

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.12

(21) Номер заявки
201990717

(22) Дата подачи заявки
2017.09.18

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(54) НОВАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ ГРИППА СВИНЕЙ

(31) **16189767.3**

(32) **2016.09.20**

(33) **EP**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/EP2017/073438**

(87) **WO 2018/054822 2018.03.29**

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

(72) Изобретатель:
**Галлай Андреас, Мундт Элис,
Николин Велько (DE)**

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

(56) G.R. VAN DE WALLE ET AL.: "Analysis of the Herpesvirus Chemokine-binding Glycoprotein G Residues Essential for Chemokine Binding and Biological Activity", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, № 9, 27 February 2009 (2009-02-27), p.

5968-5976, XP055348229, US, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M808127200, abstract

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

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

US-A1-2004109873

ABDELRAHMAN SAID ET AL.: "An equine herpesvirus 1 (EHV-1) vectored H1 vaccine protects against challenge with swine-origin influenza virus H1N1", VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 154, № 1, 5 July 2011 (2011-07-05), p. 113-123, XP028104182, ISSN: 0378-1135, DOI: 10.1016/J.VETMIC.2011.07.003 [retrieved on 2011-07-14], abstract, fig. 1

WO-A1-9522607

(57) Изобретение относится наряду с другими к вектору EHV, содержащему по крайней мере одну (по крайней мере две) последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, где указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встраивается в сайт инсерции (преимущественно ORF70), и где указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора (предпочтительно последовательностью промотора, который включает 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарными ей нуклеотидными последовательностями, или функциональным фрагментом, или ее функциональной производной, или комплементарными ей нуклеотидными последовательностями). Кроме того, изобретение относится к способам иммунизации животного, предназначенного для производства продуктов питания, включающим введение такому животному, предназначенному для производства продуктов питания, иммуногенной композиции в соответствии с данным изобретением. Кроме того, изобретение относится к способам лечения или профилактики клинических признаков, которые вызываются вирусом гриппа свиней у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются.

Список последовательностей

Данная заявка содержит список последовательностей в соответствии с 37 CFR 1.821-1.825. Список последовательностей сопровождает данную заявку и, таким образом, является введенным в нее в качестве ссылки в своей целостности.

Предпосылки создания изобретения

А. Отрасль, к которой относится изобретение.

Изобретение относится к области (векторных) вакцин и, в частности, к сайтам инсерции и промоторам, которые являются пригодными для экспрессии антигенов-мишеней из таких векторных вакцин. Кроме того, изобретение относится к вакцинам против вируса гриппа А свиней.

Б. Предпосылки создания изобретения и описание предыдущего уровня техники.

EHV векторная система.

Возбудитель лошадиного альфа-герпесвируса 1 (вирус аборта лошадей, EHV-1) принадлежит к роду *Varicellovirus* в подсемейству *Alphaherpesvirinae* семейства *Herpesviridae* и порядка *Herpesvirales*. Это большой, лишенный оболочки вирус с геномом на основе двухцепочечной ДНК, включающей приблизительно 150000 пар оснований. Другими важными членами подрода *Varicellovirus* являются человеческий вирус герпеса 3 (вирус ветряной оспы и опоясывающего лишая), вирус герпеса свиней 1 (вирус псевдобешенства или болезни Ауески), коровий герпесвирус 1 (вирус инфекционного бронхита) и вирус герпеса 4 (вирус ринопневмонита лошадей, EHV-4) (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>, Virus Taxonomy: 2015, release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30)).

EHV-1 и EHV-4 являются эндемичными вирусами и поражают лошадей во всем мире. Хотя EHV-4 вызывает преимущественно легкую инфекцию верхних дыхательных путей, EHV-1 может вызвать системную инфекцию с рядом заболеваний, имеющих симптомы от респираторных до аборта и летальной миелозэнцефалопатии в зависимости от штамма и иммунологического статуса хозяина. Две лицензированные модифицированные живые вакцины (MLV) против EHV-1 в настоящее время доступны в США и Европе соответственно, *Rhinomune*TM (Бёрингер Ингельхайм) и *Prevacino1*TM (MSD). Обе содержат классический аттенуированный штамм EHV-1 *RacH*, который 256 раз пассировали в эпителиальных клетках свиней для аттенуирования (Ma и др., 2013). Механизм аттенуирования был исследован на молекулярном уровне. Osterrieder и др. (1996) показали, что *RacH* не имеет двух геномных копий *orf67*, а также что восстановление одной копии является достаточным для восстановления вирулентности. Кроме того, *RacH* несет делецию 1283 п.о., которая удаляет более 90% кодирующей последовательности *orf1*, кодирующей иммуносупрессивный вирусный белок. Другие мутации также могут влиять на аттенуирование, но до сих пор не были детально исследованы. Все это делает *RacH* весьма безопасным вакцинным штаммом, поскольку восстановление вирулентности путем пассирования у вакцинированных животных является чрезвычайно маловероятным, если это возможно вообще.

Бактериальная хромосома *E.coli* (BAC), несущая весь геном вакцинного штамма *RacH* 1 (EHV-1) вируса герпеса лошадей (*pRacH-SE*), известна как платформа для разработки векторной вакцины. Было показано, что векторные вакцины на основе *RacH* EHV-1 являются способными вызывать иммунитет у нескольких видов млекопитающих, включая свиней, крупный рогатый скот и собак (Rosas и др., 2007; Rosas и др., 2008; Trapp и др., 2005; Said и др., 2013). Гены, кодирующие антигенные белки патогенов, могут быть экспрессированы рекомбинантным EHV-1 *RacH*. С геномом EHV-1-*RacH* работают в его BAC форме в *E.coli* и приспособливают для экспрессии дополнительных белков, как правило, путем вставки трансгенных экспрессионных кассет (Tischer и др., 2010). После трансфекции ДНК *pRacH-SE* в культивируемые перmissive клетки репликация EHV-1 инициируется с помощью клеточных транскрипционных факторов. Активность вирусной ДНК-полимеразы приводит к удалению всех связанных с вектором BAC последовательностей и восстановлению генома *RacH* EHV-1 до его исходного состояния. Получают инфекционный вирус, который не отличается от *RacH*.

Когда *pRacH-SE* переносят в *E.coli*, например, путем инсерции трансгенных экспрессионных кассет, то вирус, восстановленный после трансфекции в перmissive клетках, будет нести модификацию и будет экспрессировать дополнительный ген. Рекомбинантный *RacH* EHV-1 можно использовать как векторную вакцину.

Промотор для векторной системы EHV.

Однако количество трансгенного белка, который экспрессируется без дополнительного экзогенного промотора, обычно является относительно низким. Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в дополнительных промоторах, которые могут быть использованы для экспрессии трансгенного белка из такого вектора, в частности, рекомбинантного *RacH* EHV-1.

При использовании энхансера промотора предраннего гена 1 человеческого цитомегаловируса (Boshart и др., 1985) сообщалось, что трансгены эффективно экспрессируются с сайта инсерции *orf1/3*. В таких исследованиях сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH) использовался для стабилизации транскриптов с целью осуществления лучшей экспрессии (Ma и др., 2012; Said и др., 2013). Несмотря на то что нет доказательств того, что HCMV может индуцировать опухоли у человека, теоретический риск не может быть исключен. До того как был описан энхансер HCMV-IE (Boshart и др., 1985), большинство сильных энхансеров были обнаружены в геномах известных онкогенных вирусов,

таких как обезьяний вирус 40 (SV40), вирусы полиомы или вирус мышинной саркомы Молоуни. Несмотря на то что чрезвычайно сильные и неспецифические для тканей энхансеры промоторов HCMV и MCMV (мышинный цитомегаловирус) очень хорошо подходят для различных исследований, они не могут представлять собой первый выбор промотора для трансгенных векторных вакцин в целом. В частности, риск случайного воздействия на лиц, которые вакцинируют животных, может рассматриваться регуляторными органами как препятствие для лицензирования вакцины.

Сайт инсерции для векторной системы EHV.

Штамм EHV-1 дикого типа имеет три открытых рамки считывания (orf), которые называются orf1, orf2 и orf3 на одном конце длинного уникального сегмента их генома (координаты последовательности 1298-3614; фиг. 1а). Orf1 и orf3 расположены последовательно на одной цепи ДНК, тогда как orf2 кодируется комплементарной цепочкой. Штамм вакцины RacH имеет делецию 1283 п.о. в этой области, что влияет на orf1 и orf2; это указывает на то, что эти гены не являются существенными для репликации вируса. По этой причине такой сайт служит как инсерционный сайт трансгена. Этот сайт вставки называется ORF1/3.

Однако размер и количество трансгенов, которые могут быть встроены в инсерционный сайт ORF1/3, обычно является ограниченным. Таким образом, для увеличения возможностей вектора EHV-1 существует неудовлетворенная потребность в новых и альтернативных способах инсерции и экспрессии трансгенов из вектора EHV-1, в частности рекомбинантного вектора EHV-1 RacH.

Вирус гриппа А свиней (SIAV).

Свиной грипп является острым респираторным вирусным заболеванием, которое вызывается вирусом гриппа А (IAV) семейства Orthomyxovirus, который снижает здоровье и качество жизни свиней. Клинические признаки гриппа у свиней могут проявлять диапазон тяжести, но часто возникают как легкое респираторное заболевание с высокой заболеваемостью и быстрым восстановлением, в редких случаях со смертельным исходом. Однако болезнь создает значительную экономическую нагрузку, так как приводит к потере веса, снижению массы тела и, в некоторых случаях, репродуктивным нарушениям у свиноматок из-за высокой температуры. SIAV является одним из важнейших респираторных патогенов свиней, и его высокая распространенность в свиных стадах во всем мире непосредственно коррелирует с экономическими последствиями заболевания. В Европе в настоящее время существуют четыре вызывающих экономические потери основных подтипа вируса гриппа А, циркулирующие у свиней, которых выращивают на фермах (Brown, 2000). H1N1 (птичий субтип) и H3N2 вирусы свиного гриппа были энзоотическими в крупных странах-производителях свиней с 1980-х гг. Вирусы H1N2 были занесены в европейских свиней около двадцати лет назад (Brown и др., 1995), а пандемический подтип H1N1 (H1pdmN1) был занесен в популяцию свиней путем передачи от человека свиньям в процессе человеческой пандемии H1N1 в 2009 г. и постоянно распространялся в глобальном масштабе в популяциях свиней с оцениваемой средней распространенностью в Европе на уровне 8% всех вирусных инфекций свиного гриппа (Watson и др., 2015). Кроме того, свиной грипп оказывает также влияние на здоровье человека, поскольку IVA является хорошо известным в отношении своего потенциала зоонозов (Thacker & Janke, 2008).

Четыре наиболее распространенных штамма вируса гриппа А в Европе представляют собой подтипы H1N2, H3N2 и H1N1 (H1N1 птичий и H1N1 пандемический). Таким образом, существует потребность в высокоэффективных вакцинах против подтипов H1N2, H3N2 и H1N1 (H1N1 птичьего и H1N1 пандемического) и, таким образом, обеспечение широкой защиты от этих полевых штаммов IAV свиней.

Кроме того, выгодно иметь поливалентную вакцину, поскольку поливалентные вакцины в целом являются более экономически эффективными и более эффективными с точки зрения затрат времени, чем моновалентные вакцины.

Однако в общем случае эффективность вакцины может подвергаться воздействию со стороны интерференционных эффектов, таких как вирусная интерференция различных вакцинных штаммов и/или вирицидные эффекты в одном из компонентов вакцины. Таким образом, существует потребность в комбинированных вакцинах IAV для свиней, которые являются высокоэффективными и не подвергаются воздействию указанных выше эффектов.

Кроме того, широкое и мультивалентное покрытие циркулирующих штаммов IAV свиней также должно эффективно предотвращать ассоциированное с вакциной усиление респираторного заболевания (VAERD) после инфицирования вакцинированных животных полевой вирусной инфекцией, что может наблюдаться в случае, если вакцинные штаммы/антигены и полевые вирусы являются только отдаленно близкими друг к другу (Rajao и др., 2016).

Вакцина, которая основывается на векторе EHV, как описано в данной заявке, не является модифицированной живой вакциной (MLV), она обеспечивает максимальную безопасность в отношении IAV свиней, поскольку никаких живых IAV не производится или не передается животным, что предотвращает, таким образом, потенциальное восстановление вирулентности вакцинного(ых) штамма(ов) и генетической рекомбинации или реассортации с полевыми штаммами свиней или человека. Кроме того, в отличие от вакцин на основе убитого вируса (действующий стандарт), векторная вакцина, как ожидается, не только индуцирует нейтрализующие антитела против IAV у свиней, но также сильно стимулирует клеточный иммунитет против IAV свиней как с помощью MHC класса I, так и класса II. Таким образом, су-

существует потребность в векторных вакцинах на основе SIAV.

Кроме того, как модифицированные живые вакцины, так и инактивированные вакцины не имеют характерного свойства для диагностической дифференциации инфицированных животных от вакцинированных животных (DIVA). Таким образом, существует потребность в вакцинах SIAV DIVA. DIVA может быть достигнута путем выявления антител против белков IAV свиней, таких как NP (нуклеопротеин) или NA (нейраминидаза) у животных, которые были инфицированы полевыми штаммами IAV свиней. В противоположность этому животные, вакцинированные при использовании вакцины, как описано в данной заявке (но такие, которые не были инфицированы вирусом дикого типа или MLV и не вакцинированы инактивированной вакциной), экспрессируют только HA белок (белки) IAV свиней, и у таких вакцинированных животных белки, такие как NP или NA и, таким образом, также антитела против NP или NA, не могут быть обнаружены.

Инактивированные (убитые) вакцины могут вводиться свиноматкам перед опоросом для обеспечения защиты поросят от IAV свиней путем получения иммунитета от матери (вакцина для свиноматок). Кроме того, инактивированные вакцины могут применяться непосредственно у поросят (вакцины для поросят). Однако при применении в виде вакцины для поросят инактивированные вакцины не могут преодолеть полученный от матери иммунитет против IAV свиней у молодых поросят. Таким образом, вакцинация свиным IAV поросят при использовании инактивированных вакцин применяется в моменты времени, начиная с возраста приблизительно 8 недель, и индуцирует иммунитет приблизительно с 12 недель жизни или позже, т.е. остается иммунологический промежуток, в котором поросята могут быть больше не защищенными с помощью материнского иммунитета против свиного IAV, а защита от IAV свиней в результате вакцинации поросят еще не достигнута, что, таким образом, оставляет таких животных чувствительными к IAV инфекции свиней в течение этого периода времени. В отличие от убитых вакцин описанная в данной заявке вакцина позволяет проводить вакцинацию поросят с уровнями материнских антител против IAV свиней и все еще обеспечивает защиту от поздней инфекции IAV свиней. Таким образом, существует потребность в том, чтобы вакцины против свиного IAV были высокоэффективными и вводились в раннем возрасте даже в присутствии материнских антител.

Краткое изложение сущности изобретения

Для того чтобы избежать таких препятствий, данное изобретение обеспечивает новые сайты инсерции, новые последовательности промотора и вакцины SIAV.

Таким образом, решение описанной выше технической задачи достигается с помощью описания и вариантов осуществления, характеризующихся формулой изобретения, а изобретение в различных его аспектах реализуется в соответствии с формулой изобретения.

Для того чтобы увеличить возможности вектора EHV, данное изобретение обеспечивает новые и альтернативные способы инсерции и экспрессии трансгенов из конструкции вектора EHV.

Изобретение относится к EHV векторам, которые имеют новые сайты инсерции в пределах ORF70, как определено в данной заявке.

Изобретение обеспечивает EHV вектор, включающий

- (i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
- (ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встраивается в ORF70,
- (iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора.

Изобретение относится к новому альтернативному сайту инсерции ORF70, который может использоваться для встраивания последовательностей, которые кодируют экзогенный антиген, и экспрессируют белок с EHV вектора, в частности, рекомбинантного RasH EHV-1.

Новый "сайт инсерции ORF70" в векторе EHV-1 характеризуется частичной делецией, укорочением, замещением, модификацией или подобными относительно ORF70. Ожидается, что делеция полного ORF70 будет невыгодной с точки зрения репликации вируса и, таким образом, производства и эффективности вакцины, поскольку полное удаление ORF70 может влиять на промотор ORF71, который кодирует gpII. Новый сайт инсерции ORF70 и/или инсерции (экспрессионной кассеты) в ORF70 функционально определяется таким образом, что ORF71 остается функциональным или интактным.

В конкретном аспекте сайт инсерции ORF70 охватывает делецию части размером приблизительно 801 п.о. в пределах ORF70 для RasH (SEQ ID NO: 20) или последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 95, 99% гомологичной ей. Делетированная часть в последовательности генома RasH показана как SEQ ID NO: 20 (номера нуклеотидов не представлены, поскольку полная последовательность гена RasH не известна). В другом специфическом аспекте сайт инсерции ORF70 охватывает теоретическую делецию размером 801 п.о. в пределах ORF70 для штамма EHV-1 дикого типа ab4 (номер доступа Genbank AY665713.1). Делетированная часть находится в последовательности генома дикого типа ab4 (номер доступа Genbank AY665713.1) между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO: 19).

В данном изобретении "фланкирующие участки" направляют рекомбинацию экспрессионной кассеты, которая включает последовательность, кодирующую экзогенный антиген, в геном EHV-1. Эти фланкирующие участки присутствуют в EHV-1 в естественном состоянии. Up70 фланкирующий участок (417 п.о.,

SEQ ID NO: 13) и Up71 фланкирующий участок (431 п.о., SEQ ID NO: 14) выбраны для классической гомологичной рекомбинации для всех векторов/плазмид переноса, используемых для сайта *orf70*. В штамме ab4 EHV-1 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1) соответствующие последовательности расположены в нуклеотидах 127264-127680 (фланкирующие участки выше *orf70*, SEQ ID NO: 15) и 128483-128913 (фланкирующие участки выше *orf71*), SEQ ID NO: 16). Для RED рекомбинации фланкирующие участки укорачиваются за счет рестрикционного переваривания XbaI. Эти укороченные фланкирующие участка являются идентичными 283 п.о., расположенным 3' в "классическом" фланкирующем участке размером 417 п.о. (Up30 фланкирующий участок, SEQ ID NO: 13) и 144 п.о., расположенным 5' в "классическом" фланкирующем участке размером 417 п.о. (Up71 фланкирующий участок, SEQ ID NO: 14), которые описаны выше. Эти укороченные фланкирующие участки называются Up70 фланкирующим участком (283 и.о.), который является включенным как SEQ ID NO: 17, и Up71 фланкирующим участком (144 и.о.), который является включенным как SEQ ID NO: 18. Эти различные фланкирующие участки определяют тот же сайт инсерции ORF70. Фланкирующие участки используются попарно и всегда имеют один "левый" фланкирующий участок, такой как SEQ ID NO: 13, 15, 17, и один "правый" фланкирующий участок, такой как SEQ ID NO: 14, 16, 18.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает новые регуляторные последовательности/промоторные последовательности нуклеиновых кислот для трансгенной экспрессии, иммуногенные композиции, вакцины и соответствующие способы, которые преодолевают недостатки в данной области техники.

Таким образом, изобретение обеспечивает EHV вектор, включающий

- (i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
- (ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встраивается в сайт инсерции,
- (iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора, включающего 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарные ей нуклеотидные последовательности, или функциональный фрагмент, или ее функциональную производную, или комплементарные ей нуклеотидные последовательности.

Таким образом, данное изобретение относится к EHV векторам, которые имеют два новых промотора: 4pgG600 и 4pMCP600, и их производным меньшей длины, которые, как было показано, являются функциональными после транзиторной трансфекции в культурах клеток или на фоне репликации гЕНV1-RacH в культурах клеток. Показано также, что новые промоторы p430 и p455 являются функциональными на фоне репликации гЕНV1-RacH в культурах клеток, а также у животных (свиней и мышей). Уровни активности двух новых промоторов в течение цикла вирусной репликации, как оказалось, были очень похожи, как следует из экспериментов *in vitro* исследования кинетики промотора.

Эти свойства позволяют создавать рекомбинантные векторные вакцины на основе EHV-1 RacH, экспрессирующие два различных антигена параллельно с подобной эффективностью. Если целевая вакцина состоит из двух различных патогенов, применение двух новых промоторов в двух сайтах инсерции в сочетании с двумя последовательностями полиаденилирования может значительно снизить стоимость товара и представляет собой явное преимущество по сравнению с вектором, который экспрессирует только один антигенный компонент.

Данное изобретение касается вектора EHV-1, который экспрессирует два разных трансгена с одного скелетного вектора без связывания двух трансгенов с помощью функций, имеющих происхождение от РНК вируса (2a-пептиды, IRES-сайты) под контролем одного промотора.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает EHV вектор, включающий

- (i) по крайней мере две последовательности, которые кодируют экзогенные антигены, относящиеся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
- (ii) указанные последовательности, которые кодируют экзогенный антиген, являются встроенными в сайты инсерции,
- (iii) указанные последовательности, которые кодируют экзогенный антиген, являются оперативно связанными с последовательностями промотора.

Дополнительно изобретение обеспечивает иммуногенные композиции и DIVA вакцины, включающие EHV вектор, как описано выше.

Эти свойства позволяют создавать рекомбинантные векторные вакцины на основе EHV-1 RacH, экспрессирующие два различных антигена параллельно с подобной эффективностью. Если целевая вакцина состоит из двух разных патогенов, применение двух новых промоторов в двух сайтах инсерции в сочетании с двумя последовательностями полиаденилирования может значительно снизить стоимость товара и представляет собой явное преимущество по сравнению с вектором, который экспрессирует только один антигенный компонент.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает вакцины SIAV. Настоящее изобретение относится также к специфическим последовательностям гемагглютининов, таких как SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27,

SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29 и к их гомологичным последовательностям. Кроме того, данное изобретение обеспечивает моновалентные и поливалентные SIAV вакцины, которые являются безопасными и высокоэффективными.

Дополнительно SIAV вакцина на основе вектора в соответствии с данным изобретением может использоваться для дифференцирования животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, инфицированных вирусом гриппа А свиней, от животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые были вакцинированы иммуногенной композицией или вакциной DIVA, как описывается в данной заявке.

Кроме того, изобретение относится к использованию иммуногенных композиций и вакцин DIVA, включающих EHV векторы, как описывается в данной заявке. Изобретение относится к способу иммунизации животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, лечения или профилактики клинических признаков, которые вызываются свинным IAV у животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, способу снижения титра вируса в легких животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, и способу вакцинации животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, которое нуждается в антителах против свиного вируса гриппа А.

Подробное описание изобретения

Данное изобретение решает проблемы, присущие уровню техники, и обеспечивает четкое преимущество по сравнению с уровнем техники. В общем случае, данное изобретение обеспечивает EHV вектор, включающий

- (i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
- (ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встраивается в ORF70,
- (iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, включающую EHV вектор, как описывается в данной заявке, и необязательно фармацевтический носитель.

Таким образом, изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, которая включает EHV вектор, включающий

- (i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
- (ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встраивается в ORF70,
- (iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора.

Преимущественно экспериментальные данные, которые обеспечиваются в данном изобретении, раскрывают, что новый сайт инсерции в пределах вектора EHV может быть использован для встраивания и экспрессии антигенов. Кроме того, обеспечение нового сайта инсерции сейчас позволяет осуществлять инсерцию и экспрессию антигенов с различных сайтов инсерции, а также осуществлять экспрессию более одного антигена соответственно. Кроме того, экспериментальные данные показывают, что векторы EHV с новым сайтом инсерции могут использоваться для обеспечения иммуногенных композиций из одного или двух сайтов, а также для вакцины DIVA соответственно.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает EHV вектор, включающий

- (i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
- (ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встраивается в сайт инсерции,
- (iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора, который включает 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарными ей нуклеотидными последовательностями, или функциональным фрагментом, или ее функциональной производной, или комплементарными ей нуклеотидными последовательностями.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, включающую EHV вектор, как описывается в данной заявке, и необязательно фармацевтический носитель.

Таким образом, изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, которая содержит EHV вектор, включающий

- (i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
- (ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встраивается в сайт инсерции,
- (iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора, который включает 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарными ей нуклеотидными последовательностями, или функциональным фрагментом, или ее функциональной производной, или комплементарными ей нуклеотидными по-

следовательностями.

Преимущественно экспериментальные данные, которые обеспечиваются данным изобретением, раскрывают, что новые последовательности промотора, которые были получены, могут использоваться для экспрессии антигенов. Кроме того, обеспечение новых последовательностей промотора позволяет осуществлять экспрессию антигенов с различных сайтов инсерции векторной системы такой, как EHV векторная система, и экспрессию более чем одного антигена соответственно. Кроме того, экспериментальные данные показывают, что последовательности промотора могут использоваться для экспрессии антигенов в векторных системах, таких как EHV векторная система для обеспечения иммуногенных композиций из одного или двух сайтов и для вакцины DIVA соответственно.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает EHV вектор, включающий

(i) по крайней мере две последовательности, которые кодируют экзогенные антигены, относящиеся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
(ii) указанные последовательности, которые кодируют экзогенные антигены, являются встроенными в сайты инсерции,

(iii) указанные последовательности, кодирующие экзогенные антигены, являются оперативно связанными с последовательностями промотора.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, которая включает EHV вектор, как описывается в данной заявке, и необязательно фармацевтический носитель.

Таким образом, изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, которая содержит EHV вектор, включающий

(i) по крайней мере две последовательности, которые кодируют экзогенные антигены, относящиеся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
(ii) указанные последовательности, кодирующие экзогенные антигены, являются встроенными в сайты инсерции,

(iii) указанные последовательности, которые кодируют экзогенные антигены, являются оперативно связанными с последовательностями промотора.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, включающую два или более EHV вектора, как описывается в данной заявке. Преимущественно иммуногенная композиция включает два, три или четыре EHV вектора.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция включает два EHV вектора.

В одном аспекте данного изобретения эти два или более EHV векторов включают различные последовательности, кодирующие экзогенные антигены. Предпочтительно, когда эти два или более EHV векторов включают различные последовательности, которые кодируют экзогенные антигены, которые относятся к вирусу гриппа А свиней. Более предпочтительно, когда эти два или более EHV векторов включают различные последовательности, кодирующие гемагглютинин.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает вакцину DIVA, включающую один или более EHV векторов, как описывается в данной заявке.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор является рекомбинантным.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор представляет собой RacH или RacH SE.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор является выбранным из группы, которая состоит из EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор представляет собой EHV-1.

В одном аспекте данного изобретения животные, предназначенные для производства пищевых продуктов, представляют собой свиней.

В одном аспекте данного изобретения инфицированные патогеном животные, предназначенные для производства пищевых продуктов, представляют собой таких, которые инфицированы вирусом гриппа, преимущественно вирусом гриппа А свиней.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где подтип гемагглютинина вируса гриппа является выбранным из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 и H18.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, а подтип гемагглютинина гриппа представляет собой H1 и/или H3.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где антигены гемагглютинина вируса гриппа А имеют происхождение от свиней.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор включает по крайней мере две последовательности, которые кодируют гемагглютинин вируса гриппа.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор включает по крайней мере четыре последова-

тельности, кодирующие гемагглютинин вируса гриппа.

В одном аспекте данного изобретения ENV вектор включает четыре последовательности, которые кодируют гемагглютинин вируса гриппа.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где последовательность, кодирующая гемагглютинин вируса гриппа является выбранной из группы штаммов, состоящий из

A/swine/Italy/116114/2010(H1N2),
 A/swine/Italy/7680/2001(H3N2),
 A/swine/Gent/132/2005(H1N1),
 A/swine/Italy/4675/2003(H1N2),
 A/swine/Italy/259543/2003(H1N2),
 A/swine/Denmark/13772-1/2003(H1N1),
 A/swine/England/MD0040352R/2009(H1N1),
 A/swine/Hungary/13509/2007(H3N2),
 A/swine/Italy/13962/95(H3N2),
 A/swine/Cotes d'Armor/1121/00(H1N1),
 A/Swine/Colorado/1/77,
 A/Swine/Colorado/23619/99,
 A/Swine/Cote d'Armor/3633/84,
 A/Swine/England/195852/92,
 A/Swine/Finistere/2899/82,
 A/Swine/Hong Kong/10/98,
 A/Swine/Hong Kong/9/98,
 A/Swine/Hong Kong/81/78,
 A/Swine/Illinois/100084/01,
 A/Swine/Illinois/100085A/01,
 A/Swine/Illinois/21587/99,
 A/Swine/Indiana/1726/88,
 A/Swine/Indiana/9K035/99,
 A/Swine/Indiana/P12439/00,
 A/Swine/Iowa/30,
 A/Swine/Iowa/15/30,
 A/Swine/Iowa/533/99,
 A/Swine/Iowa/569/99,
 A/Swine/Iowa/3421/90,
 A/Swine/Iowa/8548-1/98,
 A/Swine/Iowa/930/01,
 A/Swine/Iowa/17672/88,
 A/Swine/Italy/1513-1/98,
 A/Swine/Italy/1523/98,
 A/Swine/Korea/CY02/02,
 A/Swine/Minnesota/55551/00,
 A/Swine/Minnesota/593/99,
 A/Swine/Minnesota/9088-2/98,
 A/Swine/Nebraska/1/92,
 A/Swine/Nebraska/209/98,
 A/Swine/Netherlands/12/85,
 A/Swine/North Carolina/16497/99,
 A/Swine/North Carolina/35922/98,
 A/Swine/North Carolina/93523/01,
 A/Swine/North Carolina/98225/01,
 A/Swine/Oedenrode/7C/96,
 A/Swine/Ohio/891/01,
 A/Swine/Oklahoma/18717/99,
 A/Swine/Oklahoma/18089/99,
 A/Swine/Ontario/01911-1/99,
 A/Swine/Ontario/01911-2/99,
 A/Swine/Ontario/41848/97,
 A/Swine/Ontario/97,
 A/Swine/Quebec/192/81,
 A/Swine/Quebec/192/91,
 A/Swine/Quebec/5393/91,

A/Swine/Taiwan/7310/70,
 A/Swine/Tennessee/24/77,
 A/Swine/Texas/4199-2/98,
 A/Swine/Wisconsin/125/97,
 A/Swine/Wisconsin/136/97,
 A/Swine/Wisconsin/163/97,
 A/Swine/Wisconsin/164/97,
 A/Swine/Wisconsin/166/97,
 A/Swine/Wisconsin/168/97,
 A/Swine/Wisconsin/235/97,
 A/Swine/Wisconsin/238/97,
 A/Swine/Wisconsin/457/985,
 A/Swine/Wisconsin/458/98,
 A/Swine/Wisconsin/464/98, и
 A/Swine/Wisconsin/14094/99.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где кодирующая гемагглютинин вируса гриппа последовательность является выбранной из группы штаммов, состоящий из

A/swine/Italy/116114/2010(H1N2),
 A/swine/Italy/7680/2001(H3N2),
 A/swine/Gent/132/2005(H1N1), и
 A/swine/Italy/4675/2003(H1N2).

В одном аспекте данного изобретения последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где кодирующая гемагглютинин вируса гриппа последовательность кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящую из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где кодирующая гемагглютинин вируса гриппа последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере 70% идентичности с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где кодирующая гемагглютинин вируса гриппа последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 80% по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 91%, по крайней мере 92%, по крайней мере 93%, по крайней мере 94%, по крайней мере 95%, по крайней мере 96%, по крайней мере 97%, по крайней мере 98% или по крайней мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

В одном аспекте данного изобретения последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует N (нейраминидазу) вируса гриппа, а подтип N является выбранным из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 и N10.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор, иммуногенная композиция или DIVA вакцина не включает последовательностей, которые кодируют антиген N (нейраминидаза) вируса гриппа.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор, иммуногенная композиция или вакцина DIVA не включает последовательностей, которые кодируют антиген NP (нуклеопротеин) вируса гриппа.

В одном аспекте данного изобретения EHV вектор включает дополнительные регуляторные последовательности такие, как последовательность сигнала терминации или последовательность полиаденилирования.

Сайт инсерции.

В одном аспекте данного изобретения указанный сайт инсерции представляет собой ORF1/3.

В одном аспекте данного изобретения указанный сайт инсерции представляет собой ORF70.

В одном аспекте данного изобретения первая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, встраивается в ORF70.

В одном аспекте данного изобретения вторая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, встраивается в ORF1/3.

В одном аспекте данного изобретения инсерция в ORF70 характеризуется частичной делецией, укорачиванием, заменой, модификацией и т.д. в ORF70, благодаря чему ORF71 остается функциональным.

В одном аспекте данного изобретения инсерция в ORF70 характеризуется делецией части последовательности, содержащей приблизительно 801 п.о., в пределах ORF70 для RacH (SEQ ID NO: 20) или

последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 95, 99% гомологичной и/или идентичной ей.

В другом специфическом аспекте вектора в соответствии с изобретением инсерция в ORF70 характеризуется делецией части последовательности, содержащей приблизительно 801 п.о. в пределах ORF70 для RacH (SEQ ID NO: 20), или последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 95, 99% гомологичной и/или идентичной указанной последовательности делеции в любом другом штамме.

В дополнительном специфическом аспекте вектора в соответствии с изобретением инсерция в ORF70 характеризуется делецией части, содержащей приблизительно 801 п.о., в пределах ORF70 для штамма ab4 EHV-1 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), благодаря чему делетированная часть в последовательности генома ab4 дикого типа размещается между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO: 19), или является на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичной и/или идентичной этой последовательности.

В дополнительном специфическом аспекте вектора в соответствии с изобретением инсерция в ORF70 характеризуется делецией части, содержащей приблизительно 801 п.о., в пределах ORF70 для штамма ab4 EHV-1 дикого типа (код доступа Genbank AY665713.1), благодаря чему делетированная часть в последовательности генома ab4 дикого типа размещается между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO: 19), или является на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичной и/или идентичной указанной последовательности делеции в любом другом штамме.

В одном аспекте данного изобретения EHV-1 вектор включает по крайней мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичной и/или идентичной любой из этих последовательностей.

В одном аспекте данного изобретения EHV-1 вектор включает

(i) по крайней мере один левый фланкирующий участок ORF70, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17; и

(ii) по крайней мере один правый фланкирующий участок ORF70, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 18.

Промотор.

В одном аспекте данного изобретения последовательность промотора является выбранной из группы, состоящей из: большого T SV40, предраннего гена 1 HCMV и MCMV, промотора человеческого фактора элонгации альфа, промотора полиэдрина бакуловирусов, функционального фрагмента 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), предпочтительно, когда указанный функциональный фрагмент представляет собой р430 (SEQ ID NO: 3), функционального фрагмента нуклеотидной последовательности, комплементарной 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), функционального фрагмента 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), предпочтительно, когда указанный функциональный фрагмент представляет собой р455 (SEQ ID NO: 4), функционального фрагмента комплементарной нуклеотидной последовательности 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2).

В одном аспекте данного изобретения последовательность промотора включает 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарные ей нуклеотидные последовательности, или функциональный фрагмент, или ее функциональную производную, или комплементарные ей нуклеотидные последовательности.

В одном аспекте данного изобретения функциональный фрагмент или производная последовательности промотора имеет гомологию 80, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,9%.

В одном аспекте данного изобретения функциональный фрагмент или производная последовательности промотора имеет длину 550 нуклеотидов, предпочтительно 500, 490, 480, 470, 460, 455, 450, 445, 440, 435, 434, 433, 432, 431, 430 нуклеотидов, наиболее предпочтительно 455 или 430 нуклеотидов.

В одном аспекте данного изобретения функциональный фрагмент последовательности промотора представляет собой укорочение 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или ее комплементарную нуклеотидную последовательность, предпочтительно, когда идентичность последовательности составляет (по крайней мере) 72% по всей длине (или выше).

В одном аспекте данного изобретения функциональный фрагмент последовательности промотора 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) представляет собой фрагмент, который обозначается как 430p430 (SEQ ID NO: 3). В другом аспекте идентичность последовательности составляет (по крайней мере) 70, 80, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9%.

В одном аспекте данного изобретения функциональный фрагмент последовательности промотора представляет собой укорочение 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) или его комплементарную нуклеотидную последовательность предпочтительно, когда идентичность последовательности составляет (по крайней мере) 78% по всей длине (или выше).

В одном аспекте данного изобретения функциональный фрагмент последовательности промотора 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) представляет собой фрагмент, который обозначается как р455 (SEQ ID NO: 4). В другом аспекте идентичность последовательности составляет (по крайней мере) 70, 80, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7,

нальный фрагмент, или ее функциональная производная, или комплементарные ей нуклеотидные последовательности, являются оперативно связанными с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, которая имеет по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 80%, по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 91%, по крайней мере 92%, по крайней мере 93%, по крайней мере 94%, по крайней мере 95%, по крайней мере 96%, по крайней мере 97%, по крайней мере 98% или по крайней мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 26.

В одном аспекте данного изобретения функциональный фрагмент последовательности промотора 4pG600 (SEQ ID NO: 1) представляет собой фрагмент, который обозначается как p430 (SEQ ID NO: 3), где функциональный фрагмент последовательности промотора 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) представляет собой фрагмент, который обозначается как 455p455 (SEQ ID NO: 4).

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или вакцина DIVA является тетравалентной.

В одном аспекте данного изобретения указанная иммуногенная композиция или DIVA вакцина является рецептированной для ведения единичной дозы.

Предпочтительно, когда единичная доза имеет общий объем от приблизительно 0,2 до 2,5 мл, более предпочтительно от приблизительно 0,2 до 2,0 мл, даже более предпочтительно от приблизительно 0,2 до 1,75 мл, еще более предпочтительно от приблизительно 0,2 до 1,5 мл, даже более предпочтительно от приблизительно 0,4 до 1,25 мл, даже более предпочтительно от приблизительно 0,4 до 1,0 мл с единичной дозой 0,5 мл или с дозой 1,0 мл, которая является наиболее предпочтительной. Более предпочтительно, когда единичная доза имеет общий объем 0,5, 1, 1,5 или 2 мл.

Также было показано, что единичная доза иммуногенной композиции в соответствии с изобретением является эффективной после введения такой единичной дозы такой иммуногенной композиции.

В одном аспекте данного изобретения указанная иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится внутримышечно или интраназально.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина безопасна для свиней в возрасте первых шести недель жизни, в возрасте первых двух недель жизни, в возрасте первой недели жизни или в первый день жизни.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте данного изобретения указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой водный раствор для инъекций, среду для культивирования клеток или буфер для ресуспендирования.

В одном аспекте данного изобретения указанный буфер для ресуспендирования представляет собой забуференный фосфатом солевой раствор.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина включает от 1×10^4 до 1×10^9 инфекционных доз 50% культуры тканей (TCID₅₀), предпочтительно от 1×10^4 до 1×10^8 TCID₅₀, даже более предпочтительно от 1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀ вектора EHV.

В одном аспекте данного изобретения указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

В одном аспекте данного изобретения указанная иммуногенная композиция или DIVA вакцина является мультивалентной вакциной.

В одном аспекте данного изобретения указанная иммуногенная композиция или DIVA вакцина представляет собой бивалентную вакцину, тетравалентную вакцину, гексавалентную вакцину или гептавалентную вакцину.

В одном аспекте данного изобретения указанная иммуногенная композиция или DIVA вакцина представляет собой бивалентную вакцину или тетравалентную вакцину.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина является эффективной в лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных вирусом гриппа А свиней, у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина защищает от гомологичного и/или гетерологичного заражения вирусом гриппа А свиней.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина защищает от гомологичного и/или гетерологичного заражения вирусом гриппа А свиней серотипов H1 и/или H3.

Набор.

Композиции могут, если это является желательным, быть представлены в упаковке или устройстве для распыления, которые могут содержать одну или более единичных дозированных форм, включающих активный ингредиент. Пакет может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Упаковка или дозатор могут сопровождаться инструкциями для введения, предпочтительно для ввода животному, предназначенному для производства продуктов питания, в частности свиньям. К такому(им) контейнеру(ам) могут добавляться примечания в форме, установленной

правительственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, содержащие сообщения об утверждении органом производства, использования или продажи для введения животным.

