

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043809**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.26**

(21) Номер заявки  
**201890274**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.07.11**

(51) Int. Cl. **C12N 15/861** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12N 15/34** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 7/01** (2006.01)

---

(54) **ВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА ИЗ АДЕНОВИРУСА 9 ПТИЦ (FAdV-9) И СВЯЗАННЫЕ СПОСОБЫ**

---

(31) **62/190,913**

(32) **2015.07.10**

(33) **US**

(43) **2018.08.31**

(86) **PCT/CA2016/050811**

(87) **WO 2017/008154 2017.01.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ГУЭЛФ (СА)**

(72) Изобретатель:  
**Пэй Яньлун, Экфорд Джеймс,  
Корредор Хуан Карлос, Крелл Питер  
Дж., Нажи Эва (СА)**

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

(56) CORREDOR, J.C. ET AL.: "The non-essential left end region of the fowl adenovirus 9 genome is suitable for foreign gene insertion/replacement", VIRUS RESEARCH, vol. 149, no. 2, 2010, pages 167-174, ISSN: 0168-1702, See whole document

CORREDOR, J.C. ET AL.: "Antibody response and virus shedding of chickens inoculated with left end deleted fowl adenovirus 9-based recombinant viruses", AVIAN DIS., vol. 55, no. 3, 2011, pages 443-446, See whole document

YANG, D.H. ET AL.: "Development of fowl adenovirus 9 based vector vaccine expressing

the hemagglutinin gene of an H5N1 influenza virus", PROGRAMME AND PROCEEDINGS, P. 48. ORAL PRESENTATIONS - VACCINES AND VIRAL IMMUNOLOGY. ESW - 8TH INTERNATIONAL CONGRESS OF VETERINARY VIROLOGY, August 2009 (2009-08-01), Budapest - Hungary, See whole document

OJKIC, D. ET AL.: "The Long Repeat Region Is Dispensable for Fowl Adenovirus Replication in Vitro", VIROLOGY, vol. 283, 2001, pages 197-206, ISSN: 0042-6822, See whole document  
US-B1-6296852

LE GOFF, F.L. ET AL.: "Deletion of open reading frames 9, 10 and 11 from the avian adenovirus CELO genome: effect on biodistribution and humoral responses", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 86, 2005, pages 2019-2027, ISSN:0022-1317, See whole document

DENG, L. ET AL.: "Oral inoculation of chickens with a candidate fowl adenovirus 9 vector", CLIN. VACCINE IMMUNOL, vol. 20, no. 8, 2013, pages 1189-1196, See whole document

CORREDOR, J.C. ET AL.: "A region at the left end of the fowl adenovirus 9 genome that is non-essential in vitro has consequences in vivo", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 91, 2010, pages 51-58, ISSN: 0022-1317, See whole document

WO-A1-2010058236

(57) В изобретении описаны рекомбинантные вирусные векторы, полученные из аденовируса 9 птиц (FAdV-9), и связанные способы. Рекомбинантные FAdV-9 векторы могут содержать одну или несколько делеций на левом конце и/или правом конце генома FAdV-9. Необязательно векторы содержат одну или несколько экзогенных нуклеотидных последовательностей, такие последовательности кодируют полипептид, представляющий интерес. Рекомбинантные FAdV-9 векторы можно использовать в качестве вектора для двойной доставки. Также описано применение векторов для создания иммуногенного ответа у пациента и/или для профилактики заболевания.

**B1****043809****043809****B1**

### Связанная заявка

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США № 62/190,913, поданной 10 июля 2015 года, содержание которой включено, таким образом, посредством ссылки в полном объеме.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к аденовирусу 9 птиц (FAdV-9) и более конкретно к FAdV-9 векторной системе двойной доставки и связанным способам, а также к их использованию для предотвращения заболевания.

### Предпосылки изобретения

Аденовирусы птиц (FAdV) являются повсеместными патогенами домашней птицы и являются членами семейства Adenoviridae.

Аденовирусы (AdV) рода Mastadenovirus исследовали в качестве средств против злокачественных опухолей (Huebner et al. (1956), Cody & Douglas (2009), Yamamoto & Curiel (2010)) и вакцинных векторов (Lasaro & Ertl (2009)).

Проблема предварительного существующего иммунитета против HAdV-5, примером которой является исследование STEP HIV, в котором использовали рекомбинантный HAdV-5 (Buchbinder et al. (2008), McElrath et al. (2008)), вызвала интерес к исследованию менее распространенных серотипов AdV и не относящихся к человеку AdV в качестве как онколитических ((Cody & Douglas (2009), Gallo et al. (2005), Shashkova et al. (2005)), так и вакцинных векторов (Barouch (2008), Lasaro & Ertl, (2009), Sharma et al. (2009)). Аденовирусы птиц (FAdV) рода Aviadenovirus, в том числе виды от FAdV-A до FAdV-E (Adair, B. & Fitzgerald, S. (2008), Benkő et al. (2005)), исследовали в качестве вакцинных векторов. Доказана эффективность первого поколения вакцинных векторов на основе FAdV для индукции образования антител против доставляемого трансгена (Corredor & Nagy (2010b), Ojkic & Nagy (2003)), а куры получали защитный иммунитет против вируса инфекционного бурсита (IBDV) (Francois et al. (2004), Sheppard et al. (1998)) и вируса инфекционного бронхита (Johnson et al. (2003)). Анализ полных геномов FAdV-1, летального сиротского вируса куриных эмбрионов (CELO) (Chiocca et al. (1996)) и FAdV-9 (Ojkic & Nagy (2000)) (виды FAdV-A и FAdV-D, соответственно) и концевых геномных областей FAdV-2, -4, -10 и -8 (Corredor et al. (2006), Corredor et al. (2008)) показал, что FAdV имеют общую геномную организацию.

Доказано, что вакцинные векторы на основе аденовирусов являются перспективными инструментами контроля патогенов (Bangari & Mittal (2006), Ferreira et al. (2005)). Первое поколение вакцинных векторов на основе аденовирусов птиц (FAdV) эффективно использовали для того, чтобы индуцировать образование антител против встроенного чужеродного гена (трансгена) (Corredor, & Nagy (2010a), Ojkic & Nagy (2003)), а у кур подтвержден защитный иммунитет против вируса инфекционного бурсита (Francois et al. (2004), Sheppard et al. (1998)) и вируса инфекционного бронхита (Johnson et al. (2003)).

Аденовирусные векторы из уровня техники, в частности, из аденовирусов птиц, стеснены пределом размера для размера вставки чужеродной ДНК в векторной ДНК. Следовательно, невозможно клонировать особенно большие вставки ДНК, представляющие важные части иммуногенных белков в независимом реплицирующемся вирусе. Также невозможно клонировать больше чем один ген. Значение вектора, способного экспрессировать два или даже несколько антигенов, состоит в том, что только одна вакцина будет необходима для того, чтобы защищать от двух или больше заболеваний. Это невозможно при использовании аденовирусных векторов существующего уровня техники из-за недостатка полезной емкости.

Следовательно, сохраняется потребность в новых аденовирусных векторах и, в частности, в новых аденовирусных векторах для двойной доставки, а также их использованиях.

### Сущность изобретения

Авторы изобретения разработали новые аденовирусные векторы на основе рекомбинантного аденовируса 9 птиц (FAdV-9). Векторы, в частности, можно использовать для доставки и/или экспрессии экзогенных последовательностей и в качестве аденовирусных векторов для двойной доставки. В новый вектор можно вставлять одну или несколько экзогенных нуклеотидных последовательностей. Необязательно, одна или несколько экзогенных нуклеотидных последовательностей кодируют один или несколько антигенных сайтов заболевания, представляющего интерес.

Соответственно, в одном из аспектов изобретение относится к вирусному вектору из рекомбинантного аденовируса 9 птиц (FAdV-9). В одном из вариантов осуществления рекомбинантный FAdV-9 вирусный вектор представляет собой вирусный вектор для двойной доставки.

В одном из аспектов FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на левом конце генома. В одном из вариантов осуществления делеция на левом конце генома содержит делецию одной или нескольких из ORF0, ORF1 и ORF2. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на правом конце генома. В одном из вариантов осуществления делеция на правом конце генома содержит делецию одного или нескольких из ORF19, TR2, ORF17 и ORF11. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делеции как на левом конце, так и на правом конце генома. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию ORF0, ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию ORF1, ORF2,

TR2, ORF17 и ORF11. В другом варианте осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию ORF1, ORF2, и ORF19. В другом дополнительном варианте осуществления FAdV9-вирусный вектор имеет делецию ORF1, ORF2 и ORF19, TR2 или ORF11.

В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на левом конце генома приблизительно в 2291 пару оснований, необязательно между приблизительно 1900 и 2500 парами оснований. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на правом конце генома приблизительно в 3591 пару оснований. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на правом конце генома между приблизительно 3000 парами оснований и 4000 парами оснований.

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с последовательностью с двумя делециями, представленными на фиг. 10A. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID № 1, с одной или несколькими делециями, необязательно одной или несколькими делециями, представленными на фиг. 10A.

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор имеет инсерционную емкость больше чем 4000 п. о., больше чем 5000 п. о., больше чем 6000 п. о. или необязательно больше чем 7000 п. о.

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит по меньшей мере одно из следующего:

(a) нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой нуклеотиды с 575 до 2753 удалены,

(b) нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой нуклеотиды с 847 до 2753 удалены,

(c) нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой нуклеотиды с 38807 до 42398 удалены,

(d) нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой нуклеотиды с 34220 до 36443 удалены,

(e) нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой нуклеотиды с 38807 до 40561 удалены или в которой нуклеотиды с 41461 до 42398 удалены, и

(f) нуклеотидную последовательность по меньшей мере с 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей с нуклеотидными последовательностями, изложенными в (a), (b), (c), (d) или (e).

Например, в одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 575 до 2753, с 847 до 2753 и/или с 38807 до 42398. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 575 до 2753 и с 38807 до 42398. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 847 до 2753 и с 38807 до 42398. В другом варианте осуществления вирусный вектор содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 847 до 2753 и с 34220 до 36443. В другом варианте осуществления вирусный вектор содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 847 до 2753, с 34220 до 36443 и с 38807 до 40561 или с 41461 до 42398.

Другой аспект изобретения предусматривает вирусный вектор, в который вставлена одна или несколько экзогенных нуклеотидных последовательностей. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит одну или несколько экзогенных нуклеотидных последовательностей, кодирующих один или несколько полипептидов, представляющих интерес, необязательно один или несколько антигенных и/или терапевтических полипептидов. В одном из аспектов, вирусный вектор представляет собой вектор для двойной доставки, способный экспрессировать две или больше экзогенных нуклеотидных последовательностей. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит экзогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие один или несколько антигенных сайтов заболевания, представляющего интерес. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит последовательность, соответствующую по меньшей мере одному гену, перечисленному в табл. 1, или его гомологу.

Также изобретение относится к клеткам-хозяевам, трансформированным одним или несколькими вирусными векторами, как раскрыто в настоящем описании.

Дополнительным аспектом изобретения является способ получения вирусного вектора, как раскрыто в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления способ включает вставку экзогенной нуклеотидной последовательности в рекомбинантный FAdV-9 вирусный вектор, как раскрыто в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор содержит одну или несколько рекомбинантных управляющих последовательностей, таких как один или несколько промоторов. Необязательно, вирусный вектор содержит один или несколько сайтов клонирования для того, чтобы содействовать рекомбинантной inserции экзогенных нуклеотидных последовательностей в вирусный вектор.

В одном из аспектов предоставлена иммуногенная композиция, содержащая aFAdV-9 вирусный вектор, как раскрыто в настоящем описании, который имеет экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антигенный сайт заболевания, представляющего интерес, вставленный в него. В одном из вариантов осуществления иммуногенная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. В одном из вариантов осуществления иммуногенная композиция дополнительно содержит адъювант. В одном из вариантов осуществления иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

В другом аспекте изобретение относится к способу создания иммуногенного ответа у пациента. В одном из вариантов осуществления способ включает введение пациенту вирусного вектора или иммуногенной композиции, как раскрыто в настоящем описании. Также изобретение относится к вирусному вектору или иммуногенной композиции, как раскрыто в настоящем описании, для применения в создании иммуногенного ответа у пациента. В одном из вариантов осуществления способы и применения, описанные в настоящем описании, предназначены для создания иммуногенного ответа против антигена заболевания, необязательно одного или нескольких заболеваний, перечисленных в табл. 1. В одном из вариантов осуществления способы и применения, описанные в настоящем описании, предназначены для профилактики заболевания и/или вакцинации пациента против одного или нескольких заболеваний.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения видны из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и отражают предпочтительные варианты осуществления изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации сущности и объема изобретения будут видны специалистам в данной области из подробного описания.

#### Краткое описание фигур

Новые признаки настоящего изобретения установлены, в частности, в приложенной формуле изобретения. Однако само изобретение, вместе с другими его целями и преимуществами, легче понять из дальнейшего подробного описания конкретного варианта осуществления, в прочтении вместе с приложенными чертежами, на которых:

на фиг. 1 представлена FAdV-9 векторная система (FAd-мида). FAd-мида имеет следующие характеристики: непатогенный штамм FAdV-9, необязательные области на левом и правом конце, рекомбинантные FAdV растут подобно FAdV-9 дикого типа, сниженное вирусыведение и образование антител к вирусному каркасу, а EGFP (ген-репортер) экспрессируют с использованием этого каркаса, когда используют экзогенный (чужеродный) промотор (CMV) (Corrector, J. C. & Nagy, E. (2010b));

на фиг. 2 представлена последовательность левого конца FAdV-9. Функция ORF1 и 1C: модулирует врожденный и адаптивный иммунный ответ; функция ORF0, 1A, 1B и 2: не известна. Когда удаляют ORF0, нативный ранний промотор не функционирует -экспрессия чужеродных генов отсутствует (например mCherry). Когда удаляют только ORF1 и 2, нативный промотор работает;

на фиг. 3 представлена делеция ORF 0, 1 и 2. (A) Схема создания pFAdV9-Δ0-1-2-RED: ORF0, ORF1, 1A, 1B, 1C и 2 заменяли на кассету CAT, фланкированную с обеих сторон сайтами SwaI для того, чтобы создавать pFAdV9-Δ0-1-2CAT посредством гомологичной рекомбинации. Кассету CAT удаляли посредством расщепления SwaI, после чего следовало повторное лигирование для того, чтобы создавать немеченный pFAdV9-Δ0-1-2SwaI. Затем кодирующую последовательность mCherry клонировали в сайт SwaI для того, чтобы создавать pFAdV9-Δ0-1-2RED; MLP, главный поздний промотор; ITR, инвертированный концевой повтор; (B) и (D) расщепление NotI и ПЦР амплификация ДНК для того, чтобы верифицировать FAd-миды и соответствующие вирусы. Дорожки Δ0-2; pFAdV9-Δ0-12-RED или вирус 3 пасирования; дорожки wt: pFAdV9-wt или вирус; M: маркер ДНК 1 т. о. Расщепление ДНК pFAdV9-wt с использованием NotI: размеры фрагментов 26 т. о., 11,4 т. о., 6 т. о., 4 т. о. и 1,4 т. о.; расщепление NotI дорожки Δ0-2; размеры фрагментов составляют 26 т. о.; 11,4 т. о., 5,9 к и 4 т. о.; продукт ПЦР дорожки Δ0-2 1619 п. о. и продукт ПЦР wt 3107 п. о.; (C) цитопатический эффект (CPE) и экспрессия mCherry с помощью RecFAdV;

на фиг. 4 представлена делеция ORF1 и 2. (A) схема создания pFAdV9-Δ1-2-RED: ORF1, 1A, 1B, 1C и 2 заменяли на кассету CAT, фланкированную по обеим сторонам сайтами SwaI для того, чтобы создавать pFAdV9-Δ1-2CAT посредством гомологичной рекомбинации. Кассету CAT удаляли посредством расщепления SwaI, после чего следовало повторное лигирование для того, чтобы создавать немеченный pFAdV9-Δ1-2SwaI. Затем кодирующую последовательность mCherry клонировали в сайт SwaI для того,



чтобы создавать pFAdV9-Δ1-2RED; MLP, главный поздний промотор; ITR, инвертированный концевой повтор; (B) и (D) расщепление NotI и ПЦП амплификация ДНК для того, чтобы верифицировать FAd-миды и соответствующие вирусы. Дорожки Δ1-2; pFAdV9-Δ1-2RED или вирус 3 пассирования; дорожки wt: pFAdV9-wt или вирус; M: маркер ДНК 1 т. о. Расщепление ДНК pFAdV9-wt с использованием NotI: размеры фрагментов составляют 26 т. о., 11,4 т. о., 6 т. о., 4 т. о. и 1,4 т. о.; расщепление дорожки Δ1-2 с использованием NotI; размеры фрагментов составляют 26 т. о.; 11,4 т. о., 6,2 к и 4 т. о.; продукт ПЦП дорожки Δ1-2 1912 п. о. и продукт ПЦП wt 3107 п. о.; (C) экспрессия mCherry с помощью RecFAdV;

на фиг. 5 представлена последовательность правого конца FAdV-9. Функция TR-2, ORF17 и ORF11 неизвестна; TR-2: самая длинная область повтора состоит из 13 прилегающих прямых повторов 135 п. о. длиной; ORF17 и 11 вероятно представляют собой мембранные гликопротеины;

на фиг. 6 представлена делеция ORF17. (A) схема создания pFAdV9-Δ17. ORF17 заменяли на кассету CAT, фланкированную с обеих сторон сайтами SwaI посредством гомологичной рекомбинации для того, чтобы создавать pFAdV9-Δ17 (B) и (C) расщепление NotI и ПЦП амплификация ДНК для того, чтобы верифицировать FAd-миды и соответствующие вирусы. Дорожки Δ17; pFAdV9-Δ17 или вирус 3 пассирования; дорожки wt: pFAdV9-wt или вирус; M: маркер ДНК 1 т. о. Расщепление ДНК pFAdV9-wt с использованием NotI: размеры фрагментов составляют 26 т. о., 11,4 т. о., 6 т. о., 4 т. о. и 1,4 т. о.; расщепление дорожки Δ17 с использованием NotI; размеры фрагментов составляют 26381 п. о.; 11485 п. о., 6056 п. о., 4078 п. о. и 1391 п. о.; продукт ПЦП дорожки Δ17 2822 п. о. и ПЦП wt не давала продукта;

на фиг. 7 представлена делеция TR2, ORF17 и 11. (A) схема создания pFAdV9-ΔTR2-17-11EGFP: TR2, ORF17, ORF11 заменяли на кассету CAT, фланкированную с обеих сторон сайтами SwaI для того, чтобы создавать pFAdV9-ΔTR2-17-11CAT посредством гомологичной рекомбинации. Кассету CAT удаляли посредством расщепления SwaI, после чего следовало повторное лигирование для того, чтобы создавать немеченный pFAdV9-ΔTR2-17-11SwaI. Затем кассету EGFP клонировали в сайт SwaI для того, чтобы создавать pFAdV9-ΔTR2-17-11EGFP; MLP, главный поздний промотор; ITR, инвертированный концевой повтор; кассета EGFP, CMV-EGFP; (B) и (D) расщепление NotI и ПЦП амплификация ДНК для того, чтобы верифицировать FAd-миды и соответствующие вирусы. Дорожки ΔTR2; pFAdV9-ΔTR2-17-11EGFP или вирус 3 пассирования; дорожки wt: pFAdV9-wt или вирус; M: маркер ДНК 1 т. о. Расщепление ДНК pFAdV9-wt с использованием NotI: размеры фрагментов составляют 26 т. о., 11,4 т. о., 6 т. о., 4 т. о. и 1,4 т. о.; расщепление дорожки ΔTR2 с использованием NotI; размеры фрагментов составляют 21 т. о.; 11,4 т. о., 6 т. о., 4 т. о., 3 т. о. и 1,4 т. о.; продукт ПЦП дорожки ΔTR2 3014 п. о. и продукт ПЦП wt 4966 п. о.; (C) экспрессия mCherry с помощью RecFAdV;

