентного изолята OUR T88/3. Спустя три неде-

ли все иммунизированные группы вместе с контрольной группой (группой G), состоящей из трех неиммунизированных свиней, заражали внутримышечно, используя 1 мл, содержащий 10^4 ТЦИД₅₀/мл близко родственного вирулентного изолята ASFV OUR T88/1. Такую контрольную группу содержали отдельно (комната 4), тогда как свиней, иммунизированных с использованием одного и того же титра ASFV, но разными путями инокуляции (и/н или в/м), размещали в одной и той же изолированной комнате, разделенной перегородками высотой 1 м следующим образом: эксперимент 1 (группы A и B), эксперимент 2 (группы C и D), эксперимент 3 (группы E и F).

Отбор образцов, клиническое и посмертное обследование.

День иммунизации определяли как день 0 (0 д.п.и.). Ректальные температуры и клинические признаки контролировали ежедневно перед иммунизацией и на протяжении исследования, следуя клинической оценке, о которой сообщалось ранее (King с соавторами, 2011). Образцы крови с EDTA и сыворотки брали у всех свиней перед иммунизацией вирусом (0 д.п.и.), после иммунизации (3, 5, 7, 14 и 21 д.п.и.) и после провокационного заражения (3, 5, 7, 14 и 19 д.п.з.).

Также осуществляли посмертное обследование, чтобы оценить макроскопические поражения у умерших свиней или свиней, подвергнутых эвтаназии во время эксперимента при достижении предварительно определяемой конечной гуманной точки, а также в конце эксперимента на день после заражения (д.п.з.). Макроскопические поражения оценивали в соответствии со стандартизированной схемой оценки патологии при инфекциях ASFV (Galindo-Cardiel с соавторами, 2013). Конечную гуманную точку определяли в соответствии с правилами обеспечения благополучия животных, установленных в лицензии Министерства внутренних дел Великобритании, так что свиней с ректальной температурой выше $40,5^{\circ}\text{C}$ в течение трех следующих друг за другом дней или свиней, у которых наблюдается три или больше клинических признака заболевания вместе в один день, подвергали эвтаназии. Эвтаназию проводили посредством внутривенной инъекции пентобарбитала натрия.

Выявление ASFV и оценка иммунного ответа.

После сбора образцы крови в EDTA замораживали при -80°C вплоть до выявления ASFV с использованием количественной ПЦР (кПЦР), как описано ранее (King с соавторами, 2003). Замороженные образцы тканей (селезенки, миндалины, легкого, подчелюстных, ретрофарингеальных и желудочно-печеночных лимфатических узлов) также анализировали в отношении присутствия ASFV, используя кПЦР. Образцы сыворотки также замораживали при -80°C вплоть до анализа с использованием коммерчески доступных наборов для ELISA для выявления антител против структурного белка Vp72 ASFV (INGEZIM PPA Compac, Ingenasa Madrid, Spain). Кроме того, образцы сыворотки использовали для того, чтобы оценить с помощью коммерчески доступных наборов для ELISA (R&D Systems, Abingdon, UK) цитокины свиней с воспалительными и иммунологическими функциями в гуморальном и опосредованном клетками иммунитета у свиней (IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-4 и IL-10). Концентрации цитокинов представлены в виде пг/мл.

Статистические анализы.

Данные анализировали, используя программу для статистического анализа GraphPad Prism, версию 6.0 (GraphPad Software). Оценивали значения ректальной температуры, клинические признаки, макроскопические поражения, вирусемии, ASFV-антитела и уровни цитокинов, вычисляя средние \pm стандартные отклонения (SD). В случае анализа температуры и клинических признаков различия между исходными уровнями (день 0) и значениями, полученными в каждой временной точке в не подвергнутой инокуляции контрольной группе и инокулированных группах, анализировали, используя односторонний ANOVA с апостериорным критерием Бонферрони. Кроме того, различия между не подвергнутой инокуляцией контрольной группой и инфицированными группами, а также различия между двумя инфицированными группами в одной и той же временной точке анализировали, используя двусторонний ANOVA с апостериорным критерием Бонферрони. При всех сравнениях различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты, полученные на контрольных неиммунизированных свиньях.

Начиная с 3 д.п.з. у свиней в контрольной группе G (неиммунизированные) наблюдали неспецифические симптомы, такие как лихорадка ($40,8-41,7^{\circ}\text{C}$) и апатия (смотри фиг. 21G). Указанные клинические признаки прогрессивно увеличивались вплоть до 5 д.п.з., при этом ректальные температуры составляли $41,4-41,6^{\circ}\text{C}$, свиньи находились в лежачем положении и имели место эритема кожи и цианотические области на кончиках ушей, и свиней подвергали эвтаназии по этическим причинам. После эвтаназии свиней на 5 д.п.з. некропсия показала наличие макроскопических поражений, характерных для острой формы ASF, таких как геморрагический лимфаденит (при этом желудочно-кишечные и почечные лимфатические узлы были наиболее тяжело поражены), гиперемическая спленомегалия, не спавшиеся легкие с интерстициальным и альвеолярным отеком, а также пена в трахее, петехия в почках (коре и мозговой слой) и легких, ретроперитонеальный отек и слабый застой в печени.

Результаты, полученные на группах, иммунизированных интраназальным путем.

Из свиней, иммунизированных OUR T88/3 интраназальным путем, 100% (n=6) свиней в группах B (10^3 ТЦИД₅₀) и D (10^4 ТЦИД₅₀) выживали при заражении. У некоторых из выживших свиней наблюдали временное умеренное опухание суставов до и после провокационного заражения. У двух свиней из груп-

пы В (В3 и В4) и 3 из группы D (D2, D4 и D5) наблюдали другие кратковременные признаки после заражения (температура, отсутствие аппетита, апатия). В группе F (10^5 ТЦИД₅₀) 66% переживали заражение. Две свиньи, которые не пережили (F3 и F5), были подвергнуты эвтаназии на 5 день после заражения и имели макроскопические поражения, характерные для ASF, и некоторые другие клинические признаки (опухание колен и эрозия кожи на носу). Три выживших свиньи (F1, F2 и F4) также имели клинические признаки и поражения, включая тяжелое опухание суставов, затрудненное дыхание, эритему на ушах, конъюнктивит, а также эрозии/язвы кожи на носу, боках и конечностях, которые оставались до конца эксперимента.

Результаты, полученные на группах, иммунизированных внутримышечным путем.

Из свиней, иммунизированных внутримышечным путем, 3 (E2, E3 и E6) из группы E (10^5 ТЦИД₅₀) были подвергнуты эвтаназии или были найдены мертвыми в период с 13 по 14 д.п.и., и до заражения у них наблюдали признаки, типичные для ASF. Из зараженных свиней 50% (3/6) в группе A (10^3 ТЦИД₅₀), 66% (4/6) в группе C (10^4 ТЦИД₅₀) и 33% (2/6) в группе E (10^5 ТЦИД₅₀) выживали при заражении.

Статистический анализ результатов.

Сравнительный статистический анализ клинических оценок (5 дней до гибели), полученных для свиней, которые погибли или были подвергнуты эвтаназии внутри каждой экспериментальной группы (включая свиней, погибших до заражения в группе E и неиммунизированных контрольных свиней), показал сходные кинетики, а также незначимые различия в достигаемых температурах среди групп (фиг. 22). Кроме того, кинетики клинических оценок были сходными, значимые различия наблюдали только между свиньями, погибшими в группе F (и/н, 10^5) и в группе A (в/м, 10^3) (фиг. 24). С другой стороны, статистический анализ клинических оценок у свиней, которые выжили, показал, что после провокационного заражения у выживших свиньи в группе F (и/н, 10^5) наблюдали значимые отличия в клинических оценках по сравнению с выжившими свиньями, включенными в другие группы, вплоть до конца исследования (фиг. 24).

При макроскопической оценке выживших свиней поражения наблюдали, главным образом, в сердечной и дыхательной системах, коже и скелетно-мышечной системе. В общем, у выживших свиней, иммунизированных внутримышечно (всего 9 свиней), не наблюдали поражений или наблюдали минимальные поражения легких (6/9 свиньи), тогда как у выживших свиней, иммунизированных интраназально (всего 16 свиней), наблюдали сердечные и легочные поражения (12/16 свиней), а также поражения кожи и суставов (7/16 свиней). В этом смысле, хотя поражения у выживших свиней, иммунизированных интраназально с использованием 10^3 и 10^4 (группы В и D), были умеренными, у выживших свиней, которым инокулировали интраназально 10^5 (группа F), наблюдали наиболее интенсивные поражения сердечной и дыхательной системы и скелетно-мышечные поражения (фибринозный плеврит, фибринозно-некротическая плевропневмония, фибринозный перикардит и серозно-фибринозный/гнояный периартрит), при этом поражения сердечной и дыхательной систем были сравнимы с присутствием вторичных бактериальных инфекций. Статистический анализ оценок макроскопических поражений подтвердил значимые различия между выжившими свиньями в группе F (и/н, 10^5) и другими группами выживших животных (фиг. 25).

Обсуждение.

Полученные результаты продемонстрировали полную защиту (100%) у свиней, иммунизированных интраназально 10^3 и 10^4 ТЦИД₅₀/мл низковирулентного изолята ASFV OUR T88/3. У свиней наблюдали минимальные и временные неблагоприятные клинические реакции до и после провокационного заражения вирулентным изолятом ASFV OUR T88/1, а также слабые поражения в легких, ассоциированные со вторичными бактериальными инфекциями, и, главным образом, суставов.

Авторы на основании полученных результатов предположили, что более низкая доза (например, 10^2 ТЦИД₅₀) также может индуцировать высокие уровни защиты от летального заражения.

Однако в двух группах свиней, иммунизированных интраназально 10^5 ТЦИД₅₀/мл, и во всех группах, иммунизированных внутримышечно, степень придаваемой защиты была более низкой. Наименьший показатель выживаемости наблюдали у свиней, иммунизированных внутримышечно 10^5 ТЦИД₅₀/мл, при этом 3 из 6 иммунизированных свиней (E2, E3 и E6) погибли до заражения.

Результаты показывают, что интраназальная иммунизация свиней живыми аттенуированными вакцинами ASFV является альтернативой внутримышечному пути, о котором сообщалось ранее.

Интраназальная иммунизация индуцировала меньше клинических признаков до заражения по сравнению с внутримышечным путем, и имел место более высокий процент защищенных свиней.