Изобретение обеспечивает набор, включающий иммуногенную композицию или DIVA вакцину, как описывается в данной заявке.

В одном аспекте данного изобретения набор дополнительно включает письмо-инструкцию для лечения и/или профилактики гриппа А свиней.

Способ лечения.

Изобретение обеспечивает способ иммунизации животного, предназначенного для производства продуктов питания, который включает введение такой животному, предназначенному для производства продуктов питания, иммуногенной композиции или DIVA вакцины, как описывается в данной заявке.

Предпочтительно, когда иммунизация приводит к уменьшению частоты возникновения инфекции вируса гриппа А свиней или снижению тяжести клинических признаков, вызванных или связанных с конкретной инфекцией вирусом гриппа А свиней.

Кроме того, иммунизация животного, предназначенного для производства продуктов питания, которое в этом нуждается, при использовании иммуногенных композиций, как обеспечивается в данной заявке, приводит к предотвращению инфекции животного, предназначенного для производства продуктов питания, вирусом гриппа А свиней. Даже более предпочтительно, когда иммунизация приводит к эффективной, длительной иммунологической реакции против инфекции вирусом гриппа А свиней. Имеется в виду, что указанный период времени будет продолжаться больше 2 месяцев, предпочтительно больше 3 месяцев, более предпочтительно больше 4 месяцев, более предпочтительно больше 5 месяцев, более предпочтительно больше 6 месяцев. Следует понимать, что иммунизация может не быть эффективной у всех иммунизированных животных. Однако термин требует, чтобы значительная часть животных поголовья была эффективно иммунизирована.

Преимущественно в этом контексте предполагается поголовье животных, предназначенных для производства продуктов питания, которые обычно, т.е. без иммунизации, будут развивать клинические признаки, которые, как правило, вызываются или ассоциируются с инфекцией вирусом гриппа А свиней. Будут ли животные поголовья, предназначенные для производства пищевых продуктов, эффективно иммунизированы, может быть определено без дополнительного раскрытия специалистом в данной области техники. Преимущественно иммунизация будет эффективной, если клинические признаки, по крайней мере у 33%, по крайней мере у 50%, по крайней мере у 60%, по крайней мере у 70%, по крайней мере у 80%, по крайней мере у 90%, даже более предпочтительно по крайней мере у 95% и наиболее предпочтительно у 100% животных данного поголовья являются сниженными по частоте возникновения или тяжести по крайней мере на 10%, более предпочтительно по крайней мере на 20%, еще более предпочтительно по крайней мере на 30%, даже более предпочтительно по крайней мере на 40%, еще более предпочтительно по крайней мере на 50%, даже более предпочтительно по крайней мере на 60%, еще более предпочтительно по крайней мере на 70%, даже более предпочтительно по крайней мере на 80%, еще более предпочтительно по крайней мере на 90%, еще более предпочтительно по крайней мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с животными, предназначенными для производства пищевых продуктов, которые не были иммунизированы или были иммунизированы с помощью иммуногенной композиции, которая была доступной до даты приоритета данного изобретения, но затем были инфицированы конкретным вирусом гриппа А свиней.

Данное изобретение обеспечивает способ лечения или профилактики клинических признаков, вызванных вирусом гриппа А, у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются, где способ включает введение животному, предназначенному для производства пищевых продуктов, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или DIVA вакцины, как описывается в данной заявке.

Предпочтительно, когда клинические признаки являются сниженными по крайней мере на 50%, даже более предпочтительно по крайней мере на 60%, еще более предпочтительно по крайней мере на 70%, даже более предпочтительно по крайней мере на 80%, даже более предпочтительно по крайней мере на 90%, еще более предпочтительно по крайней мере на 95%, наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с животным, предназначенным для производства продуктов питания, которое не подвергалась обработке (ни было иммунизировано), но затем было инфицировано конкретным вирусом гриппа А.

Данное изобретение обеспечивает способ снижения титров в легких у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются, по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или DIVA вакцины, как описывается в данной заявке. Однако следует понимать, что указанный вирус является вирусом гриппа А, предпочтительно вирусом гриппа А свиней.

Предпочтительно, когда титры вируса являются сниженными по крайней мере на 50%, даже более предпочтительно по крайней мере на 60%, еще более предпочтительно по крайней мере на 70%, даже

более предпочтительно по крайней мере на 80%, даже более предпочтительно по крайней мере на 90%, еще более предпочтительно по крайней мере на 95%, наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы того же вида, которые были потом инфицированы конкретным вирусом гриппа А.

Преимущественно экспериментальные данные, которые обеспечиваются данным изобретением, раскрывают безопасность и эффективность иммуногенной композиции, представленной в данной заявке, при введении свиньям. Фактически свиньи, которые были вакцинированы иммуногенной композицией, которая представлена в данной заявке, имеют сниженные клинические признаки, связанные с заболеванием, по сравнению с невакцинированными поросятами, такие как сниженные титры вируса в легких после заражения вирусной инфекцией.

Данное изобретение обеспечивает способ вакцинации животного, предназначенного для производства продуктов питания, нуждающегося в этом, которое имеет титры антител против вируса гриппа А свиней, включающий этап введения указанной животному, предназначенному для производства пищевых продуктов, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или DIVA вакцины, как описывается в данной заявке.

Однако антитела против вируса гриппа А свиней могут присутствовать у невакцинированных поросят, такие антитела образуются у поросят в ответ на инфекцию вирусом гриппа А свиней. Альтернативно антитела против вируса гриппа А свиней у невакцинированных поросят являются материнскими антителами, которые образовались в ответ на вакцинацию свиноматок вакциной против вируса свиного гриппа А, или в ответ на инфекцию вирусом гриппа А свиноматок. Материнские антитела пассивно передаются от таких свиноматок поросятам через молозиво и молоко.

Интерференция материнских антител с вакцинным антигеном может снижать или даже устранять иммунный ответ против живых, а также инактивированных вакцин. Различные степени интерференции индуцированного вакциной иммунного ответа с антителами, которые имеют происхождение от матери, были продемонстрированы для живых вакцин, а также для вакцин, которые являются неспособными к репликации (т.е. инактивированных или субъединичных вакцин).

Таким образом, вакцина IAV свиней, описанная в данной заявке, может успешно применяться у поросят в присутствии материнских антител против IAV свиней и обеспечивает защиту от инфекции IAV свиней.

Кроме того, вакцинации свиноматок вакциной IAV свиней, как описывается в данной заявке, приводит к иммунитету свиноматок и передаче материнских антител поросятам.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает способ получения иммунитета, который имеет происхождение от матери, против вируса гриппа А у молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, который включает введение матери указанной молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или DIVA вакцины, как описывается в данной заявке, когда указанная мать является беременной указанным молодым животным, предназначенным для производства пищевых продуктов.

Поскольку вакцина IAV, описанная в данной заявке, может быть успешно применена у поросят в присутствии материнских антител, указанная вакцина может использоваться для вакцинации свиноматок и последующей вакцинации поросят, родившихся от указанной свиноматки. Вакцинированная свиноматка передает материнский иммунитет, включая антитела, поросятам. Однако, поскольку описанная в данной заявке вакцина IAV свиней, не препятствует материнским антителам, поросята могут быть вакцинированы той же вакциной в ранний период после рождения. Кроме того, путем вакцинации свиноматки этой вакциной или любой другой вакциной для свиноматок против IAV свиней, как описывается в данной заявке, а также молодых поросят, рожденных от этой свиноматки, повышается защита от инфекции, вызванной вирусом гриппа А. В первые дни-недели жизни поросята являются защищенными материнским иммунитетом. Кроме того, путем ранней вакцинации поросят они приобретают иммунитет против инфекции вирусом гриппа А и, таким образом, являются защищенными без возникновения иммунологического интервала между угасанием материнского иммунитета и началом вакцинации.

Данное изобретение обеспечивает способ получения повышенной защиты против инфекции вирусом гриппа А у молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, которое в этом нуждается, где

а) мать указанного молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, является вакцинированной с помощью терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или DIVA вакцины, как описывается в данной заявке, в то время, когда указанная мать является беременной указанным молодым животным, предназначенным для производства пищевых продуктов; и/или

б) указанное молодое животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является вакцинированным с помощью терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или DIVA вакцины в возрасте в пределах трех недель.

Предпочтительно, когда указанная иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится беременной свиноматке по крайней мере один раз перед опоросом, предпочтительно после осуществления

основной иммунизации одной, более предпочтительно двумя вакцинами ("повторяющиеся дозы"). Когда иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится свиноматке три раза, то первая основная иммунизация должна осуществляться за 116-60 дней перед опоросом, предпочтительно за 116-58 дней перед опоросом и наиболее предпочтительно за 116-56 дней перед опоросом. Вторая основная иммунизация должна осуществляться за 95-40 дней перед опоросом, предпочтительно за 95-38 дней перед опоросом и наиболее предпочтительно за 95-35 дней перед опоросом. Заключительное бустерное введение перед опоросом следует проводить за 10-20 дней перед опоросом, предпочтительно за 12-18 дней перед опоросом и наиболее предпочтительно за 14 дней до опороса.

Иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится пороссятам предпочтительно до достижения ими возраста 3 недель. Предпочтительно, когда иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится каждому поросенку в возрасте 1-21 день, более предпочтительно в возрасте 1-10 дней, даже более предпочтительно в возрасте 1-9 дней, даже более предпочтительно в возрасте 1-8 дней, даже более предпочтительно в возрасте 1-7 дней, даже более предпочтительно в возрасте 1-6 дней, даже более предпочтительно в возрасте 1-5 дней, даже более предпочтительно в возрасте 1-4 дня, даже более предпочтительно в возрасте 1-3 дня, даже более предпочтительно в возрасте 1 или 2 дня (дней) и наиболее предпочтительно в возрасте 1 дня.

Однако иммуногенная композиция может вводиться пороссятам в виде двух или более доз с первой дозой, которая вводится перед введением второй (бустерной) дозы. Предпочтительно, когда первая доза вводится в течение первых двух недель от роду, более предпочтительно в пределах первой недели от рождения и даже более предпочтительно, когда она вводится в первый день рождения. Предпочтительно, когда вторая доза вводится по крайней мере через 15 дней после первой дозы. Более предпочтительно, когда вторая доза вводится в пределах 15-40 дней после первой дозы. Даже более предпочтительно, когда вторая доза вводится по крайней мере через 17 дней после первой дозы. Также более предпочтительно, когда вторая доза вводится в пределах 17-30 дней после первой дозы. Даже более предпочтительно, когда вторая доза вводится по крайней мере через 19 дней после первой дозы. Также более предпочтительно, когда вторая доза вводится в пределах 19-25 дней после первой дозы. Наиболее предпочтительно, когда вторая доза вводится по крайней мере через 21 день после первой дозы. В желаемом аспекте режима двукратного введения как первая, так и вторая доза иммуногенной композиции, вводятся в том же количестве. Предпочтительно, когда каждая доза вводится в желаемом количестве, с дозой 1 мл, которая является наиболее предпочтительной дозой для первого и второго введения. В дополнение к первому и второму режиму дозирования, альтернативный вариант осуществления включает дополнительные последующие дозы. Например, третья, четвертая или пятая дозы могут вводиться в этих аспектах. Предпочтительно, когда дальнейшие третья, четвертая и пятая дозы вводятся в том же количестве, что и первая доза, с временными промежутками между дозами, которые являются последовательными с временным промежутком между первой и второй дозами, как упоминается выше. Таким образом, указанный способ относится к вакцинации беременных свиноматок, а также рожденных поросят.

В одном аспекте данного изобретения животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, представляет собой свинью, поросенка или свиноматку.

В одном аспекте данного изобретения вирус гриппа А представляет собой вирус гриппа А свиней.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится однократно.

Является понятным, что единичная доза вводится только один раз. Как показано в примерах, иммуногенная композиция, как обеспечивается в данной заявке, была подтверждена как эффективная после введения единичной дозы.

Предпочтительно, когда единичная доза имеет общий объем приблизительно от 0,2 до 2,5 мл, более предпочтительно приблизительно от 0,2 до 2,0 мл, даже более предпочтительно приблизительно от 0,2 до 1,75 мл, еще более предпочтительно приблизительно от 0,2 до 1,5 мл, даже более предпочтительно приблизительно от 0,4 до 1,25 мл, даже более предпочтительно приблизительно от 0,4 до 1,0 мл с самой предпочтительной единичной дозой 0,5 или 1,0 мл. Наиболее предпочтительная единичная доза имеет общий объем 0,5, 1, 1,5 или 2 мл.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится животным, предназначенным для производства пищевых продуктов, в период первых шести недель после рождения, в период первых двух недель жизни, в период первой недели жизни или в первый день жизни.

Предпочтительно, когда животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, подвергаются иммунизации в возрасте в пределах интервала 1-40 дней, в возрасте в пределах интервала 1-30 дней, в возрасте в пределах интервала 1-21 дней, более предпочтительно, когда указанное животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, подвергаются иммунизации в возрасте в пределах интервала 1-10 дней, даже более предпочтительно в возрасте в пределах интервала 1-9 дней, даже более предпочтительно в возрасте в пределах интервала 1-8 дней, даже более предпочтительно в возрасте в пределах интервала 1-7 дней, даже более предпочтительно в возрасте в пределах интервала 1-6 дней, даже более предпочтительно в возрасте в пределах интервала 1-5 дней, даже более предпочтительно в возрасте в пределах интервала 1-4 дней, даже более предпочтительно в возрасте в пределах интервала 1-3 дней, да-

же более предпочтительно в возрасте 1 или 2 дней и наиболее предпочтительно в возрасте 1 или 0 дней.

Предпочтительно, когда животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, которое подвергают иммунизации, является таковым в возрасте 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дня. Более предпочтительно, когда животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, которое подвергают иммунизации, является таковым в возрасте 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней. Однако понятно, что после вакцинации животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, которое является таковым в возрасте нескольких дней после рождения, необходимо несколько дней, чтобы иммунная система животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, развила иммунитет против инфекции вирусом гриппа А свиней. Таким образом, предпочтительно, чтобы животные, предназначенные для производства пищевых продуктов, подвергались иммунизации в первый день жизни.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится в двух дозах.

Как показано в примерах, иммуногенная композиция, которая обеспечивается в данной заявке, была подтверждена как эффективная после введения двух доз.

Однако иммуногенная композиция может вводиться в двух или более дозах с первой дозой, которая вводится перед введением второй (бустерной) дозы. Предпочтительно, когда первая доза вводится в возрасте первых двух недель после рождения, более предпочтительно, в возрасте первой недели и даже более предпочтительно, в первый день от рождения. Предпочтительно, когда вторая доза вводится по крайней мере через 15 дней после первой дозы. Более предпочтительно, когда вторая доза вводится через 15-40 дней после первой дозы. Даже более предпочтительно, когда вторая доза вводится по крайней мере через 17 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно, когда вторая доза вводится через 17-30 дней после первой дозы. Даже более предпочтительно, когда вторая доза вводится по крайней мере через 19 дней после первой дозы. Также более предпочтительно, когда вторая доза вводится через 19-25 дней после первой дозы. Наиболее предпочтительно, когда вторая доза вводится по крайней мере через 21 день после первой дозы. В желаемом аспекте режима двукратного введения, как первая, так и вторая дозы, иммуногенной композиции вводятся в одинаковом количестве. Предпочтительно, когда каждая доза составляет желаемое количество, указанное выше, с дозой 1 мл для первой и второй дозы, которая является наиболее предпочтительной. В дополнение к режиму первой и второй дозы, альтернативный вариант осуществления включает дальнейшие дополнительные дозы. Например, третий, четвертый или пятый дозовые режимы могут вводиться в этих аспектах. Предпочтительно, когда дальнейшие третий, четвертый и пятый дозовые режимы вводятся в том же количестве, что и первая доза с временными рамками между дозами, которые являются последовательными с временными рамками между первой и второй дозами, как упоминается выше.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится животному, предназначенному для производства продуктов питания, в течение первой недели жизни, а второй раз в период второй, третьей или четвертой недели жизни.

В одном аспекте данного изобретения указанная иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится внутримышечно или интраназально.

Предпочтительно, когда иммуногенная композиция или DIVA вакцина вводится местно или системно. Приемлемыми путями введения, конечно, являются пероральное или парентеральное введение, такое как интраназальное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, подкожное, а также ингаляционное. Однако в зависимости от природы и способа действия соединения, иммуногенная композиция или DIVA вакцина могут также вводиться другими путями.

В одном аспекте данного изобретения животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является негативным по антителам против вируса гриппа А свиней.

В одном аспекте данного изобретения животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является позитивным на антитела против вируса гриппа А свиней. Предпочтительно, когда титры антител к вирусу гриппа А свиней определяются в соответствии с анализом ингибирования гемагглютинации и/или анализом нейтрализации вируса, которые составляют от 1:2 до 1:2048, от 1:2 до 1:1024, от 1:2 до 1:512 от 1:2 до 1:256 от 1:2 до 1:128, от 1:2 до 1:64, от 1:2 до 1:32, от 1:2 до 1:16, от 1:64 до 1:2048, от 1:64 до 1:1024, или от 1:64 до 1:512 соответственно. Альтернативно или в дополнение, титры антител к вирусу гриппа А свиней определяются с помощью анализов ELISA, которые оцениваются при использовании установленных или рекомендованных специфических для анализа пороговых значений для положительных и отрицательных по вирусу гриппа А свиней образцов соответственно.

Измерение антител к вирусу гриппа А свиней, происходящих от матери, находится в пределах общих знаний квалифицированного специалиста в данной области техники.

Предпочтительно, когда иммуногенная композиция или DIVA вакцина включает от 1×10^4 до 1×10^9 TCID₅₀, предпочтительно от 1×10^4 до 1×10^8 TCID₅₀, даже более предпочтительно от 1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀ EHV вектора.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина включает от

1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀ EHV вектора.

В одном аспекте данного изобретения указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из уменьшения потери веса тела, снижения вирусной нагрузки в легких, снижения поражения легких, снижения и/или сокращения выделения вируса, снижения ректальной температуры, снижения клинических симптомов (в частности, респираторных симптомов), повышения индукции (нейтрализующих) антител к вирусу гриппа А свиней, повышенной стимуляции Т-клеток против вируса гриппа А свиней, повышенной стимуляции В-клеток против вируса гриппа А свиней и уменьшения провоспалительных цитокинов, например IL1 β , в легких или их комбинаций по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы того же вида.

В одном аспекте данного изобретения лечение или профилактика приводит к сокращению фазы вирусной нагрузки по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, необработанной контрольной группы тех же видов.

Предпочтительно, когда лечение или профилактика приводит к сокращению фазы вирусной нагрузки по крайней мере на 50%, даже более предпочтительно по крайней мере на 60%, еще более предпочтительно по крайней мере на 70%, даже более предпочтительно по крайней мере на 80%, даже более предпочтительно по крайней мере на 90%, еще более предпочтительно по крайней мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, необработанной контрольной группы тех же видов, впоследствии инфицированных вирусом гриппа А свиней.

Предпочтительно, когда лечение или профилактика приводит к сокращению выделения вируса гриппа А свиней с пятого дня после заражения или инфекции, более предпочтительно с четвертого дня после заражения или инфекции, более предпочтительно с третьего дня после заражения или инфекции и наиболее предпочтительно с первого или второго дня после заражения или инфекции вирусом гриппа А свиней по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, необработанной контрольной группы тех же видов.

В одном аспекте данного изобретения лечение или профилактика приводит к сокращению выделения вируса гриппа А свиней с 1 дня после заражения (инфекции).

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина защищает против гомологичного и/или гетерологичного заражения вирусом гриппа А.

В одном аспекте данного изобретения иммуногенная композиция или DIVA вакцина защищает против заражения вирусом гриппа А серотипов H1 и/или H3.

Данное изобретение также относится к EHV вектору, иммуногенной композиции или DIVA вакцине, как описывается в данной заявке, для терапевтического применения.

Данное изобретение также относится к EHV вектору, иммуногенной композиции или DIVA вакцине, как описывается в данной заявке, для применения в качестве иммуногена или вакцины.

Данное изобретение также относится к EHV вектору, иммуногенной композиции или DIVA вакцине, как описывается в данной заявке, для применения в качестве лекарственного средства.

Данное изобретение также относится к применению EHV вектора, иммуногенной композиции или DIVA вакцины, как описывается в данной заявке, для производства лекарственного средства.

Данное изобретение также относится к применению EHV вектора, иммуногенной композиции или DIVA вакцины, как описывается в данной заявке, для лечения и/или профилактики инфекций гриппа А свиней у животного, предназначенного для производства продуктов питания.

DIVA.

Главным преимуществом эффективной вакцины DIVA является то, что она позволяет выявлять животных, предназначенных для производства пищевых продуктов (предпочтительно свиней), остро инфицированных или инфицированных некоторое время (по крайней мере приблизительно 3 недели), перед тем как брать образцы в популяции вакцинированных животных, а также предлагает возможность отслеживания распространения или повторного введения патогена (предпочтительно вируса свиного гриппа) в популяции животных. Таким образом, это дает возможность с определенным уровнем уверенности заявлять, что популяция вакцинированных свиней является свободной от вируса гриппа А свиней на основании результатов лабораторных исследований.

Маркерная вакцина облегчает быстрое и эффективное введение и позволяет проводить различия между животными, инфицированными полевым вирусом (ассоциированным с болезнью), и вакцинированными животными.

Иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с изобретением не включает каких-либо кодирующих антиген последовательностей, которые кодируют N (нейраминидазу) вируса гриппа, и/или последовательностей, которые кодируют NP (нуклеопротеин) вируса гриппа.

В отличие от этого после заражения животных свиным вирусом гриппа А дикого типа или животных, вакцинированных модифицированной живой вакциной, или вакцинированных инактивированной вакциной на основе цельного вируса, или имеющих остаточные материнские антитела, инфицирован-

ные/вакцинированные животные вырабатывают/имеют специфические антитела против N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина). Однако у животных, которые были вакцинированы иммуногенной композицией в соответствии с изобретением, такие специфические антитела не могут быть обнаружены.

С помощью типичных иммунологических тестов и/или геномных аналитических тестов животные, вакцинированные только иммуногенной композицией в соответствии с данным изобретением, могут быть дифференцированы от животных, которые были инфицированы вирусом свиного гриппа дикого типа, или вакцинированы модифицированной живой вакциной, или вакцинированы инактивированной цельной вирусной вакциной, или таких, которые имеют остаточные материнские антитела, тем, что животные, вакцинированные только иммуногенной композицией в соответствии с изобретением, не будут иметь специфических антител против N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) и какой-либо специфической последовательности вируса гриппа А, которая кодирует N (нейраминидазу) и/или NP (нуклеопротеин) соответственно.

Данное изобретение обеспечивает способ различения животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, инфицированных вирусом гриппа А свиней, от животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, вакцинированных иммуногенной композицией или вакциной DIVA, как описано в данной заявке, включающий

- а) получение образца от животного, предназначенного для производства пищевых продуктов; и
- б) анализ указанного образца в иммуноанализе и/или в геномном аналитическом тесте.

В одном аспекте данного изобретения иммуноанализ предусматривает определение, включает ли образец антитела, которые специфически узнают белок N (нейраминидазы) или белок NP (нуклеопротеина) вируса гриппа свиней.

В одном аспекте данного изобретения животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является инфицированным вирусом гриппа А свиней, если были определены антитела, которые специфически узнают белок N (нейраминидазы) или белок NP (нуклеопротеины) вируса гриппа свиней.

В одном аспекте данного изобретения геномный аналитический тест включает определение, включает образец антитела, которые специфически узнают белок N (нейраминидазы) или белок NP (нуклеопротеины) вируса гриппа свиней.

В одном аспекте данного изобретения животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является инфицированным вирусом гриппа А свиней, если были определены специфические последовательности, которые кодируют белок N (нейраминидазы) и/или белок NP (нуклеопротеина) вируса гриппа свиней.

В одном аспекте данного изобретения иммуноанализ представляет собой EIA (ферментный иммуноанализ), ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), или где геномный аналитический тест представляет собой ПЦР (полимеразную цепную реакцию), ОТ-ПЦР (полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой) или ПЦР в реальном времени (полимеразную цепную реакцию в реальном времени).

В одном аспекте данного изобретения животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, представляет собой свиному.

В одном аспекте данного изобретения образец представляет собой образец сыворотки.

Предпочтительно, когда антитело, специфическое для N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) SIAV дикого типа, используется для выявления антигена SIAV в срезах дыхательных путей, полученных от свиньи, которая предполагается как такая, которая инфицирована SIAV или которая является вакцинированной вакциной в соответствии с изобретением. В таком случае только образец от инфицированной свиньи или свиньи, вакцинированной модифицированной живой вакциной, или вакцинированной инактивированной вакциной цельного вируса, или имеющей остаточные материнские антитела, будет демонстрировать положительные результаты на указанное специфическое антитело против N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина). В отличие от этого образец, полученный от свиньи, вакцинированной вакциной в соответствии с настоящим изобретением, не будет демонстрировать результатов в отношении указанного специфического антитела против N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) по причине отсутствия таких антигенов (только гемагглютинин) в вакцине в соответствии с данным изобретением.

Однако эпитопы N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) эволюционно сохраняются и являются специфическими для SIAV и мишени для нейтрализации антител.

Таким образом, тест может, например, включать ячейки с эпитопами N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) SIAV дикого типа, которые являются поперечно связанными с микроячейками планшета для анализа. Указанное поперечное связывание предпочтительно осуществляется с помощью якорного белка, такого как, например, поли-L-лизин. Экспрессионные системы для получения эпитопов N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) дикого типа являются хорошо известными для специалиста в данной области техники. Альтернативно указанные эпитопы N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) могут быть химически синтезированы.

Животные, вакцинированные только вакциной в соответствии с данным изобретением, будут вырабатывать антитела против эпитопов N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина). Однако такие жи-

вотные имеют повышенный уровень антител против эпитопа HA (гемагглютинина) в соответствии с данным изобретением. Как следствие, никакие антитела не связываются с ячейкой, которая была покрыта эпитопами N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) дикого типа. В отличие от этого, если ячейка была покрыта эпитопом HA в соответствии с данным изобретением, то антитела связываются с указанным замещенным HA эпитопом.

В одном аспекте данного анализа ELISA является непрямой ELISA, сэндвич-ELISA, конкурентным ELISA или блокирующим ELISA.

Однако различные методики ELISA являются хорошо известными квалифицированному специалисту в данной области техники. Типичные анализы ELISA были описаны Wensvoort G. и др., 1988 (*Vet. Microbiol.*, 17(2):129-140), Robiolo B. и др., 2010 (*J. Virol. Methods.*, 166(1-2):21-27); и Colijn, E.O. и др., 1997 (*Vet. Microbiology*, 59:15-25).

Предпочтительно, когда тест на дифференциацию животного, инфицированного полевым SIAV, или животного, вакцинированного модифицированной живой вакциной, или вакцинированного инактивированной вакциной цельного вируса, или имеющего остаточные материнские антитела, от такого, которое является вакцинированным только вакциной в соответствии с данным изобретением, обеспечивается путем выделения РНК из клетки респираторного тракта, использования обратной транскриптазы с последующей амплификацией кДНК. Используя специфические праймеры для N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина), можно проводить ПЦР. В этом случае свинья является инфицированной SIAV дикого типа, если она является позитивной по сигналу ПЦР.

Однако если никакой специфической последовательности N (нейраминидазы) и/или NP (нуклеопротеина) не может быть амплифицировано, то такое животное было вакцинировано вакциной в соответствии с данным изобретением.

Кроме того, праймеры и/или зонды для методики реального времени могут использоваться для опознавания N (нейраминидазы), и/или NP (нуклеопротеина), и/или специфического HA гемагглютинина. Однако такие способы хорошо являются известными в области техники.

В другом аспекте в соответствии с изобретением геномный аналитический тест представляет собой ПЦР (полимеразную цепную реакцию), ОТ-ПЦР (полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой) или ПЦР (полимеразную цепную реакцию) в реальном времени.

Определения.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют то же значение, как это понимается средним специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Значение и объем терминов должны быть понятными; однако в случае любой скрытой неоднозначности, приведенные в данной заявке определения преобладают над любым словарем или внешним определением. Кроме того, если иное не требуется контекстом, то формы единственного числа будут включать также ссылки на множество, а термины, которые употребляются во множественном числе, будут включать единственное число. В данной заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, применение термина "включающий", а также другие формы, такие как "включает" и "является включенным", не являются ограничительными. Все патенты и публикации, упомянутые в данной заявке, являются включенными в нее в качестве ссылки.

Осуществление данного изобретения будет использовать, если не указано иное, общепринятые методики вирусологии, молекулярной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантной ДНК, химии белков и иммунологии, которые находятся в пределах квалификации специалиста. Такие методики полностью объясняются в литературе. См., например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, том I, II и III, второе издание (1989) *DNA Cloning*, том I и II (D.N. Glover ред., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ред., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins ред., 1984); *Animal Cell Culture* (R.K. Freshney ред., 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); *Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984) the series, *Methods In Enzymology* (S. Colowick и N. Kaplan ред., Academic Press, Inc.); *Protein purification methods - a practical approach* (ELV Harris и S. Angal, ред., IRL Press at Oxford University Press) и *Handbook of Experimental Immunology*, том I-IV (D.M. Weir и C.C. Blackwell ред., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Перед тем как подробно описать изобретение, следует понимать, что изобретение не ограничивается конкретной ДНК, полипептидными последовательностями или параметрами процесса, которые, конечно, могут меняться. Следует также понимать, что терминология, используемая в данной заявке, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения, и не предназначена для ограничения. Следует отметить, что, как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа "любой" и "данный" включают в себя ссылки на множество, если содержание явно не указывает на иное. Таким образом, например, ссылка на "антиген" включает смесь двух или более антигенов, ссылка на "наполнитель" включает смеси двух или более наполнителей и т.п.

Молекулярно-биологические определения.

Термин "вектор", как известно в данной области техники, относится к полинуклеотидной конструкции, как правило, плазмиде или бактериальной искусственной хромосоме, которые используются для передачи генетического материала в клетку-хозяина. Векторами могут быть, например, бактерии, виру-

сы, фаги, бактериальные искусственные хромосомы, космиды или плазмиды. Вектор, как используется в данной заявке, может состоять из или содержать ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор состоит из ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой инфекционный вирус. Такой вирусный вектор содержит вирусный геном, который является сконструированным таким образом, что он несет чужеродный ген, который не имеет функции репликации вирусного вектора ни в культуре клеток, ни в животном-хозяине. В соответствии с конкретными аспектами данного раскрытия вектор может использоваться для различных аспектов, таких как простая передача генетического материала, для трансфекции клеток или организмов-хозяев, для использования в качестве вакцин, например ДНК-вакцин, или с целью экспрессии генов. Экспрессия гена представляет собой термин, который описывает биосинтез белка в клетке, как она контролируется специфической полинуклеотидной последовательностью, называемой геном. В конкретном аспекте вектор может быть "экспрессионным вектором", который является вектором, способным контролировать экспрессию белка, кодируемого одним или несколькими генами, которые содержатся в векторе, когда он присутствует в соответствующей среде.

Векторы и способы для создания и/или использования векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут быть такими или аналогичными тем, которые раскрыты в патентах США № 4603112, 4769330, 5174993, 5505941, 5338683, 5494807, 4722848, 5942235, 5364773, 5762938, 5770212, 5942235, 382425, публикациях PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update", PNAS, USA, 93:11349-11353, октябрь 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety", PNAS, USA, 93:11341-11348, октябрь 1996; Smith и др., патент США № 4745051 (рекомбинантный бакуловирус) Richardson, CD (ред.), *Methods in Molecular Biology*, 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995, Humana Press Inc.); Smith и др., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", *Molecular and Cellular Biology*, грудень, 1983, том 3, № 12, с. 2156-2165; Pennock и др., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector", *Molecular and Cellular Biology*, марта 1984, том 4, № 3, с. 406; EPA0370573; заявка США № 920197, поданная 16 октября 1986; патентная публикация № 265785; патент США № 4769331 (рекомбинантный вирус герпеса), Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors", PNAS, USA, 93:11307-11312, октябрь 1996; Andreansky и др., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors", PNAS, USA, 93:11313-11318, октябрь 1996; Robertson и др., "Erstein-Barr virus векторы for gene delivery to B lymphocytes", PNAS, USA, 93:11334-11340, октябрь 1996; Frolov и др., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications", PNAS, USA, 93:11371-11377, октябрь 1996; Kitson и др., *J. Virol.*, 65, 3068-3075, 1991; патенты США № 5591439, 5552143; WO 98/00166; акцептованная заявка США сер. № 08/675556 и 08/675566, обе поданы 3 июля 1996 г. (рекомбинантный аденовирус), Grunhaus и др., 1992, "Adenovirus as cloning vectors", *Seminars in Virology* (том 3), с. 237-52, 1993; Ballay и др., *EMBO Journal*, том 4, с. 3861-65; Graham, Tibtech, 8, 85-87, апрель, 1990; Prevec и др., *J. Gen Virol.*, 70, 42434; PCT WO 91/11525; Feigner и др. (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 2550-2561, *Science*, 259:1745-49, 1993; и McClements и др., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS, USA, 93:11414-11420, октябрь 1996; и патенты США № 5591639, 5589466, и 5580859, а также WO 90/11092, WO 93/19183, WO 94/21797, WO 95/11307, WO 95/20660; Tang и др., *Nature*, Furth и др., *Analytical Biochemistry*, relating to DNA expression vectors, среди других. См также WO 98/33510; Ju и др., *Diabetologia*, 41:736-739, 1998 (экспрессионная система лентивируса); Sanford и др., патент США № 4945050; Fischbach и др. (Intracel); WO 90/01543, Robinson и др., *Seminars in Immunology*, том 9, с. 271-283 (1997) (векторные системы на основе ДНК); Szoka и др., патент США № 4394448 (способ встраивания ДНК в живые клетки); McCormick и др., патент США № 5677178 (применение цитопатических вирусов); и патент США № 5928913 (векторы для доставки генов), а также другие цитируемые в данной заявке документы.

Термин "вирусный вектор" описывает генетически модифицированный вирус, которым управляют с помощью метода рекомбинантной ДНК таким образом, чтобы его введение в клетку-хозяина приводило к специфической биологической активности, например, экспрессии трансгена, переносимого этим вектором. В конкретном аспекте трансген представляет собой антиген. Вирусный вектор может или не может быть репликационно компетентным в клетке-мишени, ткани или организме.

Получение вирусного вектора может быть осуществлено при использовании любых соответствующих методов геной инженерии, хорошо известных в данной области техники, включая, но без ограничения стандартные методики расщепления с помощью рестрикционной эндонуклеазы, лигирования, трансформации, очистки плазмиды, ДНК секвенирования, трансфекции клеточных культур, например, как описано у Sambrook и др. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989); или К. Maramorosch и Н. Koprowski (*Methods in Virology Volume VIII*, Academic Press Inc. London, UK (2014)).

Вирусный вектор может включать последовательности из генома любого известного организма. Последовательности могут быть включены в своей нативной форме или могут быть модифицированы

любым способом для получения желаемой активности. Например, последовательности могут содержать инсерции, делеции или замены.

Вирусный вектор может включать кодирующие участки для двух или более белков, представляющих интерес. Например, вирусный вектор может включать в себя кодирующий участок для первого белка, представляющего интерес, и кодирующий участок для второго белка, который представляет интерес. Первый белок, который представляет интерес, и второй белок, который представляет интерес, могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах вирусный вектор может включать кодирующий(ие) участок(и) для третьего или четвертого белка, который представляет интерес. Третий и четвертый белки, представляющие интерес, могут быть одинаковыми или разными. Общая длина двух или более белков, представляющих интерес, которые кодируются одним вирусным вектором, может меняться. Например, общая длина двух или более белков, представляющих интерес, может составлять по крайней мере приблизительно 200 аминокислот, по крайней мере приблизительно 250 аминокислот, по крайней мере приблизительно 300 аминокислот, по крайней мере приблизительно 350 аминокислот, по крайней мере приблизительно 400 аминокислот, по крайней мере приблизительно 450 аминокислот, по крайней мере приблизительно 500 аминокислот, по крайней мере приблизительно 550 аминокислот, по крайней мере приблизительно 600 аминокислот, по крайней мере приблизительно 650 аминокислот, по крайней мере приблизительно 700 аминокислот, по крайней мере приблизительно 750 аминокислот, по крайней мере приблизительно 800 аминокислот или более.

Желаемые вирусные векторы включают векторы на основе вируса герпеса, такие как те, которые имеют происхождение от *EHV-1* или *EHV-4*.

В соответствии с конкретными аспектами данного раскрытия термин "вирусный вектор" или альтернативно "вирусная конструкция" относится к рекомбинантной вирусной конструкции, полученной из вируса, который выбирают из семейства *Herpesviridae*, таких как *EHV-1*, *EHV-3*, *EHV-4*, *EHV-8* и *EHV-9*. Предпочтительные векторы включают векторы на основе вируса герпеса, такие как те, что имеют происхождение от *EHV-1* или *EHV-4*.

Термины "вирусный вектор" и "вирусная конструкция" могут использоваться как взаимозаменяемые.

Термин "конструкция", как он используется в данном описании, относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, такой как плазмида, ВАС или рекомбинантный вирус, который был получен синтетически.

Термин "плазмида" относится к цитоплазматической ДНК, которая реплицируется независимо от бактериальной хромосомы в бактериальной клетке-хозяине. В конкретном аспекте в соответствии с данным изобретением термин "плазмида" и/или "плазмида для переноса" относится к элементу рекомбинантной ДНК-технологии, полезному для конструирования, например, кассеты экспрессии для введения в вирусный вектор. В другом специфическом аспекте термин "плазмида" может использоваться для обозначения плазмиды, полезной для целей ДНК-вакцинации.

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

Термин "нуклеиновая кислота", "последовательность нуклеиновой кислоты", "нуклеотидная последовательность", "полинуклеотид", "полинуклеотидная последовательность", "РНК последовательность", "последовательности кДНК" или "последовательность ДНК", как используется в данной заявке, относится к олигонуклеотиду, нуклеотиду или полинуклеотиду и их фрагментам и частям, а также к ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, и представлять собой смысловую или антисмысловую цепь. Последовательность может представлять собой не кодирующие последовательности, или кодирующую последовательность, или смесь обоих. Последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с данным изобретением могут быть получены при использовании стандартных методик, которые являются хорошо известными специалисту в данной области техники.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" также специфически включают нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличных от пяти существующих в биологии (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил).

Термины "регуляторная нуклеиновая кислота", "регуляторный элемент" и "элемент контроля экспрессии" используются как взаимозаменяемые и относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые могут влиять на экспрессию оперативно связанной кодирующей последовательности в конкретном организме хозяина. Эти термины широко используются для того, чтобы охватить все элементы, которые способствуют или регулируют транскрипцию, включая промоторы, последовательности промоторов, основные элементы, необходимые для базового взаимодействия РНК-полимеразы и транскрипционных факторов, расположенные выше элементы, энхансеры и элементы ответа. Типичные регуляторные элементы у прокариот включают промоторы, последовательности оператора и сайты связывания рибосом. Регуляторные элементы, которые используются в эукариотических клетках, могут включать, но без ограничения последовательности контроля транскрипции и трансляции, такие как промоторы, энхансеры, сигналы сплайсинга, сигналы полиаденилирования, терминаторы, сигналы деградации белка, внутренние сайты

посадки рибосомы (IRES), последовательности пикорнавируса 2A и подобные, которые обеспечивают и/или регулируют экспрессию кодирующей последовательности и/или продукцию кодированного полипептида в клетке-хозяине.