на фиг. 8 показано, что рекомбинантный FAdV-9 вирусный вектор представляет собой вектор для двойной доставки, способный экспрессировать экзогенные нуклеотидные последовательности на левом конце и правом конце. (A) схема создания pFAdV9-Δ1-2RED/TR2-17-11EGFP. TR2, ORF17 и ORF11 в pFAdV9-Δ1-2RED заменяли на кассету CAT, фланкированную с обеих сторон сайтами SwaI для того, чтобы создавать pFAdV9-Δ1-2REDΔTR2-17-11CAT посредством гомологичной рекомбинации. Кассету CAT заменяли на кассету EGFP посредством расщепления SwaI, после чего следовало лигирование для того, чтобы создавать pFAdV9-Δ1-2RED/TR2-17-11EGFP. MLP, главный поздний промотор; ITR, инвертированный концевой повтор; кассета EGFP, CMV-EGFP; (B) и (D) расщепление NotI и ПЦП амплификация ДНК для того, чтобы верифицировать FAd-миды и соответствующие вирусы. Дорожки ΔDual: pFAdV9-Δ1-2RED/TR2-17-11EGFP или вирусы 3 пассирования. Дорожка M: маркер ДНК 1 т. о. Дорожки wt: pFAdV9-wt или вирус. Расщепление ДНК pFAdV9-wt с использованием NotI: размеры фрагментов составляют 26 т. о.; 11,4 т. о., 6 т. о., 4 т. о. и 1,4 т. о.; расщепление дорожек ΔDual с использованием NotI: размеры фрагментов составляют 21 т. о., 11,4 т. о., 6,2 т. о., 4 т. о. и 3 т. о.; левый продукт ПЦП дорожки ΔDual 1912 п. о. и продукт ПЦП wt 3017 п. о.; правый продукт ПЦП дорожки ΔDual 3014 п. о. и wt продукт ПЦП 4966 п. о.;

на фиг. 9 представлены гес вирусы на основе FAdV-9 с генами-репортерами;

на фиг. 10(A) представлена нуклеотидная последовательность одного из вариантов осуществления рекомбинантного FAdV-9 вирусного вектора, как раскрыто в настоящем описании, в котором удалены ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11; (B) нуклеотидные последовательности генов, вставленных в рекомбинантные вирусы: усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP, SEQ ID № 2) и mCherry красный (SEQ ID № 3); (C) нуклеотидные последовательности промоторов, вставленных в рекомбинантные гены: предранний промотор цитомегаловируса человека (CMV; SEQ ID № 4), CMV энхансер/промотор β-актина курицы (CAG, SEQ ID № 5), промотор фактора элонгации 1α человека (EF1α, SEQ ID № 6), промотор L2R (SEQ ID № 7) и промотор β-актина (SEQ ID № 8); и (D) нуклеотидная последовательность энхансера/регуляторной последовательности, используемых в рекомбинантных вирусах: посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPER, SEQ ID № 9);

на фиг. 11 приведено схематическое представление pCI-Neo. Плазмиду pCI-Neo (Promega) выбирали для того, чтобы создавать конструкции для двойной экспрессии, благодаря ее уникальным сайтам рестрикции ферментов в сайте множественного клонирования и перед ним, а также гену устойчивости к неомицину;

на фиг. 12 представлено создание рекомбинантных FAdV-9Δ4 вирусов. (А) экспрессирующую каскету EGFP амплифицировали с помощью ПЦП из промежуточной конструкции pHMR или экстрагировали из геля после двойного расщепления с использованием BamHI и BglII. (В) pFAdV-9Δ4 линейаризовали и расщепляли с использованием SmaI. (С) Как каскету EGFP, так и линейаризованный pFAdV-9Δ4 совместно трансформировали в клетки *E. coli* BJ5183, чтобы подвергать гомологичной рекомбинации. (D) Получаемую плазмиду трансформировали в клетки *E. coli* DH5α, размножали, осуществляли скрининг посредством расщепления NotI и в конечном итоге линейаризовали с использованием PacI, чтобы высвободить вирусный геном из плазмиды. Линейную рекомбинантную вирусную ДНК трансфицировали в клетки CH-SAH. (Е) рекомбинантный вирус собирали в супернатанте. Эту процедуру осуществляли для каждой экспрессирующей каскеты EGFP, что давало вирусы: FAdV-9Δ4-CMV-EGFP, FAdV-9Δ4-CMV-EGFP-WPRE, FAdV-9Δ4-CAG-EGFP, FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE, FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP и FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE;

на фиг. 13 приведено схематическое представление двойных экспрессирующих EGFP/люциферазу плазмид. (А) EGFP ПЦП амплифицировали из pEGFP-N1 и клонировали в сайт множественного клонирования pCI-Neo. Ген устойчивости к неомицину (NeoR) из pCI-Neo удаляли посредством расщепления рестрикционными ферментами. Люциферазу светлячка ПЦП амплифицировали из pGL-4.17 и клонировали под промотор SV40, что давало к двойную экспрессирующую плазмиду. (В) Плазмиду pCMV-EGFP-Luc расщепляли с использованием SpeI и EcoRI для того, чтобы клонировать в промоторы, представляющие интерес, что давало пять векторов с EGFP под управлением различных промоторов и люциферазой под управлением промотора SV40: pCMV-EGFP-Luc, pCAG-EGFP-Luc, pEF1α-EGFP-Luc, pβ-актин-EGFP-Luc и pL2R-EGFP-Luc. Пять дополнительных плазмид получали посредством ненаправленного клонирования посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурков (WPRE) в каждую двойную экспрессирующую плазмиду в сайте NotI, что давало конструкции: pCMV-EGFP-WPRE-Luc, pCAG-EGFP-WPRE-Luc, pEF1α-EGFP-WPRE-Luc, pβ-актин-EGFP-WPRE-Luc и pL2R-EGFP-WPRE-Luc;

на фиг. 14 представлено сравнение EGFP экспрессии с флуоресцентной микроскопией. Клетки CH-SAH высевали в 35 мм чашках ( $1,8 \times 10^6$  клеток/чашка) и трансфицировали с использованием 2 мкг плазмидной ДНК. Флуоресценцию EGFP измеряли посредством микроскопии через 12, 24, 36, 48, 60 и 72 часа после трансфекции. Имитацию трансфекции использовали в качестве отрицательного контроля, тогда как pEGFP-N1 являлся положительным контролем;

на фиг. 15 представлен нормализованная экспрессия EGFP в зависимости от времени. Клетки CH-SAH высевали в 35 мм чашки ( $1,8 \times 10^6$  клеток/чашка) и трансфицировали с использованием 2 мкг плазмидной ДНК. В каждый момент времени трансфицированные клетки промывали, трипсинизировали и ресуспендировали в PBS. После трех циклов замораживания-оттаивания образцы центрифугировали и концентрацию белка в собранном супернатанте измеряли с использованием Nanodrop. Флуоресценцию EGFP измеряли в считывателе микропланшетов при длинах волн возбуждения и испускания 480 и 528 нм, соответственно. Люминесценцию люциферазы измеряли с использованием набора Pierce Firefly Luciferase Glow Assay (Thermo). Двойную экспрессию (флуоресценцию/люминесценцию) каждой конструкции нормализовали по уровню экспрессии pCMV-EGFP-Luc (нормализованному до 1,0) в каждый момент времени. Критерий Стьюдента использовали для того, чтобы определять значимость экспрессии по сравнению с pCMV-EGFP-Luc, которую обозначали звездочкой (\*), где  $P < 0,05$ ;

на фиг. 16 приведено схематическое представление промежуточных конструкций, используемых для того, чтобы создавать recFAdV. (А) ДНК FAdV-9, фланкирующую сайт делеции A4 (VF1 и VF2), ПЦП амплифицировали и направленно клонировали в двойную экспрессирующую плазмиду pCMV-EGFP-Luc. Получаемую конструкцию pHMR-CMV-EGFP использовали далее для того, чтобы создавать рекомбинантный вирус FAdV-9Δ4-CMV-EGFP. (В) Создавали пять дополнительных промежуточных конструкций, что вело к плазмидам: pHMR-CAG-EGFP, pHMR-EF1α-EGFP, pHMR-CMV-EGFP-WPRE, pHMR-CAG-EGFP-WPRE и pHMR-EF1α-EGFP-WPRE;

на фиг. 17 представлен скрининг электрофорезом в агарозном геле для FAd-мид, расщепленных NotI. FAd-миды, полученные гомологичной рекомбинацией плазмид pFAdV-9Δ4 и pHMR, расщепляли с использованием NotI и осуществляли скрининг получаемых паттернов полос на агарозном геле. Расщепленная pFAdV-9Δ4 имеет ожидаемый паттерн полос 4 т. о., 5,1 т. о., 13,7 т. о. и 23,8 т. о. Рекомбинантные FAd-миды с экспрессирующей каскетой EGFP содержат дополнительный сайт NotI для скрининга. Диагностические полосы, соответствующие каждой каскете, представляют собой следующее: CMV-EGFP=2,2 т. о., CMV-EGFP-WPRE=2,2 т. о. и 0,55 т. о., CAG-EGFP=2,9 т. о., CAG-EGFP-WPRE=0,55 т. о., EF1α-EGFP=2, 7 т. о. и EF1α-EGFP-WPRE=2, 7 т. о. и 0,55 т. о. Белые стрелки указывают на диагностические полосы;

на фиг. 18 представлены кривые роста вирусов. Одностадийные кривые роста для каждого рекомбинантного аденовируса птиц определяли в клетках CH-SAH. Клетки высевали в 35 мм чашки ( $1,8 \times 10^6$  клеток/чашка) и инфицировали при MOI=5. Внутриклеточный и внеклеточный вирус собирали между 0

и 72 ч. п. и. Одностадийные кривые роста получали в двух повторениях для каждого образца и весь внеклеточный вирус титровали посредством анализа бляшкообразования;

на фиг. 19 показано, что цитопатический эффект рекомбинантного FAdV совпадает с FAdV-9Δ4. Клетки CH-SAH высевали в 35 мм чашки ( $1,8 \times 10^6$  клеток/чашка) и инфицировали при MOI=5. Цитопатический эффект рекомбинантных вирусов сравнивали с контрольным FAdV-9Δ4 "дикого типа". Наблюдали, что все рекомбинантные вирусы (данные не представлены) имели CPE, схожий с FAdV-9Δ4, о чем свидетельствовало округление и отделение клеток при использовании светлопольного микроскопа. Однако флуоресценцию EGFP от recFAdV, например, FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE, наблюдали с использованием флуоресцентной микроскопии;

на фиг. 20 представлена динамика экспрессии EGFP в клетках CH-SAH. Клетки CH-SAH высевали в 35 мм чашки ( $1,8 \times 10^6$  клеток/чашка) и инфицировали с использованием recFAdV-9s при MOI=5. В каждый момент времени инфицированные клетки собирали, промывали и ресуспендировали в PBS. После трех циклов замораживания-оттаивания образцы центрифугировали и концентрацию белка в собранном супернатанте измеряли с использованием Nanodrop. Абсолютную флуоресценцию EGFP из 50 мкг цельного клеточного лизата измеряли с использованием считывателя микропланшетов при длинах волн возбуждения и испускания 480 и 528 нм, соответственно. Не инфицированные (имитация) или FAdV-9Δ4 инфицированные клетки не демонстрировали какой-либо флуоресценции EGFP;

на фиг. 21 представлен вестерн-иммуоблоттинг образования EGFP с течением времени. Экспрессию EGFP с помощью recFAdV-9 в клетках CH-SAH сравнивали в течение 48 ч. п. и., наряду с FAdV-9Δ4 (отрицательный контроль), неинфицированной имитацией (отрицательный контроль) и rEGFP-N1 трансфицированными клетками CH-SAH (положительный контроль). Клетки CH-SAH высевали в 35 мм чашки ( $1,8 \times 10^6$  клеток/чашка) и инфицировали с использованием recFAdV-9 при MOI=5. В каждый момент времени собирали цельные клеточные лизаты и определяли концентрации белка посредством анализа Бредфорда. 6 мкг каждого образца загружали в два геля, один подлежал исследованию антителом против EGFP (1:1000), после чего следовало вторичное антимишиное HRP-конъюгированное антитело (1:5000), другой гель подлежал исследованию антителом против актина (1:200), после чего следовало вторичное антикозье HRP-конъюгированное антитело (1:20000). Все появившиеся полосы имели ожидаемый размер (EGFP=27 кДа и актин=42 кДа), как определяли по маркеру молекулярной массы (не показано);

на фиг. 22 представлен поливалентный рекомбинантный FAdV-9 с H5, H7 и HN.

#### **Подробное описание изобретения**

Авторы изобретения установили, что рекомбинантный FAdV-9 с делециями на левой и/или правой стороне генома можно использовать в качестве вирусных векторов.

В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантный FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на левом конце генома. В одном из вариантов осуществления делеция на левом конце генома содержит делецию одного или нескольких из ORF0, ORF1 и ORF2.

В одном из вариантов осуществления рекомбинантный FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на правом конце генома. В одном из вариантов осуществления делеция на правом конце генома содержит делецию одного или нескольких из ORF19, TR2, ORF17 и ORF11.

В одном дополнительном варианте осуществления рекомбинантный FAdV-9 вирусный вектор имеет делеции как на левом конце, так и на правом конце генома. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию ORF0, ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11. В одном из вариантов осуществления рекомбинантного FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию ORF1, ORF2, и ORF19. В одном из вариантов осуществления рекомбинантного FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию ORF1, ORF2 и ORF19, TR2 или ORF11.

Как показано в примерах, рекомбинантные FAdV-9 вирусные векторы с делециями на левой стороне и правой стороне, включая делецию TR2, стабильны, и их можно использовать для управления экспрессией трансгена.

FAdV вирусные векторы, описанные в настоящем описании, обеспечивают множество преимуществ. Например, в некоторых вариантах осуществления FAdV вирусные векторы делают возможным получение моно- и поливалентных вакцин. Значение вектора, способного экспрессировать двойные или даже поливалентные антигены, состоит в том, что только одна вакцина нужна для того, чтобы защищать против одного или нескольких заболеваний. В одном из вариантов осуществления векторы допускают встраивание больших сегментов чужеродной ДНК, необязательно вплоть до 7,7 т. о. чужеродной ДНК. В одном из вариантов осуществления векторы являются стабильными и безопасными для использования у животных, таких как куры. В одном из вариантов осуществления вирусные векторы легки в получении и образуют высокие вирусные титры. В одном из вариантов осуществления имеют место различные серотипы FAdV. В одном из вариантов осуществления вирусные векторы не имеют предварительно существующего иммунитета у человека, и их можно использовать в генной терапии человека.

В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусные векторы, описанные в настоящем описа-

нии, могут включать одну или несколько экзогенных нуклеотидных последовательностей (также обозначаемых в настоящем описании как трансгены).

В одном из вариантов осуществления изобретения экзогенную нуклеотидную последовательность выбирают из антигенных последовательностей против гриппа, инфекционного ларинготрахеита, инфекционного бронхита, инфекции фабрициевой сумки (Гумборо), гепатита, вирусного ринотрахеита, инфекционного катаракта, *Mycoplasma hyorheumoniae*, пастереллеза, респираторно-репродуктивного синдрома свиней (PRRS), цирковируса, бордетеллеза, парагриппа или какого-либо другого антигена, размер которого допускает его инсерцию в соответствующий вирусный вектор.

В другом варианте осуществления экзогенную нуклеотидную последовательность выбирают из антигенных последовательностей против птичьего гриппа, ларинготрахеита (LT), заболевания Ньюкасла (NDV), инфекционной анемии, телец включения, инфекционного бронхита (IB), метапневмовируса (MPV) или Гумборо.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения экзогенная нуклеотидная последовательность содержит, состоит по существу из или состоит из последовательности, соответствующей по меньшей мере одному гену, раскрытому в табл. 1, или его гомологу. Как используют в настоящем описании, термин "гомолог" гена предназначен обозначать ген с по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с геном, обладающий биологической активностью той же природы. В одном из вариантов осуществления вектор, описанный в настоящем описании, содержит 2, 3 или 4 последовательности, соответствующих генам, раскрытым в табл. 1, или их гомологам. Необязательно, экзогенные последовательности можно вставлять в вектор в одном сайте инсерции или нескольких различных сайтах инсерции.

Таблица 1

Заболевание	Ген	Доступ GEN BANK
Птичий грипп	Гемагглютинин мексиканского птичьего гриппа H5N2, штамм 435	FJ864690.1 (SEQ ID № 10)
	Гемагглютинин птичьего гриппа H7N3 Jalisco 2012	JX397993.1 (SEQ ID № 11)
	Гемагглютинин птичьего гриппа H7N3 Guanajuato 2015	KR821169 (SEQ ID № 12)
Ларинготрахеит (LT)	Гликопротеин В ларинготрахеита, штамм USDA	EU104965.1 (SEQ ID № 13)
	Гликопротеин D ларинготрахеита, штамм USDA	JN542534.1 :132317-133621 (SEQ ID № 14)
Ньюкасл (NDV)	Ген HN, штамм LaSota	KC844235.1 :6412-8145 (SEQ ID NO: 15)
	Ген HN, изолят штамма вируса болезни Ньюкасла Chicken/M08-3313/Mexico/2008	KF910962.1 (SEQ ID № 16)
Инфекционная анемия	Ген VP1 из изолята штамма вируса анемии кур CAV-10	KJ872513.1 :832-2181 (SEQ ID № 17)
	Ген VP2 из изолята штамма вируса анемии кур CAV-10	AIV09094.1 (SEQ ID № 18)
Тельца включения	Ген коротких волокон аденовируса 4 птиц	AY340863.1 (SEQ ID № 19)
Инфекционный бронхит (IB)	Полученный из штамма вируса инфекционного бронхита ArkDPI ген	EU359651.1 (SEQ ID № 20)
	гликопротеина шиповидного отростка коммерческой вакцины D	
Метапневмовирус (MPV)	Изолят метапневмовируса птиц IT/Ty/A/259-01/03, ген F	JF424833.1 :2943-45599 (SEQ ID № 21)
Гумборо	Гумборо VP2	

FAdV-9 вирусные векторы, описанные в настоящем описании, можно получать с использованием рекомбинантных технологий, таких как ПЦР амплификация нуклеотидной последовательности, представляющей интерес, посредством идентификации антигенных сайтов, выделив исходный патоген, под-

лежащих дальнейшей вставке, которые амплифицируют в вирусном векторе. Инсерцию можно создавать с использованием стандартных способов молекулярной биологии, таких как рестрикционные ферменты и ДНК лигазы, среди прочего. Инфекционный клон, полученный таким образом, вводят в подходящую клеточную линию для получения рекомбинантного вируса. Например, в одном из вариантов осуществления способы, необходимые для конструирования FAdV-9 вирусных векторов, описаны в настоящих примерах и процедурах, описанных для конструирования FAdV-9 инфекционного клона (FAd-миды) (Ojkić, D. & Nagy, E. (2001), The long repeat region is dispensable for fowl adenovirus replication in vitro. *Virology* 283, 197-206). В этой процедуре используют гомологичную рекомбинацию между вирусной геномной ДНК и линейаризованной плазмидой, содержащей оба конца генома, фланкирующие вектор каркаса (pWE-Amp со встроенными сайтами Pad). Затем чужеродный ген, представляющий интерес, с промотором для управления его экспрессией вставляют в подходящие геномные области инфекционного клона, которые являются необязательными или несущественными (Corredor и Nagy, 2010a и 2010b), и вводят в подходящую клеточную линию.