Пример 7. Иммунизация BeninΔ разными путями.

Данный пример заключался в тестировании доставки аттенуированного ASFV BeninΔMGF с делегированными генами в трех разных дозах с использованием в/м-пути (10^2 , 10^3 , 10^4 HAD₅₀) и в одной дозе (10^3 HAD₅₀) с использованием интраназального пути и заражения исходным вирулентным вирусом.

Материалы и способы.

Эксперимент проводили в помещениях с условиями биоизоляции SAPO-4 в Институте Пирбрайт. Все эксперименты на животных осуществляли на основании официального разрешения Министерства

внутренних дел Великобритании с номером 70/7198 и полностью выполняли процедуры, регламентированные законом о животных (научные методики) 1986 года.

Использовали молодых здоровых самок свиней, являющихся гибридами пород крупной белой и Ландрас со средней массой 15-20 кг из стада с высоким уровнем здоровья. После 5-дневного периода акклиматизации каждую из трех групп по шесть свиней в каждой иммунизировали внутримышечно (в/м), используя 1 мл, содержащий 10^2 (группа А), 10^3 (группа В) и 10^4 (группа С) HAD_{50} аттенуированного ASFV, штамма Benin Δ MGF с делетированными генами соответственно. Дополнительную группу из шести свиней иммунизировали интраназально (и/н), используя распылительное устройство для мукозального введения и используя объем по 1 мл на ноздрю, содержащий 10^3 Benin Δ MGF (группа D). Спустя три недели все иммунизированные группы подвергали бустер-иммунизации с использованием такой же дозы вируса таким же путем. Спустя еще 19 дней свиней в группах А-D вместе с контрольной группой (группа F), включающей в себя шесть неиммунизированных свиней, заражали внутримышечно, используя 1 мл, содержащий 10^4 ТЦИД $_{50}$ /мл исходного изолята вирулентного ASFV Benin 97/1. Такую контрольную группу содержали отдельно, тогда как других свиней размещали в одной и той же изолированной комнате, разделенной перегородками высотой 1 м следующим образом: комната 1 (группы А и В), комната 2 (группы С и D).

Отбор образцов, клиническое и посмертное обследование.

День иммунизации определяли как день 0 (0 д.п.и.). Ректальные температуры и клинические признаки контролировали ежедневно перед иммунизацией и на протяжении исследования, следуя клинической оценке, о которой сообщалось ранее (King с соавторами, 2011). Образцы крови с EDTA и сыворотки брали у всех свиней перед иммунизацией вирусом (0 д.п.и.), после иммунизации (2, 4, 7, 10, 14 и 21 д.п.и.) и после провокационного заражения (3, 5, 7, 14 и 19 д.п.з.).

Также осуществляли посмертное обследование, чтобы оценить макроскопические поражения у умерших свиней или свиней, подвергнутых эвтаназии во время эксперимента при достижении предварительно определяемой конечной гуманной точки, а также в конце эксперимента. Макроскопические поражения оценивали в соответствии со стандартизированной схемой оценки патологии при инфекциях ASFV (Galindo-Cardiel с соавторами, 2013). Конечную гуманную точку определяли в соответствии с правилами обеспечения благополучия животных, установленных в лицензии Министерства внутренних дел Великобритании, так что свиней с ректальной температурой выше $40,5^{\circ}\text{C}$ в течение трех следующих друг за другом дней или свиней, у которых наблюдается три или больше клинических признака заболевания вместе в один день, подвергали эвтаназии. Эвтаназию проводили посредством внутривенной инъекции пентобарбитала натрия.

Результаты.

Свиньи иммунизировали и проводили наблюдения ежедневно в отношении клинических признаков, включая температуру. Результаты показаны на фиг. 29. Из свиней в группах А (10^2) и В (10^3) в 4/6 случаев развивалась временная слабая лихорадка на протяжении 1 или 2 суток с 4 или 5 дня после иммунизации. В группе С (в/м 10^4) у 3/6 свиней развивалась временная слабая лихорадка на протяжении 1 или 2 суток. В группе D (и/н 10^3) у 1/6 свиней развивалась слабая временная лихорадка на 5 день после иммунизации. Никаких других клинических признаков не наблюдали.

Результаты подтверждают, что повышение дозы Benin Δ MGF не увеличивает клинические признаки после иммунизации в/м-путем. На фиг. 29 показано, что минимальные клинические признаки наблюдались у таких свиней и свиней, оставшихся после бустер-иммунизации и вплоть до периода после провокационного заражения. После заражения несколько свиней были подвергнуты эвтаназии, поскольку они достигали конечной точки умеренной тяжести (3-дневная лихорадка выше $40,5$ или 2 дня без еды). Такие свиньи включали 3 из 6 свиней из группы, иммунизированной 10^2 в/м, 2 свиней, иммунизированных 10^3 в/м, 1 свинью, иммунизированную 10^4 в/м, и 2 свиньи, иммунизированных 10^3 и/н. При некропии не наблюдали поражений ни в одной из групп, за исключением 1 свиньи из группы Benin Δ MGF 10^2 в/м, у которой было одно поражение легкого.

Сравнение средних температур в разных группах (фиг. 31) показало статистически значимые различия между группой, иммунизированной Benin Δ MGF 10^2 в/м, и другими группами после иммунизации на 4 день (более высокие по сравнению со всеми другими группами), 15 день (более высокие по сравнению с Benin Δ MGF 10^3 в/м, 10^3 и/н и 10^4 в/м). После бустер-иммунизации статистически значимые различия наблюдали между Benin Δ MGF 10^2 в/м (более высокие по сравнению с Benin Δ MGF 10^3 и/н и Benin Δ DP148R). На 12 день после заражения свиньи, иммунизированные Benin Δ MGF 10^2 в/м, имели значительно более высокую температуру по сравнению со свиньями, иммунизированными Benin Δ MGF 10^4 в/м.

Свиньи, иммунизированные Benin Δ MGF 10^3 и/н, имели значимо отличающиеся температуры на 4 день после иммунизации (ниже по сравнению с Benin Δ MGF 10^3 в/м, 10^4 в/м и Benin Δ DP148R), на 6 день после иммунизации (более высокие по сравнению с Benin Δ DP148R), на 11 день после заражения (более высокие по сравнению с Benin Δ MGF 10^4 в/м). Свиньи, иммунизированные Benin Δ MGF 10^4 в/м, имели статистически значимо отличающиеся температуры на 8 день после иммунизации (более высокие по сравнению с Benin Δ MGF 10^3 в/м, 10^3 и/н) и на 9 день после иммунизации (более высокие по сравнению с

Benin Δ DP148R). Свиньи, иммунизированные Benin Δ MGF 10^3 в/м, имели значимо отличающиеся температуры на 12 день после иммунизации (более низкие по сравнению с Benin Δ MGF 10^4 в/м и 10^3 и/н).

Сравнение средних клинических оценок разных групп (фиг. 32) показало статистически значимые различия между группой, иммунизированной Benin Δ MGF 10^2 в/м, и другими группами на 2 день после иммунизации (более высокие, чем в случае Benin Δ MGF 10^3 в/м, 10^3 и/н, Benin Δ DP148R), 4 день (более высокие, чем в случае Benin Δ MGF 10^3 в/м, 10^4 в/м, 10^3 и/н) и 5 день (более низкие, чем в случае Benin Δ DP148R, более высокие, чем в случае Benin Δ MGF 10^3 в/м, 10^3 и/н).

В заключение, Benin Δ MGF 10^2 в/м приводил к значимо более высоким клиническим оценкам и более низким температурам, чем в других группах после иммунизации.

Пример 8. Индукция мРНК IFN- β разными изолятами ASFV.

Альвеолярные макрофаги свиней инфицировали указанными изолятами ASFV при множественности инфекции 3 (Benin 97/1, Benin Δ MGF, OURT88/3) или ложно инфицировали. В разных временных точках после инфекции (2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 ч) собирали РНК из инфицированных клеток и измеряли уровни мРНК для РНК IFN- β RNA, GAPDH и гена B646L ASFV (VP72), используя количественную ПЦР с обратной транскриптазой. На фиг. 26 панели А показаны уровни IFN- β по сравнению с контрольным геном домашнего хозяйства GAPDH. На панели В показаны уровни мРНК для гена ASFV B646L (VP72).

Делеционный мутант Benin Δ MGF имел делецию или прерывание 6 представителей MGF360 и 4 представителей MGF 505 из области, расположенной вблизи левого конца генома Benin 97/1. Делеция указанных генов повышала индукцию мРНК IFN- β в макрофагах, инфицированных Benin Δ MGF360, по сравнению с исходным вирулентным вирусом, в случае которого мРНК IFN- β едва выявлялась (смотри фиг. 26). IFN типа I индуцируют экспрессию IFN-стимулируемых генов, которые вовлечены в активацию путей врожденного иммунного ответа и адаптивного иммунного ответа у хозяина и в формирование противовирусного статуса. Гипотеза авторов заключается в том, что индукция IFN типа I важная для аттенуации вирулентного ASFV и индукции защитного иммунного ответа.

Пример 9. Делеционный мутант Benin Δ DP148R.

Один ген, DP148R, был делегирован из области вблизи правого конца генома вирулентного Benin97/1. Для достижения такой делеции фрагмент длиной 529 п.н. из левой и фрагмент длиной 740 п.н. из правой областей, фланкирующих ген MGF36018R, амплифицировали в ПЦР. На фиг. 27 показаны праймеры, используемые для амплификации левой фланкирующей области (360-18RFlankL), и праймеры для амплификации правой фланкирующей области (360-18RFlankR). Амплифицированные последовательности находились между указанными праймерами. Серым заштрихована последовательность гена MGF360-18R, которая была делегирована из генома ASFV. Стартовый кодон и стоп-кодон показаны жирным шрифтом. Фланкирующие области клонировали с каждой из сторон от репортерного гена, состоящего из гена β -глюкуронидазы (β -GUS), расположенного ниже промотора VP72 ASFV. Такой плазмидой трансфицировали макрофаги свиней, инфицированные изолятом Benin 97/1. Потомков вирусов тестировали в отношении экспрессии гена β -GUS, и рекомбинантные вирусы, в которых ген β -GUS заменял ген MGF360-18R, выделяли, используя лимитирующее разведение. Делецию гена и локализацию инсерции подтверждали при ПЦР-анализе с использованием праймеров, которые были из генома ASFV вне областей, клонированных в плазмиде для переноса (смотри фиг. 27).