"Внутренний сайт посадки рибосомы" или "IRES" описывает последовательность, которая функционально способствует инициации трансляции, независимой от гена 5' IRES, и позволяет двум цистронам (открытые рамки считывания) транслироваться с одного транскрипта в клетке животного. IRES обеспечивает независимый сайт посадки рибосомы для трансляции открытой рамки считывания непосредственно выше нее. В отличие от бактериальной мРНК, которая может быть полицистронной, т.е. кодировать несколько разных полипептидов, которые последовательно транслируются с мРНК, большинство мРНК животных клеток является моноцистронными и кодируют синтез только одного полипептида. С помощью полицистронного транскрипта в эукариотической клетке трансляция будет иницироваться с 5' сайта с наибольшей трансляцией, завершаться на первом стоп-кодоне, а транскрипт будет высвобождаться из рибосомы, что приводит к трансляции только первого кодированного полипептида в мРНК. В эукариотической клетке полицистронный транскрипт, который имеет IRES, является оперативно связанным со второй или последующей открытой рамкой считывания в транскрипте, позволяет осуществлять последовательную трансляцию этой размещенной ниже рамки считывания для получения двух или более полипептидов, которые кодируются тем же транскриптом. IRES может иметь различную длину и происходить из разных источников, например, вируса энцефаломиокардита (EMCV), пикорнавирусов (например, вируса ящура (FMDV), или вируса полиомиелита (PV)), или вируса гепатита С (HCV). Различные IRES последовательности и их использование в векторной конструкции были описаны и хорошо известны в данной области техники. Размещенная ниже кодирующая последовательность является оперативно связанной с 3'-концом IRES на любом расстоянии, которое не будет оказывать негативного влияния на экспрессию расположенного ниже гена. Оптимальное или допустимое расстояние между IRES и началом размещенных ниже генов может быть легко определено путем изменения расстояния и измерения экспрессии как функции расстояния.

Термин "2a" или "2a пептид" означает короткие олигопептидные последовательности, которые описываются как 2a и "2a-подобные" последовательности, служащие линкерами, которые способны опосредовать ко-трансляционное расщепления между белками с помощью процесса, который определяется как выход из рибосомы. Такие 2a и "2a-подобные" последовательности (из Picornaviridae и других вирусов или клеточных последовательностей) могут быть использованы для соединения нескольких генных последовательностей в один ген, обеспечивая их совместную экспрессию в той же клетке (см. Luke и Ryan, 2013).

Как используется в данной заявке, термин "промотор" или "промоторная последовательность" означает нуклеотидную последовательность, которая позволяет связывать РНК полимеразу и регулирует транскрипцию гена. Как правило, промотор расположен в 5' некодирующем участке гена, проксимально к сайту старта транскрипции гена. Последовательность элементов внутри промоторов, которые функционируют при инициации транскрипции, часто характеризуются консенсусной нуклеотидной последовательностью. Примеры промоторов включают, но не ограничиваются такими, как промоторы из бактерий, дрожжей, растений, вирусов и таких животных, как млекопитающие (включая лошадей, свиней, крупный рогатый скот и человека), птиц или насекомых. Промотор может быть индуцибельным, способным к репрессии, или конститутивным. Индуцибельные промоторы иницируют повышенные уровни транскрипции с ДНК под их контролем в ответ на некоторое изменение условий культуры, таких как изменение температуры (Ptashne, 2014). Примерами промоторов, которые являются хорошо известными специалистам в данной области техники, являются, например, большой TSV40, предранний ген 1 HCMV и MCMV, альфа-промотор человеческого фактора элонгации, бакуловирусный промотор полиэдрина.

Как используется в данной заявке, в контексте в соответствии с изобретением термин промотор относится, в частности, к функциональному фрагменту, например, укорочению 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или его комплементарной нуклеотидной последовательности, предпочтительно, когда идентичность последовательности составляет (по крайней мере) 78% по всей длине (или больше). Кроме того, как используется в данной заявке, в контексте в соответствии с изобретением термин промотор, в частности, относится к функциональному фрагменту, например укорочению 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) или его комплементарной нуклеотидной последовательности, предпочтительно, когда идентичность последовательности составляет (по крайней мере) 78% по всей длине (или больше). Наиболее предпочтительно, когда "промотор" относится к p430 (SEQ ID NO: 3) или p455 (SEQ ID NO: 4). Термины "p430", "gG430" и "430" являются синонимичными и используются как взаимозаменяемые в описании, фигурах и списке последовательностей. Термины "p455", "MCP 455" и "455" являются синонимичными и используются как взаимозаменяемые в описании, фигурах и списке последовательностей и т.п.

Термин "энхансер" обозначает полинуклеотидную последовательность, которая в цис-положении влияет на активность промотора и, таким образом, стимулирует транскрипцию гена или кодирующей последовательности, функционально связанной с этим промотором. В отличие от промоторов эффект энхансера не зависит от положения и ориентации, и они могут быть расположены перед или позади транскрипционной единицы, в пределах интрона или даже внутри кодирующего участка. Энхансер мо-

жет быть расположен как в непосредственной близости от транскрипционной единицы, так и на значительном расстоянии от промотора. Является также возможным иметь физическое и функциональное перекрывание с промотором. Квалифицированному специалисту в данной области техники будет известным ряд энхансеров из разных источников (которые являются депонированными в банке данных, таком как GenBank, например энхансер SV40, энхансер CMV, энхансер вируса полиомы, аденовирусные энхансеры), которые доступны как независимые элементы или элементы, клонированные в полинуклеотидных последовательностях (например, задепонированные в АТСС или такие из коммерческих и частных источников). Ряд последовательностей промоторов также содержат энхансерные последовательности, такие, как часто используемый промотор CMV. Энхансер человеческого CMV является одним из сильнейших энхансеров, идентифицированных на сегодняшний день. Одним из примеров индуцибельного энхансера является энхансер металотионеина, который может быть стимулирован глюкокортикоидами или тяжелыми металлами.

Термин "комплементарные нуклеотидные последовательности" описывает одну цепочку или две парных цепи полинуклеотидов, таких как ДНК или РНК. Нуклеотидная последовательность комплементарной цепи отражает нуклеотидную последовательность ее парной цепи так, что вместо каждого аденозина цепи она содержит тимин (или урацил для РНК), вместо каждого гуанина - цитозин и наоборот. Комплементарная нуклеотидная последовательность, например, для 5'-GCATAC-3 представляет собой 3'-CGTATG-5' или 3'-CGUAUG-5' для РНК.

Термины "ген", "ген, который представляет интерес", как используется в данной заявке, имеют одинаковое значение и относятся к полинуклеотидной последовательности любой длины, которая кодирует продукт, представляющий интерес. Ген может дополнительно содержать регуляторные последовательности, предшествующие кодирующей последовательности (5'-некодирующие или не способные к трансляции последовательности), и последующие, те, которые расположены после кодирующей последовательности (3' некодирующие или не способные к трансляции последовательности). Выбранная последовательность может быть такой полной длины или укороченной, слитой или маркированной геном, а также может быть кДНК, геномной ДНК или фрагментом ДНК. Является общеизвестным, что геномная ДНК, кодирующая полипептид или РНК, может включать некодирующие участки (т.е. интроны), которые являются сплайсированными со зрелой матричной РНК (мРНК) и, таким образом, не присутствуют в кДНК, кодирующей тот же полипептид или РНК. Это может быть нативная последовательность, т.е. существующая(ие) в природе форма(ы), или может быть мутированная, или такая, которая включает последовательность, имеющую происхождение из различных источников, или иным образом модифицирована, если это является желательным. Эти модификации включают в себя оптимизацию по кодомам для оптимального использования кодонов в выбранной клетке хозяина или мечения. Кроме того, они могут включать делеции или инсерции цис-регуляторных участков, таких как (криптический) донор сплайсинга, акцепторные сайты и точки ветвления, сигналы полиаденилирования, ТАТА-боксы, chi-сайты, сайты посадки рибосомы, повторяющиеся последовательности, вторичные структуры (например, молекулярные структуры "петля-на-стебле"), сайты связывания для факторов транскрипции или другие регуляторные факторы, сайты рестрикционных ферментов и т.п., которые представляют собой лишь некоторые примеры, однако этот список не ограничен приведенными выше. Выбранная последовательность может кодировать полипептид, который секретируется, цитоплазматический, ядерный, связанный с мембраной полипептид или полипептид клеточной поверхности.

Термин "нуклеотидная последовательность, которая представляет интерес", как используется в данной заявке, является более общим термином, чем ген, представляющий интерес, поскольку она не обязательно содержит ген, но может содержать элементы или части гена или иную генетическую информацию, например *ori* (точка начала репликации). Нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, может представлять собой любую последовательность ДНК или РНК, независимо от того, содержит ли она кодирующую последовательность или нет.

"Открытая рамка считывания" или "ORF" относится к длине последовательности нуклеиновой кислоты, или ДНК или РНК, которая содержит сигнал начала трансляции или кодон инициации, такой как ATG или AUG, и кодон терминации, и может быть потенциально транслируемой в полипептидную последовательность.

Термин "транскрипция" описывает биосинтез мРНК в клетке.

Термин "экспрессия", как используется в данной заявке, относится к транскрипции и/или трансляции последовательности нуклеиновой кислоты внутри клетки-хозяина. В соответствии с конкретными аспектами данного изобретения термин "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции гетерологичной и/или экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты внутри клетки-хозяина. Уровень экспрессии желаемого продукта в клетке-хозяине может быть определен на основе количества соответствующей РНК или мРНК, которая присутствует в клетке, или количества желаемого полипептида, который кодируется выбранной последовательностью. Например, мРНК, транскрибированная с выделенной последовательности, может быть количественно оценена путем нозерн-блот гибридизации, защиты РНК от рибонуклеазы, гибридизации *in situ* с клеточной РНК или при использовании количественной ОТ-ПЦР (обратная транскрипция с последующей количественной ПЦР). Белки, экспрессированные с

выделенной последовательности, могут быть количественно определены различными методами, например, путем ELISA, путем вестерн-блота, путем радиоиммуноанализа, путем иммунопреципитации, путем анализа на биологическую активность белка или путем иммуноокрашивания белка с последующим анализом FACS.

Термин "экспрессионная кассета" или "единица транскрипции", или "экспрессионная единица" определяет участок внутри вектора, конструкции или полинуклеотидной последовательности, который содержит один или более генов, подлежащих транскрипции, где нуклеотидные последовательности, кодирующие транскрибированный(ые) ген(ы), а также полинуклеотидные последовательности, содержащие регуляторные элементы, которые размещены в экспрессионной кассете, являются оперативно связанными друг с другом. Они транскрибируются с промотора, и транскрипция завершается по крайней мере одним сигналом полиаденилирования. В одном конкретном аспекте они транскрибируются с одного единственного промотора. В результате этого различные гены являются, по крайней мере, транскрипционно связанными. Более одного белка или продукта можно транскрибировать и экспрессировать с каждой транскрипционной единицы (мультицистронная транскрипционная единица). Каждая единица транскрипции будет содержать регуляторные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции любой из выбранных последовательностей, содержащихся в единице, и каждая транскрипционная единица может содержать одинаковые или различные регуляторные элементы. Например, каждая транскрипционная единица может содержать один и тот же терминатор, элемент IRES, или интроны могут использоваться для функционального связывания генов в транскрипционные единицы. Вектор или полинуклеотидная последовательность может содержать более одной транскрипционной единицы.

Под термином "повышенная экспрессия", "повышенный титр или производительность" или "улучшенная экспрессия или производительность" подразумевается увеличение экспрессии, синтеза или секреции гетерологичной и/или экзогенной последовательности, введенной в клетку-хозяина, например, гена, кодирующего терапевтический белок, по сравнению с соответствующим контролем, например, белком, который кодируется кДНК, против белка, который кодируется геном, содержащим интрон. Существует повышенный титр или производительность, если клетка в соответствии с изобретением культивируется в соответствии с описанным в данной заявке способом, и если эта клетка имеет по крайней мере 1,2-, 1,5-, 2-, 3-, 4- или в 5-кратное увеличение специфической производительности или титра. Также существует повышенный титр или производительность, если клетка в соответствии с изобретением культивируется в соответствии с описанным в данной заявке способом и если эта клетка имеет по крайней мере 1,2-кратное, или по крайней мере 1,5-кратное, или по крайней мере 2-кратное, или по крайней мере 3-кратное увеличение специфической производительности или титра. Существует также повышенный титр или производительность, если клетка в соответствии с изобретением культивируется в соответствии с описанным в данной заявке способом и если эта клетка имеет по крайней мере от 1,2- до 5-кратного, преимущественно от 1,5- до 5-кратного, более предпочтительно от 2- до 5-кратного, особенно предпочтительно от 3- до 5-кратного увеличения специфической производительности или титра. "Повышенная экспрессия" может также означать, что больше клеток фактически экспрессируют ген/последовательность, которой/которая представляет интерес. Например, повышенная экспрессия может означать, что новые промоторы этого изобретения являются активными в течение более продолжительного периода времени в процессе цикла вирусной репликации по сравнению с другими промоторами.

Повышенная экспрессия, титр или производительность могут быть получены при использовании гетерологичного вектора в соответствии с изобретением. Это можно совместить с другими подходами, такими как селекция с помощью FACS на рекомбинантные клетки хозяина, содержащие в качестве дополнительного селективного маркера один или более флуоресцентных белков (например, зеленый флуоресцентный белок) или маркер клеточной поверхности. Также могут использоваться другие способы получения повышенной экспрессии и комбинация различных методов, которые основываются, например, на использовании цис-активных элементов для управления структурой хроматина (например, LCR, UCOE, EASE, изоляторы, S/MAR, STAR элементы), либо на использовании (искусственных) факторов транскрипции, обработки клеток природными или синтетическими агентами для повышения регуляции эндогенной или гетерологичной и/или экзогенной экспрессии гена, улучшения стабильности (периода полураспада) мРНК или белка, улучшения иницирования трансляции мРНК, увеличения дозы гена с помощью эписомальной плазмиды (на основе использования вирусных последовательностей в качестве источников репликации, например, SV40, полиомы, аденовируса, EBV или BPV), использования последовательностей, способствующих амплификации или систем амплификации *in vitro* на основе конкатемеров ДНК.

Анализ для измерения "повышенной экспрессии" представляет собой измерение белков на основе ЖХ-МС/МС (жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией), такой как мониторинг множественных реакций (MRM), способы выявления на основе антител, такие как вестерн-блот, дот-блот анализ (анализ методом гибридизации макромолекул путем диффузии через точечные отверстия в матрице) или иммунодиффузия и проточная цитометрия; и оценку биологической активности методом геммагглютинации.

"Активность промотора" измеряется косвенно путем количественного определения транскрипции

мРНК под контролем соответствующего промотора. мРНК количественно определяется с помощью количественной ОТ-ПЦР относительно эндогенного стандарта.

Термин "вирусная нагрузка" является хорошо известным специалисту в данной области техники. Термин "вирусная нагрузка" поочередно используется в данной заявке с термином "титр вируса". Вирусная нагрузка или титр вируса является мерой тяжести активной вирусной инфекции, и может быть определена методами, которые являются известными специалисту в данной области техники.

Определение может базироваться на выявлении вирусных белков, таком, как связывания антител с вирусными белками и их дальнейшее обнаружения или альтернативно путем выявления вирусной нуклеиновой кислоты методами амплификации, такими как ОТ-ПЦР. Мониторинг вирусной РНК, ассоциированной с вирионом, в плазме крови с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот является широко используемым параметром для оценки состояния и прогрессирования ретровирусного заболевания, а также для оценки эффективности профилактических и терапевтических мероприятий. Типично вирусную нагрузку или титр вируса можно рассчитать, оценив количество живого вируса в жидкости тела, например количество РНК копий на миллилитр плазмы крови. Предпочтительно, термин "вирусная нагрузка" или "титр вируса" является показателем количества инфекционных единиц в объеме вирусного препарата. Титр вируса является конечной точкой в биологической процедуре и определяется как разведение, при котором определенная часть тестов, которые проводятся параллельно, показывают эффект (Reed и Muench, 1938). В частности, инфекционная доза заражения 50% для культуры тканей на миллилитр (TCID₅₀/мл) дает разведение вирусного препарата, при котором 50% количества клеточных культур, инокулированных параллельно с этим разведением, являются инфицированными.

"Элементы регуляции транскрипции" обычно включают промотор, размещенный выше последовательности гена, который экспрессируется, сайты инициации транскрипции и терминации и сигнал полиаденилирования.

Термин "сайт инициации транскрипции" относится к нуклеиновой кислоте в конструкции, которая соответствует первой нуклеиновой кислоте, встроенной в первичный транскрипт, т.е. предшествующий мРНК. Сайт инициации транскрипции может перекрываться с последовательностью промотора.

"Сигнал терминации", или "терминатор", или "сигнал полиаденилирования", или "полиА", или "polyA", или "сайт терминации транскрипции", или "элемент терминации транскрипции" представляет собой сигнальную последовательность, которая вызывает расщепление в специфическом сайте на 3'-конце эукариотической мРНК и пост-транскрипционное встраивание последовательности размером приблизительно 100-200 нуклеотидов аденина (полиА хвост) на расщепленном 3'-конце и таким образом вызывает терминацию транскрипции РНК полимеразы. Сигнал полиаденилирования включает последовательность ААТААА размером приблизительно 10-30 нуклеотидов выше сайта расщепления и последовательность, расположенную ниже. Различные элементы полиаденилирования являются известными, такие как tk polyA, поздний и ранний polyA SV40, BGH polyA (является описанным в качестве примера в патенте США №5,122,458) или polyA гормона роста хомячка (WO 2010010107).

"Элементы регуляции трансляции" включают сайт инициации трансляции (AUG), стоп-кодон и polyA сигнал для каждого индивидуального полипептида, который экспрессируется. Внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) может быть включен в некоторые конструкции. Для оптимизации экспрессии может быть целесообразно удалять, добавлять или изменять 5'- и/или 3'-нетранслируемые участки последовательности нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется, для того чтобы устранить любые дополнительные потенциально несоответствующие альтернативные кодоны инициации трансляции или другие последовательности, которые могут мешать или уменьшать экспрессию, как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Консенсусные сайты связывания рибосомы (последовательность Козака) могут быть встроены непосредственно выше стартового кодона для усиления трансляции и таким образом экспрессии.

По определению полинуклеотидная последовательность или каждый ген, встроенные в клетку-хозяина, или соответствующий белок, или РНК, кодируемые таким образом, относятся к "экзогенной", "экзогенной последовательности", "экзогенному гену", "экзогенной кодирующей последовательности", "последовательности, кодирующей экзогенный антиген" по отношению к клетке-хозяину, когда она происходит от других видов(а). В соответствии с этим промоторы на основе ENV-4 в соответствии с данным изобретением являются экзогенными, принимая во внимание ENV-1 вирусный вектор. Как используется в данной заявке по отношению к последовательности или гену, представляющему интерес, такому как антиген, термин "экзогенный" или "последовательность, которая кодирует экзогенный антиген" означает, что указанная последовательность или ген, представляющий интерес, в частности указанный антиген, экспрессируется вне своих природных видов. В соответствии с этим НЗ антиген из свиного IAV представляет собой один из примеров экзогенного антигена, если речь идет о векторе ENV-1. Любая неконская последовательность или ген, представляющий интерес, такая как не-конский антиген, является, таким образом, экзогенной последовательностью или геном, или антигеном, представляющим интерес, в соответствии со специфическим аспектом данного изобретения.

По определению каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, встроенный в клетку-хозяина, и соответствующий белок или РНК, которые кодируются таким образом, называется

"гетерологичным", "гетерологичной последовательностью", "гетерологичным геном", "гетерологичной кодирующей последовательностью", "трансгеном" или "гетерологичным белком" по отношению к клетке-хозяину. Это применяется даже в том случае, если встроенная последовательность или встроенный ген идентичен эндогенной последовательности или эндогенному гена клетки-хозяина. Например, последовательность промотора EHV-4, которая встраивается в другой участок вирусного вектора EHV-4, или в модифицированной форме по сравнению с вирусом EHV-4 дикого типа, по определению является гетерологичной последовательностью. Как используется в данной заявке относительно последовательности или гена, представляющего интерес, например антигена, термин "гетерологичный" означает, что указанная последовательность или ген, представляющий интерес, в частности указанный антиген, экспрессируется вне контекста своих природных подвидов. В соответствии с этим любая специфическая последовательность или ген не-EHV-1, которая представляет интерес, такая как антиген, например антиген из любого альфа-герпесвируса лошадей за исключением EHV-1, например EHV-3, EHV 8, является, таким образом, гетерологичной последовательностью или геном, который представляет интерес, или антигеном в соответствии со специфическим аспектом данного изобретения.

Термин "несуществующие в природе" означает любую последовательность или ген, представляющий интерес, такой, как антиген, который не существует в данном контексте в природе, такой как гибридная последовательность, или последовательность, или ген, представляющий интерес, такой как антиген из отличных видов, или последовательность, или ген, представляющий интерес, такой как антиген, который не является естественным продуктом благодаря искусственной мутации, инсерции, делеции и т.п.

Термин "рекомбинантный" используется поочередно с терминами "несуществующий в природе", "гетерологичный" и "экзогенный" в описании в соответствии с данным изобретением. Таким образом, "рекомбинантный" белок представляет собой белок, который экспрессируется либо с гетерологичной, либо с экзогенной полинуклеотидной последовательности. Термин "рекомбинантный", как используется в данной заявке в отношении вируса, означает вирус, который получен путем искусственных манипуляций с вирусным геномом. Вирус, который включает гетерологичную или экзогенную последовательность, такую как последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является рекомбинантным вирусом. Термин рекомбинантный вирус и термин несуществующий в природе вирус используются как взаимозаменяемые.

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

Как используется в данной заявке, термин "оперативно связанный" используется для описания связи между регуляторными элементами и геном или его кодирующим участком. Типично, когда экспрессия гена происходит под контролем одного или более регуляторных элементов, например, но без ограничения конститутивных или индуцибельных промоторов, специфичных для ткани регуляторных элементов и энхансеров. Указание на то, что ген или кодирующий участок является "оперативно связанным с", или "оперативное связывание с", или "оперативно ассоциированный с" регуляторными элементами означает, что ген или кодирующий участок контролируется или подвергается воздействию со стороны регуляторного элемента. Например, промотор является оперативно связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или на экспрессию кодирующей последовательности.

Кроме того, в рамках данного описания термины "функциональное связывание", "функционально связан" или "оперативно связан" означает, что две или более последовательности нуклеиновой кислоты или элементы последовательности расположены таким образом, что это позволяет им функционировать определенным для этого способом. Например, промотор/энхансер или терминатор является функционально связанным с кодирующей последовательностью гена в случае, если он способен контролировать или модулировать транскрипцию связанной с ним в цис-положении последовательности гена. В общем случае, но без необходимости последовательности ДНК, которые функционально связаны, являются смежными, где это необходимо для соединения кодирующих участков полипептида или в случае секреции сигнального пептида, являются смежными и находятся в рамке считывания.

Однако, несмотря на то что оперативно связанный промотор в общем случае размещается выше кодирующей последовательности или оперативно связанный терминатор в общем случае размещается ниже кодирующей последовательности, не является необходимым быть смежными с ней. Энхансеры не должны быть смежными до тех пор, пока они увеличивают транскрипцию кодирующей последовательности. Для этого они могут располагаться выше или ниже кодирующей последовательности и даже на некотором расстоянии от нее. Сайт полиаденилирования является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он расположен на 3'-конце кодирующей последовательности, таким образом, что транскрипция осуществляется через кодирующую последовательность к сигналу полиаденилирования. Связывание осуществляется с помощью рекомбинантных способов, известных в данной области техники, например, путем лигирования в соответствующих сайтах рестрикции или при использовании тупых концов, или с помощью методики слияния ПЦР. Синтетические олигонуклеотидные линкеры или адаптеры могут использоваться в соответствии с обычной практикой, если приемлемые сайты рестрикции не являются присутствующими.

В соответствии с этим термин "функциональный фрагмент или производная" промоторной последовательности означает, что фрагмент или производная все еще проявляет промоторную активность.

Функциональные анализы по оценке активности промотора являются хорошо известными специалистами в данной области техники (Bustin, 2000, Nolan и др., 2006). Типичный вариант осуществления такого функционального анализа включает, например, эксперимент по исследованию кинетики промотора. Клетки, инфицированные векторными вирусами, несущие экспрессионные кассеты, где промотор или его фрагмент регулирует транскрипцию репортерного трансгена, инкубируют в течение различных промежутков времени. Общую РНК готовят из образцов, собранных в разные моменты времени после заражения. После разрушения загрязняющей ДНК путем переваривания при использовании ДНКазы I, осуществляют обратную транскрипцию РНК. Один образец из повторности обрабатывают при добавлении обратной транскриптазы (ОТ), второй образец из повторности обрабатывают без добавления ОТ для того, чтобы продемонстрировать успешное удаление загрязняющей ДНК из препарата РНК. Полученную кДНК очищают и используют в качестве матрицы в традиционной ПЦР. Только те образцы, которые были обработаны при добавлении ОТ, производят ПЦР-продукт. Эти кДНК могут затем использоваться для количественной ПЦР с праймерами для репортерного трансгена и параллельно с праймерами для эссенциального гена вирусного вектора (внутренний стандартный ген), транскрипция которого обеспечивает внутренний стандарт для эффективности инфекции и репликации. Значение количественной ПЦР для репортера нормализуют для различных конструкций и времени после инфицирования, используя значения количественной ПЦР внутреннего стандартного гена. Это позволяет интерпретировать промоторную активность для различных промоторов и их фрагментов.

Термин "гомология последовательности", как используется в данной заявке, относится к методу определения родства двух последовательностей. Чтобы определить гомологию последовательности, две или более последовательности подвергают оптимальному выравниванию и в случае необходимости вводят пробелы (гэпы). Однако в отличие от "идентичности последовательности" консервативные аминокислотные замены подсчитываются как совпадение при определении гомологии последовательности. Иными словами, для получения полипептида или полинуклеотида, который имеет 95% гомологии последовательности с референтной последовательностью, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% аминокислотных остатков или нуклеотидов в референтной последовательности должны совпадать или включать консервативные замены другой аминокислотой или нуклеотидом, или количество аминокислот или нуклеотидов до 15%, предпочтительно до 10, 9, 8, 7, 6%, даже более предпочтительно до 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% от общего количества аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включая консервативные замены, в референтной последовательности могут быть встроены в референтную последовательность. Предпочтительно, когда гомологичная последовательность включает отрезок размером по крайней мере 50, даже более предпочтительно 100, даже более предпочтительно 250, даже более предпочтительно 500 нуклеотидов.

Термин "идентичность последовательности", как это является известным в данной области техники, относится к взаимосвязи между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, а именно референтной последовательностью и определенной последовательностью, которая должна сравниваться с референтной последовательностью. Идентичность последовательности определяется путем сравнения данной последовательности с референтной последовательностью после того, как последовательности были оптимально выровнены, чтобы обеспечить наивысшую степень сходства последовательностей, как определяется совпадением между цепями таких последовательностей. При таком выравнивании идентичность последовательности устанавливается в соответствии с положениями. Например, последовательности являются "идентичными" в конкретном положении, если в этом положении нуклеотидные или аминокислотные остатки являются идентичными. Затем общее число таких совпадений положений делится на общее количество нуклеотидов или остатков референтной последовательности, чтобы получить % идентичности последовательности. Идентичность последовательности может быть легко рассчитана известными способами, включая, но не ограничиваясь такими, как те, что описаны в *Computational Molecular Biology*, Lesk, AN, ред., Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, DW, ред., Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, часть I, Griffin, A.M. и Griffin, H.G., ред., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. и Devereux, J., ред., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H. и Lipman, D., *SIAM, J. Applied Math.*, 48:1073 (1988), раскрытие которых является включенным в данную заявку в качестве ссылки. Преимущественные способы определения идентичности последовательности предназначены для обеспечения наибольшего соответствия между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей кодируются в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичность последовательности между заданными последовательностями. Примеры таких программ включают, но не ограничиваются такими, как GCG пакет программ (Devereux, J. и др., *Nucleic Acids Research*, 12 (1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S.F. и др., *J. Molec. Bid.*, 215:403- 410 (1990)). Программа BLASTX доступна от NCBI и из других источников (BLAST Manual, Altschul, S. и др., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894,

Altschul, S.F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), содержание которых приведены в данной заявке в качестве ссылки. Эти программы оптимально выравнивают последовательности при использовании веса пробела по умолчанию для получения высокого уровня идентичности последовательности между данной и референтной последовательностями. Для иллюстрации под полинуклеотидом с нуклеотидной последовательностью, которая имеет, например, по крайней мере 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% "идентичности последовательности" с референтной нуклеотидной последовательностью, понимают тот факт, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида идентична референтной последовательности за исключением того, что последовательность данного полинуклеотида может содержать вплоть до 15, предпочтительно, вплоть до 10, даже более предпочтительно, вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов референтной нуклеотидной последовательности. Иными словами, в полинуклеотиде с нуклеотидной последовательностью, которая имеет по крайней мере 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% идентичности по сравнению с референтной нуклеотидной последовательностью, вплоть до 15%, предпочтительно 10, 9, 8, 7, 6%, даже более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% нуклеотидов в референтной последовательности могут быть делетированы или заменены другими нуклеотидами, или количество нуклеотидов до 15%, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7, 6%, даже более предпочтительно вплоть до 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% может быть встроено в референтную последовательность. Эти мутации в референтной последовательности могут присутствовать в 5'- или 3'-концевых положениях референтной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими конечными положениями, распределяясь или отдельно среди нуклеотидов в референтной последовательности, или в одной или нескольких смежных группах в референтной последовательности. Аналогично под полипептидом с данной аминокислотной последовательностью, которая имеет по крайней мере, например, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99% идентичности последовательности с референтной аминокислотной последовательностью, понимают тот факт, что данная аминокислотная последовательность полипептида идентична референтной последовательности, за исключением того что данная последовательность полипептида может содержать вплоть до 15 предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7, 6, даже более предпочтительно, вплоть до 5, 4, 3, 2, 1 аминокислотных замен на каждые 100 аминокислот референтной аминокислотной последовательности. Иными словами, для получения данной полипептидной последовательности, которая имеет по крайней мере 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, даже более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99% идентичности последовательности с референтной аминокислотной последовательностью, вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7%, даже более предпочтительно вплоть до 5, 4, 3, 2, 1% аминокислотных остатков в референтной последовательности могут быть делетированы или заменены другой аминокислотой, или число аминокислот вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7%, даже более предпочтительно до 5, 4, 3, 2, 1% от общего количества аминокислотных остатков в референтной последовательности может быть встроено в референтную последовательность.

Эти изменения в референтной последовательности могут присутствовать в амино- или карбоксигруппированных положениях референтной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими конечными положениями, распределяясь или отдельно среди остатков в референтной последовательности, или в одной или нескольких непрерывных групп в референтной последовательности. Предпочтительно, когда положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Однако консервативные замены не включаются как совпадения при определении идентичности последовательности.

Термины "идентичность" и "процент идентичности" используются в данной заявке как взаимозаменяемые. Для целей данного изобретения в данной заявке определяется, что, для того чтобы определить процент идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравниваются с целью оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в последовательность первой аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают остатки аминокислот или нуклеотидов в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой или нуклеотидным остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, присутствующих обоим последовательностям (т.е. % идентичности=количество идентичных положений/общее количество положений (т.е. положения, которые перекрываются) $\times 100$). Предпочтительно, когда две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей может быть проведено по всей длине двух последовательностей, которые подвергаются сравнению, или на фрагментах двух последовательностей. Как правило, сравнение будет проведено по всей длине двух сравниваемых последовательностей. Однако идентичность последовательности может быть проведена на участке, например, двадцати, пятидесяти, ста или более смежных аминокислотных остатков.

Квалифицированному специалисту в данной области техники будет известно о том, что доступны различные компьютерные программы для определения гомологии между двумя последовательностями. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено при использовании математического алгоритма. В предпочтительном варианте осуществления изобретения процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеиновокислотными последовательностями определяют, используя алгоритм Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol., (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения Accelrys GCG (является доступной на сайте: <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), при использовании либо матрицы Blosum 62, либо матрицы PAM250 и штрафа за открытие пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, а также штрафа за продолжение пробела 1, 2, 3, 4.

Белковые последовательности или последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с данным изобретением могут быть также использованы как "последовательность запросов" для осуществления поиска по доступным базам данных, например, для идентификации других членов семейства или близких последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены при использовании программ BLASTN и BLASTP (версия 2.0) (Altschul и др. (1990), J. Mol. Biol., 215:403-10). Поиск белков BLAST может быть выполнен с помощью программы BLASTP, счет=50, длина слова=3, для получения гомологии аминокислотных последовательностей с белковыми молекулами в соответствии с изобретением. Для получения выравниваний с пробелами для целей сравнения программу Gapped BLAST можно использовать так, как описано в Altschul и др. (1997), Nucleic Acids Res., 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTP и BLASTN). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Определение технологии на основе EHV-1 и EHV-4/рекомбинантного вектора.

Термин "непарнокопытные", или "конский", или "конь", или "лошадь" означает принадлежность к семье Equidae, которая включает лошадей, ослов и зебр, предпочтительно лошадей. Кроме того, термин "непарнокопытные", или "конский", или "конь", или "лошадь" охватывает также гибриды членов семейства Equidae (например, мулов, лошаков и др.).

"Вирус герпеса" или "вектор на основе вируса герпеса" относится к видам в семействе Herpesviridae порядка Herpesvirales.

Термин "вектор на основе вируса герпеса лошадей" или "вирус герпеса лошадей" или "EHV" означает члена семейства Herpesviridae, который поражает лошадей/коней. На сегодняшний день было идентифицировано восемь различных видов лошадиного герпеса, пять из которых относятся к подсемейству Alphaherpesvirinae (EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9) и три к Gammaherpesvirinae. (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>, Virus Taxonomy, 2015, release EC, 47, London, UK, July 2015; e-mail ratification 2016 (MSL #30).

Термин "EHV-1" означает лошадиный альфа-герпесвирус 1, который является членом подрода Varicellovirus рода Alphaherpesvirinae в семействе Herpesviridae. Неограничивающей ссылкой на последовательность для EHV-1 может быть пример EHV-1 штамма дикого типа ab4 (номер доступа Genbank AY665713.1) или RacH (Hubert, 1996).

Термин EHV-4 означает лошадиный альфа-герпесвирус 4, который является членом подрода Varicellovirus рода Alphaherpesvirinae в семействе Herpesviridae.

Термин "два или более вектора EHV" охватывает два, три, четыре, пять или шесть векторов EHV.

Термин "встроенный в ORF70" и "сайт инсерции представляет собой ORF70" означает, что фрагмент ДНК был встроен в геномную ДНК в положении, которое кодирует открытую рамку считывания 70 лошадиного герпесвируса 1. Указанная инсерция приводила к делеции 801 п.о., которые размещаются 5' от "ORF70", оставляя на 3'-конце интактными 423 п.о., снижающих экспрессию генного продукта *orf70* гликопротеина G. Гликопротеин G нескольких альфа-герпесвирусов, включая EHV-1, был продемонстрирован как такой, который секретируется из инфицированных клеток и функционирует как иммуномодулирующий белок путем связывания провоспалительных цитокинов. Отмена его экспрессии в вирусном векторе будет увеличивать иммуногенность вирусной инфекции по сравнению с EHV-1 дикого типа, который имеет интактную экспрессию гликопротеина G.

Термин "встроенный в ORF1/3" и "сайт инсерции в ORF1/3" означает, что фрагмент ДНК встраивали в вирусный геном в положении, при котором путем случайной делеции при пассирования вируса во время процедуры аттенуирования вакцинного штамма EHV-1 RacH фрагмент размером 1283 п.о., содержащий 90% ORF1, и весь ORF2 были удалены. Этот сайт инсерции был выбран потому, что вероятность того, что экспрессия трансгенов в этом положении будет препятствовать репликации вируса, как предполагалось, будет чрезвычайно низкой.

Определение вакцины.

"Иммуногенная или иммунологическая композиция" относится к композиции вещества, включая антиген или его иммуногенную часть, которая вызывает иммунологический ответ у хозяина на основе клеточного или опосредованного антителами иммунного ответа на композицию. Предпочтительно, когда иммуногенная композиция индуцирует иммунный ответ, и более предпочтительно, когда вызывает за-

щитный иммунитет против одного или более клинических симптомов инфекции IAV свиней. Хозяин также описывается как "животное, предназначенное для производства продуктов питания". В случае когда хозяин проявляет защитную иммунологическую реакцию, такую, что повышается устойчивость к новой инфекции и/или снижается клиническая тяжесть заболевания, иммуногенная композиция описывается как "вакцина".

Термин "антиген", используемый в данной заявке, является хорошо понятным в данной области техники и включает вещества, которые являются иммуногенными, т.е. иммуногенами, а также вещества, которые индуцируют иммунологическую невосприимчивость, или анергию, т.е. отсутствие реакций защитных механизмов организма на чужеродные вещества. Как используется в данной заявке, термин "антиген" является предназначенным для обозначения белков полной длины, а также их пептидных фрагментов, которые содержат или включают эпитоп. Кроме того, термин "последовательность, которая кодирует антиген" относится к последовательности, кодирующей антиген. Предпочтительно, когда последовательность, которая кодирует антиген, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, такую, как последовательность кДНК. Однако термин "последовательность нуклеиновой кислоты" был определен в данной заявке.

Термин "по крайней мере одна последовательность, которая кодирует экзогенный антиген" также охватывает более одной последовательности, которая кодирует экзогенный антиген. Таким образом, понятно, что термин "по крайней мере одна последовательность, которая кодирует экзогенный антиген" охватывает две, три, четыре, пять или шесть последовательностей, которые кодируют экзогенные антигены. В соответствии с этим термин "по крайней мере две последовательности, которые кодируют экзогенные антигены" охватывает три, четыре, пять или шесть последовательностей, которые кодируют экзогенные антигены.

Термин "отличная последовательность, которая кодирует экзогенные антигены" означает последовательности, отличающиеся по своей последовательностью друг от друга.

"Имуногенная композиция", как используется в данной заявке, может относиться к полипептиду или белку, таким, как например, поверхностный белок вируса, вызывающего иммунологический ответ, как описывается в данной заявке. Термин "имуногенный фрагмент" или "имуногенная часть" относится к фрагменту или к укороченной и/или замещенной форме белка или полипептида, который включает один или более эпитопов и, таким образом, вызывает иммунный ответ, описанный в данной заявке. В общем случае такие укороченные и/или замещенные формы или фрагменты будут включать шесть смежных аминокислот из полноразмерного белка. Такие фрагменты могут быть идентифицированы при использовании ряда методов картирования эпитопов, хорошо известных в данной области техники. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, том 66 (Glenn E., Morris, ред., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены путем одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых носителях, пептидов, которые соответствуют участкам молекулы белка, и проведения реакции пептидов с антителами, при этом пептиды все еще остаются прикрепленными к носителю. Такие методики являются известными и описаны в данной области техники; см., например, патент США № 4708871; Geysen и др. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3998-4002; и Geysen и др. (1986), *Molec. Immunol.*, 23:709-715. Аналогично конформационные эпитопы легко идентифицируются путем определения пространственной конформации аминокислот путем, например, рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См. *Epitope Mapping Protocols*, как указано выше. Синтетические антигены также включены в это определение, например полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие рекомбинантные или синтетически полученные антигены. См., например, Bergmann и др. (1993), *Eur. J. Immunol.*, 23:2777-2781; Bergmann и др. (1996), *J. Immunol.*, 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. and Cell Biol.*, 75:402-408; nGardner и др. (1998), 12-я Всемирная конференция по вопросам ВИЧ/СПИД, Женева, Швейцария, 28 июня-3 июля 1998 г.

Термин "иммунизация" относится к активной иммунизации путем введения иммуногенной композиции животному, предназначенному для производства продуктов питания, которое подвергается иммунизации, вызывая, таким образом, иммунный ответ против антигена, который является включенным в такую иммуногенную композицию.