Вирусный вектор по настоящему изобретению можно использовать, например, для получения и введения иммуногенных композиций, содержащих по меньшей мере вирусный вектор, как раскрыто в настоящем описании, и экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один антигенный сайт заболевания, представляющего интерес, вставленной в него. Необязательно, вирусный вектор по настоящему изобретению представляет собой вектор для двойной доставки, который можно использовать для управления экспрессией двух или больше экзогенных нуклеотидных последовательностей. В одном из вариантов осуществления две или больше экзогенных нуклеотидных последовательностей находятся под управлением различных промоторов. В одном из вариантов осуществления промоторы выбирают из группы, состоящей из CMV, CAG, EF1 $\alpha$ , $\beta$ -актина и L2R.

В одном из вариантов осуществления аденовирус птиц, описанный в настоящем описании, содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой удалены ORF0, ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11. SEQ ID № 1 соответствует полной геномной последовательности аденовируса D птиц (номер доступа GenBank AC\_000013.1). В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор, описанный в настоящем описании, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены ORF0, ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11. В предпочтительном варианте осуществления аденовирус птиц, описанный в настоящем описании, содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой полностью или частично удалены ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор, описанный в настоящем описании, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности по меньшей мере с 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой удалены ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11.

В другом варианте осуществления аденовирус птиц, описанный в настоящем описании, содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены ORF1, ORF2 и ORF19. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор, описанный в настоящем описании, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены ORF1, ORF2 и ORF19.

В другом варианте осуществления аденовирус птиц, описанный в настоящем описании, содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены ORF1, ORF2 и ORF19, TR2 или ORF11. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор, описанный в настоящем описании, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены ORF1, ORF2 и ORF19, TR2 или ORF11.

В другом варианте осуществления аденовирус птиц, описанный в настоящем описании, содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 575 до 2753. Эта последовательность (нуклеотиды с 575 до 2753) содержит ORF0, ORF1A, ORF1B, ORF1C и ORF2. В другом варианте осуществления FAdV-9 вирусный вектор, описанный в настоящем описании, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой удалены нуклеотиды с 575 до 2753. В другом варианте осуществления аденовируса птиц, описанный в настоящем описании, содержит нуклеотидную последовательность с идентично-

стью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 847 до 2753. Эта нуклеотидная последовательность (нуклеотиды с 847 до 2753) содержит ORF1A, ORF1B, ORF1C и ORF2. В другом варианте осуществления FAdV-9 вирусный вектор, описанный в настоящем описании, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 847 до 2753.

В другом варианте осуществления аденовирус птиц, описанный в настоящем описании, содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 38807 до 42398. Эта нуклеотидная последовательность (нуклеотиды с 38807 до 42398) содержит TR-2, ORF17 и ORF11. В другом варианте осуществления FAdV-9 вирусный вектор, описанный в настоящем описании, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой целиком или частично удалены нуклеотиды с 38807 до 42398.

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью, содержащей или состоящей из SEQ ID № 1, в которой удалены по меньшей мере 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 или 5000 нуклеотидов, соответствующих целиком или частично нуклеотидам с 575 до 2753 и/или с 38807 до 42398 в SEQ ID № 1.

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью,

содержащей или состоящей из SEQ ID № 1, в которой удалены по меньшей мере 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 или 5000 нуклеотидов, соответствующих целиком или частично нуклеотидам с 847 до 2753 и/или с 38807 до 42398 в SEQ ID № 1.

В другом варианте осуществления вирусный вектор содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью,

содержащей или состоящей из SEQ ID № 1, в которой удалены по меньшей мере 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 или 5000 нуклеотидов, соответствующих целиком или частично нуклеотидам с 847 до 2753 и с 34220 до 36443.

В другом варианте осуществления вирусный вектор содержит или состоит из нуклеотидной последовательности с идентичностью последовательностей с последовательностью, содержащей или состоящей из SEQ ID № 1, в которой удалены по меньшей мере 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 или 5000 нуклеотидов, соответствующих целиком или частично нуклеотидам с 847 до 2753, с 34220 до 36443 и с 38807 до 40561 или с 41461 до 42398.

По меньшей мере одну экзогенную нуклеотидную последовательность необязательно вставляют в FAdV-9 вирусный вектор, описанный в настоящем описании. Соответственно, в одном из вариантов осуществления FAdV-9 нуклеотидная последовательность с делециями, описанными в настоящем описании, присутствует в векторе не в виде одной непрерывной последовательности, но скорее включает куски непрерывных последовательностей, прерываемые по меньшей мере одной и необязательно по меньшей мере двумя, тремя или четырьмя, экзогенными нуклеотидными последовательностями. Следовательно, в одном из вариантов осуществления аденовирус птиц, описанный в настоящем описании, содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей с идентичностью последовательностей с одной или несколькими последовательностями, представленными в SEQ ID № 1, в которых удалено по меньшей мере одно из ORF0, ORF1, ORF2, TR2, ORF17 и ORF11, и нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере две, три, четыре или пять непрерывных последовательностей.

Число нуклеотидов, удаленных из FAdV-9, варьирует. В одном из вариантов осуществления удаляют от 1000 до 7000 нуклеотидов, необязательно разделенных между левым и правым концом генома. В других вариантах осуществления удаляют от 1500 до 6000 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления удаляют по меньшей мере 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000 или 6000 нуклеотидов.

Размер экзогенной нуклеотидной последовательности (ей), вставленной в вирусный вектор, описанных в настоящем описании, также варьирует. В одном из вариантов осуществления на основе правила стабильности аденовируса 105%, емкость вектора составляет вплоть до 7751 п. о. В других вариантах осуществления вставляют от 1000 до 7000 нуклеотидов, необязательно разделенных между левым и правым концом генома. Например, один чужеродный ген можно вставлять в левый конец, а второй чужеродный ген можно вставлять в другой конец. В других вариантах осуществления вставляют от 1500 до 6000 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления вставляют по меньшей мере 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или 6000 экзогенных нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на левом конце генома приблизительно в 2291 пару оснований, необязательно между приблизительно 1900 и 2500 парами оснований. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на правом

конце генома приблизительно в 3591 пару оснований. В одном из вариантов осуществления FAdV-9 вирусный вектор имеет делецию на правом конце генома между приблизительно 3000 парами оснований и 4000 парами оснований.

Идентичность последовательностей обычно оценивают с помощью расширенного поиска программой BLAST версии 2.1 (стандартные параметры по умолчанию; Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.* 215:403-410). BLAST представляет собой ряд программ, которые доступны онлайн в U.S. National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine Building 38A Bethesda, MD 20894). В расширенном поиске Blast задают параметры по умолчанию. Ссылки на программы Blast включают: Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search". *Nature Genet.* 3:266-272.; Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" *Meth. Enzymol.* 266:131-141; Altschul, S.F., Madden, T.L., Schöffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402); Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." *Genome Res.* 7:649-656).

Как используют в настоящем описании, "вирусный вектор" относится к рекомбинантному аденовирусу, который способен доставлять экзогенную нуклеотидную последовательность в клетку-хозяина. Например, в одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит участки рестрикции, которые подходят для вставки экзогенной нуклеотидной последовательности в вектор. В одном из вариантов осуществления в нуклеотидной последовательности вирусного вектора удаляют одну или несколько нуклеотидных последовательностей, которые не необходимы для репликации или передачи FAdV-9, описанного в настоящем описании. Например, в одном из вариантов осуществления в рекомбинантном FAdV-9 вирусном векторе удаляют нуклеотидные последовательности на левом и/или правом конце генома FAdV-9. В одном из вариантов осуществления в рекомбинантном FAdV-9 вирусном векторе удаляют нуклеотидные последовательности, соответствующие одному или нескольким из ORF 0-2, ORF19, TR2, ORF17 и ORF11. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит одну или несколько экзогенных управляющих последовательностей, таких как промоторы или сайты клонирования, которые можно использовать для управления экспрессией трансгенов. В одном из вариантов осуществления промоторы выбирают из группы, состоящей из CMV (SEQ ID № 4), CAG (SEQ ID № 5), EF1 $\alpha$  (SEQ ID № 6),  $\beta$ -актина (SEQ ID № 8) и L2R (SEQ ID № 7).

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, представляющий интерес. В одном из вариантов осуществления полипептид, представляющий интерес, представляет собой антиген заболевания, представляющего интерес. Например, в одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антигенный сайт заболевания, представляющего интерес. Экзогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид, представляющий интерес, можно легко получать известными в данной области способами, например, посредством химического синтеза, скрининга подходящих библиотек или посредством извлечения последовательности гена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В отношении настоящего раскрытия, заболевания, представляющие интерес, включают, но не ограничиваясь этим, грипп, инфекционный ларинготрахеит (ILT), инфекционный бронхит (IB), инфекционный бурсит (Гумборо), гепатит, вирусный ринотрахеит, инфекционный катар, *Mycoplasma hyorhinotracheae*, пастереллез, респираторно-репродуктивный синдром свиней (PRRS), цирковироз, бордетеллиоз, парагрипп, птичий грипп, заболевание Ньюкасла (NDV), инфекционную анемию, гепатит с тельцами включения (IBH) и метапневмовирус (MPV).

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор адаптируют для того, чтобы экспрессировать экзогенную нуклеотидную последовательность в клетке-хозяине. Например, в одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит управляющие последовательности, способные влиять на экспрессию экзогенной нуклеотидной последовательности у хозяина. Например, вирусные векторы, описанные в настоящем описании, могут содержать одну или несколько управляющих последовательностей, таких как транскрипционный промотор, энхансер, необязательная последовательность оператора, чтобы управлять транскрипцией, последовательность, кодирующая подходящие мРНК участки связывания рибосомы, сайты альтернативного сплайсинга, трансляционные последовательности или последовательности, которые управляют терминацией транскрипции и трансляции. Необязательно, вирусный вектор содержит различные управляющие последовательности на левом конце и правом конце векторов. В одном из вариантов осуществления промоторы выбирают из группы, состоящей из CMV (SEQ ID № 4), CAG (SEQ ID № 5), EF1 $\alpha$  (SEQ ID № 6),  $\beta$ -актина (SEQ ID № 8) и L2R (SEQ ID № 7), а энхансером может быть WPRE (SEQ ID № 9).

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит одну или несколько экзогенных нуклеотидных последовательностей, функционально связанных с одной или несколькими управляющими-

ми последовательностями. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор содержит сайт инсерции смежно с одной или несколькими управляющими последовательностями так, что, когда экзогенную нуклеотидную последовательность вставляют в вектор, экзогенная нуклеотидная последовательность функционально связана с управляющими последовательностями. Как используют в настоящем описании, нуклеотидные последовательности "функционально связаны", когда они находятся в функциональных отношениях друг к другу. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он управляет транскрипцией последовательности; участок связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы делать возможной трансляцию. Необязательно, последовательности, которые функционально связаны, представляют собой непрерывные последовательности в вирусном векторе.

В одном из вариантов осуществления вирусный вектор, описанный в настоящем описании, содержит последовательность, подходящую для биологического отбора организмов-хозяев, содержащих вирусный вектор, например, позитивный или негативный селективный ген.

Другие известные в данной области способы, такие как рекомбинантные технологии, включая в качестве неограничивающих примеров те, которые раскрыты в Sambrook et al. (Sambrook J et al. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3-е издание), Cold Spring Harbor Laboratory Press), также подходят для получения нуклеотидных последовательностей и вирусных векторов, как раскрыто в настоящем описании.

Необязательно, вирусные векторы и способы, описанные в настоящем описании, можно использовать для генной терапии у пациентов животных, нуждающихся в этом. Например, в одном из вариантов осуществления вирусные векторы, описанные в настоящем описании, можно использовать для доставки и экспрессии терапевтической нуклеотидной последовательности или нуклеотида, кодирующего терапевтический белок. В одном из вариантов осуществления предоставлен способ генной терапии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, вирусного вектора или композиции, как раскрыто в настоящем описании, где вирусный вектор содержит экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическую нуклеотидную последовательность или белок.

Другой аспект настоящего раскрытия включает иммуногенную композицию, содержащую рекомбинантный FAdV-9 вирусный вектор, как раскрыто в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления иммуногенные композиции можно получать известными способами для получения композиций для введения животным, включая в качестве неограничивающих примеров человека, сельскохозяйственных животных, домашнюю птицу и/или рыбу. В одном из вариантов осуществления эффективное количество вирусного вектора, описанного в настоящем описании, объединяют в смесь с фармацевтически приемлемым носителем. Подходящие носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA) или Handbook of Pharmaceutical Additives (составители Michael и Irene Ash, Gower Publishing Limited, Aldershot, England (1995)). Исходя из этого, композиции включают, хотя не исключительно, растворы вирусных векторов, описанных в настоящем описании, ассоциированные с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и могут содержаться в буферных растворах с подходящим pH и/или быть изотоническими физиологическим жидкостям. В одном из вариантов осуществления иммуногенная композиция содержит адъювант.

Новые FAdV-9 вирусные векторы, связанные способы и использования более ясно проиллюстрированы в следующем описании конкретных примеров.

#### Пример 1. Материалы и способы.

##### 1.1. Клеточная культура и вирусы.

Клетки гепатомы кур (клеточную линию CH-SAH) поддерживали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла/смеси питательных веществ F-12 Ham (DMEM-F12) (Sigma) плюс 2 00 мМ L-глутамин и 100 Ед./мл пенициллина-стрептомицина (PenStrep, Sigma) с 10% не инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), как описано (Alexander, H.S., Huber, P., Cao, J., Krell, P.J., Nagy, E. 1998. Growth Characteristics of Fowl Adenovirus Type 8 in a Chicken Hepatoma Cell Line. *J. Virol. Methods.* 74, 9-14.). Рекомбинантные FAdV создавали с использованием вируса с делецией FAdV-9Δ4, описанного у Corredor и Nagy (2010b), в качестве основы. Размножение всех вирусов осуществляли в клетках CH-SAH, как описано у Alexander et al. (1998).

##### 1.2. Основные манипуляции с ДНК.

1.2.1. Бактериальные культуры и выделение плазмид Клетки *Escherichia coli* DH5α представляли собой бактериальный организм-хозяин для всех описанных плазмид, тогда как клетки *E. coli* BJ5183 использовали для гомологичной рекомбинации, чтобы создавать рекомбинантные FAd-миды.

Бактериальные культуры выращивали на селективной жидкой или агаровой (16 мг/мл) среде Луриа-Бертани (LB) для выращивания, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при 37°C. Собирали отдельные колонии *E. coli*, инокулировали их в 5 мл среды LB с добавлением 0,1% ампициллина для того, чтобы отбирать по росту бактерии, содержащие трансформированную плазмиду с устойчивостью к ампициллину. Инкубация и рост проходили в течение приблизительно 16 часов. Химически (CaCl<sub>2</sub>) получали ком-



патентные *E. coli* DH5 $\alpha$  и трансформировали их с использованием или 10 мкл продукта лигирования или 1 мкл очищенной плазмидной ДНК (Sambrook, J., Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, том 1, 3-е изд. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York, USA). Все плазмиды выделяли с использованием или набора EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini-prep (Bio Basic) или набора PureLink HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen) (для плазмид размером больше 40 т. о. или когда необходима высокая концентрация ДНК) по протоколу производителя.

#### 1.2.2. ПЦР и расщепление рестрикционными ферментами.

ДНК амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) во время клонирования всех двойных экспрессирующих конструкций и рекомбинантных вирусов. Для всего клонирования ПЦР амплификацию проводили с использованием набора Kod Hot Start Polymerase (Novagen). Однако, Taq полимеразу использовали при скрининге плазмиды с помощью ПЦР. Если не установлено иное, условия ПЦР для полимераз Kod и Taq сведены в табл. 2. Все ПЦР реакции осуществляли с использованием Mastercycler Pro (Eppendorf).

Расщепление рестрикционными ферментами (RE) осуществляли как для ферментов Fast Digest (Fermentas), так и для ферментов из New England BioLabs (NEB). Все реакции проводили по протоколу производителя (для каждого фермента). Реакции расщепления всегда проводили при 37°C, и образцы инактивировали теплом в термоциклере Mastercycler Pro (Eppendorf).

Если не указано иное, все образцы ДНК подвергали электрофорезу при 100 В в 0,8% агарозных гелях, содержащих 1 $\times$  RedSafe™ (iNtRON Biotechnology). Для электрофореза образцов ДНК использовали 6 $\times$  ДНК загрузочный буфер [0,25% (масс./об.) бромфеноловый синий, 40% сахароза (масс./об.) в воде] и 1 $\times$  буфер трис-ацетат-EDTA (ТАЕ).

#### 1.2.3. Конструирование плазмиды и трансформация.

После RE расщепления и очистки в геле, ПЦР амплифицированную ДНК и плазмиду лигировали вместе с T4 ДНК лигазой (Invitrogen). Если не установлено иное, лигирование осуществляли при молярном соотношении вставки и вектора 1:1 в течение ночи при 16°C. 50 мкл CaCl<sub>2</sub> компетентных *E. coli* DH5 $\alpha$  смешивали с 10 мкл продукта лигирования или 1 мкл очищенной плазмидной ДНК. Компетентные клетки и ДНК инкубировали на льду в течение 30 мин, затем осуществляли тепловой шок при 42°C в течение 1 мин. Клетки восстанавливали на льду в течение 3 мин и 500 мкл супероптимального бульона со средой для катаболитной репрессии (SOC) добавляли в каждую микропробирку для центрифуги. Клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч при встряхивании, затем центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл бульона LB. Весь объем распространяли по чашке с LB агаром, содержащим ампициллин.

Гомологичную рекомбинацию проводили в клетках *E. coli* BJ5183. 2 мкг как промоторных кассет, так и линейной FAdV-9 $\Delta$ 4 ДНК смешивали в 100 мкл химически компетентных клеток BJ5183. Смеси оставляли на льду в течение 15 мин, после чего следовал тепловой шок при 42°C в течение 1 мин. Клетки восстанавливали на льду в течение 20 мин, и 1 мл среды SOC добавляли в каждую микропробирку для центрифуги и переносили в 5 мл стеклянную культуральную пробирку. Клетки инкубировали в течение 2 ч при 37°C при встряхивании, затем центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл бульона LB. Весь объем клеток распространяли по чашке с LB агаром, содержащим ампициллин.

#### 1.2.4. Секвенирование.

Все продукты ПЦР и плазмиды очищали и секвенировали с помощью ДНК секвенатора ABI 3730 (Laboratory Services Division, Guelph, ON). Данные о последовательностях анализировали с использованием SnapGene Viewer (GSL Biotech).