Делеция гена DP148R не снижает репликацию вирусов в макрофагах.

Репликацию штамма вируса Benin Δ MGF36018R в макрофагах свиней сравнивали с исходным вирусом Benin 97/1. Альвеолярные макрофаги свиней инфицировали при множественности 3 и в разных временных точках после инфекции (0, 24, 48, 72, 96 ч) собирали вирус из клеток и надосадков и титровали, используя альвеолярные макрофаги свиней. Результаты (фиг. 28) показали, что делеция гена MGF360 18R не снижала репликацию вирусов в макрофагах.

Делеция гена DP148R аттенуирует ASFV у свиней.

Группу из 5 самцов свиней крупная белая/ландрас (15-20 кг) иммунизировали внутримышечно, используя 10^3 HAD₅₀ Benin Δ DP148R, и наблюдали клинические признаки. У всех 5 свиней проявлялись временные клинические признаки в течение 1 или 2 суток на 4 или 5 день после иммунизации. Такие признаки включали временную лихорадку, потерю аппетита и летаргию.

Свиней подвергали бустер-инокуляции такой же дозой вируса тем же путем на 21 день после иммунизации и заражали вирулентным Benin97/1 параллельно с контрольными неиммунизированными свиньями на 39 день после иммунизации. Не наблюдали никаких дополнительных клинических признаков после бустер-инокуляции и все свиньи выживали при заражении (окончание на 19-21 день после заражения). Не наблюдали поражений при посмертном вскрытии.

Сравнение средних температур в разных группах (фиг. 31) показало статистически значимые различия между группой, иммунизированной Benin Δ DP148R, и другими группами после иммунизации на 2 день (более низкая по сравнению с группами Benin Δ MGF 10^2 в/м и 10^4 в/м) и 5 день (более высокая по сравнению с группами Benin Δ MGF 10^3 в/м, 10^4 в/м и 10^3 и/н). В указанные дни после бустер-иммунизации статистически значимо более низкие температуры наблюдали в группе Benin Δ DP148R по

сравнению с другими группами: 5 (BeninΔMGF 10^2 в/м, 10^3 в/м), 6 (BeninΔMGF 10^2 в/м), 12 (BeninΔMGF 10^2 в/м, 10^3 и/н), 13 (BeninΔMGF 10^4 в/м, 10^3 и/н), 14 (BeninΔMGF 10^2 в/м, 10^3 в/м, 10^3 и/н), 15 (BeninΔMGF 10^2 в/м, 10^3 в/м), 17-19 (все группы BeninΔMGF). После заражения статистически более низкие температуры наблюдали между свиньями, иммунизированными BeninΔDP148R, и другими иммунизированными группами на 3 день (BeninΔMGF 10^3 и/н), 5 день (10^2 в/м), 6 день (10^3 в/м).

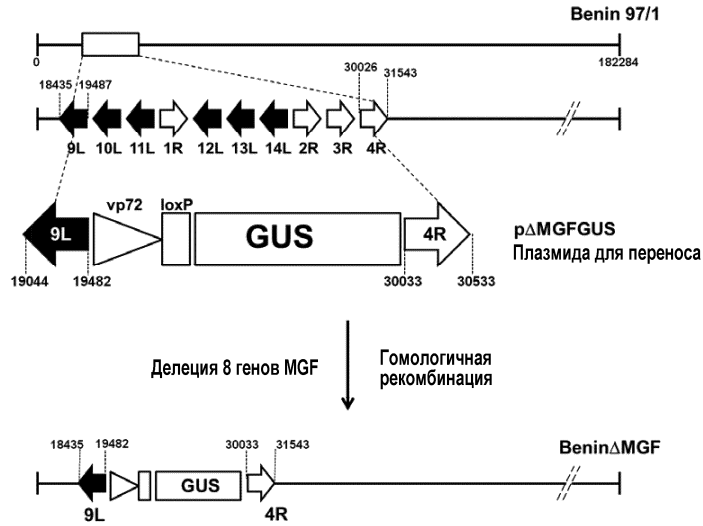
Сравнение средних клинических оценок для разных групп (фиг. 32) показало статистически значимые различия между группой, иммунизированной BeninΔDP148R, и другими группами после иммунизации на 4 день (более высокие, чем BeninΔMGF 10^2 в/м, 10^3 в/м, 10^3 и/н), 5 день (BeninΔMGF 10^2 в/м, 10^3 в/м, 10^3 и/н, 10^4 в/м), 6 день (BeninΔMGF 10^3 в/м, 10^3 и/н, 10^4 в/м) и 6 день (BeninΔMGF 10^3 в/м, 10^3 и/н, 10^4 в/м).

В заключение, BeninΔDP148R давал значимо более высокие клинические оценки и более низкие температуры, чем другие группы, и не было выявлено поражений при посмертном вскрытии.

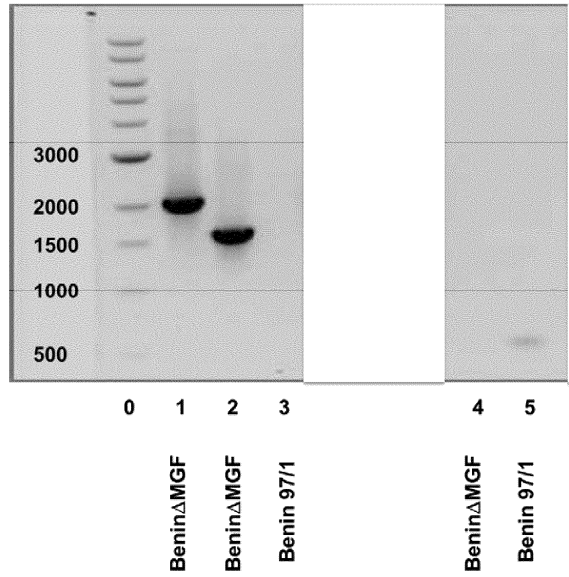
Все публикации, упоминаемые в приведенном выше описании, включены в настоящее описание в виде ссылки. Различные модификации и варианты описанных способов и системы согласно изобретению будут очевидны для специалистов в данной области, не выходя за рамки объема и не отходя от сути изобретения. Хотя изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами, следует понимать, что заявленное изобретение не следует неправомерно ограничивать такими конкретными вариантами. Действительно подразумевается, что различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые очевидны для специалистов в области вирусологии, молекулярной биологии или родственных областях, входят в объем, определяемый следующей далее формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Атенуированный вирус африканской лихорадки свиней (ASF), способный индуцировать иммунный ответ, в котором отсутствует функциональный вариант гена DP148R.
2. Атенуированный вирус ASF по п.1, в котором ген DP148R делетирован, частично делетирован или прерван.
3. Атенуированный вирус ASF по п.1 или 2, в котором дополнительно отсутствует функциональный вариант следующих генов:
генов полигенного семейства 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L и 14L и
генов полигенного семейства 505 1R, 2R, 3R и 4R.
4. Атенуированный вирус ASF по любому из пп.1-3, в котором остальная часть генома соответствует геному из вирулентного изолята вируса ASFV.
5. Атенуированный вирус ASF по п.4, в котором остальная часть генома соответствует геному из одного из следующих вирулентных изолятов вируса ASFV: Georgia 2007/1, Benin 97/1, Kenyan, Malawi Lil20/1, Pretoriuskop/96/4 и Tengani 62.
6. Атенуированный вирус ASF по п.5, в котором остальная часть генома соответствует геному вируса Benin 97/1.
7. Атенуированный вирус ASF по любому из пп.1-6, который при введении пациенту индуцирует иммунный ответ, который является защитным от последующего заражения вирулентным вирусом ASF.
8. Атенуированный вирус ASF по любому из пп.1-7, который при введении пациенту индуцирует пониженный опосредованный Т-клетками иммунный ответ по сравнению с иммунным ответом, индуцированным аттенуированным вирусом OURT88/3.
9. Вакцина для профилактики ASF, содержащая аттенуированный вирус ASF по любому из пп.1-8.
10. Вакцина по п.9, которая дополнительно содержит множество аттенуированных вирусов ASF.
11. Вакцина по п.10 для применения в индукции перекрестного защитного иммунного ответа против множества генотипов вирусов ASF.
12. Вакцина по любому из пп.9-11 для применения в профилактике африканской лихорадки свиней.
13. Способ аттенуации вируса ASF, который включает стадию частичного или полного делетирования или прерывания экспрессии гена DP148R.
14. Способ профилактики африканской лихорадки свиней у пациента, который включает стадию введения пациенту эффективного количества вакцины по любому из пп.9-12.
15. Способ по п.14, в котором пациентом является домашняя свинья.
16. Способ по п.14 или 15, в котором вакцину вводят, следуя схеме прайм-буст.

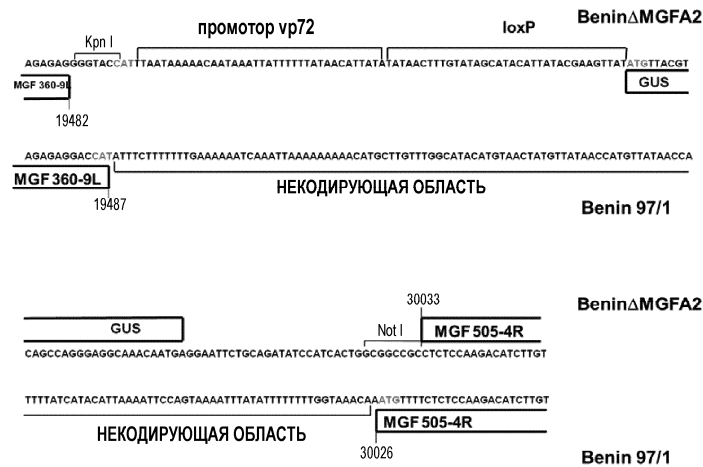


Фиг. 1



Фиг. 2

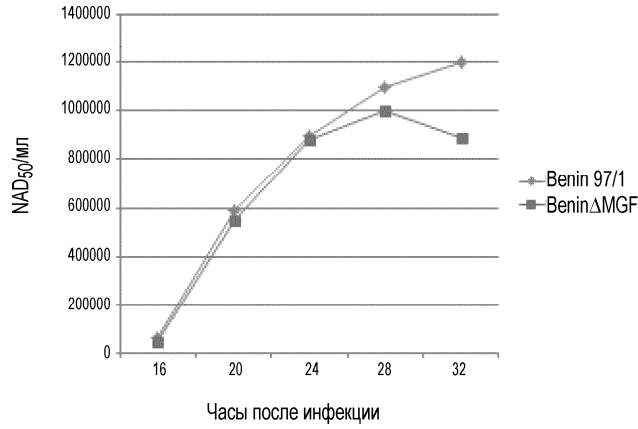
Последовательность левого фланка делеции/инсерции