Термин "в этом нуждается" или "в случае необходимости", как используется в данной заявке, означает, что введение/лечение является ассоциированным с бустингом, или улучшением здоровья, или клинических признаков, или любым другим положительным медицинским влиянием на здоровье животных, которые получают иммуногенную композицию в соответствии с данным изобретением.

Термин "вакцина", как используется в данной заявке, относится к фармацевтической композиции, включающей по крайней мере один иммунологически активный компонент, который индуцирует иммунологический ответ у животного и возможно, но не обязательно один или более дополнительных компонентов, которые усиливают иммунологическую активность активного компонента. Вакцина может дополнительно содержать дополнительные компоненты, типичные для фармацевтических композиций. Для различения иммунологически активный компонент вакцины может включать в себя полные вирусные частицы или такие в их исходной форме либо в виде аттенуированных частиц в так называемой модифицированной живой вакцине (MLV), либо в виде частиц, инактивированных с помощью соответствующих

методов, в так называемой убитой вакцине (KV). В другой форме иммунологически активный компонент вакцины может содержать приемлемые элементы организмов (субъединичные вакцины), где эти элементы получают либо путем разрушения частицы, либо выращивания культур, содержащих такие частицы, и необязательно последующие стадии очистки, обеспечивающие получение желаемой(ых) структуры(структур), либо с помощью синтетических процессов, включающих соответствующие манипуляции, при использовании соответствующих систем, основанных на использовании, например, бактерий, насекомых, млекопитающих или других видов, а также необязательно дальнейшие процедуры изоляции и очистки, либо путем индукции синтетических процессов у животных, которые нуждаются в вакцине, путем непосредственного введения генетического материала при использовании соответствующих фармацевтических композиций (полинуклеотидная вакцинация). Вакцина может включать один или одновременно более одного элементов, описанных выше. Как используется в конкретных аспектах в соответствии с изобретением, "вакцина" относится к живой вакцине или живому вирусу, которая также называется рекомбинантной вакциной. В другом специфическом аспекте в соответствии с изобретением "вакцина" относится к инактивированного или убитому вирусу, включая вирусоподобные частицы (VLP). Таким образом, вакцина может быть субъединичной вакциной, или убитой вакциной (KV), или инактивированной вакциной.

Термин "ДНК вакцинация" или "полинуклеотидная вакцинация" означает непосредственную инокуляцию генетического материала при использовании приемлемых фармацевтических композиций.

Различные способы физической и химической инактивации являются известными в данной области техники. Термин "инактивированный" относится к предварительно вирулентному или неvirulentному вирусу, который подвергают облучению (ультрафиолетовыми лучами (УФ), рентгеновскими лучами, электронным пучком или гамма-излучением), нагревают или химически обрабатывают для инактивации или уничтожения такого вируса, сохраняя при этом его иммуногенность. Соответствующие агенты для инактивации включают бета-пропиолактон, бинарный или бета- либо ацетил-этиленмин, глутеральдегид, озон и формалин (формальдегид).

Для инактивации формалином или формальдегидом, формальдегид, как правило, смешивают с водой и метиловым спиртом для образования формалина. Добавление метилового спирта предотвращает деградацию или перекрестную реакцию в процессе активации. В одном варианте используют приблизительно 0,1-1% 37%-ного раствора формальдегида для инактивации вируса. Важно отрегулировать количество формалина для обеспечения того, чтобы материал был инактивированным, но не настолько, чтобы возникали побочные эффекты от высокой дозы.

Более конкретно, термин "инактивированный" в контексте вируса означает, что вирус не является способным к репликации *in vivo* или *in vitro*. Например, термин "инактивированный" может относиться к вирусу, который был размножен *in vitro*, а затем подвергся инактивации при использовании химических или физических средств, для того чтобы он больше не был способен к репликации.

Как используется в данной заявке, термины "инактивированный", "убитый" или "KV" используются как взаимозаменяемые.

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

"Фармацевтическая композиция" по существу состоит из одного или более ингредиентов, способных модифицировать физиологические, например иммунологические функции организма, в который она вводится, или организмов, живущих в или на организме. Термин включает, но без ограничения антибиотики или антипаразитарные средства, а также другие составляющие, которые, как правило, используются для достижения других целей, таких как, но не ограничиваясь такими, как способы обработки, стерильность, стабильность, возможность введения композиции энтеральным путем или парентеральными путями, такими как пероральный, интраназальный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный или другой подходящий путь введения, толерантность после введения или контролируемое высвобождение. Один неограничивающий пример такой фармацевтической композиции, который приводится исключительно для демонстрационных целей, можно было бы получить следующим образом: супернатант клеточной культуры инфицированных клеток смешивают со стабилизатором (например, спермидином и/или альбумином бычьей сыворотки (BSA), а затем смесь лиофилизируют или обезвоживают другими способами. Перед вакцинацией смесь подвергают регидратации в водном (например, физиологическом растворе, забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS)) или неводных растворах (например, масляной эмульсии, адьюванте на основе алюминия).

Как используется в данной заявке, "фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, адьюванты, стабилизирующие агенты, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты, замедляющие адсорбцию и подобные им. В некоторых предпочтительных вариантах, особенно тех, которые включают лиофилизованные иммуногенные композиции, стабилизирующие агенты для применения в данном изобретении включают стабилизаторы для лиофилизации или высушивания замораживанием.

В некоторых аспектах иммуногенная композиция в соответствии с изобретением содержит адью-

вант. "Адьювант", как используется в данной заявке, может включать в себя гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа "вода-в-масле", эмульсию типа "масло-в-воде", эмульсию типа "вода-в-масле-в-воде". Эмульсия может основываться, в частности, на светлом жидком вазелиновом масле (стандарт Европейской Фармакопеи); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном после олигомеризации алкенов, в частности изобутила или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, в частности растительных маслах, этилолеате, ди- (каприлат/капрат) пропиленгликоле, три-(каприлат/капрат) глицероле или диолеате пропиленгликоля; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности сложных эфирах изостеариновой кислоты. Для получения эмульсии масло используют в сочетании с эмульгаторами. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности сложные эфиры сорбитана, маннита (например, олеат ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислоты, которые обязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилен-полиоксиэтилена, в частности продукты плуроник, в частности L121. См., Hunter и др., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (ред. Stewart-Tull, DES), John Wiley and Sons, NY, с. 51-94 (1995); и Todd и др., *Vaccine*, 15:564-570 (1997). Типичные адьюванты представляют собой SPT эмульсию, описанную на с. 147 "*Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*" под ред. M. Powell и M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсию MF59, описанную на с. 183 этой же книги.

Дополнительным примером адьювантов является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила. Лучшими адьювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые являются перекрестно сшитыми, в частности, со сложными эфирами полиалкенила сахаров или полиспиртов. Эти соединения являются известными под термином карбомер (Pharmurgia, том 8, № 2, июнь 1996). Специалисты в данной области техники могут обратиться также к патенту США № 2909462, где описаны такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксилированным соединением, которое имеет по крайней мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, где атомы водорода по крайней мере трех гидроксильных групп являются замещенными ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по крайней мере 2 атома углерода. Лучшими радикалами являются радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например винилы, аллил и другие этилен-ненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы могут сами по себе содержать другие заместители такие, как метил. В частности, пригодными являются продукты, которые продаются под наименованием КАРБОПОЛ® (BF Goodrich, Огайо, США). Они являются перекрестно сшитыми с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди них можно упомянуть КАРБОПОЛ® 974Р, 934Р и 971Р. Наиболее целесообразно применение Карбопола 971Р. Среди сополимеров малеинового ангидрида и производной алкенила можно вспомнить сополимеры ЕМА (Monsanto), которые являются сополимерами малеинового ангидрида и этилена. Путем растворения этих полимеров в воде получают кислый раствор, который предпочтительно нейтрализуют до физиологического значения рН, чтобы получить раствор адьюванта, в который будет вводиться сама иммуногенная, иммунологическая или вакцинная композиция.

Дополнительные пригодные адьюванты включают как неограничивающие примеры, среди многих других, адьювантную систему RIBI (Ribi Inc.), Блок-сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, липидно-аминный адьювант авридин, термолабильный энтеротоксин из *E.coli* (рекомбинантный или иной), холерный токсин, IMS 1314 или мурамил-дипептид, или существующие в природе, или рекомбинантные цитокины, или их аналоги, или стимуляторы высвобождения эндогенного цитокина, среди многих других.

Предполагается, что адьювант будет добавляться в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, более предпочтительно в количестве от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, даже более предпочтительно в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу, наиболее предпочтительно в количестве приблизительно 1 мг на дозу. Альтернативно адьювант может находиться в концентрации от приблизительно 0,01 до 50%, предпочтительно в концентрации от приблизительно 2 до 30%, предпочтительно в концентрации от приблизительно 5 до 25%, еще более предпочтительно, в концентрации от приблизительно 7 до 22% и наиболее предпочтительно в концентрации от 10 до 20% по объему конечного продукта.

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

"Изолированный" означает "измененный рукой человека" по сравнению с его естественным состоянием, т.е. если это происходит в природе, то он был изменен, или выделен из своей первоначальной окружающей среды, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, который естественным образом является присутствующим в живом организме, не является "изолированным", но тот же поли-

нуклеотид или полипептид, отделенный от материалов, которые сосуществуют с ним в его естественном состоянии, является "изолированным" в том смысле, как этот термин используется в данном документе.

"Аттенуирование" означает снижение вирулентности патогена. В данном изобретении "аттенуирование" является синонимом "авирулентности". В данном изобретении аттенуированный вирус представляет собой такой, в котором вирулентность была уменьшена так, что он не вызывает клинических признаков инфекции, но способен индуцировать иммунный ответ в целевом животном, а также может означать, что клинические признаки снижаются относительно частоты возникновения заболевания или тяжести у животных, инфицированных аттенуированным вирусом, в частности вирусным вектором EHV-1 RasH, как заявлено в данной заявке, по сравнению с "контрольной группой" животных, инфицированных с помощью неаттенуированного вируса или патогена, и тех, которые не получают аттенуированного вируса. В этом контексте термин "снижение/сниженный" означает уменьшение по крайней мере на 10%, преимущественно на 25%, еще более предпочтительно на 50%, еще более предпочтительно на 60%, даже более предпочтительно на 70%, еще более предпочтительно на 80%, еще более предпочтительно на 90% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с контрольной группой, как определено выше. Таким образом, аттенуированный, авирулентный патоген, такой как, например, заявленный аттенуированный вирусный вектор, в частности EHV-1 (предпочтительно RasH) вирусный вектор, как заявлено в данной заявке, является приемлемым для получения модифицированной живой вакцины (MLV) или модифицированной живой иммуногенной композиции.

Термин "лечение и/или профилактика" относится к уменьшению частоты возникновения конкретной инфекции вируса гриппа свиней в стаде или уменьшению тяжести клинических признаков, вызванных или связанных с конкретной инфекцией вируса гриппа А свиней. Таким образом, термин "лечение и/или профилактика" также относится к сокращению количества животных в стаде, которые заражаются конкретным вирусом гриппа А свиней (=уменьшению частоты заражения инфекцией конкретного вируса гриппа А свиней) или к снижению тяжести клинических признаков, которые обычно ассоциированы или вызваны инфекцией вируса гриппа А свиней в группе животных, где животные получили эффективное количество иммуногенной композиции, как указано в данной заявке, по сравнению с группой животных, где животные не получали такой иммуногенной композиции.

"Лечение и/или профилактика" обычно включает в себя введение эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с данным изобретением животному или поголовью животных, которые в этом нуждаются, или таким, которые могли бы извлечь пользу из такого лечения/профилактики. Термин "лечение" относится к введению эффективного количества иммуногенной композиции после того, как животное или, по крайней мере, некоторые животные поголовья уже было/были инфицировано/инфицированы таким вирусом гриппа А свиней, где такие животные уже проявляют некоторые клинические признаки, вызванные или связанные с инфекцией, вызванной таким вирусом гриппа А свиней. Термин "профилактика" относится к введению животному перед любым инфицированием такого животного вирусом гриппа А свиней или, по крайней мере, где такое животное или ни одно из животных в группе животных не проявляет никаких клинических признаков, вызванных или связанных с инфекцией таким вирусом гриппа А свиней. Термины "профилактика" и "предотвращение" используются в этой заявке как взаимозаменяемые.

Термин "клинические признаки", как используется в данной заявке, относится к признакам инфекции животного вирусом гриппа А свиней. Клинические признаки инфекции зависят от выбранного патогена. Примеры таких клинических признаков включают, но не ограничиваются такими, как респираторный дистресс синдром, отит, жесткий покров, легкая лихорадка, депрессия и снижение аппетита. Однако клинические признаки также включают, но не ограничиваются такими, как клинические признаки, которые непосредственно наблюдаются у живых животных. Примеры клинических признаков, которые непосредственно наблюдаются у живых животных, включают выделения из носа и глаз, летаргию, кашель, хрипы, удар, повышенную температуру, потерю веса, обезвоживание, хромоту, дегидратацию, бледную кожу, худосочность и т.п.

Предпочтительно, когда клинические признаки, сниженным по частоте своего возникновения или по тяжести у животного, которого подвергают лечению, по сравнению с животными, которые либо не были подвергнуты лечению, либо были подвергнуты лечению при использовании иммуногенной композицией, доступной до данного изобретения, но впоследствии инфицированы конкретным вирусом гриппа свиней, относятся к уменьшению потери веса тела, снижению вирусной нагрузки в легких, уменьшению легочных повреждений, снижению и/или укорочению периода выделения вируса, снижению ректальной температуры, снижению клинических симптомов (в частности, респираторных симптомов), повышенной индукции (нейтрализующих) антител против вируса гриппа А свиней, повышению стимуляции Т-клеток против вируса гриппа А свиней, повышению стимуляции В-клеток против вируса гриппа А свиней и снижению уровня провоспалительных цитокинов, например IL1 β , в легких или к их комбинациям.

В данной заявке "эффективная доза" означает, но не ограничивается таким, как количество антигена, которое вызывает или способно вызывать иммунный ответ, обеспечивающий уменьшение клинических симптомов у животного, которому вводят антиген.

Как используется в данной заявке, термин "эффективное количество" означает в контексте компо-

зиции количество иммуногенной композиции, способной индуцировать иммунный ответ, который уменьшает частоту или тяжесть инфекции или частоту возникновения заболевания у животного. Такое эффективное количество является способным уменьшить возникновения конкретной инфекции вируса гриппа А свиней в стаде или уменьшить тяжесть клинических признаков конкретной инфекции вируса гриппа А свиней. В частности, эффективное количество относится к бляшкообразующим единицам (БОЕ) на дозу. Альтернативно в контексте терапии термин "эффективное количество" относится к количеству терапевтического агента, достаточному для того, чтобы снизить или ослабить тяжесть или продолжительность заболевания или расстройства, или одного или более симптомов заболевания или расстройства, предотвратить развитие заболевания или расстройства, вызвать регрессию заболевания или расстройства, предотвратить рецидив, развитие, начало или прогрессирование одного или более симптомов, связанных с заболеванием или расстройством либо усиливать, либо улучшать профилактику или лечение другой терапии или терапевтического агента.

"Иммунный ответ" или "иммунологический ответ" означает, но без ограничения развитие клеточного и/или опосредованного антителами иммунного ответа на (иммуногенную) композицию или вакцину, которая представляет интерес. Конечно, иммунный или иммунологический ответ включает, но без ограничения один или более из следующих эффектов: продукция или активация антител, В-клеток, лимфоцитов Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток и/или гамма-дельта Т-клеток, направленных конкретно на антиген или антигены, включенные в композицию или вакцину, представляющую интерес, в соответствии с данным изобретением. Предпочтительно, когда хозяин будет демонстрировать либо протективный иммунологический (анамнестический) ответ, либо терапевтический ответ, такой, что устойчивость к новой инфекции будет повышена и/или снижена клиническая тяжесть заболевания. Такая защита будет продемонстрирована либо уменьшением количества симптомов, снижением тяжести симптомов или отсутствием одного или более симптомов, связанных с инфекцией патогеном, задержкой наступления виремии, снижением вирусной персистенции, уменьшением общей вирусной нагрузки и/или уменьшением экскреции вируса.

"Защита от болезни", "протективный иммунитет", "функциональный иммунитет", "уменьшение клинических симптомов", "индукция/выработка нейтрализующих антител и/или трансформация сыворотки" и подобные фразы означают частичный или полный ответ, направленный против заболевания или состояния, которое вызывается путем введения одной или более терапевтических композиций в соответствии с данным изобретением, или их комбинации, что приводит к сниженным вредным эффектам, чем можно было бы ожидать для неиммунизированного животного, страдающего от заболевания или инфекции. Т.е. тяжесть вредных эффектов инфекции уменьшается у вакцинированного животного. Инфекция может быть снижена, замедлена или, возможно, полностью прекращена у вакцинированного животного. При этом, когда имеется в виду полное предотвращение инфекции, то это специально указывается. Если полное предотвращение не указано, то оно включает в себя частичное предотвращение. "Протективный иммунологический ответ" или "протективный иммунитет" будет продемонстрирован либо уменьшением, либо отсутствием клинических симптомов, которые обычно демонстрируются инфицированным хозяином, более быстрым временем восстановления и/или снижением продолжительности инфекционности, или пониженным титром патогена в тканях или жидкостях организма, или пониженной экскрецией вируса у инфицированного хозяина.

В данной заявке "снижение частоты возникновения заболевания и/или клинических признаков" или "снижение клинических симптомов" означает, но не ограничивается такими, как уменьшение количества инфицированных животных в группе, уменьшение или устранение ряда животных, которые проявляют клинические признаки инфекции, или уменьшение тяжести каких-либо клинических симптомов, которые присутствуют в одном или более животных, по сравнению с инфекцией дикого типа. Например, следует вспомнить любое снижение нагрузки патогена, выделение патогена, снижение передачи патогена или уменьшение любого клинического признака, который является симптоматическим для гриппа. Является желательным, когда эти клинические признаки снижаются у одного или более животных, которые получают терапевтическую композицию в соответствии с данным изобретением по крайней мере на 10% по сравнению с животными, которые не получают композицию и которые стали инфицированными. Более предпочтительно, когда клинические признаки уменьшаются у животных, которые получают композицию в соответствии с данным изобретением по крайней мере на 20%, предпочтительно по крайней мере на 30%, еще лучше по крайней мере на 40% и даже более предпочтительно по крайней мере на 50%.

Термин "повышенная защита" в данном документе означает, но не ограничивается такими, как значительное снижение одного или более клинических симптомов, которые являются ассоциированными с инфицированием с помощью инфекционного агента, в группе вакцинированных животных по сравнению с невакцинированной контрольной группой животных. Термин "статистически значимое снижение клинических симптомов" означает, но без ограничения такими, как частота возникновения хотя бы одного клинического симптома в вакцинированной группе животных, которая является по крайней мере на 10%, предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, еще более предпочтительно на 50% и даже более предпочтительно на 70% ниже, чем в невакцинированной контрольной группе после заражения инфекционным агентом.

Термин "патоген" является хорошо известным специалисту в данной области техники. Однако термин "патоген" включает бактерии и вирусы.

Термин "животное, предназначенное для производства продуктов питания" означает животных, используемых для потребления человеком, таких, как свиньи, крупный рогатый скот, птица, рыба и подобных им, предпочтительно свиней. Термин "животное, предназначенное для производства продуктов питания" исключает парнокопытных, таких как лошади.

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

Термин "выделение" относится к секретам, таким как носовые выделения и, кроме того, к аэрозолям, создаваемым при кашле или чихании. Таким образом, выделение может быть определено путем изучения титра вируса в назальных смывах или титра вируса в легких. Термин "выделение" дополнительно охватывает перенос вируса в восприимчивых животных (т.е. индикаторных). Оценка выделения вируса является общеизвестной для квалифицированного специалиста в данной области техники.

Термин "антитела против вируса гриппа А свиней" относится к антителам, которые являются специфическими к вирусу гриппа А свиней. Примеры таких антител против вируса гриппа А свиней включают, но без ограничения материнские антитела, образовавшиеся при вакцинации свиноматок вакциной против вируса гриппа А свиней, или материнские антитела, образовавшиеся при инфекции свиноматок, вирусом гриппа А свиней. Кроме того, антитела против вируса гриппа А свиней у поросят могут развиваться в ответ на инфекцию вирусом свиного гриппа А у поросят. Термин "антитела против вируса гриппа А свиней" может также означать, но без ограничения поросенка, который имел или имеет (пассивный перенос материнских антител) титр антител к SIAV, предпочтительно по крайней мере 1:10, более предпочтительно больше 1:20, еще более предпочтительно больше 1:40, еще более предпочтительно больше 1:80, еще более предпочтительно больше 1:160, еще более предпочтительно больше 1:320 и наиболее предпочтительно больше 1:640. Предпочтительно, когда титр антител против вируса гриппа А свиней выявляется и может быть количественно оценен в специфическом иммунологическом анализе вируса гриппа А свиней, таком, как анализ ингибирования гемагглютинации, анализ ELISA или реакция сывороточной нейтрализации.

"Безопасность" относится к отсутствию побочных осложнений у вакцинированных животных после вакцинации, в том числе, но не ограничиваясь такими, как потенциальное преобразование живой вирусной вакцины в вирулентную, клинически значимые побочные эффекты такие, как стойкие, системные болезни или неприемлемое воспаление в сайте введения вакцины.

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

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

Рецептуры.

Рецептуры данного изобретения содержат эффективное для иммунизации количество одной или более иммуногенных композиций и физиологически приемлемый носитель. Вакцины включают эффективное для иммунизации количество одной или более иммуногенных композиций и физиологически приемлемый носитель. Рецептuru должна соответствовать способу введения.

Иммуногенная композиция, если это предпочтительно, также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов, или буферные агенты для доведения значения pH. Иммуногенная композиция может представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетку, капсулу, композицию с замедленным высвобождением или порошок. Рецептuru для перорального введения может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия и т.д., фармацевтической степени чистоты.

Приемлемые способы введения включают, но не ограничены такими, как интраназальное, пероральное и внутримышечное. Введение с питьевой водой, наиболее предпочтительно в единичной дозе, является желательным. Специалистам в данной области техники будет понятно, что композиции в соответствии с изобретением могут также вводиться в виде одной, двух или более доз, а также с помощью других способов введения. Например, такие другие пути введения включают подкожное, внутрикожное, интраперитонеальное. В зависимости от желаемой продолжительности и эффективности лечения композиции в соответствии с изобретением могут вводиться один или несколько раз, также с перерывами, например, на ежедневной основе в течение нескольких дней, недель или месяцев, и в различных дозах, таких как приблизительно от 1×10^4 до 1×10^9 (см. титр вируса выше). В специфическом аспекте в соответст-

вии с данным изобретением дозировка составляет приблизительно от 1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀.

Определение антигена.

Термин "вирус гриппа свиней" является известным специалисту в данной области техники. Термин вирус гриппа свиней относится к типу А или типу С вируса гриппа из семейства Orthomyxovirus, вызывающего грипп свиней. Несмотря на то что ортомиксовирусы имеют 3 группы: тип А, тип В и тип С, только тип А и тип С вирусов гриппа инфицируют свиней. Предпочтительно, когда вирус гриппа свиней является вирусом гриппа А свиней. Подтипы вируса гриппа свиней включают H1N1, H1N2, H3N2 и H3N1. H9N2 и H5N1 также могут быть обнаружены у свиней. Предпочтительно, когда вирус гриппа свиней представляет собой вирус гриппа, который был изолирован от свиней.

Термины "НА" или "Н", "NA" или "N" и "NP" являются известными специалисту в данной области техники. Однако в общем случае вирусы гриппа А разделяются на 17 Н (гемагглютинин) и 10 N (нейраминидаза) подтипов, которые могут образовывать различные возможные комбинации (обозначаются как H1N1, H1N2 ... H2N1, H2N2 ... H5N1, H5N2 ... и т.д.). Н (гемагглютинин) и N (нейраминидаза) являются поверхностными гликопротеинами вирусов гриппа А, таких как SIAV. Кроме того, N является основной антигенной мишенью нейтрализующих антител. Дополнительно NP (нуклеопротеин) образует нуклеокапсид.

Определение DIVA.

Термин "DIVA (дифференциация между инфицированными и вакцинированными животными)" относится к вакцине, которая может использоваться для различения вакцинированного животного и инфицированного животного.

Термин "образец" относится к образцу жидкости организма, образцу обособленных клеток или образцу ткани или органа. Образцы жидкости организма могут быть получены по известной методике и включают образцы крови, плазмы, сыворотки или мочи, более предпочтительно образцы крови, плазмы или сыворотки. Образцы тканей или органов могут быть получены из любой ткани или органа путем, например, биопсии. Изолированные клетки могут быть получены из жидкостей организма или тканей или органов при использовании методик разделения, таких как центрифугирование или сортировки клеток.

Термин "полученный" может включать этап изоляции и/или очистки, известные специалисту в данной области техники, предпочтительно при использовании преципитации, колонки и т.д.

Термин "иммуноанализ" и "геномные аналитические тесты" означает основу для дифференциации животных, вакцинированных иммуногенной композицией в соответствии с данным изобретением, от животных, инфицированных существующим в природе (ассоциированным с заболеванием) вирусом свиного гриппа. Примеры иммунологических тестов включают любой ферментно-иммунологический или иммунохимический метод определения, такой как ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), EIA (иммуноферментный анализ), RIA (радиоиммуноанализ), иммуноферментный сэндвич-анализ, электрохемилюминисцентный иммуноанализ (ECLIA), усиленный диссоциацией лантанидный флуоресцентный иммуноанализ (DELFLIA) или твердофазные иммунные анализы, непрямой иммунофлуоресцентный анализ (IFT), иммуногистологическое окрашивание, вестерн-блот анализ или любой другой подходящий метод, доступный специалисту в данной области техники. В зависимости от используемого анализа антигены или антитела могут быть мечены ферментом, флуорофором или радиоизотопом. См., например, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc., New York, NY (1994); и Frye и др., Oncogen 4: 1153-1157, 1987.

Термин "геномный аналитический тест" относится к методу анализа генома на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), ПЦР в реальном времени (ПЦР в реальном времени) или ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), Templex ПЦР, амплификации на основе нуклеиновой кислоты (NASBA) и методам изотермической амплификации при использовании полимеразы и специфических олигонуклеотидов в качестве праймеров. Упомянутые выше способы амплификации являются хорошо известными в данной области техники.

Пункты

Следующие пункты описываются в данной заявке.

Изобретение обеспечивает следующие пункты.

Соединение.

1. EHV вектор, включающий

- (i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем
- (ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является встроенной в ORF70,
- (iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора.

2. Иммуногенная композиция, которая включает EHV вектор в соответствии с п.1 и необязательно фармацевтический носитель.

3. Иммуногенная композиция, которая включает EHV вектор, содержащий

- (i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к

патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем

(ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является встроенной в ORF70,

(iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора.

4. EHV вектор, включающий

(i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем

(ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является встроенной в сайт инсерции,

(iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора, который включает 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарные им нуклеотидные последовательности, или функциональный фрагмент, или их функциональную производную, или комплементарные ей нуклеотидные последовательности.

5. Иммуногенная композиция, включающая EHV вектор в соответствии с п.4 и необязательно фармацевтический носитель.

6. Иммуногенная композиция, которая включает EHV вектор, содержащий

(i) по крайней мере одну последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем

(ii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является встроенной в сайт инсерции,

(iii) указанная последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, является оперативно связанной с последовательностью промотора, который включает 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарные им нуклеотидные последовательности, или функциональный фрагмент, или их функциональную производную, или комплементарные ей нуклеотидные последовательности.

7. EHV вектор, включающий

(i) по крайней мере две последовательности, которые кодируют экзогенные антигены, относящиеся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем

(ii) указанные последовательности, кодирующие экзогенный антиген, являются встроенными в сайты инсерции,

(iii) указанные последовательности, кодирующие экзогенный антиген, являются оперативно связанными с последовательностями промотора.

8. Иммуногенная композиция, которая включает EHV вектор в соответствии с п.7 и необязательно фармацевтический носитель.

9. Иммуногенная композиция, которая включает EHV вектор, содержащий

(i) по крайней мере две последовательности, которые кодируют экзогенные антигены, относящиеся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем

(ii) указанные последовательности, кодирующие экзогенный антиген, являются встроенными в сайты инсерции,

(iii) указанные последовательности, кодирующие экзогенный антиген, являются оперативно связанными с последовательностями промотора.

10. Иммуногенная композиция, включающая два или более EHV векторов в соответствии с любым из пп.1-9.

11. Иммуногенная композиция в соответствии с п.10, где иммуногенная композиция включает два EHV вектора.

12. Иммуногенная композиция в соответствии с п.10, где два или более векторов EHV включают различные последовательности, кодирующие экзогенные антигены.

13. Вакцина DIVA, включающая один или более векторов EHV в соответствии с любым из пп.1-12.

14. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-13, где вектор EHV является рекомбинантным.

15. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-14, где вектор EHV представляет собой RasH или RasH SE.

16. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-14, где вектор EHV является выбранным из группы, состоящей из EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9,

17. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-16, где вектор EHV представляет собой EHV-1.

18. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-17,

где животные, предназначенные для производства пищевых продуктов, представляют собой свиней.

19. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-18, где патоген, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, представляет собой вирус гриппа, предпочтительно вирус гриппа А свиней.

20. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-19, где последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин.

21. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-20, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, а подтип гемагглютинина вируса гриппа является выбранным из группы, которая состоит из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 и H18.

22. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-21, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, а подтип гемагглютинина вируса гриппа представляет собой H1 и/или H3.

23. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-22, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где антигены гемагглютинина вируса гриппа А имеют происхождение от свиней.

24. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-23, где вектор EHV включает по крайней мере две последовательности, которые кодируют гемагглютинин вируса гриппа.

25. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-24, где вектор EHV включает по крайней мере четыре последовательности, кодирующие гемагглютинины вируса гриппа.

26. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-25, где вектор EHV включает четыре последовательности, кодирующие гемагглютинины вируса гриппа.

27. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-26, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где последовательность, кодирующая гемагглютинин вируса гриппа, является выбранной из группы штаммов, состоящей из

A/swine/Italy/116114/2010(H1N2),
 A/swine/Italy/7680/2001(H3N2),
 A/swine/Gent/132/2005(H1N1),
 A/swine/Italy/4675/2003(H1N2),
 A/swine/Italy/259543/2003(H1N2),
 A/swine/Denmark/13772-1/2003(H1N1),
 A/swine/England/MD0040352R/2009(H1N1),
 A/swine/Hungary/13509/2007(H3N2),
 A/swine/Italy/13962/95(H3N2),
 A/swine/Cotes d'Armor/1121/00(H1N1),
 A/Swine/Colorado/1/77,
 A/Swine/Colorado/23619/99,
 A/Swine/Cote d'Armor/3633/84,
 A/Swine/England/ 195852/92,
 A/Swine/Finistere/2899/82,
 A/Swine/Hong Kong/10/98,
 A/Swine/Hong Kong/9/98,
 A/Swine/Hong Kong/81/78,
 A/Swine/Illinois/100084/01,
 A/Swine/Illinois/100085A/01,
 A/Swine/Illinois/21587/99,
 A/Swine/Indiana/1726/88,
 A/Swine/Indiana/9K035/99,
 A/Swine/Indiana/P12439/00,
 A/Swine/Iowa/30,
 A/Swine/Iowa/15/30,
 A/Swine/Iowa/533/99,
 A/Swine/Iowa/569/99,
 A/Swine/Iowa/3421/90,
 A/Swine/Iowa/8548-1/98,
 A/Swine/Iowa/930/01,
 A/Swine/Iowa/17672/88,

A/Swine/Italy/1513-1/98,
 A/Swine/Italy/1523/98,
 A/Swine/Korea/CY02/02,
 A/Swine/Minnesota/55551/00,
 A/Swine/Minnesota/593/99,
 A/Swine/Minnesota/9088-2/98,
 A/Swine/Nebraska/1/92,
 A/Swine/Nebraska/209/98,
 A/Swine/Netherlands/12/85,
 A/Swine/North Carolina/16497/99,
 A/Swine/North Carolina/35922/98,
 A/Swine/North Carolina/93523/01,
 A/Swine/North Carolina/98225/01,
 A/Swine/Oedenrode/7C/96,
 A/Swine/Ohio/891/01,
 A/Swine/Oklahoma/18717/99,
 A/Swine/Oklahoma/18089/99,
 A/Swine/Ontario/01911-1/99,
 A/Swine/Ontario/01911-2/99,
 A/Swine/Ontario/41848/97,
 A/Swine/Ontario/97,
 A/Swine/Quebec/192/81,
 A/Swine/Quebec/192/91,
 A/Swine/Quebec/5393/91,
 A/Swine/Taiwan/7310/70,
 A/Swine/Tennessee/24/77,
 A/Swine/Texas/4199-2/98,
 A/Swine/Wisconsin/125/97,
 A/Swine/Wisconsin/136/97,
 A/Swine/Wisconsin/163/97,
 A/Swine/Wisconsin/164/97,
 A/Swine/Wisconsin/166/97,
 A/Swine/Wisconsin/168/97,
 A/Swine/Wisconsin/235/97,
 A/Swine/Wisconsin/238/97,
 A/Swine/Wisconsin/457/985,
 A/Swine/Wisconsin/458/98,
 A/Swine/Wisconsin/464/98, и
 A/Swine/Wisconsin/14094/99,

28. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-27, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где последовательность, кодирующая гемагглютинин вируса гриппа, является выбранной из группы штаммов, состоящей из

A/swine/Italy/116114/2010(H1N2),
 A/swine/Italy/7680/2001(H3N2),
 A/swine/Gent/132/2005(H1N1), и
 A/swine/Italy/4675/2003(H1N2).

29. Вектор EHV, иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.1-28, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где последовательность, кодирующая гемагглютинин вируса гриппа, кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

30. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-29, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где последовательность, кодирующая гемагглютинин вируса гриппа, включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере 70% идентичности с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

31. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп. 1-30, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин, где кодирующая гемагглютинин вируса гриппа последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность

ность, имеющую по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 80%, по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 91%, по крайней мере 92%, по крайней мере 93%, по крайней мере 94%, по крайней мере 95%, по крайней мере 96%, по крайней мере 97%, по крайней мере 98% или по крайней мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

32. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-31, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует N (нейраминидазу), а подтип N является выбранным из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 и N10.

33. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-32, где вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA не содержат последовательностей, кодирующих антиген N (нейраминидазы) вируса гриппа.

34. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-33, где вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA не содержат последовательностей, кодирующих антиген NP (нуклеопротеина) вируса гриппа.

35. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-34, где вектор EHV включает дополнительные регуляторные последовательности, такие как сигнал терминации или последовательность полиаденилирования.

Сайты инсерции.

36. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.4-34, где указанный сайт инсерции представляет собой ORF1/3.

37. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.4-34, где указанный сайт инсерции представляет собой ORF70.

38. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-37, где первая последовательность, кодирующая экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, встраивается в ORF70.

39. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-38, где вторая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, встраивается в ORF1/3.

40. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-39, где инсерция в ORF70 характеризуется частичной делецией, укорочением, заменой, модификацией и т.д. в ORF70, благодаря чему ORF71 остается функциональной.

41. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-40, где инсерция в ORF70 характеризуется

i) делецией части размером приблизительно 801 п.о. в ORF70 для RacH (SEQ ID NO: 20) или последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 95, 99% гомологичной и/или идентичной ей; или

ii) инсерция в ORF70 характеризуется делецией части размером приблизительно 801 п.о. в ORF70 для RacH (SEQ ID NO: 20) или последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 95, 99% гомологичной и/или идентичной ей, в любом другом штамме; или

iii) инсерция в ORF70 характеризуется делецией части размером приблизительно 801 п.о. в ORF70 для штамма ab4 EHV-1 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), благодаря чему часть в последовательности генома ab4 дикого типа является размещенной между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO: 19), или последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 95, 99% гомологичной и/или идентичной ей; или

iv) инсерция в ORF70 характеризуется делецией части размером приблизительно 801 п.о. в ORF70 для штамма ab4 EHV-1 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), благодаря чему делетированная часть последовательности генома ab4 дикого типа является размещенной между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO: 19), или последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 95, 99% гомологичной и/или идентичной ей, в любом другом штамме.

42. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-41, где вектор EHV-1 включает по крайней мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 и последовательности, которая является на 70, 80, 85, 90, 95, 99% гомологичной и/или идентичной любой из этих последовательностей.

43. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-42, где вектор EHV-1 включает

(i) по крайней мере один левый участок, фланкирующий ORF70, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17; и

(ii) по крайней мере один правый участок, фланкирующий ORF70, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 18.

Промотор.

44. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-3 и

пунктами 7-43, где последовательность промотора является выбранной из группы, состоящей из большого Т SV40, предраннего гена 1 HCMV и MCMV, промотора человеческого фактора элонгации альфа, промотора бакуловирусного полиэдрина, функционального фрагмента 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), предпочтительно, когда указанный функциональный фрагмент представляет собой р430 (SEQ ID NO: 3), функционального фрагмента комплементарной нуклеотидной последовательности 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), функционального фрагмента 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), предпочтительно, когда указанный функциональный фрагмент представляет собой р455 (SEQ ID NO: 4), функционального фрагмента комплементарной нуклеотидной последовательности 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2).

45. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-3 и 7-44, где последовательность промотора включает 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарные им нуклеотидные последовательности, или функциональный фрагмент, или их функциональную производную, или комплементарные ей нуклеотидные последовательности.

46. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.4-6 и 45, где функциональный фрагмент или производная последовательности промотора имеет гомологию 80, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99,9%.

47. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.46 и 45 или 46, где функциональный фрагмент или производная последовательности промотора имеет длину 550 нуклеотидов, предпочтительно 500, 490, 480, 470, 460, 455, 450, 445, 440, 435, 434, 433, 432, 431, 430 нуклеотидов, наиболее предпочтительно 455 или 430 нуклеотидов.

48. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.4-6 и 45-47, где функциональный фрагмент последовательности промотора представляет собой укорочение 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или комплементарную ей нуклеотидную последовательность, предпочтительно, когда идентичность последовательности составляет (по крайней мере) 72% по всей длине (или больше).

49. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.4-6 и 45-48, где функциональный фрагмент последовательности промотора 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) представляет собой фрагмент, который обозначается как р430 (SEQ ID NO: 3), или последовательность, имеющую 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 3.

50. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.4-6 и 45-48, где функциональный фрагмент последовательности промотора представляет собой укорочение 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) или комплементарную ей нуклеотидную последовательность, предпочтительно, когда идентичность последовательности составляет (по крайней мере) 78% по всей длине (или больше).

51. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.4-6 и 45-48, где функциональный фрагмент последовательности промотора 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) представляет собой фрагмент, который обозначается как р455 (SEQ ID NO: 4), или последовательность, имеющую 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 4.

52. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-51, где вектор ENV включает одну или более дополнительных регуляторных последовательностей, таких как сигнал терминации, сигнал полиаденилирования или регуляторный элемент, подобный IRES и/или 2a пептиду.

Специфические комбинации промоторов и антигенов.

53. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-52, где последовательность промотора 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), или комплементарные ей нуклеотидные последовательности, или функциональный фрагмент, или ее функциональная производная или комплементарные ей нуклеотидные последовательности являются оперативно связанными с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, которая имеет по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 80%, по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 91%, по крайней мере 92%, по крайней мере 93%, по крайней мере 94%, по крайней мере 95%, по крайней мере 96%, по крайней мере 97%, по крайней мере 98% или по крайней мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 28.

54. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с п.53, где функциональный фрагмент последовательности промотора 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) представляет собой фрагмент, который обозначается как р430 (SEQ ID NO: 3).

55. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-54, где последовательность промотора 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или комплементарные ей нуклеотидные последовательности, или функциональный фрагмент, или ее функциональная производная или комплементарные ей нуклеотидные последовательности являются оперативно связанными с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, которая имеет по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 80%, по крайней мере 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 91%, по крайней мере 92%, по крайней мере 93%, по крайней мере 94%, по крайней мере 95%, по крайней мере 96%, по крайней мере 97%, по крайней мере 98% или по крайней мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, как представлено в SEQ ID NO: 27.