### 1.3. Анализ промоторной экспрессии.

#### 1.3.1. Создание двойных экспрессирующих плазмидных конструкций.

Активность пяти промоторов (CMV, CAG, EF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -актин и L2R) и одного энхансерного элемента (WPRE) сравнивали посредством измерения экспрессии EGFP в сравнении с люциферазой светлячка под управлением промотора SV40 в трансфицированных клетках CH-SAH. Плазмиды pCI-Neo (Promega), pCAG-Puro и pEF1 $\alpha$ -Puro предоставлены доктором Sarah Wootton (University of Guelph). Двойные экспрессирующие плазмиды создавали с использованием плазмиды pCI-Neo в качестве каркаса (фиг. 11), которая содержала промотор CMV наряду с несколькими уникальными сайтами RE. Оба промотора CAG и EF1 $\alpha$  субклонировали из pCAG-Puro и pEF1 $\alpha$ -Puro, соответственно, в pCI-Neo с использованием SpeI и EcoRI. Присутствие каждого промотора подтверждали посредством секвенирования с использованием праймера pCI-Neo-F (табл. 3). EGFP амплифицировали с помощью ПЦР из pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc) с использованием праймеров EGFP-F и EGFP-R (табл. 3) при температуре отжига 60°C. Получаемый продукт ПЦР экстрагировали в геле с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Как продукт ПЦР EGFP, так и плазмиды на основе pCI-Neo (содержащие промотор CMV, CAG или EF1 $\alpha$ ) подвергали двойному расщеплению с использованием EcoRI и NotI в течение 1 ч при 37°C. Затем расщепленную плазмиду и продукт ПЦР разделяли в геле и экстрагировали с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega) и проводили лигирование в течение

ночи при 4°C. После трансформации в клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  и роста на чашках с LB-ампициллином, колонии подвергали ПЦР скринингу на присутствие Фрагмента EGFP с использованием праймеров EGFP-F и EGFP-R. Все положительные колонии подтверждали посредством секвенирования с использованием праймера EGFP-I-F (табл. 3), что приводило к плазмидам pCMV-EGFP, pCAG-EGFP и pEF1 $\alpha$ -EGFP.

Промотор  $\beta$ -актина амплифицировали с помощью ПЦР из pCAG-Puro, используя праймеры  $\beta$ актин-F и  $\beta$ актин-R (табл. 3), при температуре отжига 60°C. Получаемый продукт ПЦР экстрагировали в геле с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Продукт ПЦР  $\beta$ -актина и pCAG-EGFP подвергали двойному расщеплению с использованием EcoRI и NotI в течение 1 ч при 37°C. Затем расщепленную плазмиду и продукт ПЦР разделяли в геле и экстрагировали с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega) и проводили лигирование в течение ночи при 4°C. После трансформации в клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  и роста на чашках с LB-ампициллином, осуществляли скрининг колоний с использованием RE на присутствие  $\beta$ -актина. Все положительные колонии подтверждали посредством секвенирования с использованием праймеров pCI-Neo-F и EGFP-I-F (табл. 3), что приводило к плазмиде р $\beta$ актин-EGFP.

Промотор L2R вируса куриной оспы ПЦР амплифицировали из pE68 (Zantinge, J.L., Krell, P.J., Derbyshire, J.B., Nagy, É. 1996. Partial transcriptional mapping of the fowlpox virus genome and analysis of the EcoRI L fragment. *J. Gen. Virol.* 77(4), 603-614) с использованием праймеров L2R-F и L2R-R (табл. 3) при температуре отжига 60°C. Получаемый продукт ПЦР экстрагировали в геле с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Продукт ПЦР L2R и pCMV-EGFP подвергали двойному расщеплению с использованием EcoRI и NotI в течение 1 ч при 37°C. Затем расщепленные плазмиду и продукт ПЦР разделяли в геле и экстрагировали с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega) и проводили лигирование в течение ночи при 4°C. После трансформации в клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  и роста на чашках с LB-ампициллином, осуществляли скрининг колоний с использованием RE на присутствие L2R. Все положительные колонии подтверждали посредством секвенирования с использованием праймеров pCI-Neo-F и EGFP-I-F (табл. 3), что приводило к получению плазмиды pL2R-EGFP.

Люциферазу светлячка ПЦР амплифицировали из pGL4.17 (Promega) с использованием праймеров Luc-F и Luc-R (табл. 3) при температуре отжига 55°C. Получаемый продукт ПЦР (1,6 т. о.) экстрагировали в геле с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Продукт ПЦР люциферазы и промоторные плазмиды подвергали двойному расщеплению с использованием AvrII и BstBI в течение 1 ч при 37°C. Затем расщепленные плазмиду и продукту ПЦР разделяли в геле, удаляя кассету устойчивости к неомицину (NeoR) из каждой плазмиды, и экстрагировали с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega) и проводили лигирование в течение ночи при 4°C. После трансформации в клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  и роста на чашках с LB-ампициллином, колонии подвергали ПЦР скринингу на присутствие люциферазы. Все положительные колонии подтверждали посредством секвенирования с использованием праймера SV40-F (табл. 3).

Пять дополнительных двойных экспрессирующих плазмид создавали для того, чтобы включать энхансерный элемент WPRE. Элемент WPRE ПЦР амплифицировали из pWPRE (доктор Sarah Wootton, University of Guelph) с использованием праймеров WPRE-F и WPRE-R (табл. 2.2) при температуре отжига 55°C. Продукт ПЦР экстрагировали в геле с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Продукт ПЦР WPRE и промотор подвергали расщеплению с использованием NotI в течение 1 ч при 37°C. После расщепления плазмиды обрабатывали щелочной фосфатазой (кишечной теленка, New England BioLabs) по протоколу производителя для того, чтобы предотвращать повторное лигирование. Затем расщепленные/дефосфорилированные плазмиду и продукт ПЦР разделяли в геле и экстрагировали ДНК с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega) и проводили лигирование в течение ночи при 4°C. После трансформации в клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  и роста на чашках с LB-ампициллином, колонии подвергали ПЦР скринингу на присутствие WPRE. Все положительные колонии подтверждали посредством секвенирования с использованием EGFP-I-F (табл. 3). Список всех плазмид, созданных в этом исследовании, и их предназначения приведен в табл. 4.

### 1.3.2. Трансфекция клеток гепатомы курицы.

Экспрессию EGFP измеряли посредством трансфекции клеток CH-212 двойными экспрессирующими плазмидами. Клетки высевали в 35 мм чашки при плотности  $1,2 \times 10^6$  клеток/чашка и инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) использовали для того, чтобы трансфицировать все конструкции в соответствии с рекомендациями производителя. В кратком изложении, 2 мкг двойной экспрессирующей плазмиды и 5 мкл липофектамина инкубировали в отдельных 50 мкл аликвотах среды Opti-Mem (Gibco) в течение 5 минут, затем перемешивали и инкубировали вместе в течение 20 минут. В течение этого периода времени среду удаляли из каждой чашки и монослой клеток промывали два раза фосфатно-солевым буфером (PBS). В каждую чашку добавляли 2 мл DMEM-F12 (5% FBS) без антибиотиков. Через 20 минут смеси плазмиды-липофектамин добавляли в 35 мм чашки и инкубировали в течение 6 ч при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Это повторяли для всех 10 двойных экспрессирующих плазмид.

После 6 ч удаляли среду и добавляли свежую DMEM-F12 (5% FBS). Каждые 12 часов после трансфекции (ч. п. т.) экспрессию EGFP подтверждали посредством флуоресцентной микроскопии и собирали цельный клеточный лизат. Монослой промывали с использованием PBS, добавляли трипсин и ресуспендировали клетки в DMEM-F12 (10% FBS). Затем клетки центрифугировали в 15 мл конических пробирках (Nunc®), удаляли супернатант и ресуспендировали клеточный пеллет в 500 мкл PBS и замораживали при -80°C. Образцы трансфицированных клеток, замороженные при -80°C, замораживали-оттаивали три раза. Клеточный детрит осаждали центрифугированием на 12000 об./мин в микроцентрифуге в течение 10 минут при 4°C. Супернатант переносили в свежую микропробирку для центрифуги и определяли концентрацию белка при 280 нм с использованием Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Все образцы корректировали до концентрации белка 1 мкг/мкл.

#### 1.3.3. Флуоресцентная микроскопия.

Осуществляли мониторинг как трансфицированных, так и инфицированных клеток CH-SAH посредством флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss (Carl Zeiss) с FITC-оптикой.

#### 1.3.4. Измерение экспрессии гена-репортера.

Экспрессию EGFP количественно определяли посредством спектрофлуорометрии с использованием считывателя микропланшетов GloMax®-Multi (Promega). В кратком изложении, 50 мкг лизата белка добавляли в трех повторениях в плоскодонный черный 96-луночный планшет (Corning). Флуоресценцию EGFP измеряли в считывателе микропланшетов GloMax®-Multi (Promega) при длинах волн возбуждения 480 нм и испускания 528 нм. Для каждого образца три показания усредняли для получения одного значения флуоресценции.

Экспрессию люциферазы определяли с использованием набора Pierce Firefly Luciferase Glow Assay (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя. В кратком изложении, 25 мкг белкового лизата добавляли в трех повторениях в плоскодонный черный 96-луночный планшет (Corning). В каждом повторении вручную добавляли 50 мкл субстрата для анализа люциферазы, хорошо перемешивали и инкубировали в течение 15 минут, защищая от света, прежде чем измерять люминесценцию в считывателе микропланшетов GloMax®-Multi (Promega). Для каждого образца показания усредняли для получения одного значения люминесценции.

#### 1.3.5. Нормализация промоторной экспрессии.

Нормализацию двойных экспрессирующих конструкций осуществляли для того, чтобы удалить вариабельность эффективности трансфекции от образца к образцу (Schagat, T., Paguio, A., Kopish, K. 2007. Normalizing Genetic Reporter Assays: Approaches and Considerations for Increasing Consistency and Statistical Significance. Cell Notes. 17, 9-12). Кратность изменения активности определяли между промоторными конструкциями и pCMV-EGFP-Luc. В начале для каждого конкретного момента времени и повторения усредненную значение флуоресценции и люминесценции определяли для каждой плазмидной конструкции, где вычисляли соотношение флуоресценции и люминесценции (F/R). Уровень активности сравнивают с промотором CMV, в настоящее время используемым в гесFAdV, следовательно значение соотношения F/R для CMV принимали равным 1,0 (делили соотношение F/R на само себя). Каждое оставшееся значение F/R конструкции также делили на значение F/R для CMV, что вело к значению, представляющему нормализованную кратность изменения активности (кратность A). Усредненную кратность изменения между повторениями сравнивали между всеми конструкциями в каждый момент времени.

### 1.4. Создание и определение характеристик рекомбинантных вирусов.

#### 1.4.1. Конструирование промежуточных конструкций.

Дополнительный анализ экспрессии EGFP *in vitro* осуществляли с использованием гесFAdV, содержащих экспрессирующие кассеты на основе CMV, CAG и Efl $\alpha$ . В предыдущих исследованиях гесFAdV получали посредством гомологичной рекомбинации между pFAdV-9 $\Delta$ 4 и амплифицированной ПЦР экспрессирующей кассетой, содержащей вирусные фланкирующие области, выделенные из промежуточной конструкции. Плазида pleft $\Delta$ 491-2,782 (pL $\Delta$ 2.4) содержит сайт делеции  $\Delta$ 4 на левом конце ( $\Delta$ 491-2,782 н.) FAdV-9 с RE сайтом SwaI для тупого клонирования трансгена (Corredor and Nagy, 2010b). В этом исследовании разрабатывали новую систему промежуточной конструкции посредством клонирования вирусных фланкирующих областей непосредственно в двойные экспрессирующие плазмиды, таким образом создавая плазмиды, готовые для рекомбинации (pHMR). Вирусные геномные области, фланкирующие сайт делеции  $\Delta$ 4 в FAdV-9, амплифицировали с помощью ПЦР из промежуточной конструкции pL $\Delta$ 2.4. Область слева от сайта делеции (VF1) ПЦР амплифицировали с использованием 100 нг pL $\Delta$ 2.4 и праймеров VF1-F и VF1-R (табл. 3) при температуре отжига 52°C. Получаемый продукт ПЦР экстрагировали в геле с использованием набора EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini-prep (Bio Basic). Продукт ПЦР VF1 и все двойные экспрессирующие векторы расщепляли с использованием SpeI в течение 1 ч, после чего следовало расщепление с использованием BglIII. Затем расщепленные плазмиду и продукт ПЦР разделяли в геле и экстрагировали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction (Qiagen) и проводили лигирование в течение ночи при 16°C. После трансформации в клетки E. coli DH5 $\alpha$  и роста на чашках с LB-ампициллином, колонии подвергали ПЦР скринингу на присутствие фрагмента VF1 с ис-

пользованием праймеров VF1-F и VF1-R. Все положительные колонии подтверждали посредством секвенирования. Затем область справа от сайта делеции (VF2) ПЦР амплифицировали с использованием 100 нг рLΔ2.4 и праймеров VF2-F и VF2-R (табл. 3) при температуре отжига 52°C. Получаемый продукт ПЦР экстрагировали в геле с использованием набора EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini-prep (Bio Basic). Продукт ПЦР VF2 и все двойные экспрессирующие векторы, положительные по фрагменту VF1, расщепляли с использованием KpnI в течение 1 ч, после чего следовало расщепление с использованием MfeI. Затем расщепленные плазмиду и продукт ПЦР разделяли в геле и экстрагировали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction (Qiagen) и проводили лигирование в течение ночи при 16°C. После трансформации в клетки *E. coli* DH5α и роста на чашках с LB-ампициллином, колонии подвергали ПЦР скринингу на присутствие фрагмента VF2 с использованием праймеров VF1-F и VF2-R (табл. 3) при температуре отжига 52°C, при ожидаемом размере 2 т. о. плюс размер каждой экспрессирующей кассеты EGFP. Список всех шести промежуточных плазмид рHMR приведен в табл. 4.

1.4.2 Создание рекомбинантных аденовирусов птиц. Рекомбинантные FAdV создавали для того, чтобы включать экспрессирующие кассеты CMV, CMV-WPRE, CAG, CAG-WPRE, EF1α и EF1α-WPRE, используя модифицированный способ Corredor и Nagy (2010b) (фиг. 12). Экспрессирующие кассеты, фланкированные вирусной ДНК, в плаزمиде рHMR рекомбинировали с рFAdV-9Δ4 для того, чтобы создавать новые рекомбинантные FAdмиды, содержащие промотор, представляющий интерес, и EGFP. Для получения промоторных кассет EGFP, фланкированных последовательностями вирусной ДНК, промежуточные конструкции рHMR подвергали ПЦР или RE расщеплению с использованием BglII/BamHI. Кассеты, содержащие промотор CMV (рHMR-CMV-EGFP и рHMR-CMV-EGFP-WPRE) и промотор EF1α (рHMR-EF1α-EGFP и рHMR-EF1α-EGFP-WPRE), ПЦР амплифицировали. ПЦР осуществляли с использованием 200 нг плазмиды и праймеров E1-F и E1-R (табл. 3) при температуре отжига 52°C, и получаемый продукт ПЦР экстрагировали в геле с использованием набора QIAEX II Gel Extraction (Qiagen). Кассеты, содержащие промотор CAG (рHMR-CAG-EGFP и рHMR-CAG-EGFP-WPRE), подвергали двойному расщеплению с использованием BglII/BamHI. В кратком изложении, 5 мкг плазмиды расщепляли с использованием обоих ферментов в течение 1 ч при 37°C. Образцы разделяли посредством электрофореза в геле, и полосы, соответствующие кассете CAG (4,5 т. о.) или кассете CAG-WPRE (5 т. о.), экстрагировали в геле, используя набор EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction (Bio Basic). Затем 5 мкг рFAdV-9Δ4 линейаризовали с использованием SwaI и преципитировали этанолом. Концентрацию всей ДНК, полученной посредством продуктов ПЦР и RE расщепления, измеряли с использованием Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Для каждой конструкции 2 мкг промоторной кассеты EGFP и 2 мкг расщепленной SwaI рFAdV-9Δ4 совместно трансформировали в клетки *E. coli* BJ5183. Осуществляли скрининг рекомбинации всех получаемых конструкций посредством расщепления NotI, после чего следовала трансформация в *E. coli* DH5α. Эти конструкции выращивали в среде LB, выделяли с использованием набора PureLink HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen), расщепляли с использованием PacI и экстрагировали посредством преципитации этанолом. Клетки CH-SAN высевали в 25 см колбы при плотности  $4,3 \times 10^6$  клеток/колба. 5 мкг ДНК, расщепленной PacI, трансфицировали в клетки CH-SAN с использованием 25 мкл Lipofectamine 2000 (Invitrogen). После 6 ч трансфекции смесь удаляли и добавляли свежую DMEM-F12 (5% FBS), клетки инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. В течение следующей недели осуществляли мониторинг клеток на проявление цитопатического эффекта (CPE). В этот момент клеточные культуры замораживали и оттаивали три раза, центрифугировали и осветленный супернатант, содержащий рекомбинантный FAdV-9Δ4, хранили в качестве стока P0 при -80°C. Впоследствии вирус пассировали три раза для того, чтобы получать сток P4 с высоким титром. Список гесFAdV приведен в табл. 4.

#### 1.4.3. Кривые роста вируса.

Одностадийные кривые роста для всех вирусов получали, как описано в Alexander et al. (1998). В кратком изложении, всего  $1,8 \times 10^6$  клеток CH-SAN высевали в 35 мм чашки и инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки инфицировали с использованием гесFAdV при множественности заражения (MOI), равной 5. После адсорбции в течение 1 часа при комнатной температуре, клетки промывали три раза в PBS и добавляли свежую DMEM-F12 (5% FBS). Клеточную культуральную среду и клетки собирали через 0, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 и 72 часа после инфекции (ч. п. и.). Среду удаляли и замораживали при -80°C в качестве внеклеточного вируса, а клетки промывали три раза в PBS, на монослой помещали 1 мл среды и чашку замораживали при -80°C в качестве внутриклеточного вируса. Внеклеточный вирус титровали в каждый момент времени. Клетки CH-SAN высевали в 6-луночные планшеты при плотности  $1,8 \times 10^6$  клеток/лунка и инкубировали в течение ночи. Внеклеточный вирус в каждый момент времени серийно разводили ( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ), и 100 мкл каждой аликвоты инокулировали в двух повторениях и оставляли адсорбироваться в течение 1 ч при комнатной температуре. Инокулят удаляли, а монослой промывали в PBS. В каждую лунку добавляли 3 мл агарового слоя, состоящего из 0,6% агарозы SeaKem LE (Lonza), DMEM-F12 (5% FBS, L-глутамин и PenStrep), и планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. После пяти суток в каждую лунку добавляли 1,5 мл нейтрального красного (0,015%) и после 24 ч считали бляшки.