Последовательность правого фланка делеции/инсерции

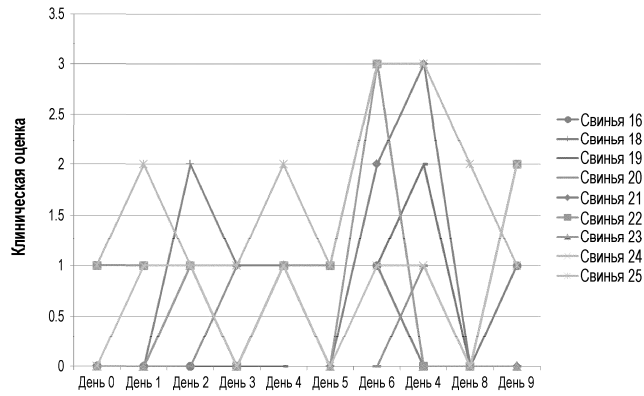
Фиг. 3

Кривые роста Benin 97/1 и BeninΔMGF



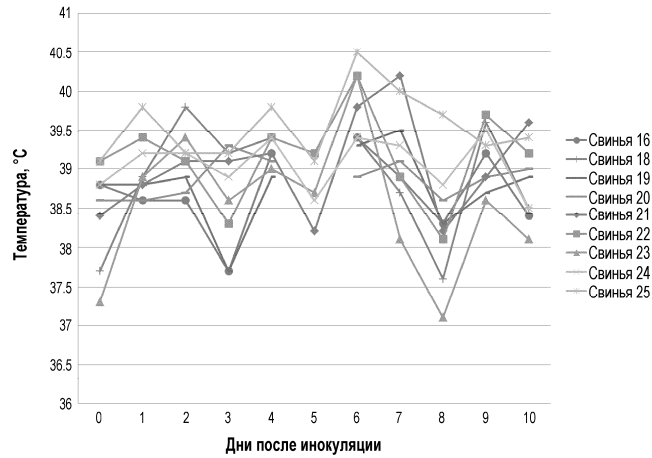
Фиг. 4

Клинические оценки после 1-ой инокуляции

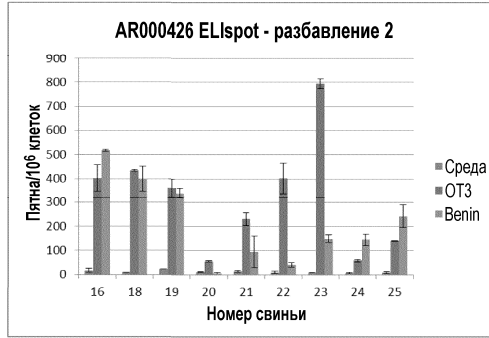
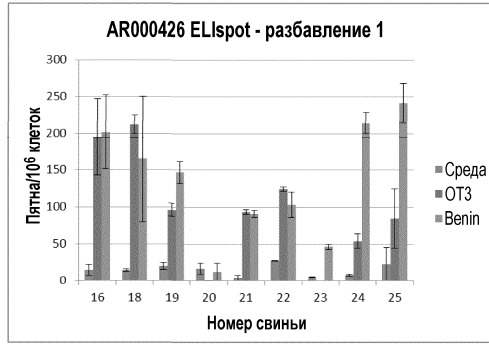


Фиг. 5

Температуры после 1-ой инокуляции

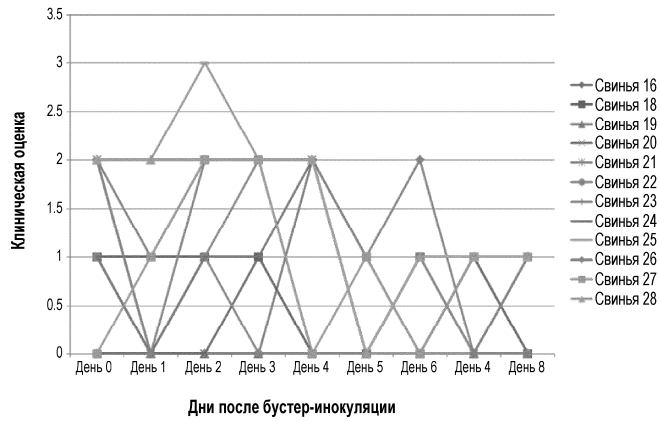


Фиг. 6



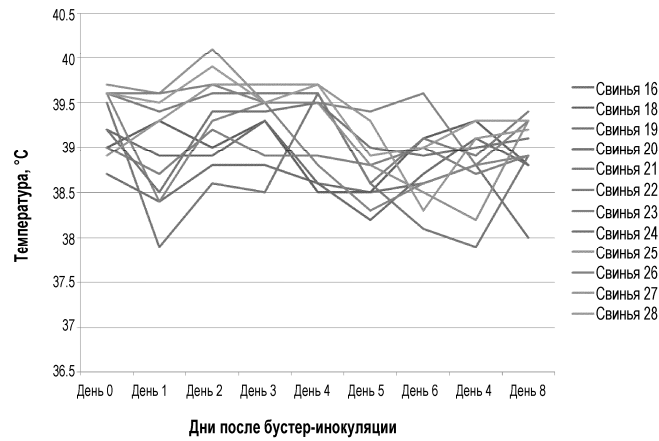
Фиг. 7

Клинические оценки после бустер-инокуляции



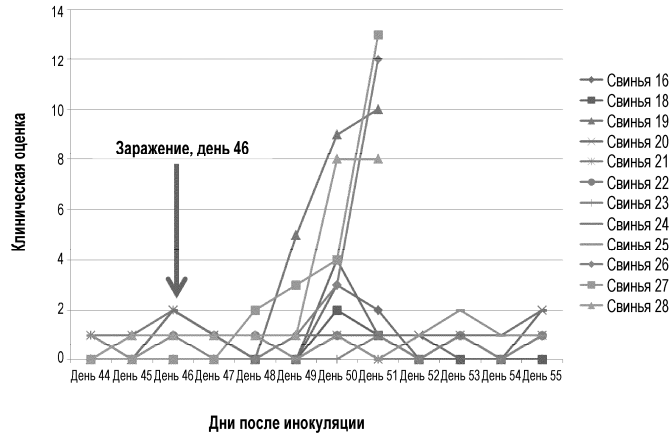
Фиг. 8

Температуры после бустер-инокуляции



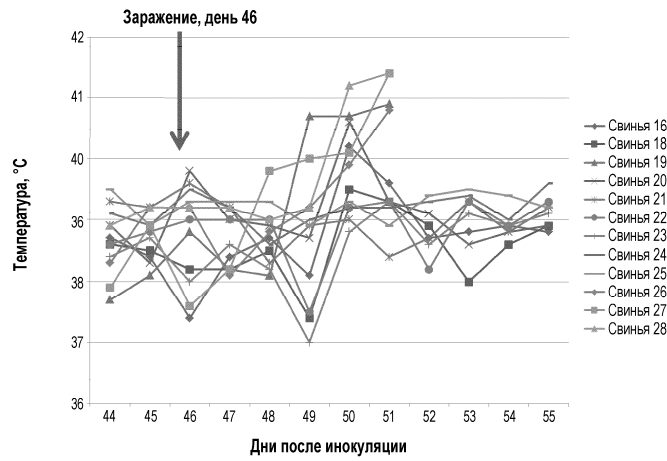
Фиг. 9

Клинические оценки после заражения Venip 97/1



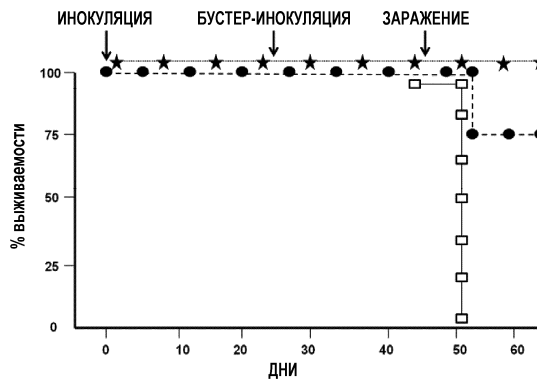
Фиг. 10

Температуры после заражения Venip 97/1

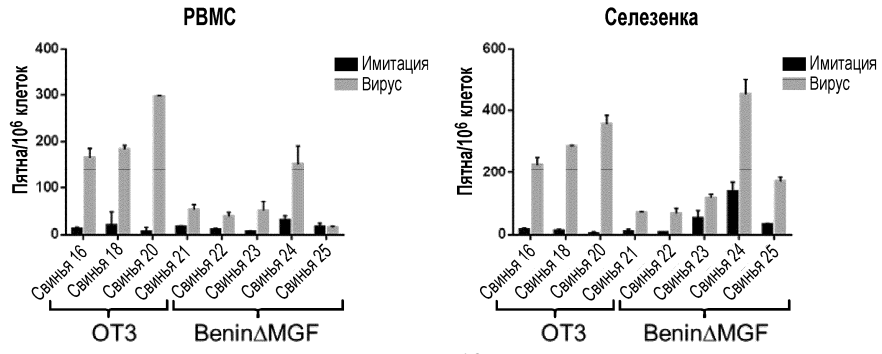


Фиг. 11

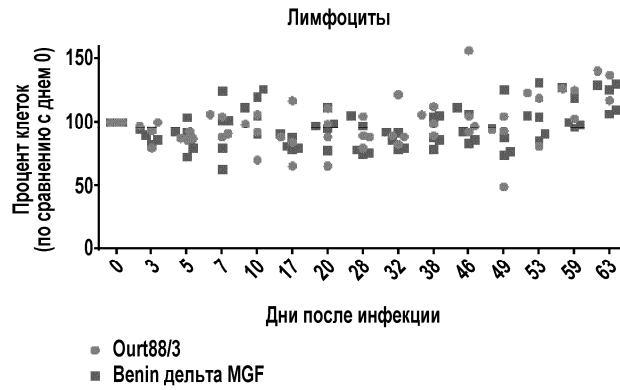
- ★ Группы 1 и 2 (свиньи 21, 22, 23, 24, 25)
- Группа 3 (свиньи 16, 19, 20)
- Группа 4 (свиньи 26, 27, 28)