56. Вектор ENV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с п.55, где функцио-

73. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-72, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

74. Иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с п.73, где указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой воду для инъекций, среду для культуры клеток или буфер для ресуспендирования.

75. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с п.74, где указанный буфер для ресуспендирования представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор.

76. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-75, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA включает от 1×10^4 до 1×10^9 TCID₅₀, предпочтительно от 1×10^4 до 1×10^8 TCID₅₀, даже более предпочтительно от 1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀ вектора EHV.

77. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-76, где указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

78. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-77, где указанная иммуногенная композиция или вакцина DIVA является мультивалентной вакциной.

79. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-78, где указанная иммуногенная композиция или вакцина DIVA является бивалентной вакциной, тетравалентной вакциной, гексавалентной вакциной или гептавалентной вакциной.

80. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-79, где указанная иммуногенная композиция или вакцина DIVA является бивалентной вакциной или тетравалентной вакциной.

81. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-80, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA является эффективной в лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных вирусом гриппа А свиней у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются.

82. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-81, где иммуногенная композиция или DIVA вакцина защищает от гомологичного и/или гетерологичного заражения вирусом гриппа А свиней.

83. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.1-82, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA защищает от заражения вирусом гриппа А свиней серотипов H1 и/или H3.

Наборы.

84. Набор, который включает иммуногенную композицию или вакцину DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83.

85. Набор в соответствии с п.84, где набор дополнительно включает инструкционное письмо для лечения и/или профилактики гриппа А свиней.

Способы лечения.

86. Способ иммунизации животного, предназначенного для производства продуктов питания, который включает введение такой животному, предназначенному для производства продуктов питания, иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83.

87. Способ лечения или профилактики клинических признаков, вызванных вирусом гриппа А, у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83.

88. Способ снижения титров вируса в легких у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются, по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83.

89. Способ вакцинации животного, предназначенного для производства продуктов питания, которое в этом нуждается, и которое имеет антитела против вируса гриппа А свиней, включающий этап введения указанному животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83.

90. Способ обеспечения материнских антител против вируса гриппа А у молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, который включает введение матери указанного молодого животного, предназначенного для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 тогда, когда указанная мать является беременной указанным молодым животным, предназначенным для производства продуктов питания.

91. Способ обеспечения повышенной защиты от инфекции вируса гриппа А у молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, где

а) мать указанного молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, является вакцинированной с помощью терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 тогда, когда указанная мать является беременной указанным молодым животным, предназначенным для производства пищевых продуктов; и/или

б) указанное молодое животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является вакцинированным с помощью терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины DIVA в возрасте трех недель.

92. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для применения в способе иммунизации животного, предназначенного для производства продуктов питания, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины DIVA.

93. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для применения в способе лечения или профилактики клинических признаков, вызванных вирусом гриппа А, у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины DIVA.

94. Иммуногенная композиция или DIVA вакцина в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для применения в способе снижения титра вируса в легких у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются, по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины DIVA.

95. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для применения в способе вакцинации животного, предназначенного для производства продуктов питания, которое в этом нуждается, и которое имеет антитела против вируса гриппа А свиней, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины DIVA.

96. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для применения в способе обеспечения материнского иммунитета против вируса гриппа А у молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, который включает введение матери указанного молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины DIVA тогда, когда указанная мать является беременной указанным молодым животным, предназначенным для производства пищевых продуктов.

97. Иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для применения в способе для обеспечения повышенной защиты против инфекции вирусом гриппа А у молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, которое в этом нуждается, где

а) мать указанного молодого животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, является вакцинированной с помощью терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 в то время, когда указанная мать является беременной указанным молодым животным, предназначенным для производства пищевых продуктов; и/или

б) указанное молодое животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является вакцинированным с помощью терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины DIVA в возрасте трех недель.

98. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-97, где животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, представляет собой свинью, поросенка или свиноматку.

99. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-98, где вирус гриппа А является вирусом гриппа А свиней.

100. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-99, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA вводится однократно.

101. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-100, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA вводится животному, предназначенному для производства продуктов питания, в возрасте первых шести недель жизни, в возрасте первых двух недель жизни, в возрасте первой недели жизни или в первый день жизни.

102. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-101, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA вводится в двух дозах.

103. Способ или применение в соответствии с п.102, где иммуногенная композиция или вакцина

DIVA вводится животному, предназначенному для производства продуктов питания, в возрасте первой недели жизни, а второй раз вводится в возрасте второй, третьей или четвертой недели жизни.

104. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-103, где указанная иммуногенная композиция или вакцина DIVA вводится внутримышечно или интраназально.

105. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-88, и 92-94, и 98-104, где животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, представляет собой свинью, негативную по антителам к вирусу гриппа А свиней.

106. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-104, где животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, представляет собой свинью, позитивную по антителам к вирусу гриппа А свиней.

107. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-106, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA включает от 1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀ вектора EHV.

108. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-107, где указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из уменьшения потери веса тела, снижения вирусной нагрузки в легких, снижения поражения легких, снижения и/или сокращения выделения вируса, снижения ректальной температуры, снижения клинических симптомов (в частности, респираторных симптомов), повышения индукции (нейтрализующих) антител к вирусу гриппа А свиней, повышенной стимуляции Т-клеток против вируса гриппа А свиней, повышенной стимуляции В-клеток против вируса гриппа А свиней и уменьшения провоспалительных цитокинов, например IL1 β , в легких или их комбинаций, по сравнению с животным, предназначенным для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы тех же видов.

109. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-108, где лечение или профилактика приводит к сокращению фазы вирусной нагрузки по сравнению с животным, предназначенным для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы тех же видов.

110. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-109, где лечение или профилактика приводит к снижению выделения вируса гриппа А с первого дня после заражения (инфекции).

111. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-110, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA защищает от гомологичного и/или гетерологичного заражения вирусом гриппа А.

112. Способ или применение в соответствии с любым из пп.86-111, где иммуногенная композиция или вакцина DIVA защищает от заражения вирусом гриппа А серотипов H1 и/или H3.

Редакция по швейцарскому типу и другие.

113. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для терапевтического применения.

114. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для применения в качестве иммуногена или вакцины.

115. Вектор EHV, иммуногенная композиция или вакцина DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для применения в качестве лекарственного средства.

116. Применение вектора EHV, иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для производства лекарственного средства.

117. Применение вектора EHV, иммуногенной композиции или вакцины DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83 для лечения и/или профилактики инфекции гриппа А у животного, предназначенного для производства продуктов питания.

DIVA.

118. Способ дифференцирования животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, инфицированных вирусом гриппа А свиней, от животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, вакцинированных иммуногенной композицией или вакциной DIVA в соответствии с любым из пп.2, 3, 5, 6 и 8-83, включающий

- а) получение образца от животного, предназначенного для производства пищевых продуктов; и
- б) анализ указанного образца в иммунологическом тесте и/или геномном аналитическом тесте.

119. Способ в соответствии с п.118, где иммунологический тест включает анализ, содержит ли образец антитела, которые специфически узнают белок N (нейраминидазы) или белок NP (нуклеопротеина) вируса гриппа свиней.

120. Способ в соответствии с п.118 или 119, где животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является инфицированным вирусом гриппа А свиней, если обнаружены антитела, которые специфически узнают белок N (нейраминидазы) или белок NP (нуклеопротеина) вируса гриппа свиней.

121. Способ в соответствии с п.118, где геномный аналитический тест включает анализ, содержит ли образец специфические последовательности вируса гриппа А свиней, кодирующие N (нейраминидазу) и/или NP (нуклеопротеин).

122. Способ в соответствии с п.118 или 121, где животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, является инфицированным вирусом гриппа А свиней, если обнаружены специфиче-

ские последовательности, которые кодируют N (нейраминидазу) и/или NP (нуклеопротеин).

123. Способ в соответствии с любым из пп.118-122, где иммуноанализ представляет собой EIA (ферментный иммуноанализ) ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) или где геномный аналитический тест представляет собой ПЦР (полимеразную цепную реакцию), ОТ-ПЦР (полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой) или ПЦР в реальном времени (полимеразную цепную реакцию в реальном времени).

124. Способ в соответствии с любым из пп.118-123, где животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, представляет собой свинью.

125. Способ в соответствии с любым из пп.118-124, где образец является образцом сыворотки.

126. Способ в соответствии с любым из пп.118-125, где ELISA является непрямым ELISA, сэндвич-ELISA, конкурентным ELISA или блокирующим ELISA.

Краткое описание фигур

Следующие фигуры образуют часть данного изобретения и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов данного изобретения. Изобретение может быть более понятным путем ссылки на одну или более таких фигур в сочетании с подробным описанием специфичных вариантов осуществления, представленных в данные заявке.

Фиг. 1А является схематической иллюстрацией сравнения участков ORF1/3 дикого типа (д.т.) EHV-1 штамма ab4 и аттенуированного вакцинного штамма EHV-1 RacH.

Фиг. 1В - схематическое изображение сайта инсерции *orf70*, где

UL - длинный уникальный сегмент;

US - короткий уникальный сегмент;

IR - внутренний инвертированный повтор;

TR - терминальный инвертированный повтор;

gG - гликопротеин G;

gpII - гликопротеин II;

orf = открытая рамка считывания;

п.о. - пары оснований.

На фиг. 2 показана карта плазмиды и нуклеотидная последовательность плазмиды для переноса pU-mC70-BGH.

На фиг. 3 показаны результаты экспериментов количественной ПЦР по изучению кинетики промотора. График 3А показывает кинетику транскрипции *orf72*, которая кодирует эссенциальный гликопротеин D. Эти данные использовали для нормализации данных по кинетики транскрипции mCherry (график 3В).

На фиг. 4 показаны результаты количественной ПЦР двух независимых экспериментов по кинетики промотора: положительная корреляция транскрипционной активности и значения. Нормализованные значения Ct результатов количественной ПЦР mCherry в разное время после инфекции отнимали от соответствующего среднего значения Ct при $t = 0$. Продемонстрированы два эксперимента в двух различных линиях клеток.

На фиг. 5 показана карта плазмиды и нуклеотидная последовательность вектора переноса pU70-p455-71K71.

На фиг. 6 показана карта плазмиды и нуклеотидная последовательность плазмиды переноса pU70-p455-H3-71K71 для инсерции экспрессионной кассеты p455-H3-71 в *orf70* EHV-1 RacH, где

H3 - открытая рамка считывания, которая кодирует гемагглютинин H3 вируса гриппа A;

71pA - новая последовательность polyA, как представлено в описании изобретения EM P2016-022;

I-SceI - сайт расщепления для рестрикционной эндонуклеазы I-SceI промотор;

aph - промотор прокариотического гена устойчивости к канамицину;

Капа - ген резистентности к канамицину;

3'-конец ORF70 - участок рекомбинации ниже сайта инсерции;

ORI - точка начала репликации;

APr - плазмидный ген резистентности к ампициллину выше;

orf70 - участок рекомбинации выше сайта инсерции;

p455 - новый промотор p455;

п.о. - пары оснований.

Фиг. 7 является схематической иллюстрацией генома гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 с увеличенным участком *orf70*, где

orf69 - открытая рамка считывания номер 69 выше сайта инсерции в *orf70*;

p455 - новый промотор, описанный в данной заявке (см., например, пример 1);

H3 - трансген гемагглютинина вируса гриппа;

71pA - новая последовательность полиаденилирования;

A*orf70* - оставшаяся часть *orf70*, содержащая промотор для *orf71*, который кодирует структурный вирусный гликопротеин II (gpII).

На фиг. 8 показан непрямым иммунофлуоресцентный анализ.

Непрямым иммунофлуоресцентный анализ клеток VERO, инфицированных гEHV-1 RacH-SE-70-

p455-H3. Через 24 ч после инфицирования клетки подвергали фиксации в этаноле и высушивали на воздухе. Использовали коммерческое моноклональное антитело против H3 в качестве первичного антитела и FITC (флуоресцеин изотиоцианат) - конъюгированный кроличий антимишинный IgG в качестве вторичного антитела. H3 был продемонстрирован в клетках, инфицированных рекомбинантным EHV-1 RasHSE-70-p455-H3, при использовании флуоресцентной микроскопии.

На фиг. 9 показан вестерн-блот.

Вестерн-блот клеток, инфицированных различными пассажами гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 или контролем гEHV-1 RasH-SE, или имитация инфицирования. Блот слева инкубировали с моноклональным антителом Ai2G7, направленным против gpII EHV-1. Блот реплики справа инкубировали с коммерческой кроличьей гипериммунной сывороткой против гемагглютинаина H3 вируса гриппа А (PA5-34930).

- 1 - Инфицированные гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 P5 клетки;
- 2 - инфицированные гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 P10 клетки;
- 3 - инфицированные гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 P15 клетки;
- 4 - инфицированные гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 P20 клетки;
- 5 - инфицированные гEHV-1 RasH-mC70 клетки.

На фиг. 10А и 10В показаны титры вируса.

Средние значения титров в легких для групп через день и через три дня после заражения для индивидуальных групп животных (а) или для средних значений групп (b). Титры приведены как инфекционная доза 50% культуры ткани для свиного IAV на 1 г гомогената легких соответственно. Титры определяли как средние значения, которые определяли для левого и правого легкого на животное соответственно и исследовали гомогенат, который был получен из пула трех образцов легких соответственно. Негативная контрольная группа (негативный контроль), контрольная группа заражения (заражение), животные, вакцинированные однократно при использовании RasH-SE-70-p455-H3 (1× EHV-1), животные, вакцинированные дважды при использовании RasH-SE-70-p455-H3 (2× EHV-1), или животные, вакцинированные дважды коммерчески доступной инактивированной свиной вакциной IAV (2× инакт.).

На фиг. 11 показана карта плазмиды и нуклеотидная последовательность вектора переноса pU-1-3-p430-BGHNKBGN.

На фиг. 12 показана карта плазмиды и нуклеотидная последовательность плазмиды переноса pU1/3-p430-H1av-BGN_K_BGN для инсерции экспрессионной кассеты p430-H1av-BGN в ORF1/3 EHV-1 RasH, где

H1av - открытая рамка считывания, которая кодирует гемагглютинин H1 вируса гриппа А;

BGNpA - polyA последовательность бычьего гормона роста;

промотор arh - промотор прокариотического гена устойчивости к канамицину;

Kana - ген устойчивости к канамицину;

Flank B - сайт рекомбинации ниже сайта инсерции;

Flank A - сайт рекомбинации выше сайта инсерции;

p430 - новый промотор p430;

п.о. - пары оснований.

Фиг. 13 является схематической иллюстрацией генома гEHV-1 RasH-SE-1/3-p430-H1av с увеличенным участком инсерции ORF1/3, где

Logf1 - часть открытой рамки считывания 1, которая осталась, выше от сайта инсерции;

p430 - новый промотор, описанный в данной заявке (см., например, пример 1);

H1av - трансген гемагглютинаина вируса гриппа;

BGNpA - последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста;

orf3 - открытая рамка считывания 3 выше от сайта инсерции.

На фиг. 14 показан вестерн-блот и иммунофлуоресценция клеток, инфицированных при использовании гEHV-1 RasH-SE-1/3-p430-H1av, которая показывает экспрессию трансгена, где

H1av - гEHV-1 RasH-SE1/3-p430-H1av;

SE - гEHV-RasH-SE (контроль);

mock - неинфицированные клетки (контроль).

Фиг. 15 является схематической иллюстрацией генома гEHV-1 RasH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (гEHV-1-RasH-SE B) с увеличенными двумя участками инсерции, где

Logf1 - часть открытой рамки считывания 1, которая осталась выше сайта инсерции;

p430 - новый промотор;

H1av - трансген гемагглютинаина вируса гриппа;

BGNpA - последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста;

orf3 - открытая рамка считывания 3 выше сайта инсерции;

orf69 - открытая рамка считывания 69 выше сайта инсерции в orf70;

p455 - новый промотор;

H3 - трансген гемагглютинаина вируса гриппа;

71pA - новая последовательность полиаденилирования;

Logf70 - оставшаяся часть orf70, которая содержит промотор для orf71, кодирующая структурный

вирусный гликопротеин II (gpII).

На фиг. 16 показан вестерн-блот.

Вестерн-блот клеток, инфицированных гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (B), пустой вектор гEHV-1 RacH-SE (SE) или имитация инфекции (контроль). Блот реплик инкубировали либо с коммерческой кроличьей гипериммунной сывороткой к H3 (H3), коммерческой кроличьей гипериммунной сывороткой (PA 34929) к H1 (H1), либо моноклональным антителом Ai2G7 к EHV-1 gpII (gpII).

На фиг. 17 показаны средние значения температуры тела перед заражением, а также через 1, 2 и 3 дня после заражения. Значение погрешности, квадратическое отклонение. Слева направо в день исследования: группа негативного контроля (нег. контр.), группы контроля заражения (контр. зараж.), животные, вакцинированные однократно с помощью RacH-SE-70-p455-H3 (1× EHV-1), вакцинированные дважды RacH-SE-70-p455-H3 (2× EHV-1) или вакцинированные дважды инактивированной вакциной свиного IAV (2× убитая).

На фиг. 18 показаны средние значения показателей легких для групп через день и через три дня после заражения. Значения погрешности, квадратическое отклонение. Группа негативного контроля (негативн. контроль), группа контроля заражения (контр. зараж.), животные, вакцинированные однократно при использовании RacH-SE-70-p455-H3 1× EHV-1), вакцинированные дважды при использовании RacH-SE-70 p455-H3 (2× EHV-1) или вакцинированные дважды коммерчески доступной инактивированной вакциной свиной IAV (2× убитая).

На фиг. 19 показаны реципрокные значения титров сывороточной нейтрализации (SN) для сыворотки животных против заражения штаммом R452-14 свиного H3 IAV, которую брали на 20 день заражения, граница обнаружения. Группа негативного контроля (негат. контр.), группа контроля заражения (контр. зараж.), группа животных, вакцинированных однократно с помощью RacH-SE-70-p455-H3 (1× EHV-1), группа животных, вакцинированных дважды RacH-SE-70-p455-H3 (2× EHV-1), или вакцинированных дважды инактивированной вакциной свиного IAV (2× убитая).

На фиг. 20 показаны результаты относительно IL-1 β для BALF, взятые через один или два дня после осуществления заражения свиным IAV. Каждая точка представляет собой значение, определенное на одно животное. Группа негативного контроля (негат. контр.), группа контроля заражения (контр. зараж.), животные, вакцинированные однократно с помощью RacH-SE-70-p455-H3 (1× EHV-1), животные, вакцинированные дважды RacH-SE-70-p455-H3 (2× EHV-1), или животные, вакцинированные дважды инактивированной вакциной свиного IAV (2× убитая).

На фиг. 21 показаны результаты, полученные с помощью IFN γ -ELISpots мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), повторно стимулированных через 7 дней после второй вакцинации. (A) Невакцинированная контрольная группа; (B) вакцинированные дважды инактивированной вакциной IAV для свиней; (C) однократно вакцинированные гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3; (D) дважды вакцинированные гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3. Для животных, вакцинированных однократно при использовании гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, повторная стимуляция соответствовала 7 дням после первой стимуляции. Каждая точка представляет собой значение, определенное на одно животное для данной точки времени и после повторной стимуляции с помощью специфических стимулов. Для повторной стимуляции использовали рекомбинантно экспрессированный HA IAV, который соответствует вакцинному H3 антигену в гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (HAV), рекомбинантно экспрессированный HA IAV, который соответствует H3 штамма для заражения R452-14 (HACH), среда для разведения HAV и HACH (RPMI), пустой вектор EHV-1 RacH-SE (EHV-1 пустой), вакцину RacH-SE-70 p455-H3 (EHV-1-H3), H3N2 штамм свиного IAV для заражения R452-14 (H3N2), супернатант клеток, полученный из неинфицированных клеток, которые использовали для выращивания R452-14 (MDCK) или рекомбинантно экспрессированный свиной нуклеопротеин (NP) IAV.

На фиг. 22 показана схематическая карта плазмиды для переноса pU1/3-p430-H1hu-BGHKBGH.

На фиг. 23 показана схематическая карта плазмиды для переноса pU70-p455-H1pdm-71K71.

На фиг. 24 показан линейный двухцепочечный ДНК геном гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm (гEHV-1 RacH-SE_D) с увеличенными участками инсерции ORF1/3 и orf70.

На фиг. 25 показана вестерн-блот клеток, инфицированных гEHV-1 RacH-SE_B, RacH-SE_D, RacH-SE или неинфицированных клеток (контр.). Блот реплик инкубировали либо с поликлональной кроличьей гипериммунной сывороткой, направленной против H3 (PA5-34930), поликлональной кроличьей гипериммунной сывороткой, направленной против H1 (PA5-34929), либо моноклональным антителом (Ai2G7) против гликопротеина II EHV-1 (gpII). Все антитела обеспечивали получение ожидаемых моделей, что подтверждало экспрессию желаемых антигенов H3 и H1 и сопоставимую эффективность репликации различных вирусов, как было оценено из весьма подобного окрашивания EHV-1 gpII во всех образцах инфицированных клеток.

На фиг. 26 показано графическое представление среднего значения нейтрализующей способности мышинной сыворотки против вирусов гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)) или (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)). Нейтрализующую способность рассчитывали путем многократного разведения сыворотки и соответствующего титра, который был нейтрализован с помощью этой сыворотки.

Средние значения трех тестов затем делили на 100, чтобы отобразить нейтрализацию 100 TCID₅₀. Значения погрешностей показывают квадратическое отклонение.

На фиг. 27 показаны титры свиного IAV в легких, которые определяли как TCID₅₀/г ткани легких для животных, которых забивали через день после заражения, негат. контр., группа негативного контроля; контр. зараж., группа контроля заражения; 2× ВМ, группа, которую подвергали внутримышечной вакцинации двукратно; ИН+ВМ, группа, которую вакцинировали первый раз интраназально, а второй раз - внутримышечно; 2× ИН, группа, которую подвергали двукратной вакцинации интраназально. Точки данных указывают на средние значения, полученные для отдельных животных. Средние горизонтальные линии показывают средние значения для группы соответственно. Верхняя и нижняя горизонтальные линии показывают стандартные отклонения соответственно. Значение *p* для парных статистических сравнений групп приведены ниже, они рассчитаны при использовании *t*-критерия, теста Манна-Уитни и программного обеспечения GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, США, при использовании стандартных параметров программного обеспечения соответственно.

На фиг. 28 показаны титры свиного IAV в легких, которые определяли как TCID₅₀/г ткани легких для животных, которых забивали через три дня после заражения, негат. контр., группа негативного контроля; контр. зараж., группа контроля заражения; 2× ВМ, группа, которую подвергали внутримышечной вакцинации двукратно; ИН+ВМ, группа, которую вакцинировали первый раз интраназально, а второй раз - внутримышечно; 2× ИН, группа, которую подвергали двукратной вакцинации интраназально. Точки данных указывают на средние значения, полученные для отдельных животных. Средние горизонтальные линии показывают средние значения для группы соответственно. Верхняя и нижняя горизонтальные линии показывают стандартные отклонения соответственно. Значение *p* для парных статистических сравнений групп приведены ниже, они рассчитаны при использовании *t*-критерия, теста Манна-Уитни и программного обеспечения GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, при использовании стандартных параметров программного обеспечения соответственно.

На фиг. 29 показаны титры свиного IAV в легких, которые определяли как TCID₅₀/г ткани легких для животных, которых забивали через пять дней после заражения, негат. контр., группа негативного контроля; контр. зараж., группа контроля заражения; 2× ВМ, группа, которую подвергали внутримышечной вакцинации двукратно; ИН+ВМ, группа, которую вакцинировали первый раз интраназально, а второй раз - внутримышечно; 2× ИН, группа, которую подвергали двукратной вакцинации интраназально. Точки данных указывают на средние значения, полученные для отдельных животных. Средние горизонтальные линии показывают средние значения для группы соответственно. Верхняя и нижняя горизонтальные линии показывают стандартные отклонения соответственно. Значение *p* для парных статистических сравнений групп приведены ниже, они рассчитаны при использовании *t*-критерия, теста Манна-Уитни и программного обеспечения GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, при использовании стандартных параметров программного обеспечения соответственно.

На фиг. 30 показаны результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), специфического для свиного иммуноглобулина G (IgG), направленного против рекомбинантно экспрессирующегося антигена гемагглютинина Н3 свиного IAV, который является гомологичными Н3, экспрессируемому вакцинным штаммом гЕНV-1 РасН-SE_В. Для анализа каждую ячейку покрывали при использовании 100 нг рекомбинантно экспрессирующегося Н3. Образцы измеряли попарно, средние значения образца вычисляли из попарных измерений и значение для группы вычисляли из средних значений образца соответственно. Контр. заражения, группа контроля заражения; 2× ВМ, группа, которую подвергали внутримышечной вакцинации двукратно; ИН+ВМ, группа, которую вакцинировали первый раз интраназально, а второй раз - внутримышечно; 2× ИН, группа, которую подвергали двукратной вакцинации интраназально. Значения погрешностей показывают квадратическое отклонение. Дни исследования (SD) указываются в скобках справа от графика.

На фиг. 31 показаны результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), специфического для свиного иммуноглобулина G (IgG), направленного против рекомбинантно экспрессирующегося антигена гемагглютинина Н3 свиного IAV, который является гомологичным Н3, экспрессируемому вакцинным штаммом гЕНV-1 РасН-SE_В. Для анализа каждую ячейку покрывали при использовании 100 нг рекомбинантно экспрессирующегося Н3. Образцы измеряли попарно, средние значения образца вычисляли из попарных измерений, а значение для группы вычисляли из средних значений образца соответственно. Контр. зараж., группа контроля заражения; 2× ВМ, группа, которую подвергали внутримышечной вакцинации двукратно; ИН+ВМ, группа, которую вакцинировали первый раз интраназально, а второй раз - внутримышечно; 2× ИН, группа, которую подвергали двукратной вакцинации интраназально. Значения погрешностей показывают квадратическое отклонение. Дни исследования (SD) указываются в скобках справа от графика.

На фиг. 32 показаны результаты специфического для гамма-интерферона твердофазного иммуноферментного капельного анализа (IFN γ ELISpot). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из крови, взятой в исследуемых животных на 28 день (SD28). Затем PBMC повторно стимулировали либо при использовании Н3N2 из штамма для заражения R452-14 свиного IAV при крат-

ности инфицирования 1 (H3N2 MOI 1) или при использовании рекомбинантно экспрессирующегося антигена гемагглютинаина H3 свиного IAV, который является гомологичным H3, экспрессируемому вакцинным штаммом gEHV-1 RasH-SE_B в концентрации 1 мкг/мл (гH3 1 мкг/мл). Используя повторно стимулированные РВМС, проводили специфический для гамма-интерферона твердофазный иммуноферментный капельный анализ (IFN γ ELISpot) и полученные значения нормализовали до 10 клеток и подсчитывали как среднее значение на группу соответственно. Контр. заражения, группа контроля заражения; 2 \times ВМ, группа, которую подвергали внутримышечной вакцинации двукратно; ИН+ВМ, группа, которую вакцинировали первый раз интраназально, а второй раз - внутримышечно; 2 \times ИН, группа, которую подвергали двукратной вакцинации интраназально. Значения погрешностей показывают квадратическое отклонение.

На фиг. 33 показаны результаты специфического для гамма-интерферона твердофазного иммуноферментного капельного анализа (IFN γ ELISpot). Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из крови, взятой у исследуемых животных на 28 день после заражения (SD28). Затем РВМС повторно стимулировали либо при использовании H3N2 из штамма для заражения R452-14 свиного IAV при кратности инфицирования 1 (H3N2 MOI 1), либо при использовании рекомбинантно экспрессирующегося антигена гемагглютинаина H3 свиного IAV, который является гомологичным H3, который экспрессируется вакцинным штаммом gEHV-1 RasH-SE_B в концентрации 1 мкг/мл (гH3 1 мкг/мл). Используя повторно стимулированные РВМС, проводили специфический для гамма-интерферона твердофазный иммуноферментный капельный анализ (IFN γ ELISpot) и полученные значения нормализовали до 10⁶ клеток и подсчитывали как среднее значение на группу соответственно. Контр. заражения, группа контроля заражения; 2 \times ВМ, группа, которую подвергали внутримышечной вакцинации двукратно; ИН+ВМ, группа, которую вакцинировали первый раз интраназально, а второй раз - внутримышечно; 2 \times ИН, группа, которую подвергали двукратной вакцинации интраназально. Значения погрешностей показывают квадратическое отклонение.

На фиг. 34 показаны результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), специфического для свиного иммуноглобулина G (IgG), направленного против рекомбинантно экспрессирующегося антигена нуклеопротеина (NP) свиного IAV. Для анализа каждую ячейку покрывали при использовании 100 нг рекомбинантно экспрессирующегося NP. Образцы измеряли попарно, средние значения образца вычисляли с попарных измерений, и значение для группы вычисляли из средних значений образца соответственно. Позитив. контр., позитивный контроль, негат. контр., группа негативного контроля, 2 \times ВМ, группа вакцинированных животных, которую подвергали внутримышечной вакцинации двукратно; ИН+ВМ, группа, которую вакцинировали первый раз интраназально, а второй раз - внутримышечно; 2 \times ИН, группа, которую подвергали двукратной вакцинации интраназально. Значения погрешностей показывают квадратическое отклонение. Дни исследования (SD) указываются в скобках справа от графика.

Обзор последовательностей

Следующие последовательности подробно описаны и раскрыты в данном изобретении.

Промоторы.

SEQ ID NO: 1: EHV-4 600 п.о. последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты 4pgG600.

SEQ ID NO: 2: EHV-4 600 п.о. последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты 4rVCP600.

SEQ ID NO: 3: EHV-4 430 п.о. последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты r430.

SEQ ID NO: 4: EHV-4 449 п.о. последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты r455.

SEQ ID NO: 5: праймер номер 1130, специфичный для *orf72*.

SEQ ID NO: 6: праймер номер 1131, специфичный для *orf72*.

SEQ ID NO: 7: праймер номер 1079, специфичный для *mCherry*.

SEQ ID NO: 8: праймер номер 1080, специфичный для *mCherry*.

Сайт инсерции.

SEQ ID NO: 9: искусственная последовательность нуклеиновой кислоты праймера ПЦР 1017 для участка инсерции *orf70*.

SEQ ID NO: 10: искусственная последовательность нуклеиновой кислоты праймера ПЦР 1018 для участка инсерции *orf70*.

SEQ ID NO: 11: искусственная последовательность нуклеиновой кислоты праймера ПЦР 1007 для участка инсерции ORF1/3.

SEQ ID NO: 12: искусственная последовательность нуклеиновой кислоты праймера ПЦР 1008 для участка инсерции ORF1/3.

SEQ ID NO: 13: левый (Up70) фланкирующий участок (417 п.о.).

SEQ ID NO: 14: правый (Up71) фланкирующий участок (431 п.о.).

SEQ ID NO: 15: левый фланкирующий участок (до *orf70*) в штамме ab4 EHV-1 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), расположенный в нуклеотидах 127264-127680.

SEQ ID NO: 16: правый фланкирующий участок (до *orf71*) в штамме ab4 EHV-1 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), расположенный в нуклеотидах 128484-128913.

SEQ ID NO: 17: укороченный фланкирующий участок в системе RED: левый (Up70) фланкирующий участок (283 п.о.) = идентичен 3' 283 п.о. "классического" фланкирующего участка размером 417 п.о.

SEQ ID NO: 18: укороченный фланкирующий участок в системе RED: правый (Up71) фланкирующий участок (144 п.о.) = идентичен 5' 144 п.о. "классического" фланкирующего участка размером 431 п.о.

SEQ ID NO: 19: удаленная часть в геномной последовательности ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), нуклеотиды 127681-128482.

SEQ ID NO: 20: удаленная часть в геномной последовательности RasH (нет доступной информации по количеству нуклеотидов, поскольку полная геномная последовательность не известна).

Последовательности плазмиды/вектора.

SEQ ID NO: 21: нуклеотидная последовательность плазмиды для переноса pU-mC70-BGH.

SEQ ID NO: 22: нуклеотидная последовательность вектора для переноса pU70-p455-71K71.

SEQ ID NO: 23: нуклеотидная последовательность плазмиды для переноса pU70-p455-H3-71K71.

SEQ ID NO: 24: нуклеотидная последовательность вектора для переноса pU-1-3-p430-BGHKBGH.

SEQ ID NO: 25: нуклеотидная последовательность плазмиды для переноса pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH.

Последовательности гемагглютинаина.

SEQ ID NO: 26: гемагглютинин [вирус гриппа A (A/swine/Italy/116114/2010 (H1N2))].

GenBank: ADR01746.1 H1pdm.

SEQ ID NO: 27: гемагглютинин [вирус гриппа A (A/swine/Italy/7680/2001 (H3N2))].

GenBank: ABS50302.2 H3.

SEQ ID NO: 28: гемагглютинин [вирус гриппа A (A/swine/Gent/132/2005 (H1N1))].

GenBank: AFR76623.1 H1av.

SEQ ID NO: 29: гемагглютинин [вирус гриппа A (A/swine/Italy/4675/2003 (H1N2))].

GenBank: ADK98476.1 * H1hu.

* Аминокислота 531 (X, стоп-кодон, заменен на I).

Примеры

Приведенные ниже примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что способы, раскрытые в примерах, представляют собой методы, которые раскрыты изобретателями для лучшего осуществления данного изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы его практического осуществления. Однако специалистам в данной области техники должно быть очевидным в контексте данного описания, что много изменений может быть сделано в конкретных вариантах, которые раскрыты, при этом также удается получить похожий или аналогичный результат без отхода от сущности и объема данного изобретения.

Пример 1. Создание нового сайта инсерции ORF70.

С целью усиления возможностей вектора EHV-1 изобретатели стремились найти способ экспрессии двух различных трансгенов с одного векторного скелета без слияния двух трансгенов с помощью функций, имеющих происхождение от РНК-вируса, под контролем одного промотора. Авторы изобретения выдвинули гипотезу, что геном вируса герпеса будет толерантным к параллельному использованию двух независимых сайтов инсерции трансгенов. Чтобы определить, является ли ORF70 EHV-1 пригодным сайтом для инсерции трансгенов, 801 пар оснований 5'-конца *orf70* (1236 п.о.) заменяли на экспрессионную кассету, которая кодирует аутофлуоресцентный белок mCherry (Shaner и др., 2004), при использовании классической гомологичной рекомбинации (фиг. 1B). Карта плазмиды pU-mC70-BGH является представленной на фиг. 2 (SEQ ID NO: 21).

Фрагмент ДНК, который использовался для гомологичной рекомбинации, вырезали из pU-mC70-BGH вместе с XbaI. Очищенный при использовании геля фрагмент подвергали ко-трансфекции с вирусной геномной ДНК EHV-1 RasH в клетки RK13. Эффективное восстановление рекомбинантного вирусного вектора и эффективная репликация в культивируемых клетках были продемонстрированы с помощью живой флуоресценции и титрования вируса (не показаны). Делеция двух третей *orf70* имела дополнительное преимущество, которое заключалось в том, что экспрессия гликопротеина G, который кодируется *orf70*, была прекращена. Показано, что гликопротеин G EHV-1 является неструктурным, секретлируемым хемокинсвязывающим белком, который действует против иммунного ответа хозяина (Drummer и др., 1998; Bruyat и др., 2003). Поскольку векторная вакцина является предназначенной для стимулирования иммунного ответа у вакцинированного субъекта, удаление этой особенной иммуносупрессивной функции вирусного вектора может дополнительно улучшить продуктивность вирусного вектора, который основывается на EHV-1 RasH-SE.

Пример 2. Идентификация и конструирование новых промоторов.

Стратегия идентификации соответствующих промоторных последовательностей была следующей: фрагменты последовательности EHV-4 размером 600 п.о., расположенные выше двух известных *orf*, подвергали анализу сначала путем выравнивания с соответствующими фрагментами последовательности генома EHV-1. Выбранные гены представляли собой *orf42*, кодирующий основной капсидный белок (MCP), и *orf70*, кодирующий гликопротеин G (gG). Основной капсидный белок является одной из наибо-

лее распространенных составляющих вириона и необходим для самосборки капсидов в ядре клетки, как только новая синтезированная вирусная ДНК является готовой для сборки. Таким образом, ожидается, что его промотор будет активным как ранний, так и поздний в цикле вирусной репликации. Для гликопротеина G известно, что его ген (*orf70*) является активным также как ранний и поздний в цикле репликации (Colle и др., 1995; Drummer и др., 1998). Идентичность последовательности составляла 82,2% для путативного промотора MCP и 82,3% для путативного промотора gG. Эти различия считались достаточно большими для предотвращения гомологичной рекомбинации, с одной стороны, и достаточно малыми, чтобы позволить осуществлять активацию транскрипции во время репликации EHV-1, с другой стороны. Для того чтобы проверить активность промотора, фрагменты ДНК размером 600 п.о.

4pgG600:

GCAGACTTTGGAGCAGCACAATTTCCGGTTGTGGACCCCATGGACCTTGGTTTGG
 CTGGTACCGTGGAAACTAACGCTCCGGAAGTTTTGGCCAGAGCAAAATACAATTC
 GAAGGTAGACATATGGAGCGCCGGAATAGTTCTGTTTAAAATGCTCGCATATCCA
 TCAACTCTATTTGAGGACCCGCCGAGTACCCCAAGAGTATGTAAAAAGCTGTC
 ATTCTCAACTACTGAGAATAATATCAAAGCTAAAGATAAACCTGAGGAGTTTCC
 ACGGGAACCAGAGTCTAGGCTCGTGC GCGGATACATCGAATACGCCAGCCTAGA
 GCGTAAGCCACATACGCGCTATCCTTGCTTCCAGCGCGTGAACCTACACATTGAC
 GGGGAATTTTTGATCCATAAAATGCTAGCGTTCAATGCTGCGATGCGCCATCCG
 CAGAAGAGTTGTTGTCCTACCCAATGTTTATGAATCTGTAGGATGACTAACAGAT
 TTGGGGTGGAGACGGCGTGGGCGATACTGTATAAAGTTGTACTACTTACCAGCCC
 AGTCAAGTGTGCTGTAGTGCCACCACCTGTAAAGCTGTGATAAGCTGCAGTT (SEQ
 ID NO: 1) и

4pMCP600:

AGCTGGGGGAGTTTGTACTATAGTGTATTACATGCGGCTTGAATAACTGCCTGG
 TTTATGTTTCGCAACATTCAAGCAGACATGCTACCGCTAAACACTTTGCAACAATT
 TTTTATTGGGTGTTTGGCCTTTGGTAGAACTGTCGCGTTTTTTGGTGGTAGCATATA
 CTACCTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTCAGCATGCTAGCACCCAACGCCGAG
 CGAGAGTATATAACTCCCATCATTGCCCAAGCTTATGCCACTTATTAGCGTCC
 GCTCTGCCGTTTGCTTAGTCATAATATCTACCGCGTTTACGCAGCAGACGCTATC
 TGCGACACAATTGGATTTGCGATACCGCGCATGTGGATGTGATTTTAATGAGAT
 CAACCTCCATGAAGCGTAACTAGGGGGCCTCCCACTGAGGCACTACCGGCTTAGC
 AGCTGACTAACACAGTATAAAACGTGAGAAGAAATCAGTCTCATGCGCCATTAG
 CGTAGGCTAGTTAGCGTGGAGGACCGGAGCGCTACCGCCAGCAGTTTCATCCGC
 CTGGTTACGGGTTTGTTAACACCTACCGGTGTTTTACCGCTACCATA (SEQ ID NO: 2)

были синтезированы и клонированы выше репортерного гена, кодирующего аутофлуоресцентный белок mCherry (Shaner и др., 2004). Как сигнал терминации транскрипции и стабилизирующую функцию для мРНК последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHpA; Goodwin & Rottman, 1992) клонировали непосредственно ниже на 3'-конце репортерного гена.