#### 1.4.4. Обнаружение экспрессии EGFP.

Всего  $1,8 \times 10^6$  клеток CH-SAN высевали в 35 мм чашки и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$ . Клетки инфицировали с использованием гесFAdV при  $\text{MOI}=5$ . Неинфицированные и инфицированные FAdV-9Δ4 клетки представляли собой отрицательные контроли, тогда как клетки, трансфицированные с использованием 6 мкг pEGFP-N1, представляли собой положительный контроль. Клетки собирали через 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 и 48 ч. п. и. и центрифугировали их на 5000 об./мин в течение 5 минут. Каждый образец ресуспендировали в 500 мкл PBS и разделяли на две аликвоты 250 мкл. Первую аликвоту хранили замороженной при  $-80^\circ\text{C}$  для дальнейшего измерения посредством спектрофлюорометрии. Вторую аликвоту снова центрифугировали, чтобы вымывать FBS. Супернатант удаляли и клеточный пеллет ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера RIPA (50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10 mM EDTA и 1% дезоксихолат натрия). Образцы инкубировали на льду в течение 20 минут и повторно центрифугировали на 12000 об./мин при  $4^\circ\text{C}$  в течение 20 минут. Супернатант собирали и хранили при  $-80^\circ\text{C}$ .

Экспрессию EGFP измеряли посредством спектрофлюорометрии в каждый момент времени. Образцы инфицированных клеток, замороженные при  $-80^\circ\text{C}$ , замораживали-оттаивали три раза. Клеточный детрит осаждали центрифугированием на 12000 об./мин в течение 10 минут при  $4^\circ\text{C}$ . Супернатант переносили в свежую микропробирку для центрифуги и определяли концентрацию белка на 280 нм с использованием Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Все образцы корректировали до концентрации белка 1 мкг/мкл. Для каждого образца, 50 мкг белкового экстракта добавляли в трех повторениях в плоскодонный черный 96-луночный планшет (Corning) и проводили анализ с использованием считывателя микропланшетов GloMax®-Multi (Promega) для того, чтобы обнаруживать флуоресценцию EGFP, используя длины волн возбуждения и испускания 480 и 528 нм, соответственно.

#### 1.4.5. Анализ Бредфорда и SDS-PAGE.

Концентрацию белка определяли с использованием набора BioRad Protein Assay по протоколу производителя. В кратком изложении, получали разведение 1:5 концентрированного окрашивающего реактива в дистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$ . 10 мкл BSA белковых стандартов с концентрацией в диапазоне от 100 мкг/мл до 1 мг/мл вместе с образцами цельных клеточных лизатов (разведенных 1:10) пипетировали в 96-луночный планшет в трех повторениях. В каждый образец добавляли 200 мкл разведенного окрашивающего реактива и перемешивали, после 5 минут инкубации поглощение измеряли на 595 нм в считывателе микропланшетов (BioTek Powerwave XS2). Создавали калибровочную кривую, используя значения поглощения BSA стандартов, и уравнение линии тенденции использовали для экстраполяции концентраций неизвестных клеточных лизатов. Значения для каждого образца усредняли для того, чтобы создавать усредненную общую концентрацию белка, учитывая коэффициент разведения. Все образцы разводили до конечной концентрации 0,67 мкг/мкл в дистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$ .

Белки разделяли через SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). 10% акриламидные гели получали в соответствии с рецептами, полученными из Roche Lab FAQs Handbook (4-е изд.). Для всех экспериментов 15 мкл каждого клеточного лизата (0,67 мкг/мкл) смешивали с 4 мкл 4× SDS-PAGE загрузочного буфера (с добавлением 2-меркаптоэтанола). Образцы инкубировали при  $95^\circ\text{C}$  в течение 10 минут перед загрузкой в гели. В индивидуальные дорожки загружали всего 10 мкг на образец, а также 5 мкл белкового маркера (Precision Plus Protein Dual Colour, BioRad). Когда загружали все образцы, гели прогоняли при 100 В в течение приблизительно 1,5 часа в подвижном буфере (25 mM Tris, 190 mM глицин, 0,1% SDS, pH 8,3).

#### 1.4.6. Вестерн-иммуноблоттинг.

После SDS-PAGE белки переносили на поливинилдендифторидные (PVDF) мембраны в Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) по протоколу производителя. Образцы прогоняли при 100 В в течение 1 часа в буфере для переноса (25 mM Tris, 190 mM глицин, 20% метанол, pH 8,3). После переноса мембраны споласкивали в Tris-буферном физиологическом растворе с добавлением 0,1% Tween 20 (TBS-T) и блокировали с использованием 5% снятого молока (в TBS-T) в течение 1 часа при комнатной температуре и встряхивании. В блокирующий раствор добавляли первичное антитело и мембраны инкубировали в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$ . Для анализа EGFP использовали первичное моноклональное антитело мыши против GFP (Molecular Probes) в разведении 1:1000. Для анализа актина использовали первичное поликлональное антитело козы против актина (Santa Cruz Biotechnology) в разведении 1:1000. На следующий день все блоты промывали три раза в TBS-T в течение 10 минут каждый при встряхивании. Затем блоты инкубировали во вторичном антителе, разведенном в блокирующем растворе, в течение 1 часа при встряхивании. Использовали следующие поликлональные вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP): антимышинное козы (Invitrogen, в разведении 1:5000) и антикозье осла (Jackson, в разведении 1:20000). Затем блоты промывали еще три раза в TBS-T и инкубировали в реактиве Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer Inc) в течение 5 минут перед проявкой с использованием ChemiDoc XRS (BioRad).

Таблица 2

Условия ПЦР при использовании полимеразы Kod  
или Taq по протоколу производителя. Полимераза Kod

Стадия	Целевой размер			
	<500 п. о.	500-1000 п. о.	1000-3000 п. о.	>3000 п. о.
Активация	95°C в течение 2 мин			
Денатурация	95°C в течение 20 с			
Отжиг	Tm°C наименьшего праймера в течение 10 с			
Элонгация	70°C в течение 10 с/т. о.	70°C в течение 15 с/т. о.	70°C в течение 20 с/т. о.	70°C в течение 25 с/т. о.
Повторение стадий 2-4	25 циклов			

#### Полимераза Taq

Активация	95°C в течение 5 мин
Денатурация	95°C в течение 1 мин
Отжиг	Tm°C наименьшего праймера в течение 30 с
Элонгация	70°C в течение 1 мин/т. о.
Повторение стадий 2-4	25 циклов

Таблица 3

Праймеры, разработанные для создания конструкций для двойной экспрессии и геFAdV. Рестрикционные ферменты, **встроенные в каждый праймер, подчеркнуты**

Праймер	Последовательность (от 5' к 3')	Tm	Рестрикционный фермент
pCI-Neo-F	GGCTCATGTCCAATATGACCGCCAT (SEQ ID № 22)	61°C	-
EGFP-F	AAAAAAGAA <u>TT</u> CACCATGGTGAGCAAGGGCGAG (SEQ ID № 23)	58°C	EcoRI
EGFP-R	AAAAAAGCGCGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC (SEQ ID № 24)	59°C	NotI
EGFP-I-F	GAGAAGCGCGATCACATGGT (SEQ ID № 25)	58°C	-
фактин-F	AAAAAA <u>CTAG</u> TTGGTCGAGGTGAGCCCCACGTT (SEQ ID № 26)	65°C	SpeI
фактин-R	AAAAAAGAA <u>TT</u> CGCCCGCGCGCTTCGCTT (SEQ ID № 27)	71°C	EcoRI
L2R-F	AAAAAA <u>CTAG</u> TCATAGTAAATATGGGTAACCTTCTTAA TAGCCA (SEQ ID № 28)	55°C	SpeI
L2R-R	AAAAAAGAA <u>TT</u> CATGGTTTGTATTGGCAAATTTAAAT TAATGTT (SEQ ID № 29)	55°C	EcoRI
Luc-F	AAAAAA <u>CTAG</u> TTGGCAATCCGGTACTGTTGGT (SEQ ID № 30)	59°C	AvrII
Luc-R	AAAAA <u>TT</u> CGAAAGCCGCCCGACTCTAG (SEQ ID № 31)	58°C	BstBI
SV40-F	GGCCTCTGAGCTATTCCAGA (SEQ ID № 32)	56°C	-
WPRE-F	AAAAAAGCGCGCTCAACCTCTGGATTACAAAATTTG TGAA (SEQ ID № 33)	56°C	NotI
WPRE-R	AAAAAAGCGCGCGCCCAAGGGAGATCCGAC (SEQ ID № 34)	58°C	NotI
VF1-F	AAAAAA <u>GAT</u> CTTACATGAATGACGCTGCTG (SEQ ID № 35)	53°C	BglII
VF1-R	AAAAAA <u>CTAG</u> TAAATACACCGAGAAATACCACG (SEQ ID № 36)	53°C	SpeI
VF2-F	AAAAAA <u>CAAT</u> TGAAATAAGACTCAGAACGCATTTCC (SEQ ID № 37)	54°C	MfeI
VF2-R	AAAAAAGGT <u>AC</u> CCCCCGCAGAGAATTAATA (SEQ ID № 38)	53°C	KpnI
E1-F	ACATGAATGACGCTGCTG (SEQ ID № 39)	53°C	-
E1-R	CCCCCGCAGAGAATTAATA (SEQ ID № 40)	52°C	-

Таблица 4

## Векторы и вирусы в этом исследовании и их ключевые признаки

pHMR-CAG-EGFP-WPRE	9484	Промежуточная конструкция для гомологичной рекомбинации с pFAdV-9Δ4
pHMR-EF1α-EGFP	8766	Промежуточная конструкция для гомологичной рекомбинации с pFAdV-9Δ4
pHMR-EF1α-EGFP-WPRE	9290	Промежуточная конструкция для гомологичной рекомбинации с pFAdV-9Δ4
pFAdV-9Δ4	44971	Каркас FAd-миды Δ491-2782
pFAdV-9Δ4-CMV-EGFP	46826	FAd-мида, содержащая CMV-EGFP в сайте Δ4
pFAdV-9Δ4-CMV-EGFP-WPRE	47350	FAd-мида, содержащая CMV-EGFP-WPRE в сайте Δ4
pFAdV-9Δ4-CAG-EGFP	47583	FAd-мида, содержащая CAG-EGFP в сайте Δ4
pFAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE	48107	FAd-мида, содержащая CAG-EGFP-WPRE в сайте Δ4
pFAdV-9Δ4-EF1α-EGFP	47389	FAd-мида, содержащая EF1α-EGFP в сайте Δ4
pFAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE	47913	FAd-мида, содержащая EF1α-EGFP-WPRE в сайте Δ4
Вирусы		
Название	Размер (п. о.)	Описание
FAdV-9Δ4	42772	Вирус FAdV-9 с делецией (Δ491-2782)
FAdV-9Δ4-CMV-EGFP	44627	Рекомбинантный вирус CMV-EGFP
FAdV-9Δ4-CMV-EGFP-WPRE	45151	Рекомбинантный вирус CMV-EGFP-WPRE
FAdV-9Δ4-CAG-EGFP	45384	Рекомбинантный вирус CAG-EGFP
FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE	45908	Рекомбинантный вирус CAG-EGFP-WPRE
FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP	45190	Рекомбинантный вирус EF1α-EGFP
FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE	45714	Рекомбинантный вирус EF1α-EGFP-WPRE

Пример 2. Создание и определение характеристик FAdV-9 вирусных векторов.

Как показано на фиг. 1-8, авторы изобретения проводили эксперименты для того, чтобы создавать и определять характеристики FAdV-9 вирусных векторов, содержащих вирусы с делециями ORF0-ORF1-ORF2 со вставленной кодирующей последовательностью mCherry и использующих нативный ранний промотор; вирусы с делециями TR2-ORF17-ORF11 со вставленной кассетой EGFP, и вирус с двойной экспрессией, который можно использовать в качестве поливалентного вектора.

На левом конце генома: от нуклеотида 847 до 2753; удаляли 1906 нуклеотидов. Эта делеция содержит ORF1A, ORF1B, ORF1C и ORF2. На правом конце генома: от нуклеотида 38807 до 42398; удаляли 3591 нуклеотид. Эта делеция содержит TR-2, ORF17 и ORF11. Полная делеция составляет 5497 п. о.; размер вектора с двойной делецией составляет 39567 п. о. Чужеродный ген, вставленный в левый конец, представляет собой mCherry (SEQ ID № 3711 п. о.). Чужеродный ген, вставленный в правый конец, представляет собой EGFP (SEQ ID № 2, 1602 п. о.). Исходя из правила стабильности аденовируса 105%, емкость двойного вектора составляет вплоть до 7751 п. о., это может быть в различных конфигурациях, например, на левом конце составляет вплоть до 4160 п. о. и на правом конце составляет вплоть до 5844 п. о.

Как показано на фиг. 2 и 3A, на левом конце генома: от нуклеотида 575 до 2753; удаляли нуклеотиды 2178 п. о. Эта делеция содержит ORF0, ORF1A, ORF1B, ORF1C и ORF2, и чужеродный ген, вставленный в левый конец, представляет собой mCherry (SEQ ID № 3711 п. о.). Осуществляли верификацию FAd-миды и соответствующих вирусов (фиг. 3B и 3D), которая показывает, что конструкция была правильной. С другой стороны, CPE рекомбинантных вирусов наблюдали в клетках CH-SAH, однако инфицированные клетки не проявляли какой-либо флуоресценции mCherry, что указывает на отсутствие экспрессии чужеродного гена, в этом случае mCherry (фиг. 3C).

Как показано на фиг. 2 и 4A, на левом конце генома: от нуклеотида 847 до 2753; удаляли 1906 нуклеотидов. Эта делеция содержит ORF1A, ORF1B, ORF1C и ORF2. Чужеродный ген, вставленный в левый конец, представляет собой mCherry (SEQ ID № 3711 п. о.). Осуществляли верификацию FAd-миды и соответствующих вирусов (фиг. 4B и 4D), которая показывает, что конструкция была правильной. Клетки CH-SAH, инфицированные рекомбинантными вирусами, демонстрировали флуоресценцию mCherry, что указывает на экспрессию чужеродного гена, в этом случае mCherry (фиг. 4C).

Как показано на фиг. 5 и 7A, на правом конце генома: от нуклеотида 38807 до 42398; удаляли 3591 нуклеотид. Эта делеция содержит TR-2, ORF17 и ORF11. Чужеродный ген, вставленный в левый конец, представляет собой EGFP (SEQ ID № 2, 1602 п. о.). Осуществляли верификацию FAd-миды и соответствующих вирусов (фиг. 7B и 7D), которая показывает, что конструкция была правильной. Клетки CH-SAH, инфицированные рекомбинантными вирусами, демонстрировали флуоресценцию EGFP, что указывает на экспрессию чужеродного гена, в этом случае EGFP (фиг. 7C).

Как показано на фиг. 8A, на левом конце генома: от нуклеотида 847 до 2753; удаляли 1906 нуклеотидов. Эта делеция содержит ORF1A, ORF1B, ORF1C и ORF2. На правом конце генома: от нуклеотида

38807 до 42398; удаляли 3591 нуклеотид. Эта делеция содержит TR-2, ORF17 и ORF11. Чужеродный ген, вставленный в левый конец, представляет собой mCherry (SEQ ID № 3711 п. о.). Чужеродный ген, вставленный в правый конец, представляет собой EGFP (SEQ ID № 2, 1602 п. о.). Осуществляли верификацию FAd-миды и соответствующих вирусов (фиг. 8B и 8D), которая показывает, что конструкция была правильной. Клетки CH-SAH, инфицированные рекомбинантными вирусами, демонстрировали флуоресценцию mCherry и EGFP, что указывает на экспрессию чужеродных генов (фиг. 8C).

На фиг. 6 представлен дополнительный вектор на основе делеции ORF17, расположенной на правом конце генома FAdV-9, в качестве логического и системного развития векторной системы.

В приведенном выше можно видеть, что когда удаляют ORF0, нативный ранний промотор не функционирует, поскольку не наблюдают экспрессию чужеродного гена (например, m-Cherry). Однако экспрессия генов-репортеров происходит, когда используют экзогенный (чужеродный) промотор (CMV) (Corredor and Nagy, 2010b). Когда удаляют только ORF1 и ORF2, нативный промотор работает и наблюдают экспрессию чужеродного гена-репортера.

На фиг. 9 представлены рекомбинантные вирусы на основе FAdV-9 с генами-репортерами. В частности, на этой фиг. приведена сводка и линейное представление для фиг. 4, 6, 7 и 8, где линия rFAdV-9-RED представляет фиг. 4, линия rFAdV-9-Δ17 представляет фиг. 6, линия rFAdV-9-EGFP представляет фиг. 7, линия rFAdV-9-Dual представляет фиг. 8.

Соответственно, авторы изобретения успешно заменяли ORF 0-2, ORF 1-2 и TR2-ORF 17-11 в FAdV-9 на гены-репортеры. Наблюдала, что ранний нативный промотор левого конца FAdV может управлять экспрессией чужеродного трансгена. Кроме того, демонстрировали стабильность большой делеции в правом конце в TR2, вопреки предыдущим исследованиям. Следовательно, FAdV-9 с делециями на левом конце и правом конце FAdV-9 можно использовать в качестве поливалентных рекомбинантных FAdV-9 вирусов, которые могут иметь применения для создания вирусов с двойной экспрессией, подходящих для вакцинных векторов.

Примеры, используемые в этом исследовании, раскрыты в табл. 5.

Таблица 5

Название	Последовательность (5'-3')	Местоположение	Цель
ORF1-2Ver-F	gcacagtcaccaatggcctt (SEQ ID № 42)	Fei et al., 2015	ORF1-2Ver-F
ORF1-2Ver-R	aaattctggtccgttaccca (SEQ ID № 43)	Fei et al., 2015	
TR2-17-11VerF	GCCTACTCCTCAGCCTATCAC (SEQ ID № 44)	38163-38184	верификация
TR2-17-11VerR	CAGTCCCTTAACGAGCACGC (SEQ ID № 45)	43113-43133	верификация
CAT-F	GTGTAGGCTGGAGCTGCTC (SEQ ID № 46)		Верификация
ORF1CATSwaI-F	ggacgtgcttaggtaatttcctccg (SEQ ID № 47) Tctttttcccgtttagtgaggag (SEQ ID № 48)	796-846	Удалены ORF1, 1A, 1B, 1C, RF20 Введен SwaI



	ATTTAAATgtgtaggctggagctgcttc (SEQ ID № 49)		
ORF2CATSwaI-R	gcgttctgagctctttattggtaa- (SEQ ID № 50) actcgaaacacgcgctcacacgcgc- (SEQ ID № 51) ATTTAAATcatatgaatactccttagttc (SEQ ID № 52)	Pei et al., 2015	
TR2-17-11CAT-F	ccccctggcgccgcttggccgcaactg (SEQ ID № 53) Caccgcgcccggacttagtctct (SEQ ID № 54) TTTAAATgtgtaggctggagctgcttc (SEQ ID № 55)	38757-38806	Удалены TR2, ORF17, ORF11 Введен SwaI
TR2-17-11CAT-R	agtagagattataggaagcggggatta (SEQ ID № 56) Tagtggtttttatttaaacgaga (SEQ ID № 57) ATTTAAATcatatgaatactccttagttc (SEQ ID № 58)	42399-42448	
ORF17CATSwaI-F	tccccctggcgccgagggccgccca (SEQ ID № 59) Ctgcaccgcgcccggacttagtctct (SEQ ID № 60) ATTTAAATgtgtaggctggagctgcttc (SEQ ID № 61)	40511-40561	Delete ORF17
ORF17CATSwaI-R	gatacgaagaaggataggagcagaat (SEQ ID № 62) Cgaggatacggtagttgactcc (SEQ ID № 63) ATATTTAAATcatatgaatactccttagttc (SEQ ID № 64)	41461-41502	
EGFPcaSwaI-F	<u>agctgcATTTAAATgtattaccgccatgca</u> <u>ttag</u> (SEQ ID № 65)	Pei et al., 2015	
EGFPcaSwaI-R	<u>agctgcATTTAAATcccaactcgaatgca</u> <u>gtg</u> (SEQ ID № 66)	Pei et al., 2015	
mCherry-F	agctgcATTTAAATATGGTGAGCAAGGGCCGAGGAGG (SEQ ID № 67)	???	амплифицировать mCherry
mCherry-R	agctgcATTTAAATCTACTGTACAGCTCGTCCATGCCG (SEQ ID № 68)	???	Кодирующая последовательность

Сайты SwaI представлены заглавными буквами.