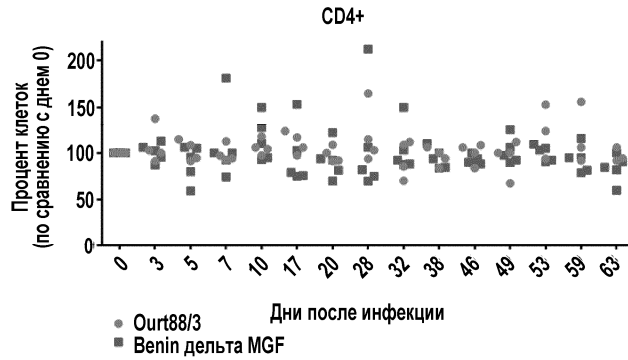
Фиг. 12



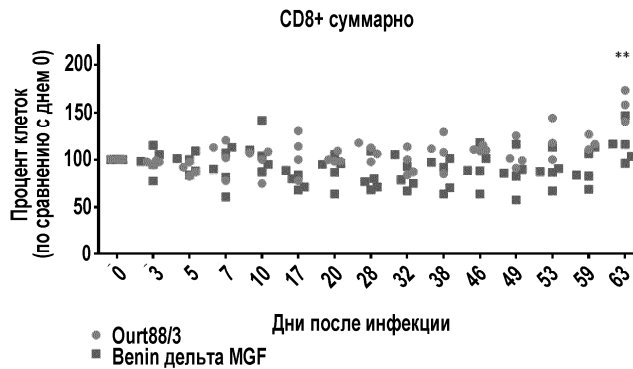
Фиг. 13



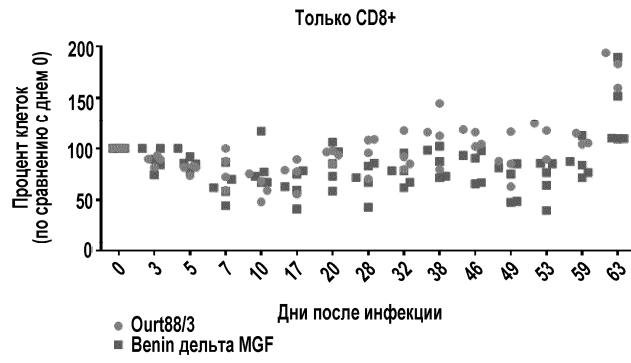
Фиг. 14



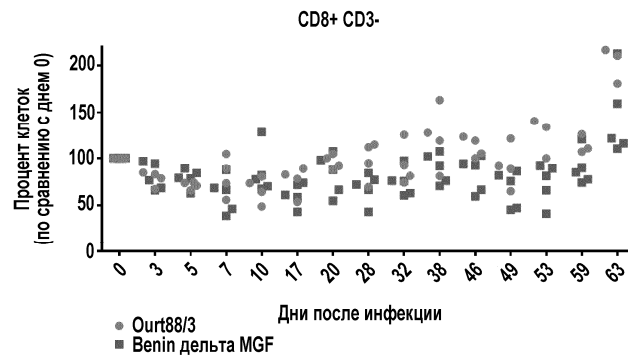
Фиг. 15



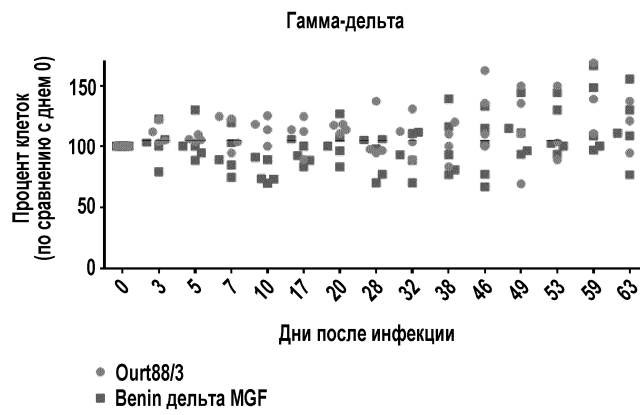
Фиг. 16



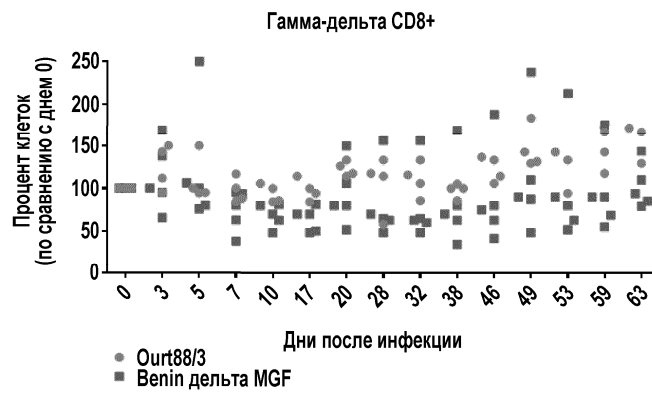
Фиг. 17



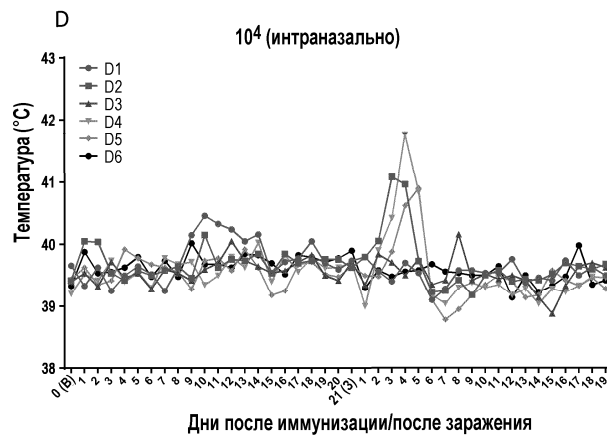
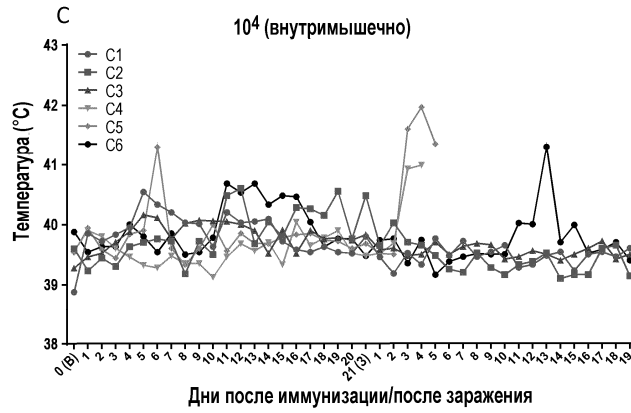
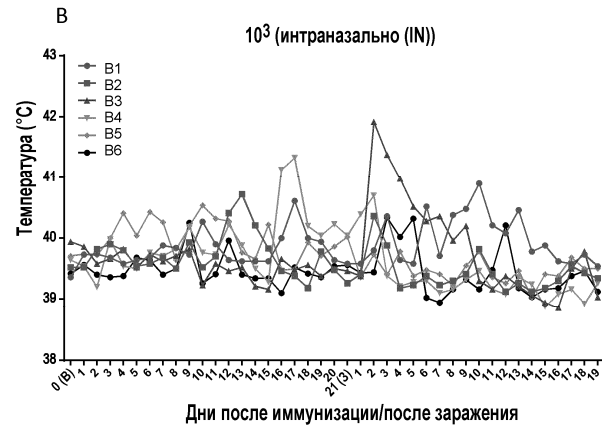
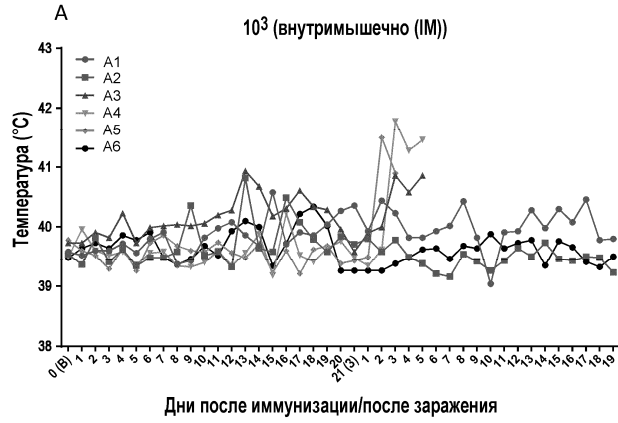
Фиг. 18