Для использования в качестве положительного контроля промотор CMV амплифицировали из коммерчески доступной плазмиды pcDNA3.1 (Invitrogen) и клонировали выше репортерного гена mCherry, а также добавляли BGHpA на 3'-конце репортерного гена. Культуры клеток трансфицировали тремя плазмидами (pBlu-4pgGmCherry, pBlu-4pMCPmCherry и pBlu-CMVmCherry) и проверяли с помощью флуоресцентной микроскопии на флуоресценцию mCherry. Сильная активность промотора CMV была очевидной в различные моменты времени после трансфекции.

Промотор 4pgG600 также был активным после трансфекции, активность промотора 4pMCP600 также проявлялась, но была слабой по сравнению с промотором 4pgG600 даже тогда, когда она сравнивалась с промотором CMV через три дня после трансфекции.

Для того чтобы исследовать эффект продуктов вирусного гена на активность промотора, культуры клеток, трансфицированные либо pBlu-4pgG600-mCherry, либо pBlu-4pMCP600-mCherry, суперинфицировали через день после трансфекции зеленым флуоресцентным EHV-1 RacHI-EF. Продукты вирусного гена явным образом трансаktivировали промотор 4pMCP600 до значительно более высокой активности, чем при отсутствии репликации EHV-1 RacHI-EF. Эффект также присутствовал в культурах клеток, трансфицированных pBlu-4pgG600-mCherry и суперинфицированных EHV-1 RacHI-EF, хотя и не столь сильно, поскольку начальная активность при отсутствии вирусной репликации была выше, чем наблюда-

ли для pBlu-4pMCP600-mCherry. Однако для обоих промоторов размером 600 п.о. было продемонстрировано трансактивирующий эффект вирусной репликации на их активность в культурах клеток.

Этот эффект можно объяснить тем, что 600 п.о. последовательность содержит репрессорные элементы, которые обычно расположены выше элементов активатора. В соответствии с этим более короткий промотор может быть более активным при отсутствии генных продуктов вируса. Для проверки этого обе последовательности промотора ENV-4 были укорочены приблизительно до 75% от их первоначальной длины и снова проверены.

В частности, 600 п.о. промоторы были укорочены

до 430 п.о. для 4pgG, который имел новое название: p430:

TCTATTTGAGGACCCGCCGAGTACCCACACAAGAGTATGTAAAAAGCTGTCATTCT
 СААСТАСТGAGAАТААТАТСААAGCTAAAGATAAACCCCTGAGGAGTTTCCACGG
 GAACCAGAGTCTAGGCTCGTGCGCGGATACATCGAATACGCCAGCCTAGAGCGT
 AAGCCACATACGCGCTATCCTTGCTTCCAGCGCGTGAACCTACACATTGACGGGG
 ААТТТТТGATCCATAAAATGCTAGCGTTCAATGCTGCGATGCGCCCATCCGCAGA
 AGAGTTGTTGTCTACCCAATGTTTATGAATCTGTAGGATGACTAACAGATTTGG
 GGTGGAGACGGCGTGGGCGATACTGTATAAAGTTGTACTACTTACCAGCCCAGTC
 AGTGTGCTGTAGTGCCACCACCTGTAAAGCTGTGATAAGCTGCAGTT (SEQ ID NO: 3) и

до 449 п.о. для 4pMCP, который имел новое название: p455:

TTGGTGGTAGCATATACTACCTTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTCAGCATGCT
 AGCACCCAACGCCGAGCGAGAGTATAAАCTCCATCATTGCCACAAGCTTATG
 CCACTTATTAGCGTCCGCTCTGCCGTTTGCTTAGTCATAATATCTACCGCCGTTTA
 CGCAGCAGACGCTATCTGCGACACAATTGGATTTGCGATACCGCGCATGTGGATG
 TGTATTTTAATGAGATCAACCTCCATGAAGCGTAACTAGGGGGCCTCCCACTGAG
 GCACTACCGGCTTAGCAGCTGACTAACACAGTATAAACGTGAGAAGAAATCAG
 TCTCATGCGCCATTAGCGCTAGGCTAGTTAGCGTGGAGGACCGGAGCGCTACCGC
 CAGCAGTTTTCATCCGCTGGTTACGGGTTTGTTAACACCTACCGGTGTTTTACCGC
 TACCATA (SEQ ID NO: 4).

mCherry репортерные плазмиды, содержащие укороченные промоторы, трансфицировали в культуры клеток и проверяли с помощью флуоресцентной микроскопии. Хотя активность p430 была сравнима с активностью версии 600 п.о. (4pgG600), активность p455 значительно увеличивалась по сравнению с активностью 4pMCP600. Этот результат был в соответствии с результатами экспериментов по трансфекции/суперинфекции при использовании версий 600 п.о. двух промоторов, а именно подтверждал, что присутствие репликации ENV-1 в одной клетке обеспечивает механизм трансактивации промотора 4pMCP600, который сильно увеличивал свою активность, в то время как трансактивация промотора 4pgG600 была заметна, но менее выражена.

В дополнение к двум новым промоторам, также была нужна новая polyA последовательность для экспрессии в новом orf70 сайте инсерции. Элемент назывался 71pA. Его нуклеотидную последовательность синтезировали и клонировали ниже от orf mCherry в плаزمиде для переноса, которые содержали p455, нацеленный на инсерционный сайт orf70 в pRacH-SE.

Затем получали гENV-1 RacH-SE для анализа промоторной активности на фоне репликации вируса (табл. 1). Два промотора ENV-4 (p430 и p455), промотор CMV и промотор IE1 мышиноного цитомегаловируса (MCMV) использовали для направленной экспрессии mCherry в комбинации с polyA сигналом BGH для повышения стабильности мРНК. Промотор MCMV IE1 (энхансер), как описано Dorsch-Häsler и др. (1985), синтезировали и клонировали в плазмидном векторе, с которого его субклонировали в плазмиду для переноса. Кроме того, p455 также клонировали в новый сайт инсерции в orf70, который направляет экспрессию mCherry в сочетании с новым сигналом полиаденилирования 71aA. гENV-1 RacHmC70 был включен в эксперименты как второй контроль. Клетки, инфицированные этим рекомбинантным вирусом, экспрессировали mCherry под контролем эндогенного промотора gG (egGp) (табл. 1).

Таблица 1

Название	ORF1/3 сайт инсерции			Orf70 сайт инсерции		
	<i>промотор</i>	<i>репортер</i>	<i>polyA</i>	<i>промотор</i>	<i>репортер</i>	<i>polyA</i>
1/3-CMV-mC	HCMV IE1	mCherry	BGH	отсутствует	отсутствует	отсутствует
1/3-MCMV-mC	MCMV IE1	mCherry	BGH	отсутствует	отсутствует	отсутствует
1/3-p455-mC	p455	mCherry	BGH	отсутствует	отсутствует	отсутствует
1/3-p430-mC	p430	mCherry	BGH	отсутствует	отсутствует	отсутствует
70-egGp-mC	отсутствует	отсутствует	отсутствует	эндогенный gG	mCherry	BGH
70-p455-mC	отсутствует	отсутствует	отсутствует	p455	mCherry	71pA

Клетки VERO или PK/WRL инфицировали всеми шестью вирусами, которые экспрессируют mCherry при MOI (множественность заражения, МЗ) 1. Инфицированные клетки собирали через 0, 4, 8 и 12 ч после инфицирования, и получали общую РНК. Вирусная и клеточная геномная ДНК, которая загрязняла препараты РНК, была разрушена путем переваривания при использовании ДНКазы I. Целостность РНК и удаление вирусной ДНК было продемонстрировано обратной транскрипцией с добавлением и без добавления обратной транскриптазы с последующим проведением ПЦР с парой праймеров, специфичных для orf72 (праймеры номера 1130/1131 (TGTCTACSTTCAAGCTTATG (SEQ ID NO: 5)/CTAGCGCAGTCGCGTTG (SEQ ID NO: 6)), кодирующих эссенциальный структурный гликопротеин D EHV-1. Ожидаемый продукт ПЦР размером 196 п.о. амплифицировали только с обратно транскрибированных образцов (кДНК), где добавляли обратную транскриптазу, в частности образцы, полученные в момент времени $t_1=4$ ч после заражения, $t_2=8$ ч после заражения и $t_3=12$ ч после заражения, но не из образцов, полученных при $t_0=0$ ч после заражения. Все образцы, где обратная транскриптаза не прибавлялась к реакционной смеси, не давали продукта ПЦР, как и ожидалось. Таким образом, было показано, что образцы (кДНК), которые должны использоваться в качестве матрицы для кПЛР, не содержали вирусной геномной ДНК.

кДНК, полученные в результате обратной транскрипции с добавленным ферментом, затем подвергали анализу с помощью количественной ПЦР, используя пару праймеров, специфичных для mCherry (праймеры номер 1079/1080 (GCGAGGAGGATAACATGG (SEQ ID NO: 7)/ACCSTTGGTCACSTTTCAG (SEQ ID NO: 8)) и пару orf72 праймеров 1130/1131 (TGTCTACSTTCAAGCTTATG (SEQ ID NO: 5)/CTAGCGCAGTCGCGTTG (SEQ ID NO: 6)). Значение C_t (порог цикла) количественной ПЦР для orf72 использовали для оценки сопоставимости различных вирусных инфекций, протекающих параллельно и для нормализации значений C_t для количественной ПЦР mCherry. Таким образом, транскрипция mCherry была количественно определена относительно времени после инфекции и относительно различных вирусов (фиг. 3).

Как показано на фиг. 3А, значения C_t для транскриптов orf72 были почти идентичными для шести различных вирусов в четыре различные моменты времени после инфицирования. В идеале все шесть вирусов могли бы иметь идентичные значения в исследованные моменты времени и только одна линия была бы видимой. Почти одинаковые линии подтвердили достаточное качество эксперимента, а также тот факт, что результаты, полученные в момент времени 12 ч после инфекции, являются валидными, поскольку уменьшение по сравнению с 8 ч после инфекции указывает на дальнейшее увеличение количества транскриптов, что возможно только тогда, когда репликация еще не прошла своего максимума. Подсчитывали статистическое среднее значение каждого вируса в каждый момент времени после инфекции. Значение для каждого вируса в определенный момент времени делили на среднее значение, рассчитанное за это время, и использовали как фактор, который вместе с C_t -значениями количественной ПЦР для mCherry нормализовали, чтобы сделать их непосредственно сопоставимыми. Нормализованные C_t -значения количественной ПЦР mCherry графически представлены на правом графике на фиг. 3В. Расхождение линий указывает на различия в количестве транскриптов mCherry, образующихся в различных инфицированных вирусом клетках.

В другом типе диаграммы два эксперимента, один при использовании клеток VERO-EU (V), а другой при использовании клеток PK/WRL (P) сочетали (фиг. 4). Качество препаратов РНК и репликацию вируса в течение времени подтверждали так, как описано выше, путем обратной транскрипции с и без обратной транскриптазы с последующим проведением ПЦР с праймерами orf72. Величины C_t количественной ПЦР, полученные для mCherry, были нормализованы так, как описано выше, на основе значений C_t количественной ПЦР для orf72. Нормализованные значения C_t $t_1=4$ ч после инфекции; $t_2=8$ ч после инфекции, $t_3=12$ ч после инфекции отнимали от нормализованного значения C_t при t_0 (дельта нормализованное C_t), что приводило к получению положительной корреляции с транскрипционной активностью.

Несмотря на то что два эксперимента в клетках VERO (V) или клетках PK/WRL (P) не могут непосредственно сравниваться, более высокие уровни экспрессии в PK/WRL клетках, скорее всего, отражают лучшую перmissивность клеток PK/WRL для репликации EHV 1, что обычно приводит к десятикратно-

му увеличению титров инфекционного вируса.

В то время как активность промоторов, имеющих происхождение от EHV, p430, p455 и egGp была почти одинаковой в соответствующие моменты времени после инфекции для используемой линии клеток, независимо от места их инсерции или используемого polyA (BGH или 71pA), активность промоторов CMV и MCMV была выше в клетках PK/WRL. В клетках VERO-EU было показано, что только промотор MCMV имеет более высокую активность, промотор CMV не превосходил промоторов EHV.

Из этих экспериментов был сделан вывод, что промоторы EHV-4 p430 и p455 были пригодны для использования в скелете EHV-1 RacH для контроля экспрессии встроенных трансгенов с обоих участков вставки ORF1/3 и ogf70.

Пример 3. Применение нового промотора p455 в рекомбинантном векторе EHV-1 вакцин и конструирование рекомбинантного вируса.

Промотор p455.

Для первого эксперимента на животных использовали гемагглютинин подтипа H3 вируса гриппа, который имеет происхождение от свиней (A/swine/Italy/7680/2001 (H3N2), номер доступа GenBank: ABS50302.2), SEQ ID NO: 27. Его кодирующую последовательность синтезировали и субклонировали в вектор для переноса pU70-p455-71K71 (фиг. 5), получая вектор переноса pU70-p455-H3-71K71 и размещая H3 под контролем нового промотора p455 и нового 71pA сигнала полиаденилирования, а также фраймируя кассету участками рекомбинации для введения в ogf70 (фиг. 6).

С помощью мутагенеза *en-passant* при использовании рекомбинационной системы RED (Tischer и др., 2006) кассету экспрессии p455-H3-71 встраивали в ogf70 pRacH-SE для получения pRacH-SE70-p455-H3 (фиг. 7).

Клетки PK/WRL трансфицировали при использовании pRacH-SE70-p455-H3, освобождали рекомбинантный вирус гEHV-1 RacH-SE70-p455-H3 и дважды очищали, используя материал единичной бляшки. Правильность инсерции экспрессионной кассеты проверяли путем секвенирования продукта участка инсерции при использовании высокоточной ПЦП с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции (ИФА, фиг. 8).

Восстановление ogf71, кодирующего EHV-1 gpII, было подтверждено путем ИФА (не показано) и вестерн-блотом (фиг. 9) при использовании моноклонального антитела Ai2G7 (принадлежащего Бёрингер Ингельхайм). Внешний вид тримеров H3 на плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью анализа гемадсорбции при использовании куриных эритроцитов (не показано). Пики титров, определенные как TCID₅₀/мл в клетках PK/WRL, были в том же диапазоне, что и титры родительского вируса гEHV-1 RacH-SE, что указывает на то, что экспрессия трансгенов не проявляет вредного воздействия на репликацию вируса (не показано). Это было подтверждено путем пассирования гEHV-1 RacH-SE70-p455-H3 в клетках PK/WRL вплоть до пассажа 20 (P20) после высвобождения. В пассажах P5, P10, P15 и P20 вирус характеризовали путем титрования, секвенирования и вестерн-блота (фиг. 9).

Два блота, которые показаны на фиг. 9, являются репликами, которые инкубировали либо с моноклональным антителом Ai2G7 (слева), которое специфически выявляет гликопротеин II (gpII) EHV-1, либо с коммерческим поликлональным кроличьим антителом (PA5-34930), которое вырабатывается в ответ на гемагглютинин подтипа H3 гриппа (справа), gpII выявляли во всех культурах клеток, инфицированных рекомбинантным EHV-1, как и ожидалось. Полноразмерный H3 был обнаружен во всех клетках, инфицированных различными пассажами гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, как и ожидалось. Специфичность антисыворотки к H3 была показана в том же вестерн-блоте, см. дорожку gG430mC. При этом только gpII моноклональное антитело проявляло реакцию, как и ожидалось, в то время как антитело против H3 не связывалось в соответствующей дорожке реплик.

Методом двойной иммунофлуоресценции (ДИФА) вирусных бляшек в клетках, инфицированных P20, и при использовании моноклонального антитела против H3 и конской анти-EHV сыворотки, было подтверждено, что практически все бляшки, индуцированные EHV-1, также экспрессируют H3 (не показано). Все анализы подтвердили стабильность рекомбинантного EHV-1 RacH-SE-70-p455-H3.

Пример 4. Подтверждение концепции исследования животных (РОС I) при использовании промотора p455 и оценки серологического ответа.

Тест на животных: критерии включения и модель эксперимента.

Пять групп, состоявших из десяти поросят, родившихся от свиноматок, которые никогда не были инфицированы вирусом гриппа А, были включены в исследование РОС-I, как представлено в табл. 2.

Таблица 2

Группа	Обработка вакциной	Кол-во животных	Путь введения	Доза
1	1x NaCl; 1x EHV1 векторная вакцина	10	в/м	2 мл NaCl; 2 мл EHV1, 1,00 x 10 ⁷ TCID ₅₀
2	2x EHV1 векторная вакцина	10	в/м	2x 2 мл EHV1, 1,00 x 10 ⁷ TCID ₅₀
3	2x NaCl	10	в/м	2x 2 мл NaCl
4	2x инактивированная вакцина	10	в/м	2x 2 мл инакт.
5	2x NaCl	10	в/м	2x 2 мл NaCl
Группа	Заражение	Кол-во животных	Путь введения	Доза
1	H3N2 вирус гриппа А от свиней	10	Интра-трахеально	8 мл, 1,00 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /мл
2	H3N2 вирус гриппа А от свиней	10	Интра-трахеально	8 мл, 1,00 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /мл
3	H3N2 вирус гриппа А от свиней	10	Интра-трахеально	8 мл, 1,00 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /мл
4	H3N2 вирус гриппа А от свиней	10	Интра-трахеально	8 мл, 1,00 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /мл
5	Культуральная среда (негатив. контроль)	10	Интра-трахеально	8 мл

Инфекционная доза 1×10^7 TCID₅₀ гEHV-1 RasH-70-p455-H3 (EHV-1) была применена либо один раз в возрасте пяти недель, либо два раза в возрасте двух и пяти недель. Для сравнения коммерчески доступную инактивированную вакцину (инакт.) применяли дважды в возрасте двух и пяти недель. Все поросята не имели материнских антител, чтобы не устранять влияние инактивированной вакцины (инакт.). Две группы не были вакцинированы, но получали инъекции физиологического раствора хлорида натрия (NaCl) и представляли собой контроль заражения или строгий негативный контроль соответственно. Через 21 день после второй вакцинации все группы, кроме группы строгого негативного контроля, были заражены при использовании 1×10^7 TCID₅₀ гетерологичного штамма вируса гриппа А (IAV) (H3N2 вирус гриппа А свиней R452-14, изолят для заражения, принадлежит Бёрингер Ингельхайм). В то время как в невакцинированной группе контроля заражения (контр, зараж.) все свиньи имели высокие титры вируса гриппа в легких через один и три дня после заражения инфекцией, все свиньи в группе строгого негативного контроля (негат. контр.) и группе, которая была вакцинирована дважды (EHV 2x) при использовании гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3, были негативными на IAV в оба дня. В группе, которая была дважды вакцинирована инактивированной контрольной вакциной (инакт. 2x), одно из пяти животных имело низкий титр IAV на третий день после заражения. В группе, вакцинированной однократно (EHV 1x) за 21 день до заражения гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3, двое из пяти животных имели низкие титры IAV в легких через день после заражения инфекцией и одно из пяти животных через три дня после заражения (фиг. 10).

Две вакцинации при использовании 1×10^7 TCID₅₀ гEHV-1 RasH-SE-70-p455-H3 полностью защищали свиней от заражения инфекцией гетерологичным IAV подтипа H3N2.

Было продемонстрировано, что вектор EHV-1 RasH-SE является пригодным для вакцинации свиней и что новый промотор 455 является функциональным для регуляции иммуногенной экспрессии гемагглютинина IAV у вакцинированных свиней.

Пример 5. Использование нового промотора p430 в вакцинах на основе рекомбинантного вектора EHV-1 и конструирование рекомбинантного вируса.

Промотор p430.

Новый идентифицированный промотор p430 использовали для экспрессии другого гемагглютинина H1N1 из вируса гриппа (A/swine/Gent/132/2005 (H1N1), номер доступа GenBank: AFR76623.1), SEQ ID NO: 28. Поскольку ген гемагглютинина в этом изоляте вируса имел происхождение от IAV свиней "птичьего" типа IAV, он назывался H1av. H1av был синтезирован и субклонирован в векторе переноса для ORF1/3 участка инсерции, pU1/3-p430-BGH_K_BGH (фиг. 11) для получения pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH. Экспрессия H1av была размещена под контролем промотора p430 и polyA сигнала бычьего гормона роста (BGH) (фиг. 12).

С помощью мутагенеза en-passant при использовании системы рекомбинации RED (Tischer и др., 2006) кассету экспрессии p430-H1av-BGH встраивали в ORF1/3 pRacH-SE для получения pRacH-SE1/3-p430-H1av (фиг. 13).

Клетки PK/WRL трансфицировали с помощью pRacH-SE1/3-p430-H1av, рекомбинантный вирус гEHV-1 RasH-SE1/3-p430-H1av высвобождали и дважды очищали, используя материал единичной бляшки. Правильность инсерции экспрессионной кассеты проверяли путем секвенирования продукта участка инсерции при использовании ПЦР высокой точности с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали методом непрямой иммунофлуорес-

ценции (ИФА) и вестерн-блота при использовании коммерчески доступных моноклональных и поликлональных антител (фиг. 14).

Восстановление *orf71*, кодирующего *gpII* EHV-1, было подтверждено с помощью ИФА и вестерн-блота при использовании моноклонального антитела Ai2G7 (принадлежащего Бёрингер Ингельхайм) (не показано). Правильный процессинг и транспорт H1av, а также локализацию в плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью анализа гемадсорбции при использовании куриных эритроцитов (не показано). Пиковые титры, определенные как TCID₅₀/мл в PK/WRL клетках, были в том же диапазоне, что и титры родительского вируса RacH-SE, что указывает на то, что экспрессия трансгенов не оказывала вредного воздействия на репликацию вируса (не показано).

Специфическое определение широкой полосы, которая мигрирует при 75 кДа, с помощью антитела PA-34929, согласуется с ожидаемым появлением рекомбинантного гликопротеина HA, как и предполагалось, исходя из его последовательности. Видимое окрашивание клеточных мембран моноклональным антителом C102 соответствует субклеточной локализации, как это и ожидалось (фиг. 14).

Для того чтобы проверить, будут ли экспрессируемые рекомбинантные гемагглютинины подвергаться процессингу и транспортироваться, как ожидалось, клетки VERO были инфицированы гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 гEHV-1 RacH-SE (родительский) при кратности заражения 0,01 или оставались неинфицированными.

Через 24 ч после инфицирования живые инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали с суспензией куриных эритроцитов в PBS, промывали PBS и окрашивали флуоресцентным Hoechst33342 для окраски ядер. Поскольку эритроциты птиц содержат клеточные ядра, они могут быть окрашены Hoechst33342 и выявляются в виде миниатюрных голубых пятен при флуоресцентной микроскопии. По сравнению с клетками, которые являются инфицированными гEHV-1 RacH-SE и не экспрессируют гемагглютинин, адсорбция куриных эритроцитов была значительно повышена для клеток, инфицированных либо с помощью гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, либо гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (не показано). Из этого можно сделать вывод, что гемагглютинины были транслированы, процессированы и транспортированы на плазматическую мембрану клеток, инфицированных векторным вирусом таким образом, как и в том случае, если бы они были продуцированы аутентичной инфекцией вируса гриппа.

Четкий фенотип гемадсорбции инфицированных клеток поддерживает результаты вестерн-блотов и иммунофлуоресцентного анализа, которые показывают эффективную экспрессию трансгенных белков и предусматривают образование функциональных тримеров HA на поверхности клеток, инфицированных вектором EHV-1.

Пример 6. Применение двух новых промоторов p455 и p430 в вакцинах на основе рекомбинантного вектора EHV-1 параллельно в двух сайтах инсерции.

Чтобы показать, что два новых промотора могут использоваться параллельно, получали рекомбинантный EHV-1 RacH, который экспрессирует два различных гемагглютинина двух различных подтипов вируса гриппа А.

Специфичность и отсутствие перекрестной реактивности поликлональных коммерческих антител к H3 (PA5-34930) и H1 (PA5-34929) проверяли с помощью вестерн-блота клеток, инфицированных однократно вирусами гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 и гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av (не показано).

Экспрессионную кассету p430-H1av-BGH собирали в векторе переноса pU1/3-p430-H1av-BGHKVG, начиная с рекомбинантного ВАС pRacH-SE-70-p455-H3 (фиг. 12), встраивали в ORF1/3 сайт инсерции при использовании двухэтапной RED рекомбинации с получением pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. Клетки PK/WRL трансфицировали pRacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 и высвобождали рекомбинантный вирус гEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, после чего его дважды очищали, используя материал единичной бляшки (фиг. 15).

Коротким обозначением этого рекомбинантного вируса является гEHV-1 RacH-SE_B. Правильность инсерции экспрессионной кассеты проверяли путем секвенирования продуктов ПЦР участков инсерции вместе с фланкирующими последовательностями при использовании высокоэффективной ПЦР с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции (ИФА, не показано) и вестерн-блота при использовании коммерчески доступных моноклональных и поликлональных антител (фиг. 16). Восстановление *orf71*, кодирующего *gpII* EHV-1, было подтверждено с помощью ИФА (не показано) и вестерн-блота при использовании моноклональных антител Ai2G7 (принадлежащих Бёрингер Ингельхайм) (фиг. 16).

Как показано на фиг. 16, оба трансгена H3 и H1av экспрессировались параллельно в культурах клеток, инфицированных двойным рекомбинантным инсертом гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. Экспрессия трансгенов была стабильной и не ухудшала вирусные титры, которые исследовались до пассажа 11 в клетках PK/WRL (не показано).

Было продемонстрировано, что два новых промотора p430 и p455 являются функциональными в контексте репликации гEHV1-RacH в культурах клеток. Уровни активности во время цикла вирусной репликации оказались очень похожими, как следует из кинетических исследований промотора *in vitro*. Эти свойства позволяют создавать рекомбинантные векторные вакцины на основе EHV-1 RacH или других векторных платформ, экспрессирующих два различных антигена параллельно с подобной эффектив-

ностью. Если целевая вакцина состоит из двух разных патогенов, то применение двух новых промоторов в двух сайтах инсерции в сочетании с двумя последовательностями полиаденилирования может значительно снизить стоимость товара и представляет собой явное преимущество перед вектором, экспрессирующим только один антигенный компонент.

Пример 7. Получение, *in vitro* характеристика и *in vivo* анализ моновалентной вакцины против вируса гриппа А свиней на основе вектора EHV-1.

Гемагглютинин вируса IAV свиней серотипа H3 (SEQ ID NO 27) (A/swine/Italy/7680/2001 (H3N2), номер доступа GenBank: ABS50302.2) был выбран в качестве антигена для исследования вакцинации у свиней. Эта новая вакцина против IAV свиней обеспечивает признак DIVA, например обнаружение антител против белков NP или NA свиного IAV у животных, которые были инфицированы полевыми штаммами IAV свиней, но не у животных, вакцинированных описанной в данной заявке вакциной, поскольку она экспрессирует только один белок HA свиного IAV. Ее кодирующую последовательность синтезировали и субклонировали с получением вектора переноса pU70-p455-H3-71K71, размещая H3 под контролем нового промотора p455 и нового сигнала полиаденилирования 71pA, также фланкируя кассету участками рекомбинации для инсерции в *orf70* (фиг. 1B).

Путем *en-passant* мутагенеза при использовании рекомбинационной системы RED кассету экспрессии p455-H3-71 встраивали в *orf70* pRacH-SE для получения pRacH-SE70-p455-H3.

Клетки PK/WRL трансфицировали pRacH-SE70-p455-H3, рекомбинантный вирус гЕНV-1 RacH-SE70-p455-H3 высвобождали и дважды очищали, используя материал единичной бляшки (фиг. 7).

Правильность инсерции экспрессионной кассеты проверяли путем секвенирования продукта участка инсерции при использовании высокоточной ПЦР с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции (ИФА, фиг. 8) и вестерн-блота (фиг. 9) при использовании коммерчески доступных моноклональных и поликлональных антител.

Восстановление *orf71*, кодирующего gpII EHV-1, было подтверждено с помощью ИФА (не показано) и вестерн-блота (фиг. 9) при использовании моноклонального антитела A12G7 (принадлежащего Бёрингер Ингельхайм). Внешний вид тримеров H3 на плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью теста гемадсорбции при использовании куриных эритроцитов (не показано). Пиковые титры, определенные как TCID₅₀/мл в PK/WRL клетках, были в том же диапазоне, что и титры родительского вируса RacH-SE, это указывает на то, что экспрессия трансгенов не проявляет вредного воздействия на репликацию вируса (не показано). Это было подтверждено путем пассирования гЕНV-1 RacH-SE70-p455-H3 в клетках PK/WRL до 20 пассажа (P20) после высвобождения. В P5, P10, P15 и P20 вирус был охарактеризован титрованием, секвенированием и вестерн-блотом (фиг. 9), в P10 та P20 дополнительно с помощью ИФА, также подтверждали экспрессию HA и генетическую стабильность инсерта, который кодирует HA, вместе промотором и последовательностями *polyA*.

Два блота, представленные на фиг. 9, являются репликами, которые инкубировали либо с моноклональным антителом A12G7 (слева), которое специфически выявляет гликопротеин II (gpII) EHV-1, либо с коммерческим кроличьим поликлональным антителом (PA5-34930), которое направлено против гемагглютинина вируса гриппа подтипа H3 (справа), gpII выявляли во всех культурах клеток, инфицированных рекомбинантным EHV-1, как и ожидалось. Полноразмерный H3 выявляли во всех клетках, инфицированных различными пассажами гЕНV-1 RacH-SE-70-p455-H3, как и ожидалось. Специфичность антисыворотки к H3 была также продемонстрирована с помощью вестерн-блота клеток, инфицированных другим рекомбинантным EHV-1 RacH-SE, экспрессирующим гемагглютинин вируса гриппа подтипа H1 (см. фиг. 16).

С помощью анализа двойной иммунофлуоресценции (дИФА) вирусных бляшек в клетках, инфицированных P20, при использовании моноклонального антитела против H3 и антисыворотки против лошадиного EHV было подтверждено, что практически все бляшки, индуцированные EHV-1, также экспрессируют H3 (не показано). Все исследования подтвердили стабильность рекомбинантного EHV-1 RacH-SE-70-p455-H3.

Для исследования его свойств в качестве векторной вакцины у молодых поросят, гЕНV-1 RacH-SE-70-p455-H3 тестировали в исследовании вакцинация-заражение. Более подробно, поросят без материнского иммунитета против IAV свиней (без материнских антител) дважды вакцинировали супернатантом клеточной культуры, содержащей RacH-SE-70-p455-H3 в дозе 1×10^7 TCID₅₀ внутримышечно в возрасте двух и пяти недель (двукратная вакцинация, $2 \times$ EHV-1), или только в возрасте пяти недель (однократная вакцинация, $1 \times$ EHV-1). Невакцинированная группа служила в качестве негативного контроля, а группа животных, которые были вакцинированы в возрасте двух и пяти недель с помощью коммерчески доступной инактивированной вакцины IAV свиней в соответствии с инструкциями производителя (но в моменты времени вакцинации), служила в качестве позитивного контроля (убитая). В возрасте 8 недель все животные, но не негативный контроль, были заражены интратрахеально дозой 1×10^7 TCID₅₀ H3N2 штаммом IAV свиней для заражения (европейский изолят R452-14 полевого вируса, H3 которого является гетерологичным H3 вакцинного антигена, используемого в RacH-SE-70-p455-H3). Вакцинированные

и незараженные животные служили в качестве негативного контроля, в то время как вакцинированные, но инфицированные животные, служили контролем заражения. При вакцинации и после вакцинации, а также до и после заражения измеряли температуру тела и брали образцы крови в разные моменты времени. Через день после заражения половину животных на группу забивали, и легкие оценивали на поражение, характерные для IAV инфекции свиней, три образца легких, взятые из левого и правого легкого брали у животных, соответственно, для определения инфекционного титра IAV свиней в гомогенатах легких, также брали образцы бронхоальвеолярных смывов (BALF). Такую же процедуру проводили с другой половиной животных на группу через три дня после заражения.

При исследовании повышения температуры тела после применения для заражения вирусом IAV свиней, вакцинированные животные показали повышение температуры тела приблизительно на 1°C через 1 день после заражения. Это повышение температуры тела через 1 день после заражения предотвращалось для группы животных, которые были дважды вакцинированы вакциной RasH-SE-70-p455-H3 (фиг. 17).

Оценка показателей легких у животных, забитых через 1 или 3 дня после заражения вирусом IAV свиней, обнаружила, что негативный контроль не показал поражения легких, характерного для инфекции IAV свиней, контроль заражения показал среднее значение поражения легких в диапазоне 6-7%, и в отношении средних значений группы показатели поражения легких были значительно снижены от 1% до 4% для группы животных, которых вакцинировали двукратно с помощью вакцины RasH-SE-70-p455-H3 (фиг. 18).

Средние значения титров IAV свиней в легких животных, забитых через 1 или 3 дня после заражения вирусом IAV свиней, показали, что негативный контроль не выявил IAV свиней в образцах легких, тогда как контроль заражения показал титры вируса на грамм ткани легких в диапазоне от более 5 (день 3) до более 7 log (день 1). В отличие от этого, средние значения группы были сильно снижены до приблизительно 2 log или менее для группы, вакцинированной однократно с помощью вакцины RasH-SE-70-p455-H3, и снижены до неопределяемых уровней для группы, вакцинированной двукратно вакциной RasH-SE-70-p455-H3 (фиг. 10).

При анализе индукции нейтрализующих антител IAV свиней после вакцинации, сыворотка животных, вакцинированных однократно с помощью вакцины RasH-SE-70-p455-H3, показала титры реципрокной нейтрализации в диапазоне приблизительно 160 через три недели после первой вакцинации, а сыворотка, полученная от животных, вакцинированных двукратно с помощью вакцины RasH-SE-70-p455-H3, показала титры нейтрализации приблизительно 2560 через три недели после второй вакцинации, тогда как сыворотки от невакцинированных групп не имели способных к определению уровней нейтрализующих антител к IAV свиней (фиг. 19).

При определении количества провоспалительных цитокинов IL-1 β в BALF от животных через 1 или 3 дня после заражения IAV свиней, уровни IL-1 β от более 100 до 900 пг/мл были обнаружены у трех из четырех животных, которых подвергали анализу на 1 день, тогда как эти уровни снижались до 100-300 пг/мл IL-1 β для BALF для животных, вакцинированных однократно вакциной RasH-SE-70-p455-H3, а также дополнительно снижались до уровней от 0 до менее 100 пг/мл IL-1 β для всех животных, которых подвергали двукратной вакцинации с помощью вакцины RasH-SE-70-p455-H3 (фиг. 20). Это показывает, что вакцинация с помощью RasH-SE-70-p455-H3 вакцины эффективно предотвращает индукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β после инфекции IAV свиней.

При анализе повторной стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), отобранных в день 28 исследования при использовании различных стимулов, стимуляция PBMC от невакцинированных животных показала значение меньше 75/1 $\times 10^6$ единиц в IFN γ -ELISpot (метод иммуноферментных пятен) независимо от используемых стимулов (фиг. 21A). PBMC, полученные от животных, которые получали инактивированную вакцину двукратно (убитая), показали приблизительно 150/1 $\times 10^6$ единиц, когда они были повторно стимулированы рекомбинантным нуклеопротеином NP свиного IAV, и приблизительно 3000/1 $\times 10^6$ единиц в IFN γ -ELISpot, когда они были повторно стимулированы H3N2 штаммом свиного IAV R452-14, но не проявляли повторной стимуляции PBMC (уровни 75/1 $\times 10^6$ единиц или меньше), когда использовали рекомбинантные HA свиного IAV или EHV-1 вирусы (фиг. 21B). В противоположность этому, животные, которые были вакцинированы однократно или двукратно вакциной RasH-SE-70-p455-H3, также показали приблизительно от 200 (1 \times EHV-1) до 300 (2 \times EHV-1)/1 $\times 10^6$ единиц в IFN γ -ELISpot, когда они были повторно стимулированы с помощью H3N2 свиного IAV штамма для заражения R452-14, но не продемонстрировали повторной стимуляции PBMC (уровни 75/1 $\times 10^6$ единиц или меньше), когда использовали рекомбинантный NP свиного IAV (фиг. 21C и 21D). Когда вирусы EHV-1 использовали для повторной стимуляции, животные, вакцинированные однократно или двукратно вакциной RasH-SE-70-p455-H3, показали приблизительно 300/1 $\times 10^6$ единиц в IFN γ -ELISpot, когда они были повторно стимулированы с помощью вакцины RasH-SE на основе пустого EHV-1, и это значение дополнительно увеличивалось до более 400/1 $\times 10^6$ единиц, когда использовали вакцину RasH-SE-70-p455-H3, экспрессирующую H3 IAV свиней соответственно (фиг. 21C и 21D). В соответствии с этим, когда использовали рекомбинантный HA IAV свиней для повторной стимуляции, только животные, ко-

торые были вакцинированы однократно или двукратно вакциной RasH-SE-70-p455-H3, показали приблизительно от 100-150 (1× EHV-1) до 150-200 (2× EHV-1)/1×10⁶ единиц в IFN γ -ELISpot (фиг. 21C и 21D).

Пример 8. Получение, *in vitro* характеристика и *in vivo* анализ тетравалентной EHV-1 векторной вакцины вируса гриппа А свиней.

Как описано ниже, в представленном изобретении четыре описанных выше антигена гемагглютина (НА) IAV свиней, полученные из птичьих HAV1, H3N2, H1N1 и H1N1 пандемических под-/серотипов IAV свиней экспрессировали при использовании двух рекомбинантных вирусов на основе EHV-1 вектора. Эта новая тетравалентная вакцина против IAV свиней обеспечивает особенность DIVA, например, путем выявления антител против белков NP или NA IAV свиней у животных, которые были инфицированы полевыми штаммами IAV свиней, но только не у животных, вакцинированных описанной в данной заявке вакциной, поскольку она экспрессирует только белки НА свиного IAV.

Новая тетравалентная вакцина IAV свиней была охарактеризована *in vitro* и проанализирована *in vivo* в отношении ее эффективности против IAV свиней.

Новый идентифицированный промотор p430 использовали для регуляции экспрессии H1N1 IAV свиней (A/swine/Gent/132/2005 (H1N1), номер доступа GenBank: AFR76623.1). Поскольку ген гемагглютина в этом изоляте вируса имеет происхождение от IAV птиц, его называли H1av. H1av был синтезирован и субклонирован в векторе переноса для участка инсерции ORF1/3 с целью получения pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH. Экспрессию H1av размещали под контролем промотора p430 и polyA сигнала бычьего гормона роста (BGH) и фланкировали участками рекомбинации для введения в ORF1/3 (фиг. 12).

С помощью *en-passant* мутагенеза и при использовании рекомбинационной системы RED кассету экспрессии p430-H1av-BGH встраивали в ORF1/3 pRacH-SE для получения pRacH-SE1/3-p430-H1av. Клетки PK/WRL трансфицировали при использовании pRacH-SE1/3-p430-H1av, рекомбинантного вируса гEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av (фиг. 13), высвобождали и дважды очищали, используя материал единичной бляшки. Правильность встраивания экспрессионной кассеты проверяли путем секвенирования продукта участка инсерции при использовании высокоточной ПЦР с корректирующей экзонуклеазной активностью. Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции (ИФА) и вестерн-блота при использовании коммерчески доступных моноклональных и поликлональных антител (фиг. 14). Восстановление *orf71*, кодирующего *gpII* EHV-1, было подтверждено с помощью ИФА и вестерн-блота при использовании моноклональных антител Ai2G7 (принадлежащих Бьорингер Ингельхайм) (не показано). Правильность процессинга, транспорта H1av, а также его локализацию в плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью теста гемадсорбции при использовании куриных эритроцитов (не показано). Пиковые титры, определенные как TCID₅₀/мл в клетках PK/WRL, были в том же диапазоне, что и титры родительского вируса RasH-SE, что указывает на то, что экспрессия трансгенов не проявляет вредного воздействия на репликацию вируса (не показано).