Последовательности полужирным специфичны для хлорамфениколовой кассеты.

Подчеркнутые последовательности специфичны для pN1-EGFP, местоположение на основе pEGFP-N1.

Последовательности курсивом представляют собой дополнительные нуклеотиды для SwaI расщепления.

Пример 3. Результаты.

3.1. Экспрессия EGFP в трансфицированных клетках CH-SAH.

3.1.1. Клонирование двойных экспрессирующих конструкций.

Двойную экспрессирующую систему создавали с использованием EGFP и люциферазы светлячка (экспрессируемой под управлением промотора SV40) для того, чтобы сравнивать эффект различных промоторных и энхансерных элементов, оказываемый на экспрессию EGFP in vitro. Коммерческая плазмида pCI-Neo (Promega), содержащая промотор CMV, представляет собой каркас для двойной экспрессирующей системы. Промотор CMV (944 п. о.) впоследствии удаляли с использованием RE расщепления SpeI и EcoRI. После очистки в геле, оба промотора CAG (1701 п. о.) и EF1 $\alpha$  (1507 п. о.) направленно субклонировали в каркас pCI-Neo, используя SpeI и EcoRI. Литированный продукт трансформировали в компетентные бактериальные клетки и отбирали колонии, скрининг которых осуществляли с помощью RE расщепления (результаты не представлены) и которые подтверждали посредством секвенирования. Этот процесс повторяли с обоими промоторами  $\beta$ -актина (285 п. о.) и L2R (120 п. о.). В праймеры вставляли сайты RE для SpeI и EcoRI, и оба промотора ПЦР амплифицировали из плазмидной ДНК. Полосу 730 п. о., соответствующую EGFP, ПЦР амплифицировали с использованием праймеров, содержащих сайты EcoRI и NotI. Продукт ПЦР направленно клонировали в каждую промоторную плазмиду, трансформированную в компетентные бактериальные клетки, и осуществляли подтверждение посредством ПЦР (данные не представлены) и секвенирования. Наконец, люциферазу светлячка (1712 п. о.) ПЦР амплифицировали с использованием праймеров, содержащих RE сайты AvrII и BstBI. Затем плазмидную ДНК, содержащую EGFP под управлением каждого промотора, расщепляли с использованием AvrII и BstBI, чтобы удалять ген устойчивости к неомицину, и люциферазу направленно клонировали на его место. Присутствие люциферазы в каждой плазмиде подтверждали с помощью ПЦР (результаты не представлены) и секвенирования. Это давало двойные экспрессирующие плазмиды: pCMV-EGFP-Luc, pCAG-EGFP-Luc, pEF1 $\alpha$ -EGFP-Luc, p $\beta$ актин-EGFP-Luc и pL2R-EGFP-Luc (фиг. 11). Создавали 5 дополнитель-

ных плазмид, чтобы включить энхансерный элемент WPRE. Полосу 543 п. о., соответствующую WPRE, ПЦР амплифицировали с использованием праймеров, содержащих сайт NotI. Каждую двойную экспрессирующую плазмиду линеаризовали с использованием NotI и элемент WPRE ненаправленно клонировали в каждую. Скрининг надлежащей ориентации осуществляли с помощью ПЦР (данные не представлены) и плазмиды подтверждали посредством секвенирования, что давало двойные экспрессирующие плазмиды: pCMV-EGFP-WPRE-Luc, pCAG-EGFP-WPRE-Luc, pEF1 $\alpha$ -EGFP-WPRE-Luc, p $\beta$ актин-EGFP-WPRE-Luc и pL2R-EGFP-WPRE-Luc (фиг. 13).

### 3.1.2. Профили экспрессии промоторов, наблюдаемые посредством флуоресцентной микроскопии.

Клетки CH-SAH трансфицировали двойными экспрессирующими конструкциями, чтобы проследить профили экспрессии EGFP в течение 72 ч. п. т. посредством флуоресцентной микроскопии (фиг. 14). Самую раннюю экспрессию EGFP отмечали через 12 ч. п. т. с помощью плазмид CMV, CMV-WPRE, CAG и CAG-WPRE, причем уровни экспрессии возрастали с течением времени. Обе конструкции EF1 $\alpha$  и EF1 $\alpha$ -WPRE начинали экспрессировать EGFP между 24 и 36 ч. п. т. и устойчиво сохраняли экспрессию с течением времени. Конструкции, содержащие промоторы  $\beta$ -актина или L2R, экспрессировали EGFP слабее всего в клетках CH-SAH, причем экспрессия начиналась через 36 и 60 ч. п. т., соответственно. Все конструкции сравнивали с имитацией трансфицированных клеток (отрицательный контроль) и положительным контролем трансфицированных pEGFP-N1 клеток (данные не представлены).

### 3.1.3. Нормализованная экспрессия промоторных конструкций.

Двойные экспрессирующие конструкции трансфицировали в клетки CH-SAH и экспрессию трансгена измеряли в течение 72 ч. п. т. Флуоресценцию EGFP измеряли посредством флуориметрии в каждый момент времени, при этом люминесценцию люциферазы измеряли с использованием набора Peirce Firefly Luciferase Glow Assay (Thermo Fisher Scientific). Чтобы лучше анализировать экспрессию EGFP, управляемую каждым промотором/энхансерным элементом, и чтобы минимизировать вариации от образца к образцу, экспрессию люциферазы из каждого образца использовали для нормализации результатов (Schagat et al., 2007). Данные анализировали посредством вычисления кратности изменения каждой конструкции в каждый конкретный момент времени после трансфекции по отношению к промотору CMV (табл. 6). Нормализованная экспрессия каждой конструкции через 12-72 ч. п. т. представлена на фиг. 15. Через 12 ч. п. т. наблюдали значительное снижение экспрессии конструкциями EF1 $\alpha$ , EF1 $\alpha$ -WPRE,  $\beta$ -актин-WPRE и L2R-WPRE по сравнению с CMV. Конструкции CMV-WPRE и CAG имели повышенную экспрессию через 12 ч. п. т., однако это не было значимо. Более выраженные различия в профилях экспрессии наблюдали между 24 и 72 ч. п. т. В целом, все конструкции демонстрировали сниженную активность с течением времени по сравнению с CMV контролем. Через 12 и 24 ч. п. т. конструкция CMV-WPRE демонстрировала повышенную кратность изменения 1,047 относительно одного CMV, хотя различия не были значимы. Между 36 и 60 ч. п. т. CMV-WPRE демонстрировала слегка сниженную кратность изменения в диапазоне от 0,851 до 0,922. Значимое снижение экспрессии удаляли через 72 ч. п. т., когда CMV-WPRE демонстрировала более низкий уровень активности 64% по сравнению с CMV контролем, и эта разница была значимой. Для каждой из оставшихся конструкций экспрессия значительно ниже, чем у CMV, во все моменты времени, где  $P < 0,05$ . Конструкции, содержащие кассеты CAG и CAG-WPRE постоянно экспрессировали в диапазоне приблизительно 50% и 40%, соответственно, по сравнению с CMV, от 24 ч. п. т. Аналогичным образом, обнаружено, что конструкции, содержащие кассеты EF1 $\alpha$  и EF1 $\alpha$ -WPRE, имеют сниженный уровень активности по сравнению с CMV и экспрессируют в диапазоне около 20%. Остальные конструкции, содержащие промоторы  $\beta$ -актина и L2R, имели уровни активности меньше 10% от такового у CMV.

## 3.2. Создание рекомбинантных FAdV-9 $\Delta$ 4.

### 3.2.1. Клонирование конструкций pHMR.

Для того чтобы анализировать активность промотора и активность WPRE в контексте репликации FAdV, создавали рекомбинантные FAdV, содержащие наиболее эффективные EGFP экспрессирующие кассеты, придерживаясь модифицированного способа Cogredor и Nagy (2010b). Фрагмент 477 п. о. (VF1) слева от сайта делеции FAdV-9 $\Delta$ 4 ПЦР амплифицировали и направленно клонировали в pCMV-EGFP-Luc, pCMV-EGFP-WPRE-Luc, pCAG-EGFP-Luc, pCAG-EGFP-WPRE-Luc, pEF1 $\alpha$ -EGFP-Luc и pEF1 $\alpha$ -EGFP-WPRE-Luc. Впоследствии фрагмент 1609 п. о. (VF2) справа от сайта делеции FAdV-9 $\Delta$ 4 ПЦР амплифицировали и клонировали в каждую плазмиду, что давало промежуточные плазмиды: pHMR-CMV-EGFP, pHMR-CMV-EGFP-WPRE, pHMR-CAG-EGFP, pHMR-CAG-EGFP-WPRE, pHMR-EF1 $\alpha$ -EGFP и pHMR-EF1 $\alpha$ -EGFP-WPRE (фиг. 16). Успешное клонирование определяли с помощью ПЦР скрининга и секвенирования.

Промежуточные конструкции подвергали ПЦР или RE расщеплению с использованием BglII/VamHI, чтобы выделять промоторные кассеты EGFP, фланкированные фрагментами вирусной ДНК, для использования в гомологичной рекомбинации с pFAdV-9 $\Delta$ 4 (FAd-мида). При гомологичной рекомбинации создавали окончательные FAd-миды: pFAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP, pFAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP-WPRE, pFAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP, pFAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP-WPRE, pFAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP и pFAdV-9 $\Delta$ 4-

EF1 $\alpha$ -EGFP-WPRE. Успешную рекомбинацию определяли посредством секвенирования и скрининга расщеплением NotI (фиг. 17). Расщепленная pFAdV-9 $\Delta$ 4 давала полосы 4 т. о., 5,1 т. о., 13,7 т. о. и 23,8 т. о. FAd-миды, содержащие CMV кассеты, идентифицировали по диагностической полосе 2,2 т. о., соответствующей промотору CMV плюс ген EGFP и хвост полиА SV4 0. FAd-миды, содержащие CAG кассеты, идентифицировали по диагностической полосе 2,9 т. о., а EF1 $\alpha$  по диагностической полосе 2,7 т. о. Дополнительные полосы 550 п. о. присутствовали в FAd-мидах, содержащих элемент WPRE. Эти FAd-миды трансфицировали в клетки CH-SAH для того, чтобы создавать соответствующие вирусы.

### 3.2.2. Кинетика роста вируса.

Кинетику роста вируса сравнивали среди шести рекомбинантных вирусов и эталонного FAdV-9 $\Delta$ 4 для того, чтобы определять, влияет ли добавление какой-либо промоторной кассеты EGFP на репликацию и рост вируса. Титр и рост вируса для всех recFAdV, похоже, придерживался паттерна, схожего с FAdV-9 $\Delta$ 4, за исключением того, что FAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP и FAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP росли до титра в половину log ниже эталона, начиная с 24 ч. п. и. (фиг. 18). Вирусы росли до следующих титров; FAdV-9 $\Delta$ 4=2,4 $\times$ 10<sup>8</sup> БОЕ/мл, FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP=4, 8 $\times$ 10<sup>8</sup> БОЕ/мл, FAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP=8,3 $\times$ 10<sup>7</sup> БОЕ/мл, FAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP=8, 2 $\times$ 10<sup>7</sup> БОЕ/мл, FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP-WPRE=3,1 $\times$ 10<sup>8</sup> БОЕ/мл, FAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP-WPRE=3,0 $\times$ 10<sup>8</sup> БОЕ/мл и FAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP=3,7 $\times$ 10<sup>8</sup> БОЕ/мл. Проявление CPE (фиг. 19) и морфология бляшек (не показано) у recFAdV схожи с FAdV-9 $\Delta$ 4 в том, клетки округлялись и откреплялись на 5-7 с. п. и. Все recFAdV экспрессировали EGFP, как видно по флуоресцентной микроскопии.

### 3.3. Активность промотора во время инфекции.

#### 3.3.1. Измерение EGFP посредством спектрофлуорометрии.

Экспрессию EGFP с помощью recFAdV измеряли между 0 и 48 ч. п. и. в клетках CH-SAH. Исходя из спектрофлуорометрии и флуоресцентной микроскопии, экспрессия EGFP для всех рекомбинантных вирусов была низка до 12 ч. п. и. Сильную экспрессию EGFP отмечали между 12 и 30 ч. п. и., но она спадала после 36-48 ч. п. и. Максимальные показания флуоресценции измеряли через 30 ч. п. и. для всех recFAdV (фиг. 20). Клетки, инфицированные FAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP, демонстрировали самое значительное повышение экспрессии EGFP по сравнению с FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP во все моменты времени, в диапазоне от 12 (48 ч. п. и.) до 29 раз (24 ч. п. и.) увеличения экспрессии. FAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP инфицированные клетки также имели повышенную экспрессию по сравнению с FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP во все моменты времени, при слегка более низком диапазоне от 2 (12 ч. п. и.) до 20 раз (24 ч. п. и.) увеличения экспрессии. Вирусы, которые содержали элемент WPRE, экспрессировали EGFP на более низком уровне по сравнению с их промоторными аналогами. FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP-WPRE представлял собой "наименее эффективный" вирус, со снижением экспрессии от 2,4 (48 ч. п. и.) до 17 раз (36 ч. п. и.) по сравнению с FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP. Несмотря на то, что оба FAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP-WPRE и FAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP-WPRE менее эффективны, чем их промоторные аналоги, оба вируса усредненно экспрессировали EGFP на более высоком уровне, чем FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP. FAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP-WPRE демонстрировали повышенную экспрессию в диапазоне от 1,3 (48 ч. п. и.) до 4,3 раза (24 ч. п. и.), тогда как экспрессия FAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP-WPRE находилась в диапазоне от снижения в 2,5 раза (12 ч. п. и.) до повышения в 3,6 раза (24 ч. п. и.).

#### 3.3.2. Экспрессия EGFP, которую измеряли вестерн-блоттинга.

В дополнение к спектрофлуорометрии, вирусную экспрессию EGFP также исследовали с помощью вестерн-иммуноблота. Собирали цельный клеточный лизат инфицированных клеток через 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 и 48 ч. п. и. В каждый момент времени 10 мкг общего белка из каждого лизата выделяли с помощью SDS-PAGE, использовали для блоттинга и блот исследовали с использованием антитела против EGFP (фиг. 21). Ожидали молекулярную массу EGFP 27 кДа (Takebe, N., Xu, L., MacKenzie, K. L., Bertino, J. R., Moore, M. A. S. 2002. Отбор долгосрочной культуры с использованием метотрексата иницирует клетки после трансдукции клеток CD34<sup>+</sup> ретровирусом, содержащим мутантный ген дигидрофолатредуктазы человека. *Cancer Gene Ther.* 9(3):308-320). В начальные моменты времени 0 и 6 ч. п. и. не обнаруживали сигнал EGFP от любых recFAdV. Через 12 ч. п. и. обнаруживали полосу, соответствующую EGFP в лизате, собранном после FAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP инфицированных клеток, которую обнаруживали вплоть до 48 ч. п. и. Клеточные лизаты, собранные после FAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP, FAdV-9 $\Delta$ 4-CAG-EGFP-WPRE и FAdV-9 $\Delta$ 4-EF1 $\alpha$ -EGFP-WPRE, также давали поддающуюся обнаружению полосу EGFP от 18 до 36 ч. п. и. В отличие от этого, полосы EGFP не наблюдали для инфицированных FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP и FAdV-9 $\Delta$ 4-CMV-EGFP-WPRE лизатов в любые моменты времени. Отрицательные контроли, инфицированный FAdV-9 $\Delta$ 4 лизат и имитация инфицированного лизата не давали сигнал для EGFP на протяжении всего времени. Трансфицированные клетки CH-SAH, содержащие EGFP положительную плазмиду под управлением промотора CMV, pEGFP-N1, давали положительный сигнал от 12 ч. п. и. и далее. В каждый момент времени блоты исследовали антителом против актина, чтобы показать относительные уровни равной нагрузки всех образцов. Уровни актина выглядели схожими в каждый момент времени, что говорит о равной нагрузке, однако через 48 ч. п. и. актин не обнаруживали в инфицированных вирусом лизатах.

Таблица 6

Кратность изменения активности промотора в трансфицированных клетках CH-SAH в различные часы после трансфекции по отношению к промотору CMV. Значимую активность определяют по Р-значению <0,05

Момент времени (ч. п. т.)	Промотор	кратность Δ	SD	P-значение
12	CMV	1,0	-	-
	CMV-WPRE	1,047	0,245	0,7526
	CAG	1,483	1,735	0,5506
	CAG-WPRE	0,479	0,370	0,0717
	EF1α	0,610	0,184	0,0015
	EF1α-WPRE	0,313	0,117	0,0005
	β-актин	0,772	0,418	0,2587
	β-актин-WPRE	0,357	0,097	0,0003
	L2R	0,566	0,528	0,1654
	L2R-WPRE	0,134	0,095	0,0001
24	CMV	1,0	-	-
	CMV-WPRE	1,047	0,116	0,5177
	CAG	0,409	0,116	0,0001
	CAG-WPRE	0,294	0,039	0,0001
	EF1α	0,156	0,076	0,0001
	EF1α-WPRE	0,087	0,018	0,0001
	β-актин	0,074	0,042	0,0001
	β-актин-WPRE	0,042	0,043	0,0001
	L2R	0,028	0,016	0,0001
	L2R-WPRE	0,010	0,002	0,0001
36	CMV	1,0	-	-
	CMV-WPRE	0,894	0,156	0,3078
	CAG	0,560	0,331	0,0180
	CAG-WPRE	0,387	0,139	0,0016
	EF1α	0,196	0,057	0,0001
	EF1α-WPRE	0,124	0,063	0,0001
	β-актин	0,056	0,037	0,0001
	β-актин-WPRE	0,015	0,007	0,0001
	L2R	0,014	0,013	0,0001
	L2R-WPRE	0,002	0,001	0,0001
48	CMV	1,0	-	-
	CMV-WPRE	0,922	0,135	0,3758
	CAG	0,431	0,036	0,0001
	CAG-WPRE	0,303	0,050	0,0001
	EF1α	0,187	0,063	0,0001
	EF1α-WPRE	0,085	0,022	0,0001
	β-актин	0,032	0,017	0,0001
	β-актин-WPRE	0,013	0,005	0,0001
	L2R	0,015	0,014	0,0001
	L2R-WPRE	0,001	0,001	0,0001
60	CMV	1,0	-	-
	CMV-WPRE	0,851	0,123	0,1039
	CAG	0,572	0,257	0,1423
	CAG-WPRE	0,392	0,191	0,0053
	EF1α	0,254	0,054	0,0026
	EF1α-WPRE	0,124	0,021	0,0001
	β-актин	0,033	0,007	0,0001
	β-актин-WPRE	0,015	0,004	0,0001
	L2R	0,002	0,001	0,0001
	L2R-WPRE	0,001	0,001	0,0001
72	CMV	1,0	-	-
	CMV-WPRE	0,643	0,056	0,0004
	CAG	0,591	0,137	0,0521
	CAG-WPRE	0,434	0,164	0,0040
	EF1α	0,296	0,082	0,0067
	EF1α-WPRE	0,234	0,119	0,0004
	β-актин	0,030	0,002	0,0001
	β-актин-WPRE	0,028	0,018	0,0001
	L2R	0,002	0,001	0,0001
	L2R-WPRE	0,003	0,003	0,0001

Пример 4. Другие варианты осуществления рекомбинантного FAdV-9.