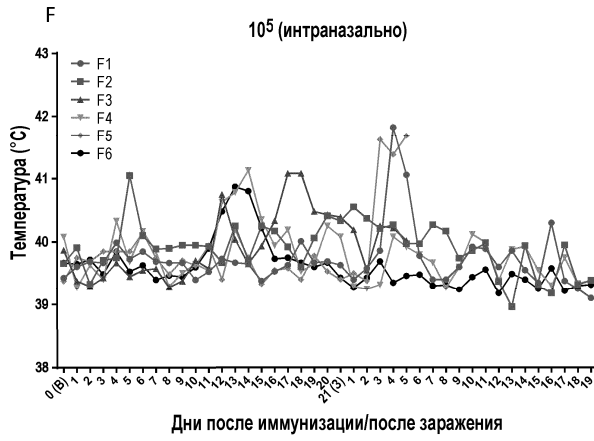


Фиг. 19

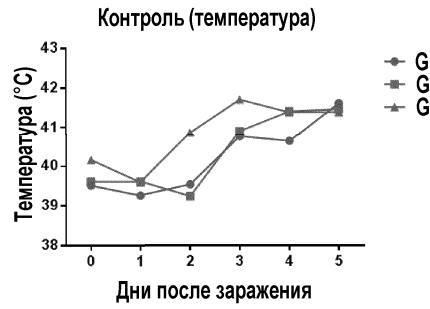


Фиг. 20





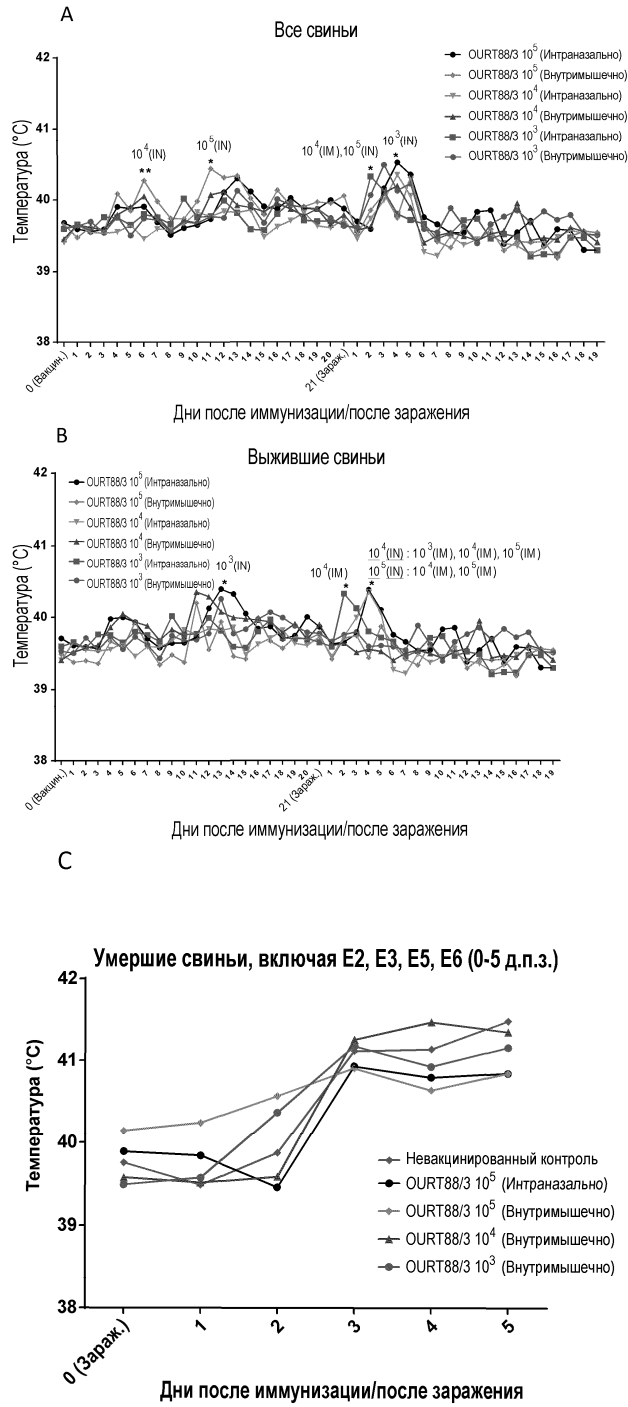
G



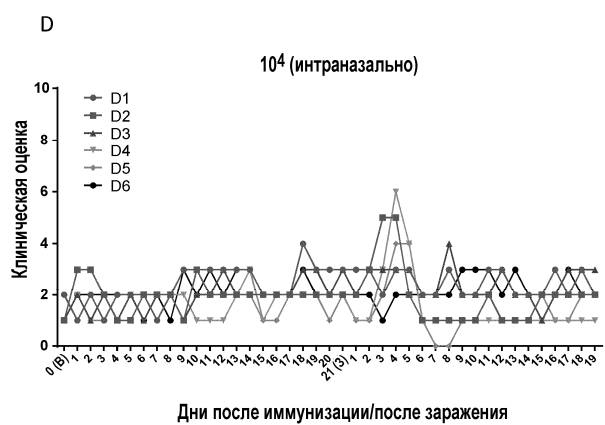
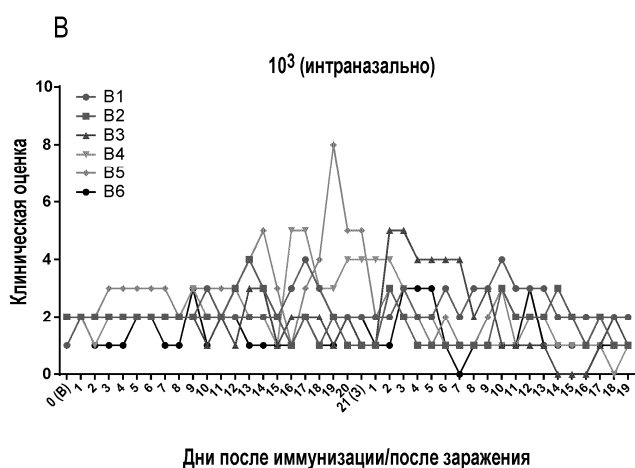
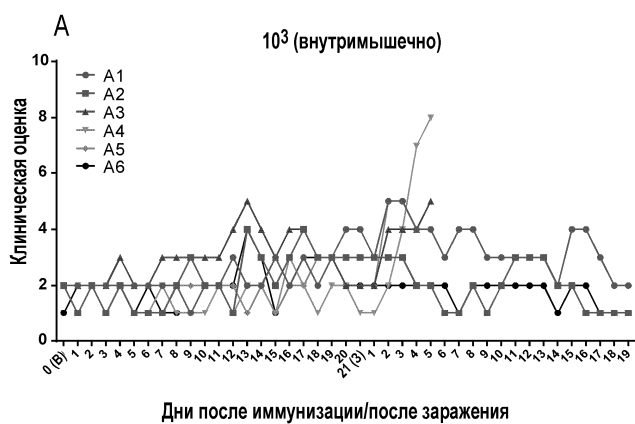
H

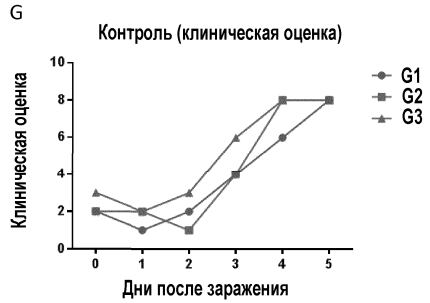
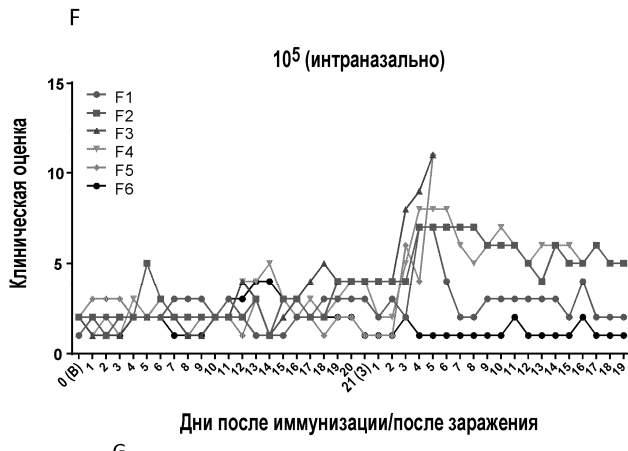
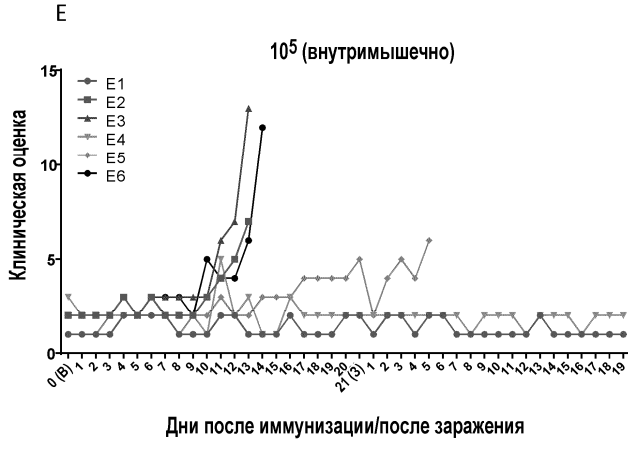


Фиг. 21

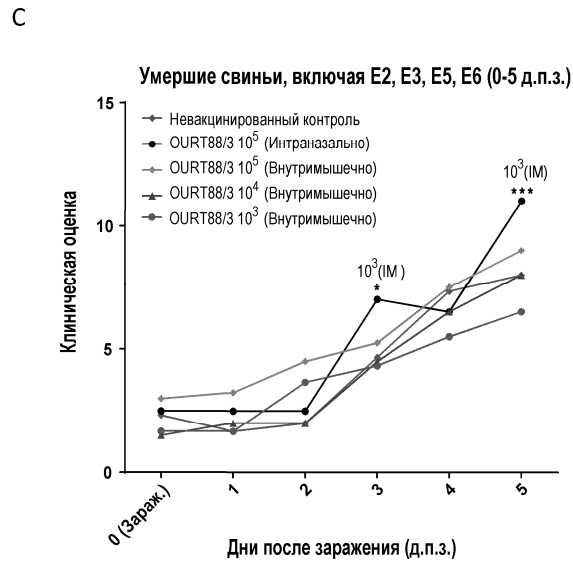
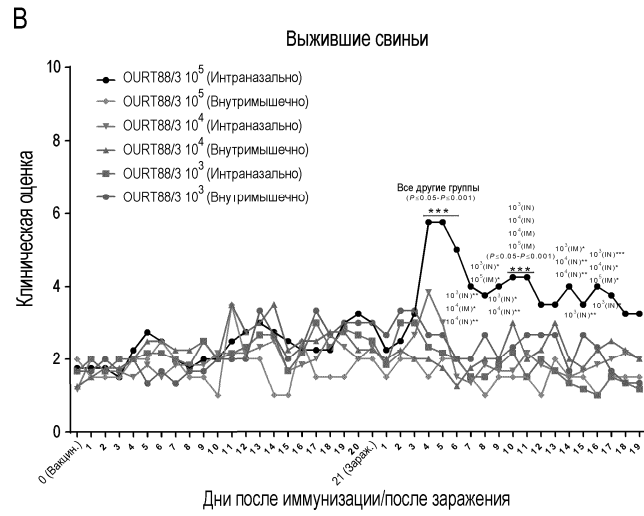
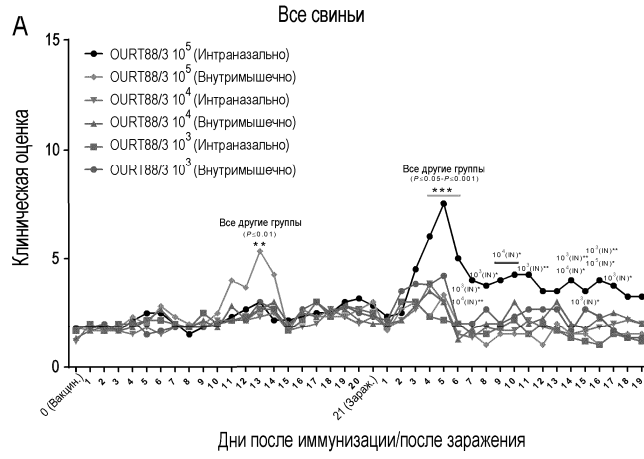