Конкретное выявление широкой полосы, которая мигрирует при 75 кДа при использовании антитела PA-34929, согласуется с ожидаемым появлением рекомбинантного гликопротеина НА, как было предусмотрено, исходя из его последовательности. Видимое окрашивание клеточных мембран моноклональным антителом C102 соответствует субклеточной локализации, как и ожидалось.

Для того чтобы проверить, процессируются ли и транспортируются ли, как ожидалось, экспрессированные рекомбинантные гемагглютинины, клетки VERO были инфицированы при использовании гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 и гEHV-1 RacH-SE (родительский) при множественности заражения 0,01, или оставались незараженными. Через 24 ч. после заражения живые инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали с суспензией куриных эритроцитов в PBS, промывали PBS и окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33342 для окрашивания ядер. Поскольку эритроциты птиц содержат клеточные ядра, они могут быть окрашены Hoechst 33342, что выявляется в виде крошечных голубых пятен при флуоресцентной микроскопии, по сравнению с клетками, инфицированными гEHV-1 RacH-SE, которые не экспрессируют гемагглютинин. При этом адсорбция куриных эритроцитов была значительно повышена на клетках, инфицированных либо гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, либо гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (не показано). Из этого можно сделать вывод, что гемагглютинины были транслированы, процессированы и транспортированы на плазматическую мембрану клеток, инфицированных векторным вирусом таким образом, как и в том случае, если бы они продуцировались аутентичной репликацией вируса гриппа. Фенотип гемадсорбции инфицированных клеток поддерживает результаты вестерн-блота и иммунофлуоресцентного анализа (для H1av, фиг. 14), которые демонстрируют эффективную экспрессию трансгенных белков и предусматривают образование функциональных тримеров НА на поверхности клеток, инфицированных вектором EHV-1. Специфичность и отсутствие перекрестной реактивности поликлональных коммерческих антител к H3 (PA5-34930) и H1 (PA5-34929) проверяли с помощью вестерн-блота инфицированных клеток, зараженных вирусами с единичной вставкой гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 и гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av (не показано).

Далее получали рекомбинантный EHV-1 RacH-SE, который экспрессировал два разных гемагглютинаина двух различных под-/серотипов вируса гриппа А.

Кассету экспрессии p430-H1av-BGH собирали в векторе для переноса pU1/3-p430-H1av-

BGH_K_BGH (фиг. 12), начиная от рекомбинантного ВАС pRacH-SE-70-p455-H3, потом она была встроена в сайт инсерции ORF1/3 с помощью двухэтапной RED рекомбинации с получением pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. Клетки PK/WRL трансфицировали pRacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, и рекомбинантный вирус гЕНV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 высвобождали и дважды очищали, используя материал единичной бляшки. Краткое обозначение рекомбинантного вируса было гЕНV-1 RacH-SE_V (фиг. 15). Правильность вставки экспрессионной кассеты была проверена путем секвенирования продуктов с помощью высокоточной ПЦР с корректирующей экзонуклеазной активностью участка инсерции вместе с фланкирующими последовательностями.

Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции (ИФА, не показано) и вестерн-блота при использовании коммерчески доступных моноклональных и поликлональных антител (фиг. 16). Восстановление *orf71*, кодирующего *gpII* EHV-1, было подтверждено ИФА (не показано) и вестерн-блота при использовании моноклональных антител Ai2G7 (принадлежащих Бьорингер Ингельхайм) (фиг. 16).

Оба трансгена H3 и H1av экспрессировались параллельно в культурах клеток, инфицированных рекомбинантным гЕНV-1 RacH-SE_V с двойной вставкой. Экспрессия трансгенов была стабильной и не ухудшала вирусные титры, которые были протестированы до 11 пассажа в клетках PK/WRL.

Было показано, что усовершенствованный вектор EHV-1 с двумя сайтами инсерции и двумя новыми промоторами экспрессирует два гемагглютинаина вируса гриппа параллельно. Субклеточная локализация, определенная с помощью ИФА, и подвижность в ДСН-ПААГЭ, как определено с помощью вестерн-блота, соответствовала аутентичным гемагглютинаинам, которые экспрессируются в инфицированных вирусом гриппа А клетках, известных из литературы.

После этого получали второй гЕНV-1 RacH с двойной вставкой, которая экспрессирует гемагглютинаины H1hu, SEQ ID NO: 29 (A/swine/Italy/4675/2003 (H1N2), номер доступа GenBank ADK98476.1) и H1pdm, SEQ ID NO: 26 (A/swine/Italy/116114/2010 (H1N2), номер доступа GenBank № ADR01746.1).

Кодирующую последовательность H1hu синтезировали и субклонировали в векторе переноса для участка инсерции ORF1/3 для получения pU1/3-p430-H1hu-BGHKBGH. Экспрессию H1hu помещали под контроль промотора p430 и сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH) и фланкировали при использовании участков рекомбинации для введения в ORF1/3 (фиг. 22).

Кодирующую последовательность H1pdm синтезировали и субклонировали с получением вектора для переноса pU70-p455-H1pdm-71K71, размещая H1pdm под контролем нового промотора p455 и нового сигнала полиаденилирования 71pA, фланкируя кассету при использовании участков рекомбинации для введения в *orf70* (фиг. 23).

Затем экспрессионные кассеты p430-H1av-BGH и p455-H1pdm-71 встраивали в pRacH-SE помощью *ep-passant* мутагенеза при использовании RED системы рекомбинации, сначала получая pRacH-SE-1/3-p430-H1hu. Используя этот модифицированный ВАС в качестве мишени, p455-H1pdm-71 встраивали с помощью *ep-passant* мутагенеза при использовании RED системы рекомбинации, получая pRacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm. pRacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm трансфицировали в клетки PK/WRL, высвобождали и трижды очищали, используя материал единичной бляшки. Краткое обозначение нового рекомбинантного векторного вируса представляет собой гЕНV-1 RacH-SE_D (фиг. 24).

Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции (ИФА, не показано) и вестерн-блота при использовании коммерчески доступных моноклональных и поликлональных антител (фиг. 25). Восстановление *orf71*, кодирующего *gpII* EHV-1, было подтверждено ИФА (не показано) и вестерн-блота при использовании моноклональных антител Ai2G7 (принадлежащих Бьорингер Ингельхайм) (фиг. 25).

Генетическая и фенотипическая стабильность рекомбинантного гЕНV-1 была продемонстрирована путем пассирования в культуре клеток при определении титров вируса через каждые 5 пассажей. Последовательности участков инсерции подтверждали через каждые десять пассажей, а экспрессию трансгенов также подтверждали с помощью вестерн-блота (не показано). Точность экспрессии оценивали с помощью двойного ИФА бляшек под верхним слоем метилцеллюлозы, подсчитывая бляшки, окрашенные анти-EHV-антителами и специфическими для трансгенов антителами (не показано).

Для исследования ее свойств в качестве векторной вакцины у молодых поросят тетравалентную вакцину IAV свиней, которая состоит из гЕНV-1 RacH-SE_V и гЕНV-1 RacH-SE_D, подвергали анализу в исследовании вакцинация-заражение. Подробное поросят с материнским иммунитетом против IAV свиней (позитивные по материнскими антителами) дважды подвергали вакцинации с помощью гЕНV-1 RacH-SE_V и гЕНV-1 RacH-SE_D в дозе 1×10^7 TCID₅₀ на вакцинный штамм в возрасте одной или четырех недель (двукратная вакцинация, $2 \times$ EHV-1) или только в возрасте четырех недель (однократная вакцинация, $1 \times$ EHV-1). Невакцинированная группа служила в качестве негативного контроля. В возрасте 11 недель всех животных, за исключением негативного контроля, интратрахеально заражали при использовании дозы 1×10^6 TCID₅₀ H3N2 штамма IAV свиней для заражения (европейский изолят R452-14 полевого вируса, гЕНV-1 RacH-SE_V). Вакцинированные и неинфицированные животные служили в качестве негативных контролей, в то время как невакцинированные, но инфицированные животные служили кон-

тролем заражения. Во время и после вакцинации, а также до и после заражения измеряли температуру тела и отбирали образцы крови в разные моменты времени. Через день после заражения половину животных в группе забивали, и легкие оценивали на поражение, характерные для IAV инфекции свиней, три образца легких из левого и правого легкого брали у животных, соответственно, для определения инфекционного титра IAV свиней в гомогенатах легких, кроме того, брали образцы бронхоальвеолярных смывов (BALF). Такую же процедуру проводили с другой половиной животных на группу через три дня после заражения. Материал образца и собранные данные подвергали анализу для определения, среди прочих, изменения температуры тела после заражения, клинических признаков после IAV инфекции у свиней, оценки легких, титров свиного IAV в легких, гистологических изменений в легочной ткани, титров сывороточной нейтрализации IAV свиней, уровня цитокинов в BALF, повторного стимулирования PBMC, которое измеряли с помощью IFN γ -ELISpot (метод иммуноферментных пятен) и активации В-клеток.

Пример 9. Индукция ответа нейтрализующих антител против двух антигенов у мышей, вакцинированных с помощью бивалентной векторной вакцины на основе гЕНV-1 RacH.

гЕНV-1 RacH SEB (гЕНV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-7-p455-H3 (см. фиг. 15)) использовали для иммунизации мышей Balb/c, для того чтобы продемонстрировать, что экспрессированные трансгены являются иммуногенными в других видах, отличных от свиней, и что нейтрализующие антитела индуцируются против одного из двух антигенов при интраназальном применении.

Подробнее три группы из пяти мышей Balb/c на группу 3-5-недельного возраста, интраназально инокулировали в дни исследования 0 и 21 при использовании либо 40 мкл гЕНV-1 RacH SEB (гЕНV-1 RacH-SE)-1/3-430-H1av-7-455-H3, группа 1), либо 40 мкл пустого вектора (гЕНV-1 RacH-SE, группа 2, контроль вектора), либо 40 мкл среды культуры ткани (группа 3 негативного контроля) соответственно. Для групп 1 и 2 дозировки инфекционного рекомбинантного EHV-1 составляли 1×10^5 TCID₅₀/40 мкл соответственно. У мышей брали образцы крови в дни исследования 0 (перед первой инокуляцией), 7, 14, 21 (перед второй инокуляцией), 28 и 35. Сыворотку готовили из образцов крови и хранили замороженной при -80°C.

Иммунофлуоресцентный анализ для определения антител против векторного вируса.

Клетки AI-ST инфицировали при множественности инфекции (MOI) 0,001 с помощью гЕНV-1 RacH-SE1212, вирус высвобождали от пустого вектора BAC pRacH-SE1.2. Через 24 ч после заражения наблюдали четкие бляшки, и клетки обрабатывали для непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА). Исследованию подвергали сыворотки заключительных образцов крови (полученных через 14 дней после второй вакцинации), разведенных 1:50 в PBS, для всех трех групп. Как положительный контроль использовали сыворотку от вакцинированной EHV-1 лошади в разведении 1:500. Вторичными антителами были коммерчески доступные FITC-конъюгированный кроличий анти-мышинный IgG для сыворотки мышей и Cy5-конъюгированный козий анти-конский IgG для лошадиной сыворотки, которые использовали при разведении 1:200. Связывания антител оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. У всех вакцинированных мышей развивались антитела, реактивные в ИФА с клетками, инфицированными гЕНV-1 RacH-SE. Неинфицированные клетки не связывались ни с одной из исследуемых сывороток. Сыворотки из группы негативного контроля мышей не показали никакого специфического связывания ни с инфицированными, ни с неинфицированными клетками. Данные приведены в табл. 3, представленной ниже.

Таблица 3

Результаты флуоресцентной микроскопии ИФА для антител, направленных против EHV-1

Обработка	Количество мышей	Идент. номер эксперимента	Разведение	Неинфицированные клетки	Инфицированные клетки
Группа 3 (негативный контроль)	1	1	1:50	негат.	негат.
	2	2	1:50	негат.	негат.
	3	3	1:50	негат.	негат.
	4	4	1:50	негат.	негат.
	5	5	1:50	негат.	негат.
Группа 2 (пустой вектор)	1	6	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
	2	7	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
	3	8	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
	4	9	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
	5	10	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.

Группа 1 (rEHV-1 RacH SE B)	1	11	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
	2	12	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
	3	13	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
	4	14	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
	5	15	1:50	негат.	ПОЗИТИВН.
Контрольное антитело	Специфи- ческие для				
Сыворотка коня	EHV-1	22	1:500	негат.	ПОЗИТИВН.
Вторичные антитела	Специфи- ческие для				
FITC-кроличье антитело	мышей	23	1:200	негат.	негат.
Су5 антитело	козье коней	24	1:200	негат.	негат.

Из этого можно сделать вывод, что инокуляция rEHV-1 в ноздри мышей приводила к инфекции и репликации вируса так, что иммунные системы мышей были стимулированы для выработки антител против EHV-1.

Тесты на нейтрализацию вируса.

Для того чтобы показать индукцию защитного иммунитета против экспрессированных трансгенов, которые происходят от вируса гриппа А (IAV) (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2) или A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), сыворотки мышей тестировали на нейтрализующую активность в отношении соответствующих вирусов (Allwinn и др., 2010; Trombetta и др., 2014). IAV, который использовался для анализа нейтрализации, представлял собой изоляты, полученные от свиней в Германии с 2014 г., в частности A/swine/Germany/AR452/2014 (H3N2) и A/swine/Germany/AR1181/2014 (H1N1). Поскольку они являются гетерологичными по отношению к штаммам, от которых происходят изучаемые вакцины, любая нейтрализация этих вирусов мышинными сыворотками будет показательной для широкой и эффективной индукции защитного иммунитета с помощью вакцинации rEHV-1.

В качестве сыворотки негативного контроля использовали сыворотку свиньи, которая была продемонстрирована как негативная по антителам к вирусу гриппа.

Тесты на нейтрализации вируса гриппа А (VNT).

Клетки MDCK для нейтрализации вируса, а также реципрокное титрование в 96-луночных планшетах инкубировали в течение двух дней при 37°C/5%CO₂ перед использованием. Соответствующие запасы IAV H3N2 и H1av N1 размораживали на льду и разводили в среде MEM, содержащей гентамицин и двойную концентрацию трипсина (MEM/Genta/2× трипсин).

Исследуемые сыворотки получали из заключительного забора крови группы 1 (rEHV-1 RacH SEB), группы 2 (пустой вектор), положительного контроля (сыворотка от свиньи, вакцинированной инактивированной мультивалентной вакциной IAV) и негативного контроля.

Сыворотки инактивировали нагреванием и в двух и трех независимых анализах, соответственно, по очереди разводили их 1:2, начиная с 1:16 до 1:4096. IAV разводили до приблизительно 100 TCID₅₀/реакционная смесь для реакции нейтрализации. Реакционную смесь для реакции нейтрализации инкубировали в течение 2 ч при 37°C, 5% CO₂. Реципрокное титрование используемого вируса проводили в четырехкратной повторности. Удаляли ростовую среду и MDCK-клетки промывали средой, содержащей гентамицин и трипсин перед добавлением реакционной смеси для нейтрализации или разведения вирусов реципрокных титрований. VNT и планшеты для титрования инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 1 ч после добавления реакционной смеси для реакции нейтрализации или разведения вируса к MDCK клеткам, соответственно. После этого инокулят удаляли и на клетки наносили свежую среду, содержащую гентамицин и трипсин. Через пять дней после инфицирования отслеживали и документировали CPE (цитопатический эффект). Фактически используемый титр вируса в анализе был рассчитан как TCID₅₀/мл по данным Reed и Munch, и разведения, при которых тестируемые сыворотки предотвращали индукцию вируса гриппа - типичного CPE, были задокументированы (см. таблицы, приведенные ниже).

Результаты VNT вируса гриппа H1avN1

H1avN1	VNT # 1		VNT # 2		VNT # 3		Среднее значение способности к нейтрализации	SD (квадратическое отклонение)
	146 TCID ₅₀ /лунка	Способность	32 TCID ₅₀ /лунка	Способность	181 TCID ₅₀ /лунка	Способность		
Мышин.	Реципрокное-нейтрализующее разведение		Реципрокное-нейтрализующее разведение		Реципрокное-нейтрализующее разведение			
гEHV-1 RacH SE_B-1	32	4672	128	4096	32	5792	4853	862
гEHV-1 RacH SE_B-2	16	2336	64	2048	негат.		2192	204
гEHV-1 RacH SE_B-3	32	4672	128	4096	16	2896	3888	906
гEHV-1 RacH SE_B-4	128	18688	512	16384	64	11584	15552	3624
гEHV-1 RacH SE_B-5	32	4672	256	8192	16	2896	5253	2695
Пустой вектор-1	н.о. (не определены)	н.д. (нет данных)	негат.	н.д.	негат.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-2	н.о.	н.д.	негат.	н.д.	негат.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-3	н.о.	н.д.	негат.	н.д.	негат.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-4	негат.	н.д.	негат.	н.д.	негат.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-5	н.о.	н.д.	негат.	н.д.	негат.	н.д.	н.д.	н.д.
Позитив. контроль свиной сыворотки	32	н.д.	н.о.	н.д.	н.о.	н.д.	н.д.	н.д.

Результаты VNT вируса гриппа H3N2

H3N2	VNT # 1		VNT # 2		VNT # 3		Среднее значение способности к нейтрализации	SD
	16 TCID ₅₀ /лунка	Способность	24 TCID ₅₀ /лунка	Способность	15 TCID ₅₀ /лунка	Способность		
Мышь	Обратн. нейтрализ. разведения		Обратн. нейтрализ. разведения		Обратн. нейтрализ. разведения			
гEHV-1 RacH SE_B -1	4096	65536	1024	24576	2048	30720	40277	22089
гEHV-1 RacH SE_B -2	1024	16384	512	12288	128	1920	10197	7455
гEHV-1 RacH SE_B -3	1024	16384	512	12288	256	3840	10837	6397
гEHV-1 RacH SE_B -4	256	4096	256	6144	64	960	3733	611
гEHV-1 RacH SE_B -5	256	4096	128	3072	64	960	2709	599
Пустой вектор-1	негат.	н.д. (нет данных)	негат.	н.д.	негат.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-2	негат.	н.д.	негат.	н.д.	негат.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-3	негат.	н.д.	негат.	н.д.	негат.	н.д.	н.д.	н.д.

Для сравнения результатов независимых тестов нейтрализующую способность рассчитывали путем умножения обратного разведения сыворотки на соответствующий титр, который был нейтрализован этой сывороткой. Средние значения трех тестов затем делили на 100 для отображения нейтрализации 100 TCID₅₀ (табл. 3, 4 и 5). Данные суммированы и представлены графически на фиг. 26.

Все мыши, вакцинированные гEHV-1 RacH SEB, развивали нейтрализующие антитела против соответствующих IAV, гетерологичных штаммов подтипов H3N2 и H1avN1. Таким образом, двукратное интраназальное применения гEHV-1 RacH-SE, экспрессирующего гемагглютинины IAV с участка инсерции *orf70* под контролем промотора *p455* (H3) и параллельно из сайта инсерции ORF1/3 под контролем промотора *p430* (H1av), успешно стимулировало защитную иммунный ответ в мышей BALB/c.

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

Пример 10. Эффективность тетравалентной вакцины IAV свиней, содержащей гEHV-1 RacH-SE_B и гEHV-1 RacH-SE_D против заражения поросят H3N2 IAV.

Для исследования ее свойств как векторной вакцины у молодых поросят, тетравалентную вакцину IAV свиней, которая состоит из гEHV-1 RacH-SE_B (гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3, см. фиг. 15) и гEHV-1 RacH-SE_D (гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm, (см. фиг. 24)), исследовали во втором эксперименте вакцинация-заражения.

В этом втором исследовании поросят от невакцинированных свиноматок, которые были определены в результате анализа как серологически отрицательные на специфические для свиного IAV антитела свиней путем применения ELISA, специфического для H3 (фиг. 30), и теста на вирусную нейтрализацию (данные не показаны) во время первой вакцинации, подвергали двукратной вакцинации тетравалентной вакциной, которая состоит из гEHV-1 RacH-SE_B и гEHV-1 RacH-SE_D. Животные были вакцинированы первый раз в первую неделю жизни (день исследования 0, SD0) и второй раз на четвертой неделе жизни (день исследования 21 SD21), соответственно, или внутримышечно, а затем внутримышечно (2× BM), или сначала интраназально, а затем внутримышечно (ИН+BM), или дважды интраназально (2× ИН), при дозе 1×10⁷ TCID₅₀ в дозе 2 мл на вакцинный штамм, животное и вакцинацию соответственно.

Невакцинированная группа служила в качестве негативного контроля, а другая невакцинированная группа служила контролем заражения. На седьмой неделе жизни (дни 69 или 70 исследования, SD42/43) все животные, за исключением негативного контроля, были заражены интратрахеально при использовании дозы 1×10⁷ TCID₅₀ H3N2 штамма свиного IAV для заражения (изолят европейского полевого вируса R452-14, H3 которого является гетерологичным по отношению к H3 вакцинного антигена, используемого в гEHV-1 RacH-SE_B). Вакцинированные и незараженные животные служили в качестве негативного

контроля (негат. контр.), в то время как вакцинированные, но инфицированные животные служили контролем заражения (контр. зараж.). При проведении вакцинации и после вакцинации, а также перед заражением брали образцы крови в разные моменты времени.

Через день после заражения половину животных в группе забивали и брали у животных по три образца из левого и правого легкого соответственно. Затем для каждого животного определяли инфекционные титры IAV свиней на грамм гомогената легких как среднее значение для левого и правого легкого на одно животное, каждый из полученных гомогенатов является сочетанием трех образцов левого или правого легкого, которые были нормализованы к общему весу трех образцов левого или правого легкого соответственно. Такую же процедуру выполняли с остальной половиной животных на группу через три дня после заражения. Для всех вакцинированных групп средние значения титров инфекционного IAV свиней, полученные от отдельных животных в группе, были статистически достоверно снижены для образцов, взятых в первый день после заражения (СН+1), по сравнению с группой контроля заражения, тогда как все животные из группы негативного контроля не проявляли инфекционных титров вируса IAV свиней в их гомогенатах легких (фиг. 27).

Кроме того, для всех вакцинированных групп средние значения титров инфекционного IAV свиней, полученные от отдельных животных в группе, статистически достоверно снижались для образцов, взятых на 3 день после заражения (СН+3), по сравнению с группой контроля заражения, тогда как все животные из группы негативного контроля не проявляли титров инфекционного вируса IAV свиней в их гомогенатах легких (фиг. 28). Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящий из гЕНВ-1 RasH-SE_B и гЕНВ-1 RasH-SE_D, статистически достоверно снижала нагрузку IAV свиней на легкие через один и через три дня после заражения гетерологичным H3N2 штаммом IAV свиней у поросят соответственно. В соответствии с этим описанная в данной заявке вакцина является эффективной против свиного IAV у свиней.

Кроме того, сыворотку, взятую у исследуемых животных в день 0 исследования (SD0, перед первой вакцинацией), на 21 день исследования (SD21, перед второй вакцинацией), и на 42 день исследования или 43 (SD42/43, перед применением материала для заражения), подвергали твердофазному иммуноферментному анализу (ELISA) на выявление специфического для свиней иммуноглобулина G (IgG), направленного против рекомбинантно экспрессирующегося антигена H3 IAV свиней, который является гомологичным H3, который экспрессируется вакцинным штаммом гЕНВ-1 RasH-SE_B. В то время как средние значения OD сывороток из группы негативного контроля дали только очень низкие значения для всех точек времени измерения, сыворотки от вакцинированных групп продемонстрировали значительное повышение уровня OD после двух внутримышечных введений (2× BM; SD21 и SD42/43), после первого интраназального и последующего внутримышечного введения (ИН + BM; SD42/43), и после двух интраназальных введений (2× ИН; SD42/43) (фиг. 30). Таким образом, вакцинация при использовании тетравалентной вакцины IAV свиней, состоящей из гЕНВ-1 RasH-SE_B и гЕНВ-1 RasH-SE_D, вызывала серологический иммунный ответ против гемагглютинаина H3 свиного IAV, который экспрессируется вакцинным штаммом гЕНВ-1 RasH-SE_B соответственно.

В дополнение к этому, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) очищали из крови, взятой у исследуемых животных на 28 день исследования (SD28). Затем PBMC повторно стимулировали либо при использовании H3N2 штамма IAV свиней R452-14 для заражения при множественности инфицирования 1 (H3N2 MOI 1), либо рекомбинантно экспрессированным антигеном H3 IAV свиней, гомологичным H3, который экспрессируется вакцинным штаммом гЕНВ-1 RasH-SE_B, при концентрации 1 мкг/мл (гH3 1 мкг/мл). Используя повторно стимулированные PBMC, проводили специфический для гамма-интерферона анализ иммуноферментных пятен (IFN γ ELISpot) и полученные значения нормализовали до 10 клеток и подсчитывали как средние значения на группу соответственно (фиг. 32). Несмотря на то что повторно стимулированные PBMC из группы контроля заражения (служили как негативный контроль для этого анализа, животные не были вакцинированы) показали средние значения пятен на группу ниже 45 после любой повторной стимуляции, повторно стимулированные PBMC группы вакцинированных животных показали средние значения пятен на группу выше 85 после двух внутримышечных введений, более 100 пятен после первого интраназального и последующего внутримышечного введения (ИН+BM) и более 150 пятен после двух интраназальных введений (2× ИН), после любой повторной стимуляции соответственно (фиг. 32). Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящий из гЕНВ-1 RasH-SE_B и гЕНВ-1 RasH-SE_D, вызывала клеточный иммунный ответ у поросят против гемагглютинаина H3 свиного IAV, который экспрессируется вакцинным штаммом гЕНВ-1 RasH-SE_B, и против H3N2 свиного IAV R452-14, используемого для гетерологичного заражения вирусной инфекцией соответственно.

Таким образом, вакцинация поросят тетравалентной вакциной IAV, которая состоит из гЕНВ-1 RasH-SE_B и гЕНВ-1 RasH-SE_D, индуцировала выявленный серологический и клеточный иммунный ответы у поросят и показала эффективность вакцины путем статистически значимого снижения нагрузки IAV свиней в гомогенатах легких через один и через три дня после заражения гетерологичным IAV свиней.

Пример 11. Эффективность вакцины свиного IAV, состоящей из гЕНВ-1 RаСН-SE_В и гЕНВ-1 RаСН-SE_D, против заражения Н3N2 IAV свиней у поросят с материнскими антителами.

Для исследования ее свойств как векторной вакцины у молодых поросят тетравалентную вакцину IAV, которая состоит из гЕНВ-1 RаСН-SE_В и гЕНВ-1 RаСН-SE_D, подвергали анализу в третьем исследовании вакцинация-заражение.

В этом третьем исследовании использовали поросят, которые были рождены и вскарммливались молозивом и молоком свиноматок, которые были дважды вакцинированы во время беременности коммерчески доступной инактивированной вакциной против IAV свиней. Поросят определяли как серологически положительных на специфические к свиному IAV антитела путем применения специфического для Н3 ELISA (фиг. 31) и путем применения коммерчески доступного ELISA, специфического для антитела к свиному IAV (IDEXX Influenza A (Virus Antibody Test)®; IDEXX, Westbrook, Maine 04092, USA) в соответствии с рекомендациями производителя (данные не показаны), поросята на момент первой вакцинации были дважды вакцинированы тетравалентной вакциной, состоящий из гЕНВ-1 RаСН-SE_В и гЕНВ-1 RаСН-SE_D. Животные были вакцинированы первый раз в первую неделю жизни (день исследования 0, SD0) и второй раз на четвертую неделю жизни (день исследования 21 SD21), соответственно, или внутримышечно, а затем еще раз внутримышечно (2× ВМ), или сначала интраназально, а затем внутримышечно (ИН+ВМ), или дважды интраназально (2× ИН) в дозе 1×10^7 TCID₅₀ в дозе 2 мл на вакцинный штамм, животное и вакцинацию соответственно. Невакцинированная группа служила в качестве негативного контроля, а другая невакцинированная группа служила контролем заражения. На одиннадцатую неделю жизни (69 дней или 70, SD69/70) все животные, за исключением негативного контроля, подвергались интратрахеальному заражению в дозе 2×10^7 TCID₅₀ Н3N2 штаммом IAV свиней для заражения (европейский изолят полевого вируса R452-14, Н3 которого является гетерологичным к антигену Н3 вакцины, которая используется в гЕНВ-1 RаСН-SE_В). Вакцинированные и незараженные животные служили в качестве негативного контроля (негат. контр.), в то время как вакцинированные, но инфицированные животные, служили контролем заражения (контр. зараж.). В момент вакцинации, после вакцинации и перед заражением брали образцы крови в разные моменты времени.

Через пять дней после заражения животных забивали и брали у животных по три образца из левого и правого легкого, соответственно. Затем для каждого животного определяли инфекционные титры IAV свиней на грамм гомогената легких как среднее значение для левого и правого легкого на одно животное, каждый из которых был получен из гомогенатов трех объединенных образцов на левое или правое легкое, и которые были нормализованы к общему весу трех образцов для левого и правого легкого соответственно. Для всех вакцинированных групп средние значения титров инфекционного IAV свиней, полученные от отдельных животных в группе, статистически достоверно снижались для образцов, взятых на пятый день после заражения (СН+5), по сравнению с группой контрольного заражения, тогда как все животные из группы негативного контроля не показали титров инфекционного вируса IAV свиней в их гомогенатах легких (фиг. 29). Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, которая состоит из гЕНВ-1 RаСН-SE_В и гЕНВ-1 RаСН-SE_D, статистически достоверно снижала нагрузку IAV свиней на легкие через пять дней после заражения гетерологичным Н3N2 штаммом IAV свиней соответственно. Таким образом, описанная в данной заявке вакцина является эффективной против свиного IAV у свиней.

Кроме того, сыворотку, взятую у исследуемых животных в день 0 исследования (SD0, перед первой вакцинацией), на 21 день исследования (SD21, перед второй вакцинацией) и на 35 день исследования (SD35, две недели после второй вакцинации), подвергали твердофазному иммуноферментному анализу (ELISA) на выявление специфического для свиней иммуноглобулина G (IgG), направленного против рекомбинантно экспрессирующегося антигена Н3 IAV свиней, который является гомологичным Н3, который экспрессируется вакцинным штаммом гЕНВ-1 RаСН-SE_В. В то время как средние значения OD сыворотки из группы негативного контроля дали только очень низкие значения для SD21 и SD35, сыворотки от вакцинированных групп продемонстрировали значительное повышение уровня OD после двух внутримышечных введений (2× ВМ; SD35), после первого интраназального и последующего внутримышечного введения (ИН+ВМ; SD35), и после двух интраназальных введений (2× ИН; SD35) (фиг. 31). Таким образом, вакцинация при использовании тетравалентной вакцины IAV свиней, состоящий из гЕНВ-1 RаСН-SE_В и гЕНВ-1 RаСН-SE_D, вызывала серологический иммунный ответ у поросят против гемагглютинина Н3 свиного IAV, который экспрессируется вакцинным штаммом гЕНВ-1 RаСН-SE_В соответственно.

В дополнение к этому мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) очищали из крови, взятой у исследуемых животных на 28 день исследования (SD28). Затем PBMC повторно стимулировали либо Н3N2 штаммом R452-14 IAV свиней для заражения при множественности инфицирования 1 (Н3N2 MOI 1), либо рекомбинантно экспрессированным антигеном Н3 IAV свиней, гомологичным Н3, который экспрессируется вакцинным штаммом гЕНВ-1 RаСН-SE_В, при концентрации 1 мкг/мл (гН3 1 мкг/мл). Используя повторно стимулированные PBMC, проводили специфический для гамма-интерферона анализ иммуноферментных пятен (IFN γ ELISpot), а полученные значения нормализовали до 10^6 клеток и под-

считывали как средние значения на группу соответственно (фиг. 33). Несмотря на то что повторно стимулированные РВМС из группы контроля заражения (служили как негативный контроль для этого анализа, животные не были вакцинированы) показали средние значения пятен на группу ниже 15 после любой повторной стимуляции, повторно стимулированные РВМС из группы вакцинированных животных показали средние значения пятен на группу выше 30 после двух внутримышечных введений, более 55 пятен после первого интраназального и последующего внутримышечного введения (ИН+ВМ), и более 65 пятен после двух интраназальных введений (2× ИН), после любой повторной стимуляции соответственно (фиг. 33). Таким образом, вакцинация тетравалентной вакциной IAV свиней, состоящий из гЕНВ-1 RаСН-SE_B и гЕНВ-1 RаСН-SE_D, вызывала клеточный иммунный ответ у поросят как против гемагглютинаина НЗ свиного IAV, который экспрессируется вакцинным штаммом гЕНВ-1 RаСН-SE_B, так и против НЗН2 свиного IAV R452-14, используемого для гетерологичного заражения вирусной инфекцией соответственно

Таким образом, вакцинация поросят тетравалентной вакциной IAV, состоящий из гЕНВ-1 RаСН-SE_B и гЕНВ-1 RаСН-SE_D, индуцировала способный к обнаружению серологический и клеточный иммунный ответ у поросят и продемонстрировала эффективность вакцины путем статистически значимого снижения нагрузки IAV свиней в гомогенатах легких через пять дней после заражения гетерологичным IAV свиней.

Пример 12. Тетравалентная вакцина свиного IAV, состоящая из гЕНВ-1 RаСН-SE_B и гЕНВ-1 RаСН-SE_D обеспечивает диагностическое свойство дифференциации инфицированных и вакцинированных животных (DIVA) на основе специфических для нуклеопротеина (NP) IAV антител.

Для оценки серологических свойств DIVA тетравалентной вакциной свиного IAV, состоящей из гЕНВ-1 RаСН-SE_B и гЕНВ-1 RаСН-SE_D, поросят, которые были рождены от и вскормлены молозивом и молоком свиноматок, которые были дважды вакцинированы во время беременности коммерчески доступной инактивированной вакциной против IAV свиней, дважды подвергали вакцинации тетравалентной вакциной, содержащей гЕНВ-1 RаСН-SE_B и гЕНВ-1 RаСН-SE_D. Первый раз животных вакцинировали в первую неделю жизни, а второй раз - на четырнадцатой неделе жизни, или внутримышечно, а затем еще раз внутримышечно (2× ВМ), или сначала интраназально, а затем внутримышечно (ИН+ВМ), или дважды интраназально (2× ИН) в дозе 1×10^7 TCID₅₀ в дозе 2 мл на вакцинный штамм, животное и вакцинацию соответственно. Невакцинированная группа служила негативным контролем (негат. контр.). Для групп 2× ВМ, ИН+ВМ, 2× ИН и негативного контроля использовали пять животных на группу и брали образцы сыворотки до первой вакцинации (фиг. 34, до вакцинации) и через 14 дней после второй вакцинации (фиг. 34, после вакцинации), соответственно. Как положительный контроль два поросенка от невакцинированных свиноматок, которые были оценены как негативные на специфические для IAV антитела к моменту первой вакцинации (данные не показаны и фиг. 34 до вакцинации), были вакцинированы дважды коммерчески доступной инактивированной вакциной, содержащей свиней IAV (позитивн. контр.). Поросята позитивного контроля были вакцинированы первый раз на второй неделе жизни и второй раз - на пятой неделе жизни, соответственно, и образцы сыворотки были взяты перед первой вакцинацией (фиг. 34 до вакцинации) и через 22 дня после второй вакцинации (фиг. 34, после вакцинации).

Сыворотки, как описано выше, исследовали в ELISA, который выявляет специфический для нуклеопротеина (NP) свиного IAV IgG (фиг. 34). Все образцы сыворотки поросят от вакцинированных свиноматок (негат. контр., группы 2× ВМ, ИН+ВМ, 2× ИН) показали средние значения OD для группы 0,7 или выше перед вакцинацией, демонстрируя, таким образом, присутствие специфических для NP IAV антител материнского происхождения у этих невакцинированных животных (фиг. 34). В отличие от этого, средняя величина для сывороток группы поросят положительного контроля была ниже 0,15 перед вакцинацией, демонстрируя отсутствие/очень низкий уровень специфических для NP IAV антител. Через 22 дня после второй вакцинации (фиг. 34, после вакцинации) с помощью коммерчески доступной инактивированной вакцины свиного IAV, содержащей NP, среднее значение сывороток группы позитивного контроля увеличивалось до более 1,9, демонстрируя, таким образом, сильную индукцию способного к выявлению специфического для NP свиного IAV IgG у поросят. В отличие от этого, через 14 дней после вакцинации тетравалентной вакциной IAV свиней, которая состоит из гЕНВ-1 RаСН-SE_B и гЕНВ-1 RаСН-SE_D и которая не содержит или не экспрессирует NP свиного IAV, образцы сыворотки поросят групп 2× ВМ, ИН+ВМ, 2× ИН, а также невакцинированной группы негативного контроля показали средние значения OD на одну группу ниже 0,15, соответственно, демонстрируя, таким образом, снижение уровней специфических для NP IAV антител, присутствующих до вакцинации, до очень низких уровней, а также что вакцинация не приводила к сильной индукции способного к выявлению специфического к NP свиного IAV IgG у поросят.

Взяты вместе, эти данные показывают, что в то время как обычная инактивированная вакцина IAV свиней, содержащая NP, приводит к сильной индукции способных к обнаружению NP-специфических антител у вакцинированных поросят, вакцинация при использовании тетравалентной вакцины IAV свиней, состоящая из гЕНВ-1 RаСН-SE_B и гЕНВ-1 RаСН-SE_D, не вызывала сильной индукции способных к выявлению специфических для NP антител у вакцинированных поросят.

Тот факт, что тетравалентная вакцина IAV для свиней, которая состоит из гEHV-1 RacH-SE_B и гEHV-1 RacH-SE_D, не вызывает сильной индукции способных к выявлению специфических для NP антител у вакцинированных поросят, демонстрирует серологический диагностический маркер, который позволяет различать инфицированных от вакцинированных животных (DIVA) и проводить дифференцирование вакцинированных животных от животных, которые были вакцинированы традиционной инактивированной вакциной IAV свиней, содержащей NP.

Эта особенность DIVA используется для коммерческой разработки тестов, сопровождающих применение тетравалентной вакцины IAV свиней, состоящей из гEHV-1 RacH-SE_B и гEHV-1 RacH-SE_D, и для поддержки мероприятий, направленных на ликвидацию IAV свиней.

Все композиции и способы, раскрытые в данной заявке, могут быть выполнены и осуществлены без чрезмерного экспериментирования на основе данного описания. Несмотря на то что композиции и способы данного изобретения были описаны в отношении предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что вариации могут применяться к композициям и способам, а также на этапах или в последовательности этапов, описанных в данной заявке, не отступая от концепции, духа и объема в соответствии с изобретением. В частности, будет очевидным, что определенные агенты, которые являются химически и физиологически подобными, могут быть заменены агентами, описанными в данной заявке, в то время как такие же или подобные результаты будут достигнуты. Все такие подобные замены и модификации, которые являются очевидными для специалистов в данной области техники, считаются такими, которые находятся в пределах объема данного изобретения и его концепции, которая определяется приведенной ниже формулой изобретения.

Ссылки

Следующие ссылки в той мере, в которой они обеспечивают типичные процедурные или другие детали дополнительно к тем, которые изложены в этом документе, специально включены в данную заявку в качестве ссылки.

1. Allwinn R, Geiler J, Berger A, Cinatl J, Doerr HW. **2010**. Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunofluorescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? *Med Microbiol Immunol.* 199(2):117-21. doi: 10.1007/s00430-010-0143-4. Epub 2010 Feb 17.
2. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. **1985**. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2):521-30.
3. Brown, I.H., Chakraverty P., Harris P.A., Alexander D.J. **1995**. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet Rec.*, (13):328-9.
4. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **2000**. *Vet Microbiol.*, 74(1-2):29-46
5. Bryant, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., and Alcamí, A. **2003**. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *The EMBO Journal* Vol. 22 (4): 833-846.
6. Bustin, S. **2000**. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**(2): 169-193.
7. Colle, C.F. 3rd, O'Callaghan, D.J. **1995**. Transcriptional analyses of the unique short segment of EHV-1 strain Kentucky A. *Virus Genes*;9(3):257-68.
8. Dorsch-Häsler, K., Keil, G.M., Weber, F., Jasin, M. Schaffner, W., and Koszinowski, U.H. **1985**. A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *PNAS* Vol. 82: 8325-8329.