На фиг. 22 представлены другие варианты осуществления рекомбинантного FAdV-9, в которых на левом конце генома ORF1 и 2 удаляют и заменяют на HA из кодирующих последовательностей H7 и в которых на правом конце генома ORF19, ORF11 или TR2 удаляют и заменяют на кассету HN, HN-IRES-HA из кассеты H5 или HA из кассеты H5, где IRES (внутренний участок посадки рибосомы) делает возможной инициацию трансляцию в середине последовательности информационной РНК (мРНК) в качестве части более общего процесса синтеза белка. Используют IRES (SEQ ID № 41) из канадского изолята вируса энцефаломиелита птиц (AEV-IRES).

Хотя настоящее раскрытие описано со ссылкой на то, что в настоящее время считают предпочтительными примерами, следует понимать, что раскрытие не ограничено раскрытыми примерами. Напротив, раскрытие предназначено для того, чтобы охватывать различные модификации и эквивалентные компоновки, включенные в сущность и объем приложенной формулы изобретения.

Все публикации, последовательности, патенты и патентные заявки включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме в той же степени, как если бы конкретно и индивидуально указали, что каждая индивидуальная публикация, последовательность, патент или патентная заявка включена по ссылке в полном объеме.

#### Литература:

Huebner, R.J., Rower W.P., Schatten, W.E., Smith, R.R. & Thomas, L.B. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 9(6), 1211-1218;

Cody, J. J. & Douglas, J. T. (2009). Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther* 16, 473-488;

Yamamoto, M. & Curiel, D. T. (2010). Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses. *Mol Ther* 18, 243-250;

Lasaro, M. O. & Ertl, H. C. J. (2009). New Insights on Adenovirus as Vaccine Vectors. *Molecular Therapy* 17, 1333-1339;

Buchbinder, S. P., Mehrotra, D. V., Duerr, A., Fitzgerald, D. W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P. B., Lama, J. R., Marmor, M. & other authors. (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372, 1881-1893;

McElrath, M. J., De Rosa, S. C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Defawe, O. D., Carter, D. K., Hural, J. & other authors. (2008). HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* 372, 1894-1905;

Cody & Douglas, 2009; Gallo, P., Dharmapuri, S., Cipriani, B. & Monaci, P. (2005). Adenovirus as vehicle for anticancer genetic immunotherapy. *Gene Ther* 12, S84-S91;

Shashkova, E. V., Cherenova, L. V., Kazansky, D. B. & Doronin, K. (2005). Avian adenovirus vector CELO-TK displays anticancer activity in human cancer cells and suppresses established murine melanoma tumors. *Cancer Gene Ther* 12, 617-626;

Barouch, D. H. (2008). Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 455, 613-619;

Sharma, A., Tandon, M., Ahi, Y. S., Bangari, D. S., Vemulapalli, R. & Mittal, S. K. (2009). Evaluation of Cross-Reactive Humoral and Cell-Mediated Immune Responses among Human, Bovine and Porcine Adenoviruses. *Molecular Therapy* 17, 113;

Adair, B. & Fitzgerald, S. (2008). Group I Adenovirus Infections. In *Diseases of Poultry*, 12th ed, pp. 252-266. Edited by Y. Saif, A. Fadly, J. Glisson, L. McDougald, L. Nolan & D. Swayne. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell;

Benkő, M., Harrach, B., Both, G., Russell, W., Adair, B., Adam, É., de Jong, J., Hess, M., Johnson, M. & other authors. (2005). Family Adenoviridae. In *Virus taxonomy Eighth report of*

the International Committee on the Taxonomy of Viruses, pp. 213-228. Edited by C. Fauquet, M. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. Ball. San Diego, CA: Elsevier Academic Press;

Corredor, J. C. & Nagy, E. (2010b). The non-essential left end region of the fowl adenovirus 9 genome is suitable for foreign gene insertion/replacement. *Virus Res* 149, 167-174;

Ojkic, D. & Nagy, E. (2003). Antibody response and virus tissue distribution in chickens inoculated with wild-type and recombinant fowl adenoviruses. *Vaccine* 22, 42-48;

Francois, A., Chevalier, C., Delmas, B., Etteradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G. H. & Langlois, P. (2004). Avian adenovirus CEL0 recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine* 22, 2351-2360;

Sheppard, M., Werner, W., Tsatas, E., McCoy, R., Prowse, S. & Johnson, M. (1998). Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. *Arch Virol* 143, 915-930;

Johnson, M. A., Pooley, C., Ignjatovic, J. & Tyack, S. G. (2003). A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* 21, 2730-2736;

Chiocca, S., Kurzbauer, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V. & Cotten, M. (1996). The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CEL0. *J Virol* 70, 2939-2949;

Ojkic, D. & Nagy, E. (2000). The complete nucleotide sequence of fowl adenovirus type 8. *J Gen Virol* 81, 1833-1837;

Corredor, J. C., Garceac, A., Krell, P. J. & Nagy, E. (2008). Sequence comparison of the right end of fowl adenovirus genomes. *Virus genes* 36, 331-344;

Corredor, J. C., Krell, P. J. & Nagy, E. (2006). Sequence analysis of the left end of fowl adenovirus genomes. *Virus genes* 33, 95-106;

Bangari, D. S. & Mittal, S. K. (2006). Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* 24, 849-862;

Ferreira, T. B., Alves, P. M., Aunins, J. G. & Carrondo, M. J. T. (2005). Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. *Gene Ther* 12, S73-S83;

Corredor, J. C. & Nagy, E. (2010a) A region at the left end of the fowl adenovirus 9 genome that is non-essential in vitro has consequences in vivo. *J Gen Virol* 91(1), 51-58;

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вирусный вектор из аденовируса 9 птиц (FAdV-9), который включает по меньшей мере одну делецию несущественной области, выбранной из ORF19 и ORF17.
2. FAdV-9 вектор по п.1, где вектор включает делецию OFR17.
3. FAdV-9 вектор по п.1, где вектор включает делецию OFR19.
4. FAdV-9 вектор по п.1, где вектор включает делецию OFR17 и OFR19.
5. FAdV-9 вектор по любому из пп.1-4, где вектор дополнительно включает делецию одной или нескольких из следующих несущественных областей: ORF0, ORF1, ORF2, TR2 и ORF11.
6. FAdV-9 вирусный вектор по п.5, где вектор содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой удалены нуклеотиды с 575 до 2753 и с 38807 до 42398.
7. FAdV-9 вирусный вектор по п.5, где вектор содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, где удалены нуклеотиды с 847 до 2753 и с 38807 до 42398.
8. FAdV-9 вирусный вектор по п.5, где вектор содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой удалены нуклеотиды с 847 до 2753 и с 34220 до 36443.
9. FAdV-9 вирусный вектор по п.5, где вектор содержит нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, в которой уда-

лены нуклеотиды с 847 до 2753, с 34220 до 36443 и с 38807 до 40561 или в которой удалены нуклеотиды с 847 до 2753, с 34220 до 36443 и с 41461 до 42398.

10. FAdV-9 вирусный вектор по любому из пп.1-9, содержащий одну или несколько экзогенных нуклеотидных последовательностей, кодирующих один или несколько полипептидов, представляющих интерес.

11. FAdV-9 вирусный вектор по п.10, где вектор представляет собой двойной вектор, содержащий две экзогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие два полипептида, представляющие интерес.

12. FAdV-9 вирусный вектор по любому из пп.1-10, содержащий экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген.

13. FAdV-9 вирусный вектор по п.12, в котором экзогенная нуклеотидная последовательность кодирует антигенные последовательности против заболевания, выбранного из гриппа, инфекционного ларинготрахеита, инфекционного бронхита, инфекционного бурсита (Гумборо), гепатита, вирусного ринотрахеита, инфекционного катары, *Mycoplasma hyorheumoniae*, пастереллеза, респираторно-репродуктивного синдрома свиней (PRRS), цирковируса, бордетеллиоза, парагриппа и какого-либо другого антигена, размер которого позволяет вставлять его в соответствующий вирусный вектор.

14. FAdV-9 вирусный вектор по п.13, в котором экзогенная нуклеотидная последовательность кодирует антигенные последовательности против заболевания, выбранного из птичьего гриппа, ларинготрахеита (LT), заболевания Ньюкасла (NDV), инфекционной анемии, гепатита с тельцами включения, инфекционного бронхита (IB), метапневмовируса (MPV) и Гумборо.

15. FAdV-9 вирусный вектор по п.13, в котором экзогенная нуклеотидная последовательность содержит последовательность, соответствующую по меньшей мере одной последовательности, выбранной из SEQ ID №№ 10-21, или ее гомологу.

16. Вирусный вектор по любому из пп.10-15, в котором экзогенная нуклеотидная последовательность функционально связана с контрольной последовательностью.

17. Вирусный вектор по п.16, в котором контрольная последовательность является последовательностью промотора.

18. Клетка-хозяин, содержащая вирусный вектор по любому из пп.1-17.

19. Способ получения вирусного вектора по любому из пп.10-17, включающий стадии:

а) вставки экзогенной нуклеотидной последовательности в вирусный вектор по п.1 с получением инфекционного клона;

б) введения инфекционного клона, полученного таким образом, в подходящую клеточную линию;

с) поддержания подходящей клеточной линии для получения вирусного вектора.

20. Способ по п.19, дополнительно включающий амплификацию экзогенной нуклеотидной последовательности перед вставкой экзогенной нуклеотидной последовательности в вирусный вектор.

21. Способ по п.19 или 20, в котором экзогенная нуклеотидная последовательность кодирует антигенные последовательности против заболевания, выбранного из гриппа, инфекционного ларинготрахеита, инфекционного бронхита, инфекции фабрициевой сумки (Гумборо), гепатита, вирусного ринотрахеита, инфекционного катары, *Mycoplasma hyorheumoniae*, пастереллеза, респираторно-репродуктивного синдрома свиней (PRRS), цирковируса, бордетеллиоза, парагриппа и какого-либо другого антигена, размер которого позволяет вставлять его в соответствующий вирусный вектор.

22. Способ по п.19 или 20, в котором экзогенная нуклеотидная последовательность кодирует антигенные последовательности против заболевания, выбранного из птичьего гриппа, ларинготрахеита (LT), заболевания Ньюкасла (NDV), инфекционной анемии, телец включения, инфекционного бронхита (IB), метапневмовируса (MPV) и Гумборо.

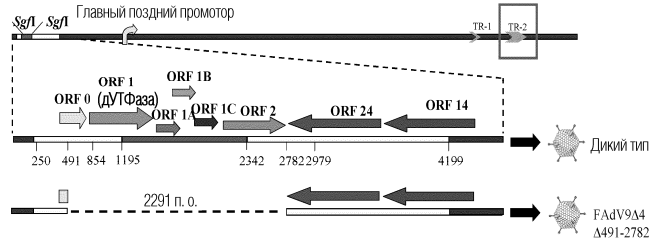
23. Способ по п.19 или 20, в котором экзогенный нуклеотид содержит последовательность, соответствующую по меньшей мере одной последовательности, выбранной из SEQ ID №№ 10-21, или ее гомологу.

24. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере FAdV-9 вирусный вектор по любому из пп.1-17 с экзогенной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере один антиген, вставленный в него.

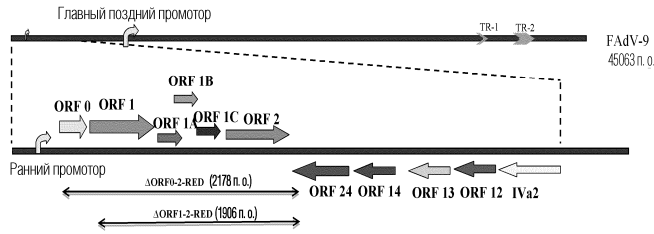
25. Иммуногенная композиция по п.24, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

26. Иммуногенная композиция по п.24 или 25, дополнительно содержащая адъювант.

27. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.24-26 в создании иммуногенного ответа у пациента.

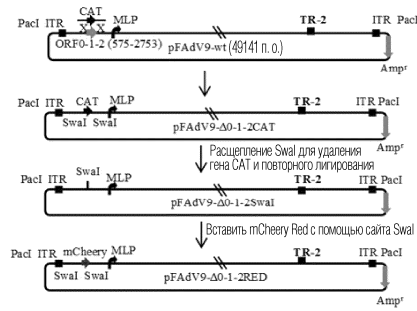


Фиг. 1

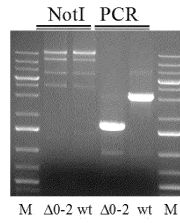


Фиг. 2

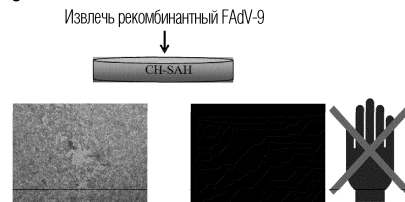
A



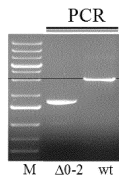
B



C



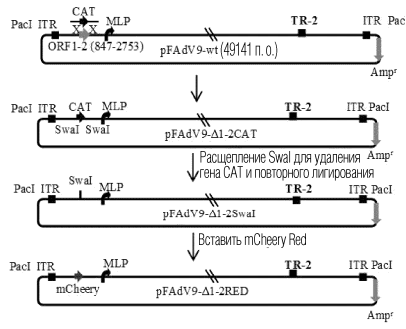
D



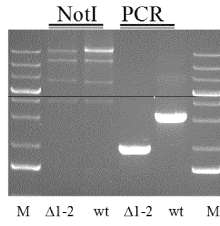
Фиг. 3A-D



A

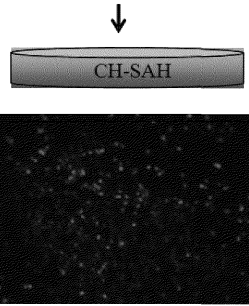


B

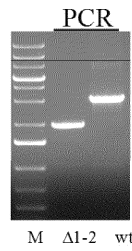


C

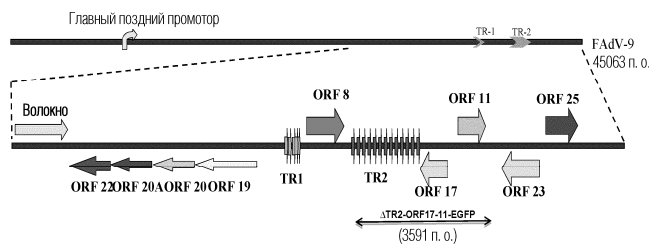
Извлечь рекомбинантный FAdV-9



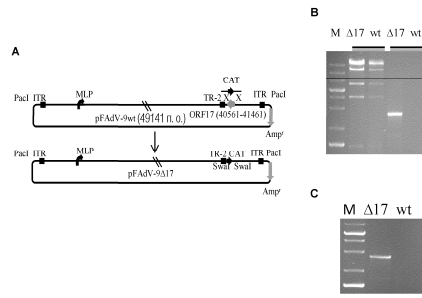
D



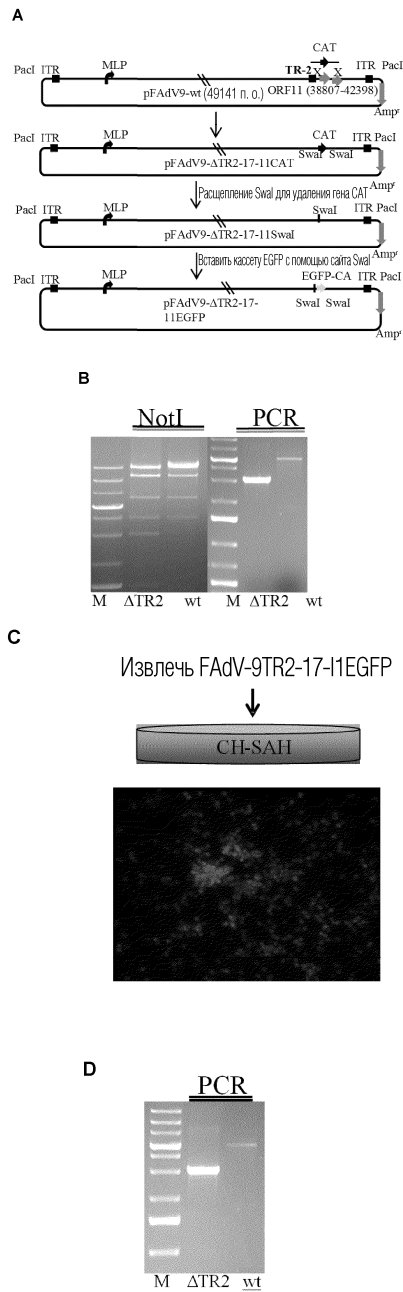
Фиг. 4A-D



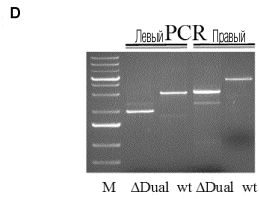
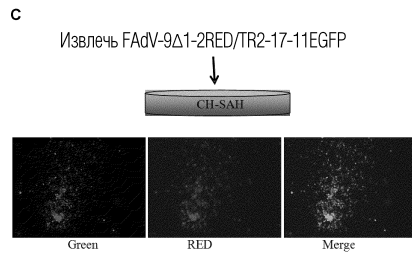
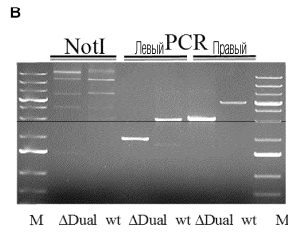
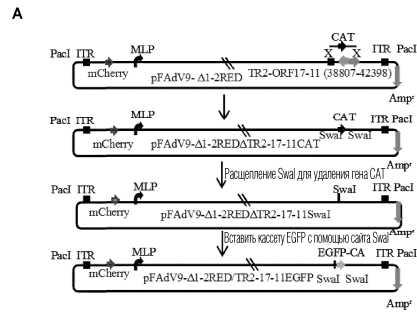
Фиг. 5



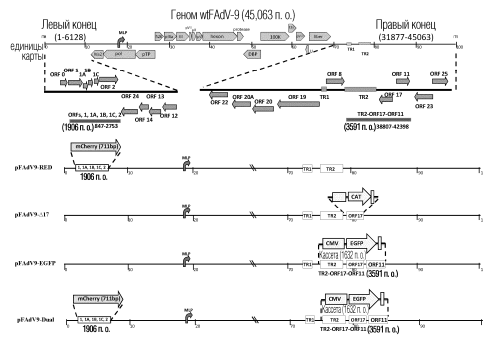
Фиг. 6А-С



Фиг. 7А-Д



Фиг. 8A-D



Фиг. 9

A

FAdV-9 Genbank #: AC\_000013.1

FAdV-9 FASTA (подчеркнутые области можно удалить: левый конец=ORF1-ORF2, правый конец=TR2, ORF17 and ORF11)