Фиг. 22

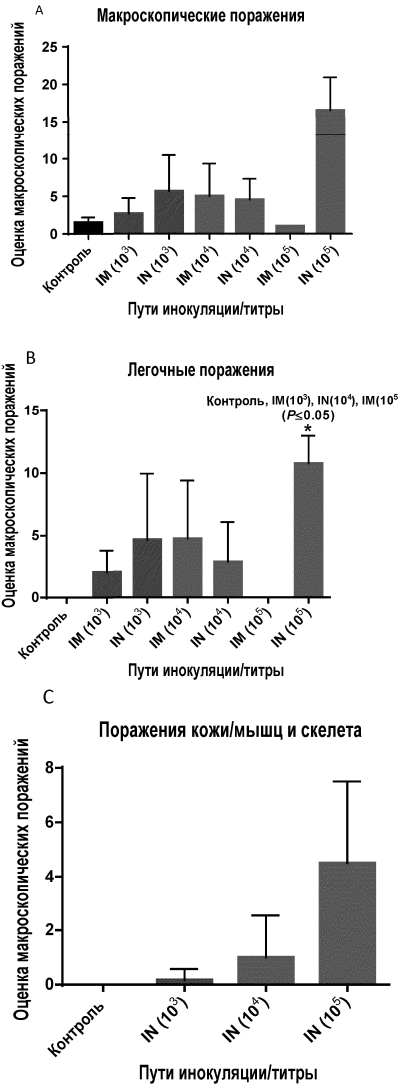




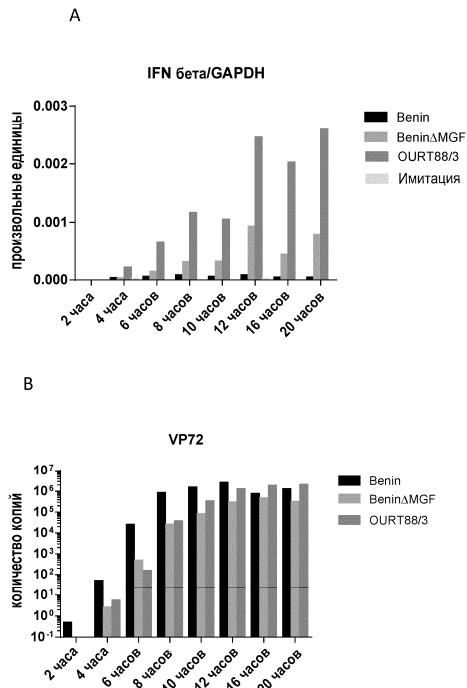
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26

AAATGAATAGATTTAATCCAAGTAGTATTAATAATTTTTAGAAATAGTGTCTACAAATATGAAATGA
 ATAGCCCAAAAAAATAAGGTGTACATTAATGTAATATATTGTAGGCTAAGTAAATTTAATATTTAAA
 GTACTTGGAAAAATATTTTTAACATATGCTGTCTAGGAATTTTTTGTAGACATTTAAAACCATATAGTT
 ACTTTATTTATACACTTAACCTGAAAAAGAAATTTGCTTAAATATTAATAGATGAAGTAATATTGTG
 TAATTTAGTCCATAACATGGGTGGGAAACAAAAATCTCGTAATATGAAAAATAAACATCCTAAAAAGAG
 TCGAATTTGTATAAGTTTATGTAACCTTATTTTAAAGTAAAGTATAAAAAATAGTACACAGAGGAAT
 AGGGGCCATTAATAATTTGGCTCCA**CACT**CTCTGTGTACAAAAAAAATATTTTTTGGCAAAAA
 AAATCCATGGAAGGATATTAATACACATAATTGTTTGACATCATATTGGTATACCTACCAATAGTAAT
 ATACAACCTCCTAATATTCACCTTATG**AAATGACCCCCCCCCCACCTATACAGTAAATAGTATAGG**
TTTTAATAAGAAAAAGATATATGATGTTTTATTTTTGTATAGTGCCTGAATGCAAAAATAAAATCC
 CAAATTTTTAACCTTTCTTTTTTTTTCTATACAGGATTTAGAAATAGTATTGGCAACGCTGTAGGGG
 ACCTGCAGCGGCTCCGGTCTTACCCCTCAGCAGCGGGCGGTGCCTCTTTCGAGCCAACTACTAAGG
 AGCTAGAGGACTTCTTACGCTCAGATGGGCAATCTGAGGAGATACTGTCTGGCCCCCTCTTAACCGTC
 TACTAGAACCCCTCATGCCCTCTGATATTTAACCGGATATCACCTATTTCTGCAGAAATCCCAAGGCAG
 GTCAGTTGGCGGCTTGAGGTCAAGATGCTTGAACGGTTATACGATGCTAATATTTACAAATATATTGT
 CTCGGCTGCGACCTAAAAAAGTCCGCAACAAGGCTATTGAGCTATCTGGGTTTTCCGAGCTATCCATA
 TTTGTCAATGCTCCTTTAGTTTTAGATATTGTACGATATGAGGAACCGGACTTTGCTGAATGGCCTTTA
 TTGTGCTGCTTACTTTGGTGAACCTCAGGTAATGATTTGCTCTACAATATATGCTCTGACCGGGC
 CAGTCTTACGGATGCCATCCAGATAAGTCTTGAGAGCAACAACAGGTAGGGATTTGCTATGCTTACT
 TGATGGGAGGCCTCAAGGGACTAGTCTCCGCCCACTGCGTAAACGCTCTGGCGCCAACTAGGCT
 CGCAGCGCAAAAAAGAGGACGCTCTTCAACCCCA**CGACTTCTTACT**GCTGCTCCAGTAGCTTTTTTGC
 CGCAGGACACCGTGGATAGGAGCTCCTCCACGCTCGCGATCCGGCGTGGAAAGCGGAACCGATCGAC
 GCCACCTGCTCCAGGGACCCCTTGGCTCGATGTCTGCTCGGCTCCCATACCTCGACGGCTGCAGCAAG
 CGGACGTCTCGTGCATTCGCTCCGTTTTTTGGCCCGCCGCCCCCCCC**CAT**TTATTCCTGTAAGATTA
 GTTTTTAATACSTATAAATACATAATTTAAGATTTAATATACCAAACTTAAACTATTTTTGTATAGT
 AACTATTAGCATGTCTACACATGATTTGTTTTCAAAAGAGAAACCGATGATATGAACGATATATCTGA
 GAAATCATCTGTCTGGATAATGCACCCGAGAAACAGCTGGAGCGAATCATATACCTGAGAACTCGCC
 CCGCAAAATGACATCATCAGAAATGGATGCTGAATATTGAAAGGTATAAAACGTGGAAATGACGTGCC
 ATGTTGTTGTTCCAAAGAAAAATGACCAAGTGCAGCAAAAAAGTTTTTCAGTATTTGGTAAGGGATCCCTAAT
 ACGTCCATCCAGAAATAATTAAAAAAATAATTTTTTGGTAAGTTTATAAACTATATAGTTAAAT
 ATGGTAAAAAAATCACAATAATAAATAAATTAACCTGAACGTGTAGAATTAATATTTTTTTAATAATCGGATAT
 AATATCCATTAATCAATAAA

Левый фланк - 529 п.н. Правый фланк - 740 п.н.

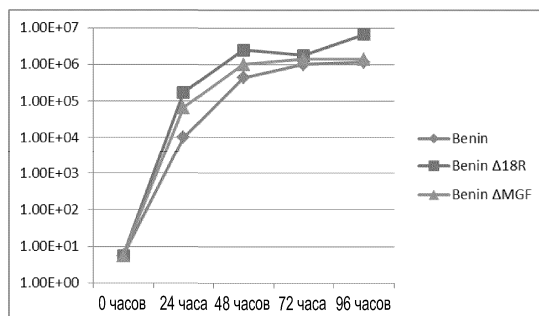
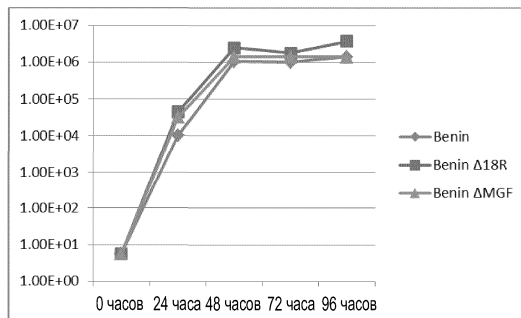
ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ

360-18RFlankL-for-Benin: GCTATCC**AA**GGTCTACAAATATGAAATGAATAGCCC
 360-18RFlankL-rev-Benin2: GCTATCC**GGTACCC**ATAAAGTGAATATTAGGATGGTTG
 360-18RFlankR-for: GCTATCC**CGGCCGC**CGACTTCTTACTGCTGCTCCAG
 360-18RFlankR-rev: GCTATCC**CTAGAT**CTTCTGGATGGAGCGTATTAGG