CATCATATATATACCTACATGAATGACGCTGTCTCACCCTGGACACCCCTCCGCGCGCTGATGG
CAAAATTTGCTCCACCAAGATTTCCCTGATACAAAGTCCGGACTGGCGCGCGGCAATACGTCCGGCGG
AGGCACGGACGGCACTTTGGCCACGATAGCAATAAATGGCGCTCCCTTGCCTGGGAATTTGGCGCGG
CACAGTCCCAATGGCTGGAGCGCTCCAGAAAGCGATTAGTTTTGCGTACGACACGAAAGCTATTTT
TGCAGACTTACTTCTATTGTTTACACCGCCGCTCCCTGTGAATTTAAATTTGATACACCG
TTCCGATCCCGTACTGGCTTTGGAAAGCGGACTTCCGACTCCCTAAATGATTTATGGTCTTAATCA
GGCTTTTGTGCCACGTTGTGCTCTCCGTTGACCTTTGAAAAGGCGCTGGTATTTCTCGGTGTGT
TTTTGGCGGATACCGCTTACGTGATCTTTTATGGCGGCTCCGGCGGTATAACAGTGGAGCGCTGA
TCTCAGAGACGATGAGCAGACCGGACTCACACCGAGCTATCCCTCTCTCTGCTGCTCTGCTG
GGTGAACCGGTTTCCCGCTATCCCTTTGTTGGACATCAGCCCTTTGGCCCTGGTCCGCGGAGCGATT
TTCTGACGACTTTCCGAAACGCTCTGTCCGAAACGATTGGTACGGAGAGTCACTACCGGGAGC
TGAACAGCGCTAGAGTCTATCTGGACGCTTATAGTAAATTTCCCTGCTTTTCCGCTTATAGT
GAGG-ATGTTTCTGATTCGGTTGGCCCGGACTCCAGCGTAAAGTGTGTGTCAGAAAGATTTCCG
GGTTCCTGACCGCCGCTGCTTACCTGGCGGCTCCGGCTTACGATTTGCTGCTTCCGCGCGG
GGTGTCCGCGCAAGAGCGGCTCTCATTCGACCGACTTTCTTTCAATCCCGCGAGCGGTATG
GGCGCTAGCCCTCGTTGGGCTGGCGTAAAGTTTTTATCGATGGGAGCGGTTATCGATA
GCATACCGGGGACTTGTAGGCTCTCTTTGATTTTGGAGCAGCAATTTCAAGCTCCGCGGGG
TACCTGATCTGCTGAGTGTATCTCCCTAAATCTCCGCTGCTGGTAAAGCGCTAATTTGTAAG
HAGAGCGCCAGGGGTGCACCGGTTTCCGCTCCACCGCGCTTTGATACAGGGCTGTCTCCCTCTCT
TTCTTAGAATGACCGAGCGAGCGCGGCAAGTGGATTTCGCGCTTCAACTGGGCGCGCTCT
CGGGCGATAACGGGCTACCGGGTCTCTCTCGAGCGGACTCCGGGAAAACAGCTGTCTCTG
ATTTTGCAGACTGTATGATTTGATTTGCTTCTGAGACTTTCTGATGAGCCTATG
DGGTGGATGTTTGTGTGCTCTGGCTTACCCTATACCGGATCCGCACTGTGTGGCAAGT
DACCAGCTCCGCTCCGCTTCCGAAAGGCTCCCTTCCGAAAGGCTTCCCGCCATCCCGAGG
GTAAAACGGTATTTGGAGAGCGCGGAGCTTCCGCGCAATTCAGACATTCGATCGAAGATT
GGTCTCTGTTTGGAGTGTATCTCCCTAAATCTCCGCTGCTGGTAAAGCGCTAATTTGTAAG
DGGCCCGGATTTGGATTTCCGCGCTTACGGACTGTATTCGCTGTTTCAAGCGAGGTTTCC
TAATAAATGCTTTTCTAACCTAATTCGCGTTGGGTTTGTCTTTGGAGACGGATGTGGGCTG
BAGGGATCCTATTTGCTTGGTGAATCTGATAAATAGAGGATCGTGAACCGCTCAGCAGTGTAT
TTCAAGCGCGCTCCGGATACGGTATTACAGAAAGCGCTACAGAGGCGGATGAAATTTCTCACTTGT
TCCGCGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TTTTCTTAAATCGAGAGATCCGTTTATTCGGTGTTCGAAAACGGCTACGATCCGCTCTGTR
GGCTGATTTGCTGGCTTGGCGCGCGGCGACTCGAAGCGCAATACGTTTGGATTAGGAGCGCGCG
TGAAGGGAGCTCTTACTTGGAGAGGATCGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
DCAACAGAAACCTTTGAGAGGGGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CACCGCTCGTGGCTTGTCTCCAGGTTTGGGGGCAAAACGCTGATTTCCCGCGAGACGGT
AAATGAGCGAATGGTGGCTACCGCTGTTGTTACTCTGAACAGAGCGTTGTGCGACTTATGCA
GTGGGCGCTTCACTGATGATTTCTGACGCTTTGCTGATTTGATGATTTGATGATTTGCTGCTG
CCATGAGAGCGCTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GCATGATTTGACTGTTTTGAGCGCTGTGACCGGTTTCCAGTTTACCAATAAGACTCAGAACCG
ATTTCCGCTGACCGATCTTTTATTTGAAATTTCAAGGGAAAGCTTCAAAAAGGATGACATATG
ACACTAGCTTAAGGGGAGGTTTTCAGGTTGCTCGAGCGCAGACAGAGCGATTAAAGTGTGT
TACCTGAGAGGATGATGATCTCCCTAAAGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGCGGCTGGTCCAGACTCTGCAAGGGCGCAAGGGTCAAGGATGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TCGTGGGGCGGTGGAGTGAAGAGGTTGAAATGGTATTTAAACAGAGGATAGGGGTTGTCG
CGGCTCTTCAAAGTACTGTACACTTATCCAACGATATGTGACACGACTTTCGCTGCTGCTG













Промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1A):

FASTA:  
 CTTAGAGCTCCGGTCCGCTAGAGAGAGTGGGGGGTAACTGGGAAAGTGTGGGGGGGGGGTCCG  
 CAATGACCGGTGCTAGAGAGAGTGGGGGGTAACTGGGAAAGTGTGGGGGGGGGGTCCGCTTTT  
 CCGAGAGGTGGGGGAGAACCTATATAAGTGCAGTAGTCGCGCTGAGCCTCTTTTTCGCAACGGTTCGCGCCA  
 GAACACAGGTAAAGTGGCTGTGTGTTCCCGGGCCCTGGCCCTTTAGGGGTTATGGCCCTTGGTGCCTTGAAT  
 TACTCCAGCCGCTGGCTCAGTACGTGATTTGATCCCGAGCTTCGGGTGAAAGTGGGGGGAGATTGAG  
 GCTTGGCTTAAAGAGCCCTTGCCTCCTGTCATGAGCCCTGGCTTGGCCCTGGGGCCGCTGCTGCA  
 ATCTGTTGGCACTTCGCGCTGTCTGCTCTTTGATAACTCTAGACATTAAAAATTTTGAATGACTGCTG  
 CGAGCTTTTTCCTGGCAAGTAGTCTTAAATGCGGGCCAGATCTGACAGCTGGTATTGGGTTTTTGGGGC  
 CCGGG  
 ATCGGACGGGGTACTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGTTGCTGGCCCTGGCCGGCCGGCTTATCGCCCGCCCT  
 GGCGGGCAACAGCTGGCCGGCTGGCCAGTGGTGGAGCGAAAGTGGCCCTTCGCGCCCTGTGCAAGGG  
 AACTCMAATGGAGAGCGCGCTCGGGAGCGGGGGGGGGTGGCTGACCCACACAGGAAAGGGGCTTTCCT  
 CCTCAGCGTGCCTCATGTGACTCCAGGAGTACCGGGGCGCTCCAGGACCTGATGATTCTCGAGCTTTG  
 GATACCTGCTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGATGAGATTTCGCGAGTGGGTTGGGAGACTGAA  
 GTTAGCCAGCTGGCACTGATTAATTCCTTGGAAATTCGCTTTTGAAGTTGGATCTGGTTCAATCTCA  
 AGCTCAGAGCTGGTCAAGTTTTTTCTCTCTTCAAGCTCTGTA

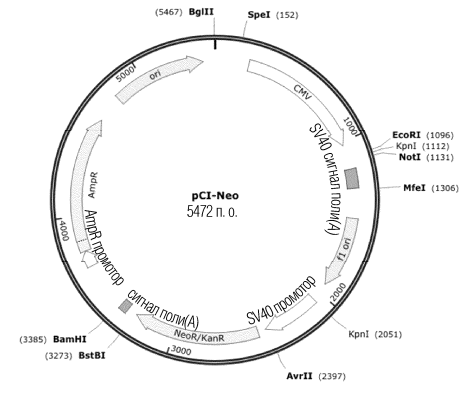
Промоторная последовательность для L2R (Fowlpox promoter):  
 CATAGTAAATGGGTAACTTCTAATAGCCATAATAAAAATGAAAAAATAATCATTAAAAACGTAAACGAA  
 CAAAAACATTAATTAATTTGCCAATAACAAACCAT

Промоторная последовательность для бета-актина (минимальная):  
 TCGAGTGTGAGCCCAAGTCTGCTTCACTCCGCAATCCGCGCCCTCCGAGCCCAATTTGATATGATTAAT  
 TTTTAAATTTTGTGCGCAATGCTGG  
 GG  
 AGCGGG

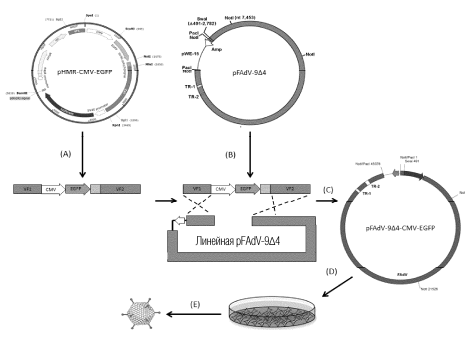
**D**  
 Знхансерная/регуляторная последовательность, которую можно использовать в рекомбинантных вирусах:

Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (HPSE):  
 FASTA:  
 TCAACCTCTGGATTACAAATTTGCAAAATGCACTGATCTTAACTAATGCTCCCTTTAGCTAGTATGGA  
 TACCTGCTTTAATGCTTTGATCATGCTATTCTCCGATATGCTTCAATTTCCCTCTGTTAAATAACCT  
 GGTTCCTCTTTATGAGGAGTGTGGCCGTTGTGAGGCAAGTGGCTGGTGGACTGTGTTTGTGAGCGC  
 AACCCCACTGTTGGGCAATGCAACCACTGTCACTCTTTCCGAGCTTTCGCTTTCCGCTCCTATTGCC  
 AGCGGGAACTATGCGCCCTCCCTCCGCTGAGAGGGGCTGGCTTGGGCACTGCAATTCCTGGG  
 TGTGTGGGAAAGCTGACTCCTTCCATGGCTGCTGCTGTGTGCACTGGAATTCGCGGGAGCTCCTT  
 CTGCTACCTCCCTCGCCCTCAATCCAGGGACCTTCCCTCCCGGGCTCTGGCGGGC

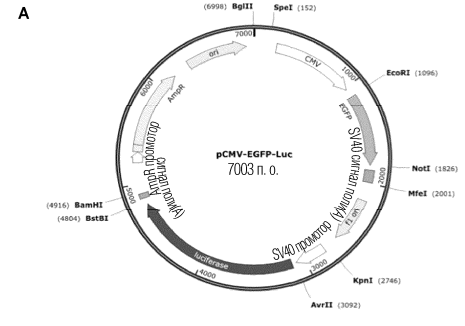
Фиг. 10A-D

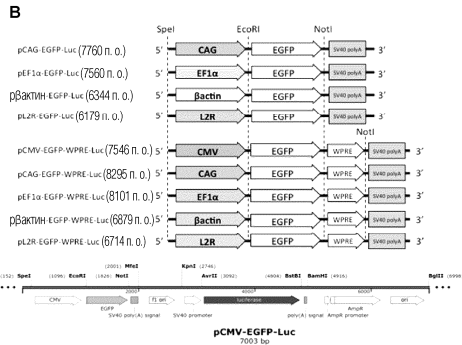


Фиг. 11

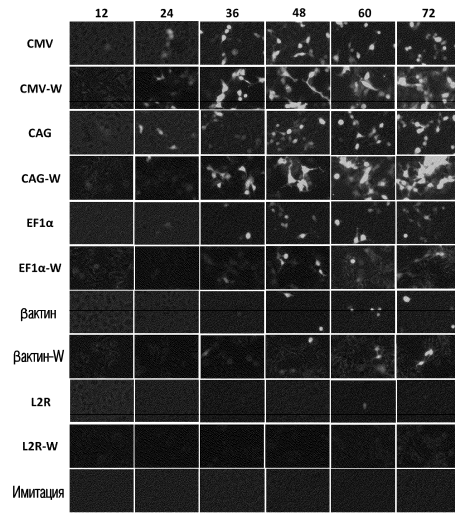


Фиг. 12

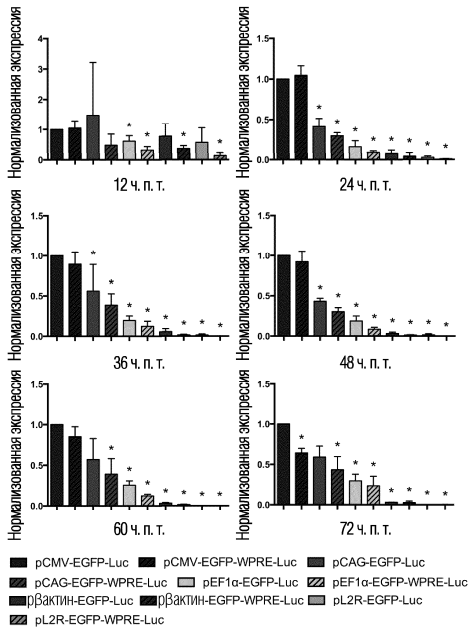




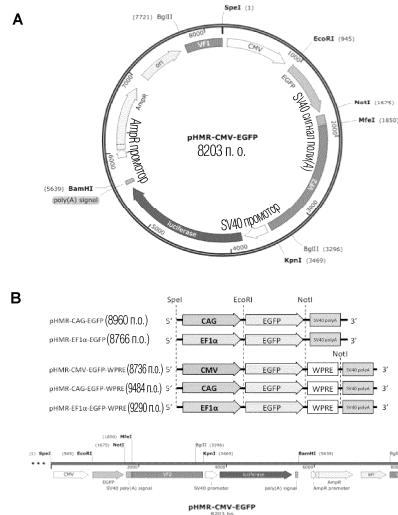
Фиг. 13А, В



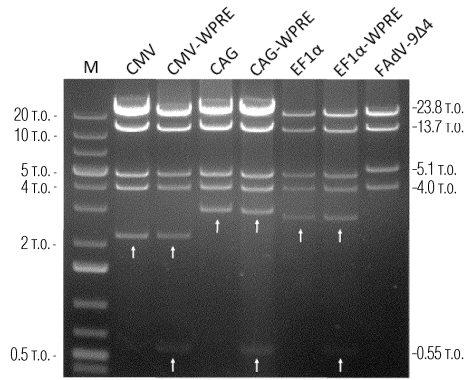
Фиг. 14



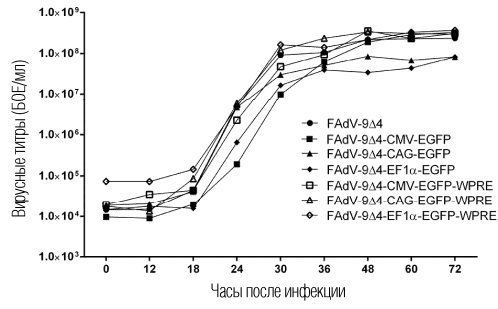
Фиг. 15



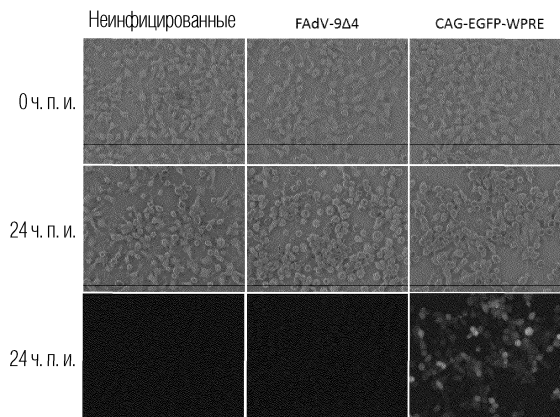
Фиг. 16А, В



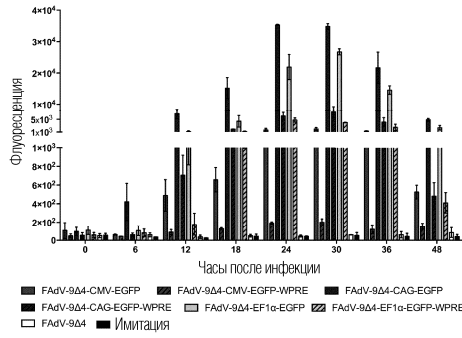
Фиг. 17



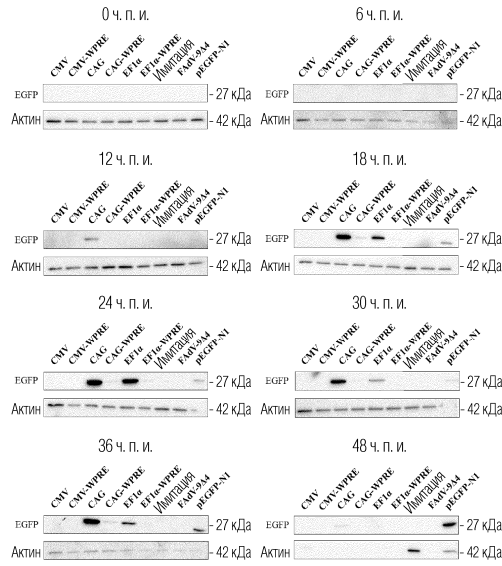
Фиг. 18



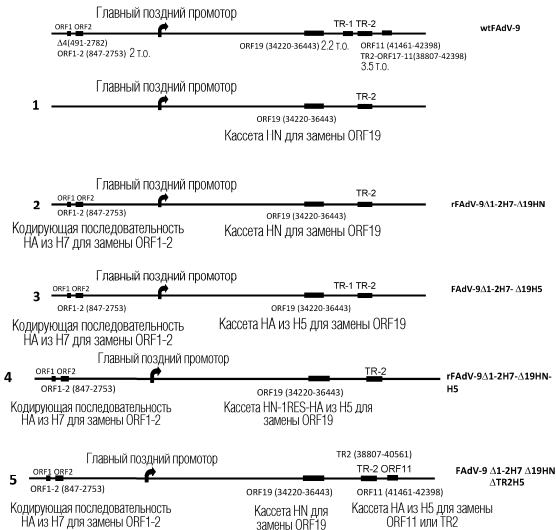
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22