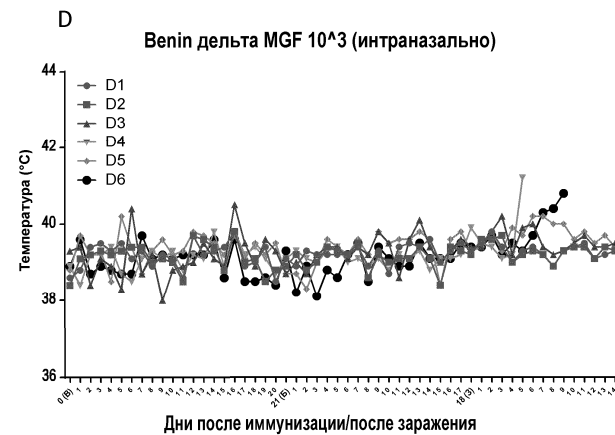
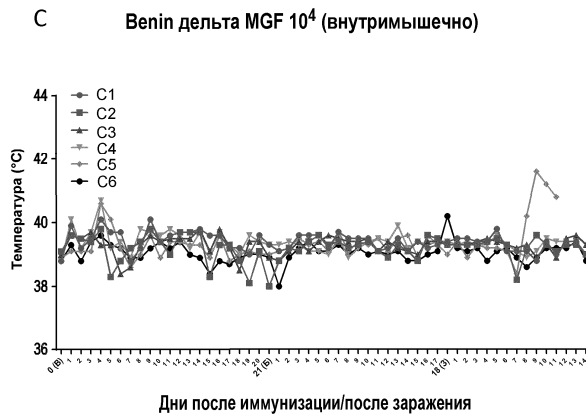
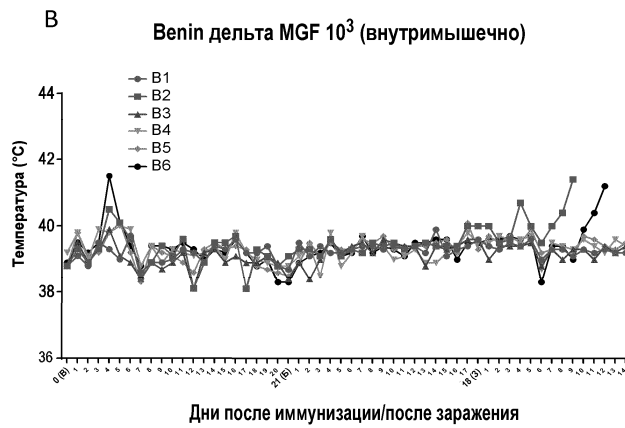
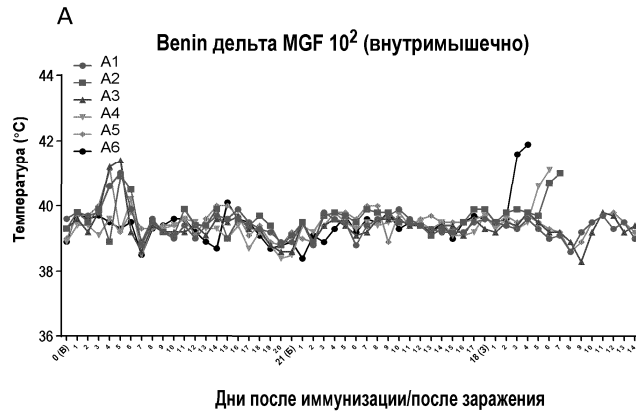
ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ СКРИНИНГА

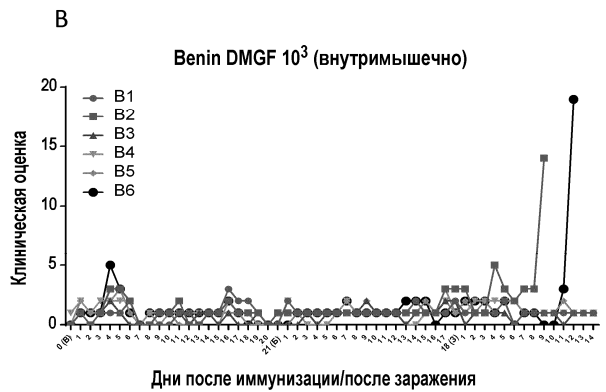
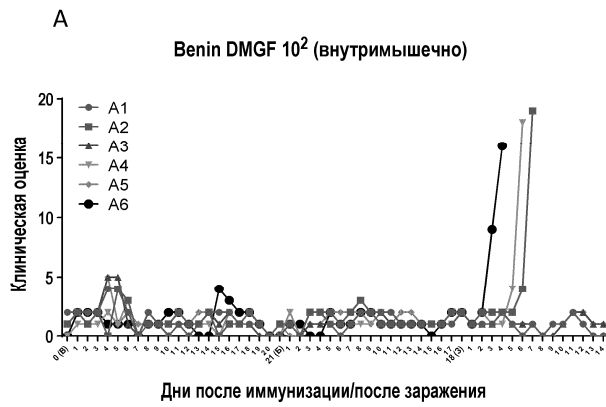
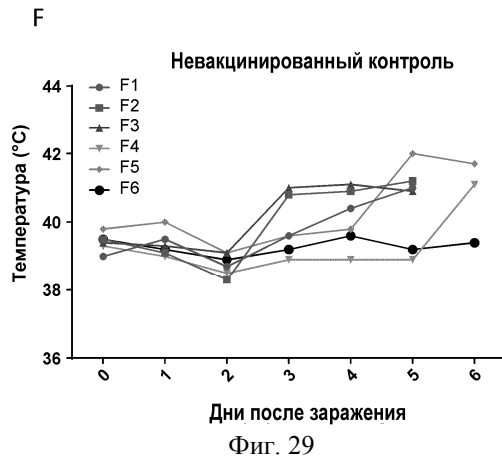
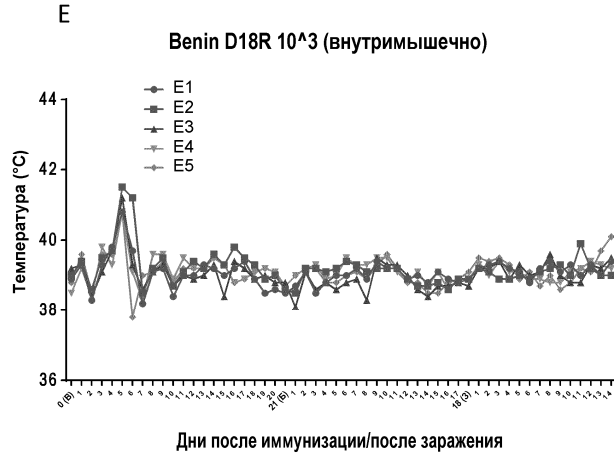
18R-Benin-Pair1-For: GAGTACAAGGGAATAGGGGCC
 18R-OURT-Pair1-Rev: GCATGACAATATGGATAGCTCG
 Папа 1: 715 п.н.
 18R-OURT-Pair2-For: GTCCGCAACAAGGCTATTGAG
 18R-OURT-Pair2-Rev: GACGTTTACGCACTGGGGC
 Папа 2: 307 п.н.
 18R-OURT-Pair3-For: CAACCAGGTAGGGAATGCTATGC
 18R-OURT-Pair3-Rev: GCTGCAGCCGTCGAGG
 Папа 3: 301 п.н.

Фиг. 27

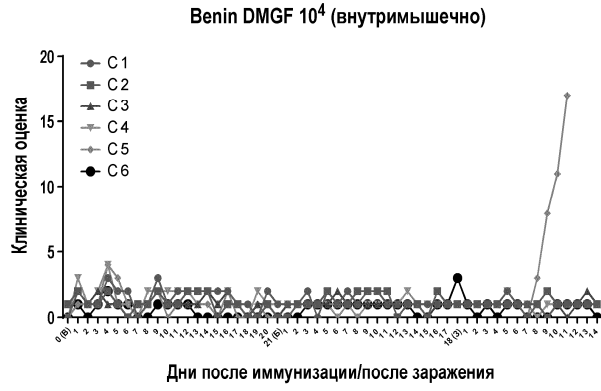


Фиг. 28

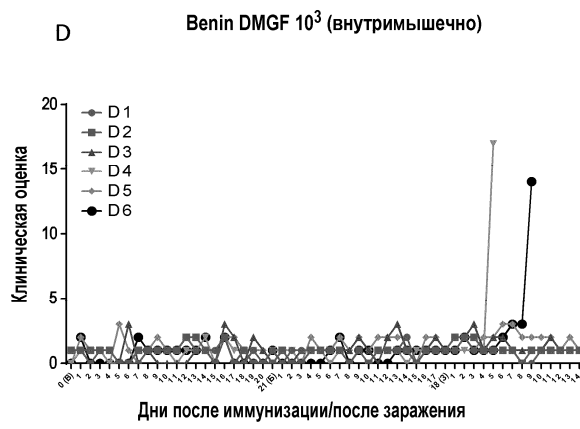




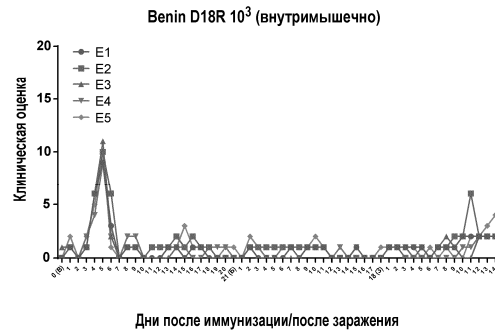
C



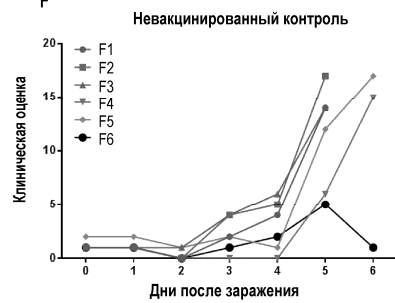
D



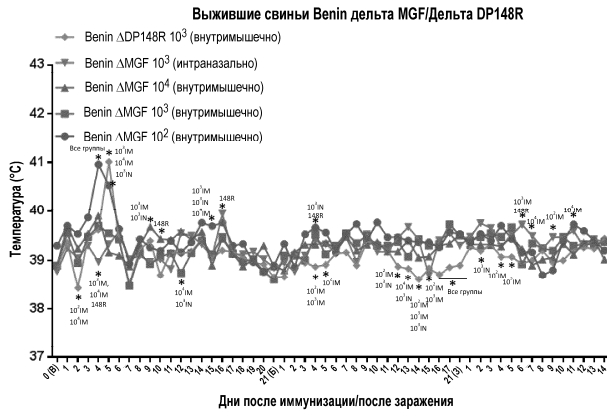
E



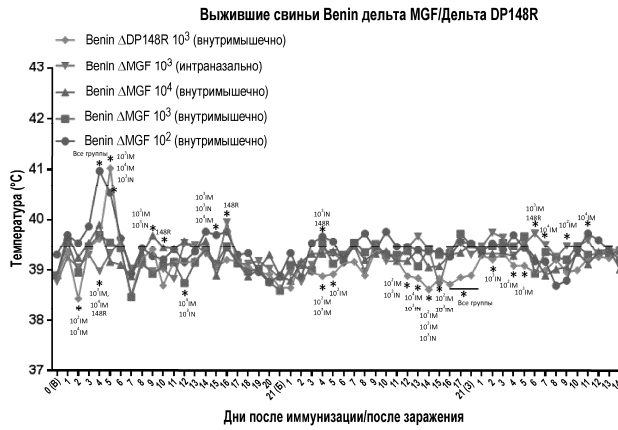
F



Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32