9. Drummer, H.E., Studdert, M.J., Crabb, B.S. **1998**. Equine herpesvirus-4 glycoprotein G is secreted as a disulphide-linked homodimer and is present as two homodimeric species in the virion. *J. Gen. Virol.* 79: 1205-1213
10. Goodwin, E.C. & Rottman, F.M. **1992**. The 3'flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J.Biol.Chem.* 267: 16330-16334.
11. Hübert, P. H., Birkenmaier, S., Rziha, H.-J. and Osterrieder, N. (1996), Alterations in the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain RaCH During Attenuation. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 43: 1–14. doi:10.1111/j.1439-0450.1996.tb00282.x
12. Luke, GA and Ryan, MD. **2013**. The protein coexpression problem in biotechnology and biomedicine: virus 2A and 2A-like sequences provide a solution. *Future Virology*, Vol. 8, No. 10, Pages 983-996.
13. Ma, G., Eschbaumer, M., Said, A., Hoffmann, B., Beer, M., Osterrieder, N. 2012. An equine herpesvirus type 1 (EHV-1) expressing VP2 and VP5 of serotype 8 bluetongue virus (BTV-8) induces protection in a murine infection model. *PLoS One*. 2012;7(4):e34425. doi: 10.1371/journal.pone.0034425. Epub 2012 Apr 12
14. Ma, G., Azab, W., Osterrieder, N. **2013**. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet Microbiol.* 167(1-2):123-34.
15. Nolan, T. Rebecca E Hands, R.E., and Bustin S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR *Nature Protocols* 1: 1559-1582
16. Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Kaaden, O.R., and O'Callaghan, D.J. **1996**. The equine herpesvirus 1 IR6 protein influences virus growth at elevated temperature and is a major determinant of virulence. *Virology* 226:243-251.
17. Ptashne, M. **2014**. *The Chemistry of Regulation of Genes and Other Things* The Journal of Biological Chemistry Vol. 289, (9) 5417–5435. Reed, L.J., and Muench, H. **1938**. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* (27) 3; 493-497.
18. Rajao DS, Sandbulte MR, Gauger PC, Kitikoon P, Platt R, Roth JA, Perez DR, Loving CL, Vincent AL. **2016**. Heterologous challenge in the presence of maternally-derived antibodies results in vaccine-associated enhanced respiratory disease in weaned piglets. *Virology*. 2016 Apr;491:79-88.
19. Rosas, C.T., König, P., Beer, M., Dubovi, E.J., Tischer, B.K., Osterrieder, N., **2007a**. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhoea virus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 88 (3), 748–757.
20. Rosas, C.T., B.K. Tischer, G.A. Perkins, B. Wagner, L.B. Goodman, N. Osterrieder. **2007b** . Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV) *Virus Research*, 125 , pp. 69–78.
21. Rosas, C.T., Van de Walle, G.R., Metzger, S.M., Loelzer, K., Dubovi, E.J., Kim, S.G., Parrish, C.R., Osterrieder, N., **2008**. Evaluation of a vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza. *Vaccine* 26 (19), 2335–3234.

22. Said, A., Elke Lange, E., Beer, M. Damiani, A., Osterrieder, N. **2013**. Recombinant equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine protects pigs against challenge with influenza A(H1N1)pmd09 Virus Research 173: 371– 376
23. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. **2004**. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. Nat Biotechnol. Dec;22(12):1567-72. Epub 2004 Nov 21.
24. Thacker, E. and Janke, B. **2008**. Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas J Infect Dis. (2008) 197 (Supplement 1): S19-S24 doi:10.1086/524988
25. Tischer, B.K, Smith, G.A.,and Osterrieder, N. in: Jeff Braman (ed.), *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition*, Methods in Molecular Biology, vol. 634,DOI 10.1007/978-1-60761-652-8_30, © Springer Science+Business Media, LLC **2010**, Chapter 30: *En Passant* Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System.
26. Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., Osterrieder, N., **2006**. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. Biotechnol. Tech. 40, 191–197.
27. Trapp, S., von Einem, J., Hofmann, H., Kostler, J., Wild, J., Wagner, R., Beer, M., Osterrieder, N., **2005**. Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. J. Virol. 79, 5445–5454.
28. Trombetta CM, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E. 2014. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. Vaccines (Basel) 13;2(4):707-34. doi: 10.3390/vaccines2040707.
29. Watson S.J., Langat P., Reid S.M., Lam T.T., Cotten M., Kelly M., Van Reeth K., Qiu Y., Simon G., Bonin E., Foni E., Chiapponi C., Larsen L., Hjulsager C., Markowska-Daniel I., Urbaniak K., Dürrwald R., Schlegel M., Huovilainen A., Davidson I., Dán Á., Loeffen W., Edwards S., Bublot M., Vila T., Maldonado J., Valls L.; ESNIP3 Consortium, Brown I.H., Pybus O.G., Kellam P. Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. **2015**, J Virol. Oct;89(19):9920-31.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор RasH EHV-1, включающий первую и вторую последовательности, которые кодируют экзогенный антиген, относящийся к патогену, который инфицирует животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, причем первая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встраивается в ORF70, где ORF70 модифицируют делецией части размером приблизительно 801 п.о., где делеция соответствует последовательности, по меньшей мере на 95% гомологичная SEQ ID NO: 20, а вторая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, встроена в сайт инсерции, и эти последовательности, кодирующие экзогенный антиген, функционально связаны с последовательностью промотора, где сайт инсерции второй последовательности, кодирующей экзогенный антиген, представляет собой ORF1/3 или ORF70.
2. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где первая и/или вторая последовательность(и), кодирующая(ие) экзогенный антиген, представляет(ют) собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин гриппа.
3. Вектор RasH EHV-1 по п.2, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует гемагглютинин гриппа подтипа H1 и/или H3.
4. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где первая и/или вторая последовательность(и), кодирующая(ие) экзогенный антиген, представляет(ют) собой последовательность, кодирующую гемагглютинин гриппа, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.
5. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где вторая последовательность, кодирующая экзогенный антиген, встроена в ORF1/3.
6. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где инсерция в ORF70 характеризуется частичной делецией, укорочением, заменой или модификацией, при этом ORF71 остается функциональной, и где прекращена экс-

прессия гликопротеина G продукта гена ORF70.

7. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где вектор EHV-1 включает по меньшей мере один фланкирующий участок с последовательностью, включающей любую из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

8. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где по меньшей мере один из промоторов является Т большой SV40, предраннего гена 1 HCMV и MCMV, промотором человеческого фактора элонгации альфа, промотором бакуловирусного полиэдрина или последовательностью, включающей любую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или нуклеотидные последовательности, комплементарные им.

9. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где по меньшей мере один промотор имеет 95% гомологию с любой из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 или комплементарными им нуклеотидными последовательностями.

10. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где по меньшей мере один промотор включает последовательность, на 95% идентичную SEQ ID NO: 3, или ее комплемент.

11. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где по меньшей мере один промотор включает последовательность, на 95% идентичную SEQ ID NO: 4, или ее комплемент.

12. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где промотор содержит р430 - SEQ ID NO: 3 и р455 - SEQ ID NO: 4.

13. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где первая и вторая последовательности, кодирующие экзогенный антиген, представляют собой последовательности, которые кодируют гемагглютинин гриппа.

14. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где животным, предназначенным для производства пищевых продуктов, является свинья.

15. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где патогенным возбудителем инфекции животного, предназначенного для производства пищевых продуктов, является вирус гриппа А свиней.

16. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где первой или второй последовательностью, кодирующей экзогенный антиген, является последовательность, кодирующая антиген гемагглютинина гриппа А свиньи, кодируемая последовательностью от свиньи.

17. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где первая или вторая последовательность, кодирующая экзогенный антиген, представляет собой последовательность, которая кодирует антиген гемагглютинина гриппа А свиньи, кодируемую последовательностью, происходящей от свиньи, и где по меньшей мере одна последовательность, кодирующая антиген гемагглютинина гриппа А, происходящая от свиньи, встроена в ORF70.

18. Вектор RasH EHV-1 по п.1, где вторая последовательность, кодирующая экзогенный антиген, встроена в ORF1/3, где первая и/или вторая последовательность(и), которая(ые) кодирует(ют) антиген гемагглютинина гриппа, по меньшей мере на 95% идентична(ы) SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29, и где промоторы имеют 95% гомологию с любой из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 или с нуклеотидными последовательностями, комплементарными им.

19. Иммуногенная композиция, включающая вектор RasH EHV-1 по п.1 и фармацевтический носитель.

20. Вакцина DIVA, включающая вектор RasH EHV-1 по п.1 и диагностический маркер для определения различия между инфицированными и вакцинированными животными.

21. Способ иммунизации животного, предназначенного для производства продуктов питания, который включает введение такому животному, предназначенному для производства продуктов питания, двух или более доз иммуногенной композиции по п.19 или вакцины DIVA по п.20.

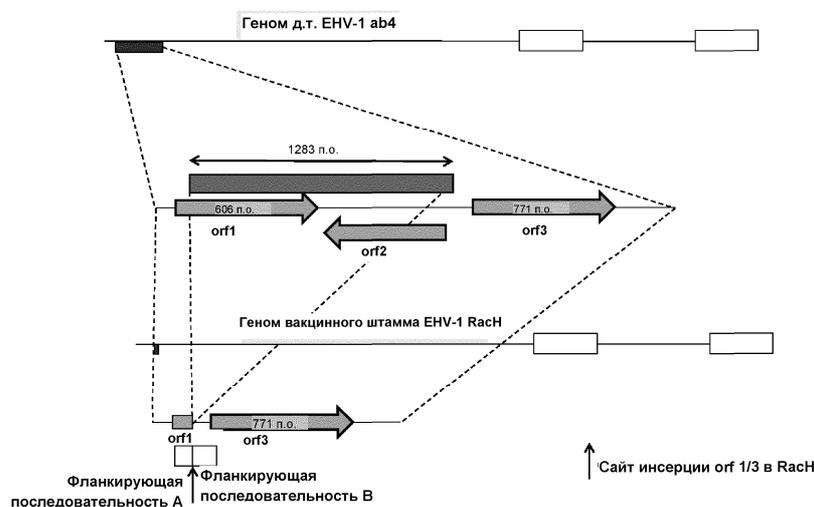
22. Способ по п.21, где животное, предназначенное для производства пищевых продуктов, представляет собой свинью.

23. Способ по п.21, где результатом способа является улучшение по меньшей мере одного параметра эффективности, выбранного из уменьшения потери веса тела, снижения вирусной нагрузки в легких, снижения поражения легких, снижения и/или сокращения выделения вируса, снижения ректальной температуры, снижения респираторных симптомов, повышения индукции антител к вирусу гриппа А свиней, повышения индукции нейтрализующих антител к вирусу гриппа А свиней, повышенной стимуляции Т-клеток против вируса гриппа А свиней, повышенной стимуляции В-клеток против вируса гриппа А свиней и уменьшения провоспалительных цитокинов или их комбинаций, по сравнению с животными, предназначенными для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы того же вида, где последовательность кодирует экзогенный антиген, вирусный антиген или антиген гемагглютинина гриппа, по меньшей мере на 95% идентичный любой из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

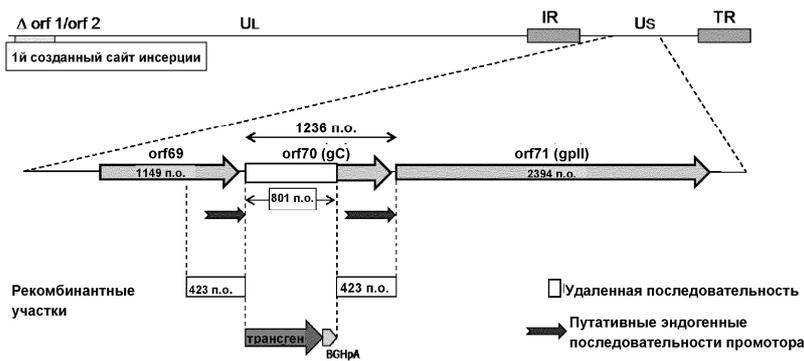
24. Способ лечения или профилактики клинических признаков, вызванных вирусом гриппа А свиней у животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по п.19 или вакцины DIVA по п.20, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, кодирует антиген гемагглютинина гриппа, по меньшей мере на 95% идентичный любой из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

25. Способ снижения титров вируса гриппа А свиней в легких животных, предназначенных для производства пищевых продуктов, которые в этом нуждаются, по сравнению с животными, предназначенными

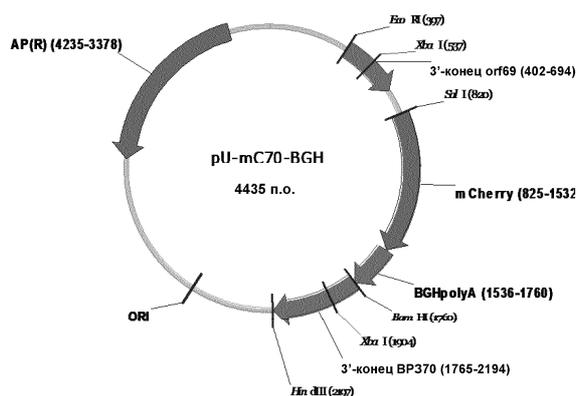
для производства продуктов питания, неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает введение животному, предназначенному для производства продуктов питания, терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по п.19 или вакцины DIVA по п.20, где последовательность, кодирующая экзогенный антиген, кодирует антиген гемагглютинаина гриппа, по меньшей мере на 95% идентичный любой из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.



Фиг. 1А

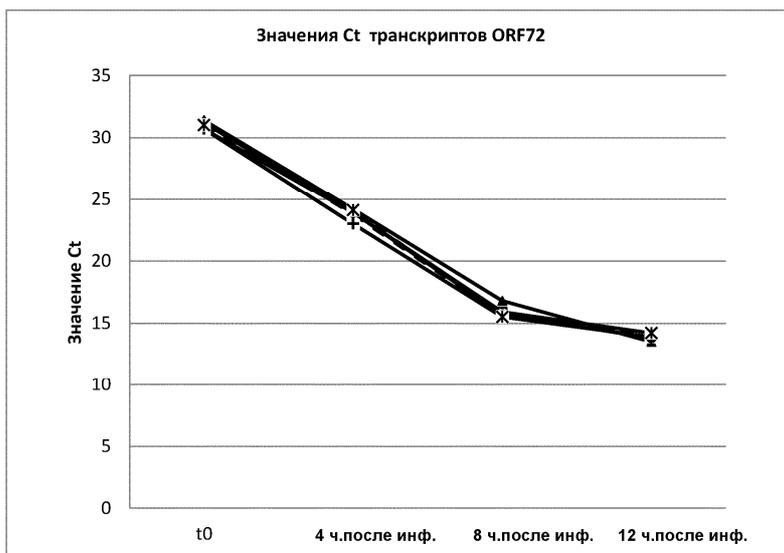


Фиг. 1В

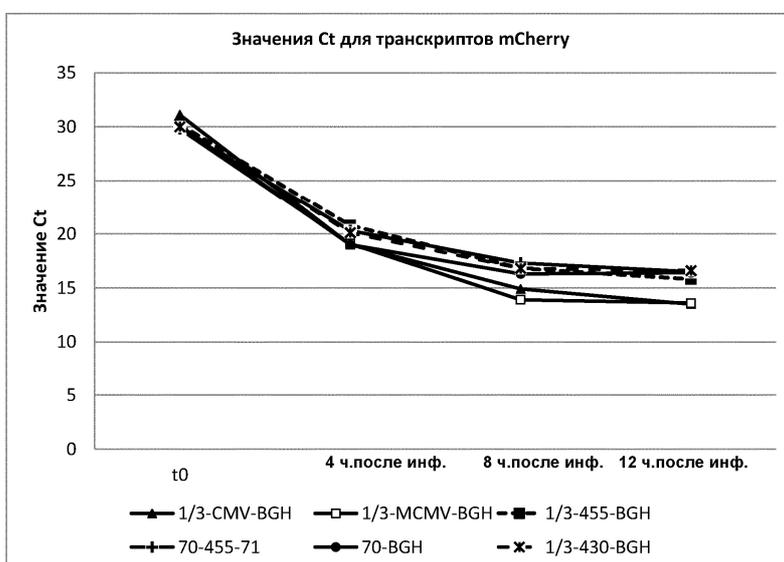


3'-конец VP369 вирусная геномная последовательность ДКН, фланкирующая сайт инсерции выше
 3'-конец VP370 вирусная геномная последовательность ДКН, фланкирующая сайт инсерции ниже
 BGH polyA последовательность полиаденилирования
 ORI точка начала репликации плазмидного вектора
 Arg ген резистентности к ампициллину (β-лактамаза)
 BamHI, EcoRI, HindIII, Sall, XbaI обозначают рестрикционные сайты эндонуклеаз

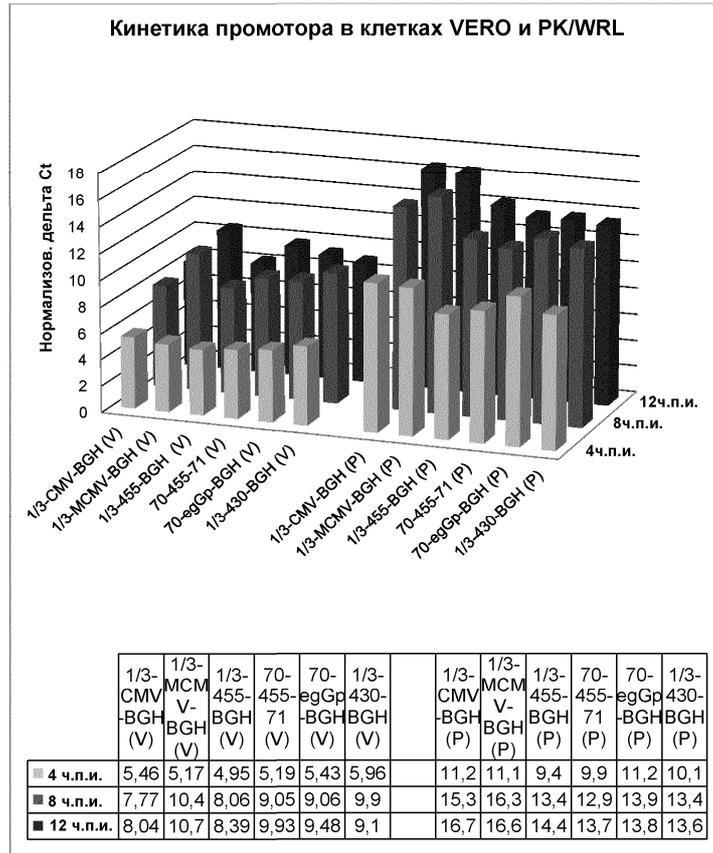
Фиг. 2



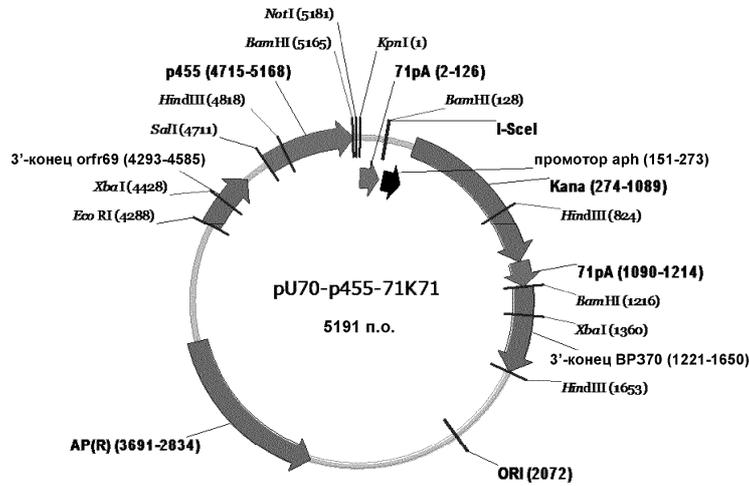
Фиг. 3А



Фиг. 3В

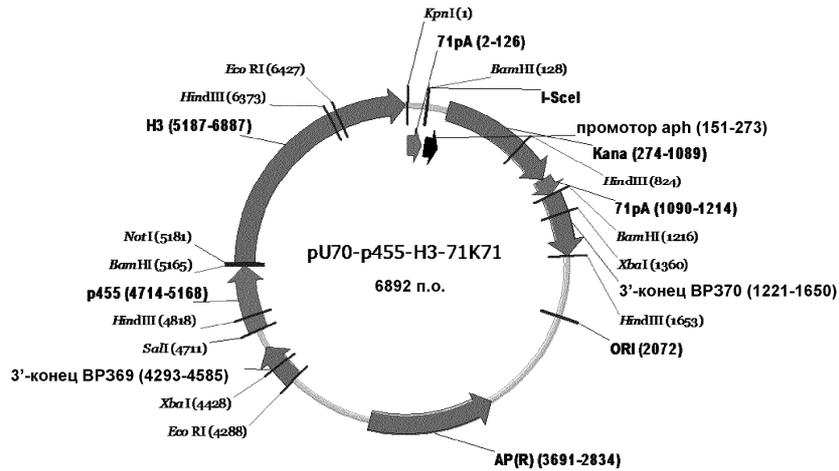


Фиг. 4



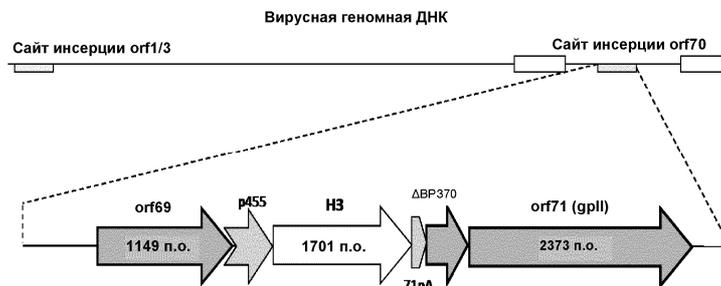
- 3'-конец BP369 инсерция выше
 - 3'-конец BP370 инсерция ниже
 - p455
 - 71pA
 - I-Sce1
 - промотор aph
 - Kana
 - ORI
 - Arg
 - EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI
- последовательность вирусной геномной ДНК, фланкирующая сайт инсерции выше
 - последовательность вирусной геномной ДНК, фланкирующая сайт инсерции ниже
 - промотор, который контролирует экспрессию трансгена
 - последовательность полиаденилирования
 - сайт рестрикции для I-Sce1
 - прокариотический промотор, который контролирует экспрессию гена резистентности к канамицину
 - orf резистентности к канамицину
 - точка начала репликации плазмидного вектора
 - ген резистентности к ампициллину
 - обозначают рестрикционные сайты эндонуклеаз

Фиг. 5



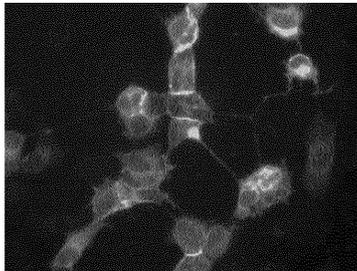
- 3'-кінець BP369** последовательность вирусной геномной ДНК, фланкирующая сайт инсерции выше
- 3'-кінець BP370** последовательность вирусной геномной ДНК, фланкирующая сайт инсерции ниже
- p455** промотор, который контролирует экспрессию трансгена
- H3** трансген (гемагглютинин IAV)
- 71pA** последовательность полиаденилирования
- I-Sce1** сайт рестрикции для I-Sce1
- промотор aph** прокариотический промотор, который контролирует экспрессию гена резистентности к канамицину
- Kana** *orf* резистентности к канамицину
- ORI** точка начала репликации плазмидного вектора
- Apr** ген резистентности к ампициллину
- EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI** обозначают рестрикционные сайты эндонуклеаз

Фиг. 6



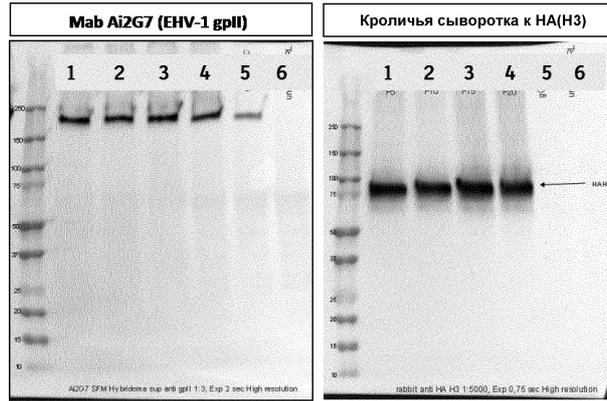
Фиг. 7

gENV-1 RasH-SE70-455-H3

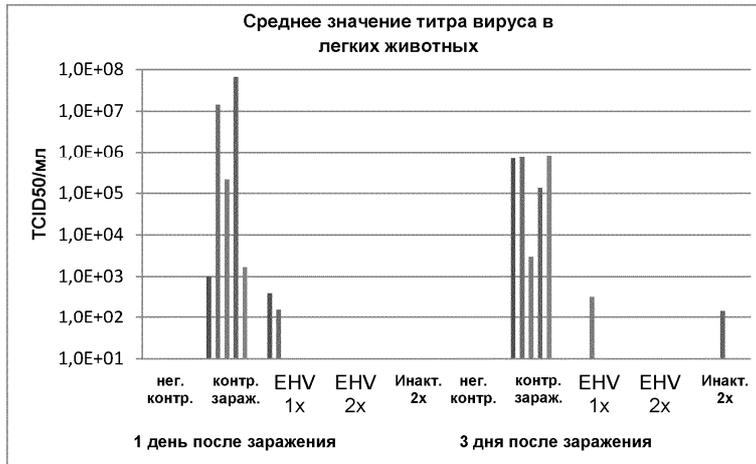


Моноклональное антитело к H3

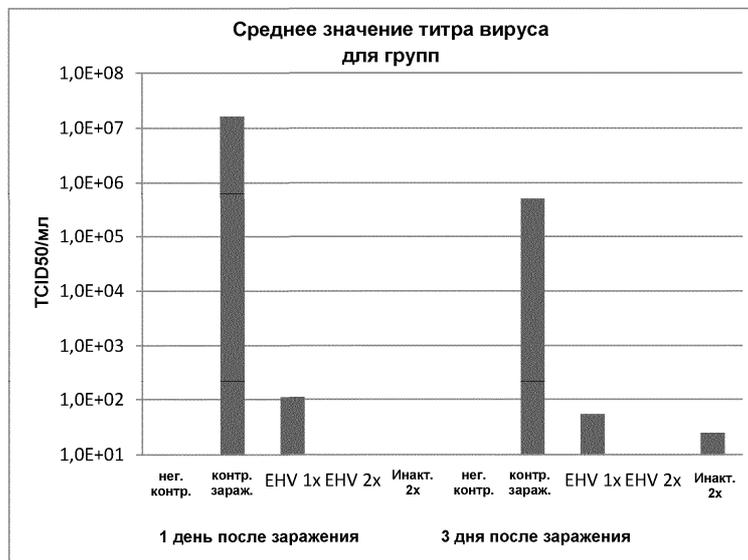
Фиг. 8



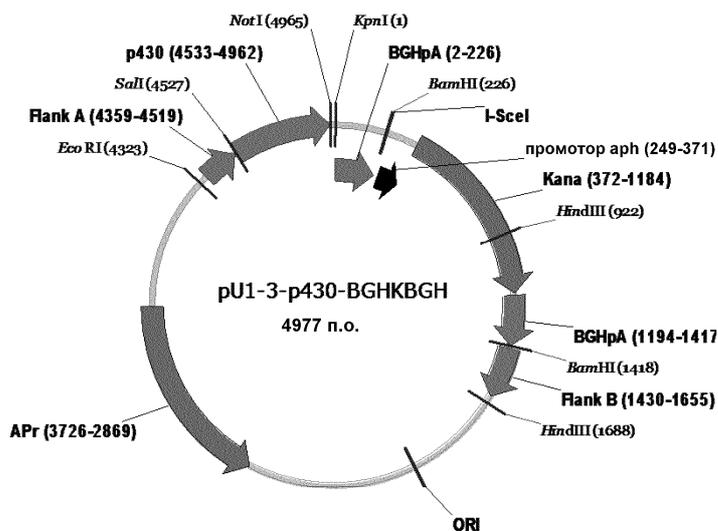
Фиг. 9



Фиг. 10А

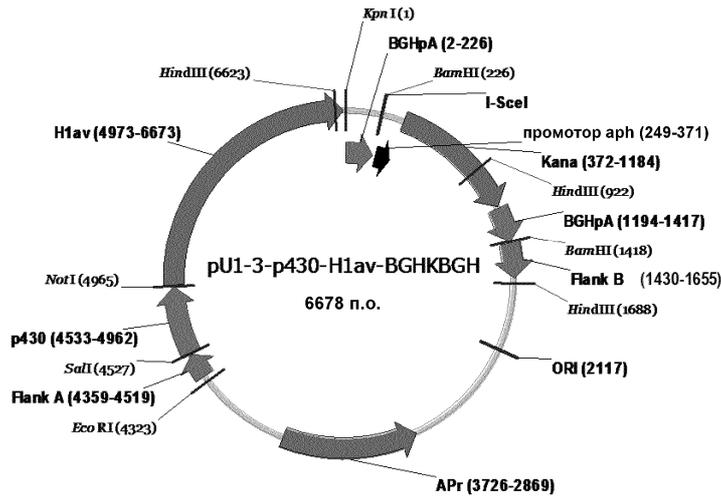


Фиг. 10В



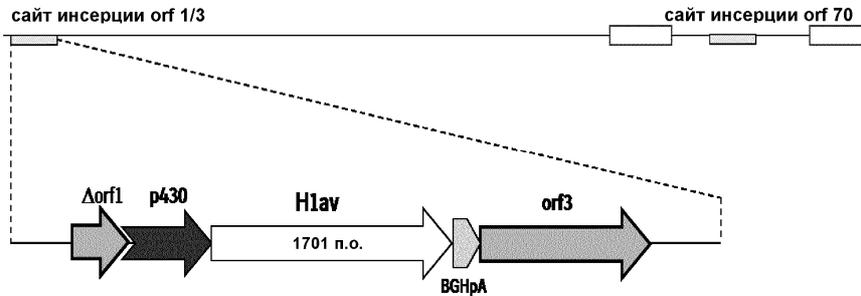
- Flank A** вирусная геномная последовательность ДНК которая фланкирует сайт инсерции выше
- Flank B** вирусная геномная последовательность ДНК, которая фланкирует сайт инсерции ниже
- p430** промотор, который контролирует экспрессию трансгена
- BGHPA** последовательность полиаденилирования
- I-SceI** рестриционный сайт для I-Sce1
- промотор aph** прокариотический промотор, который контролирует экспрессию гена резистентности к канамицину
- Kana** *orf* резистентности к канамицину
- ORI** точка начала репликации плазмидного вектора
- APc** ген резистентности к ампициллину
- EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI** обозначают рестриционные сайты эндонуклеаз

Фиг. 11

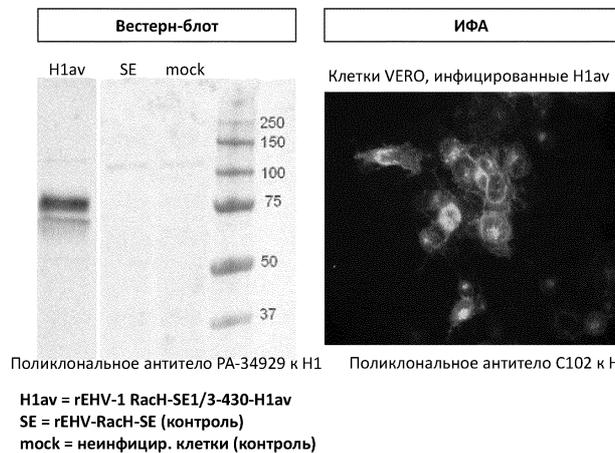


- Flank A** вирусная геномная последовательность ДНК, которая фланкирует сайт инсерции выше
- Flank B** вирусная геномная последовательность ДНК, которая фланкирует сайт инсерции ниже
- p430** промотор, который направляет экспрессию трансгена
- H1av** трансген (гемагглютинин IAV)
- BGHPA** последовательность полиаденилирования
- I-SceI** рестрикционный сайт для I-SceI
- promoter aph** прокариотический промотор, который контролирует экспрессию гена резистентности к канамицину
- Kana** орф резистентности к канамицину
- ORI** точка начала репликации плазмидного вектора
- Apr** ген резистентности к ампициллину
- EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI** обозначают рестрикционные сайты эндонуклеаз

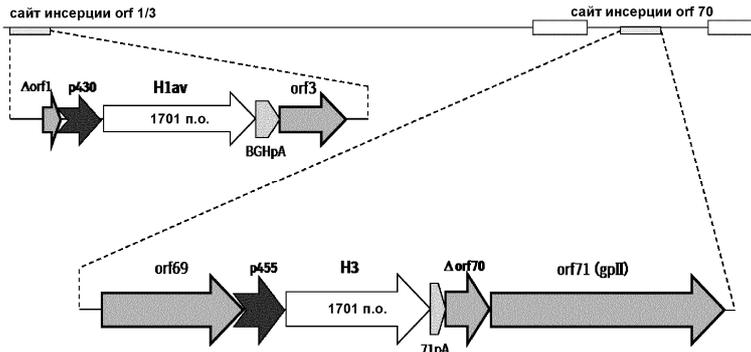
Фиг. 12



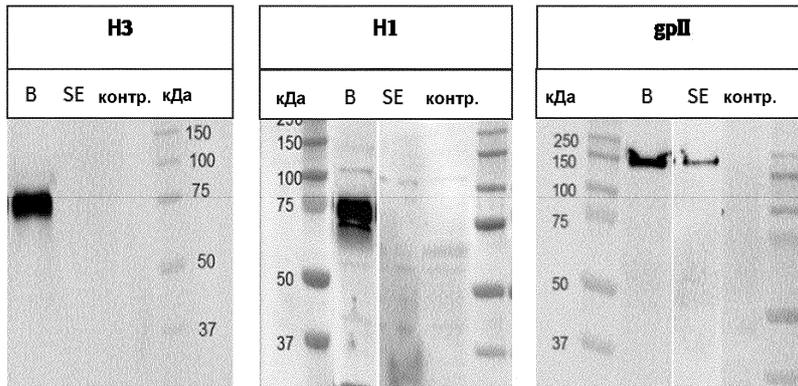
Фиг. 13



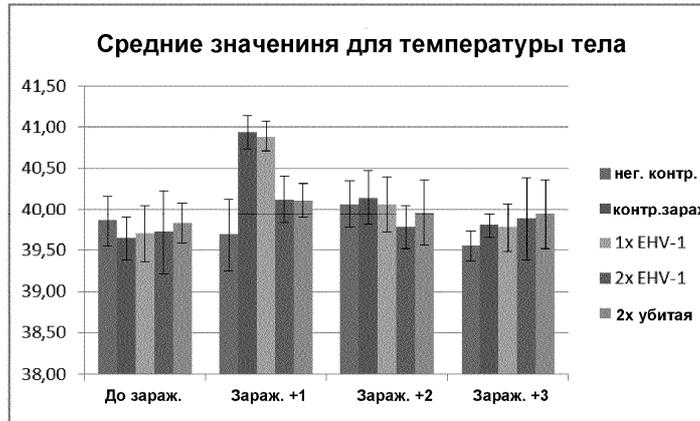
Фиг. 14



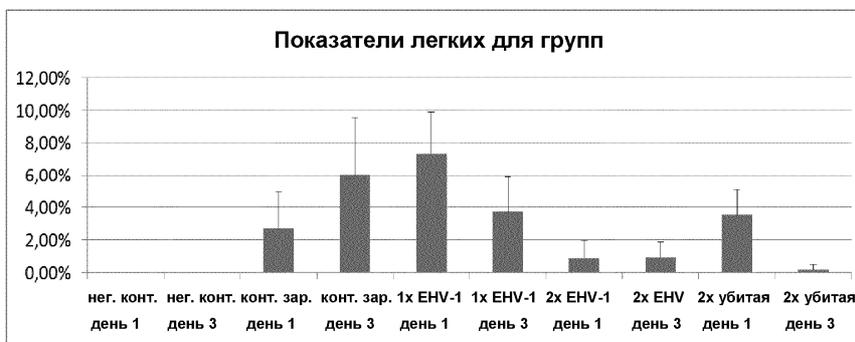
Фиг. 15



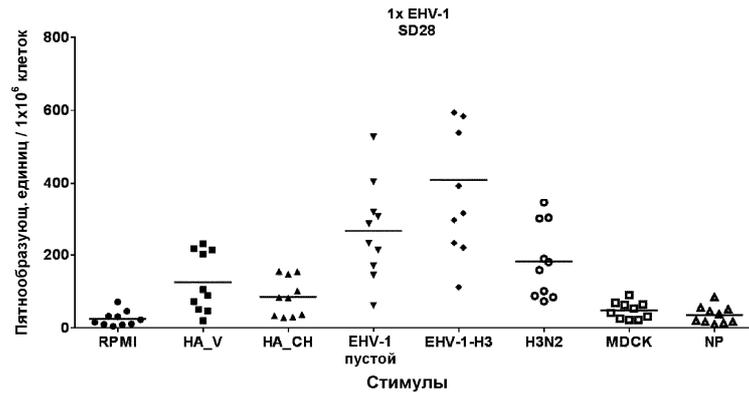
Фиг. 16



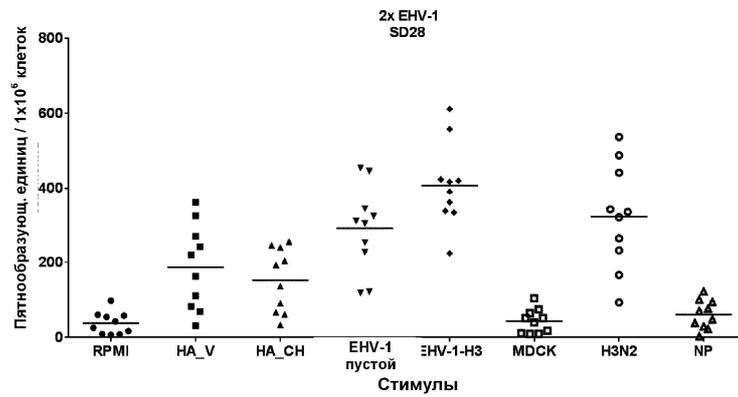
Фиг. 17



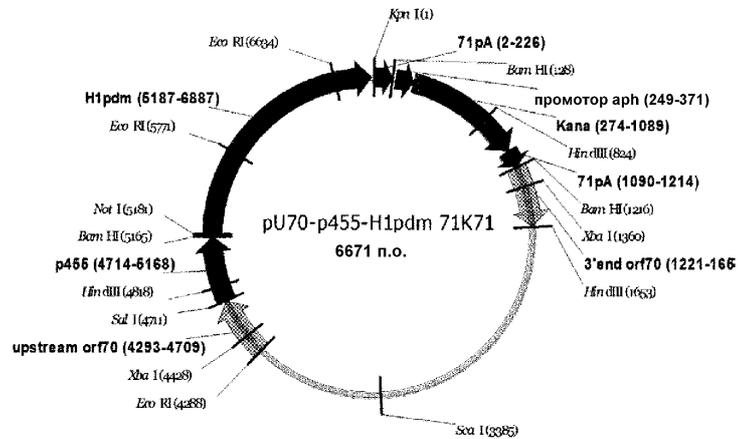
Фиг. 18



Фиг. 21С

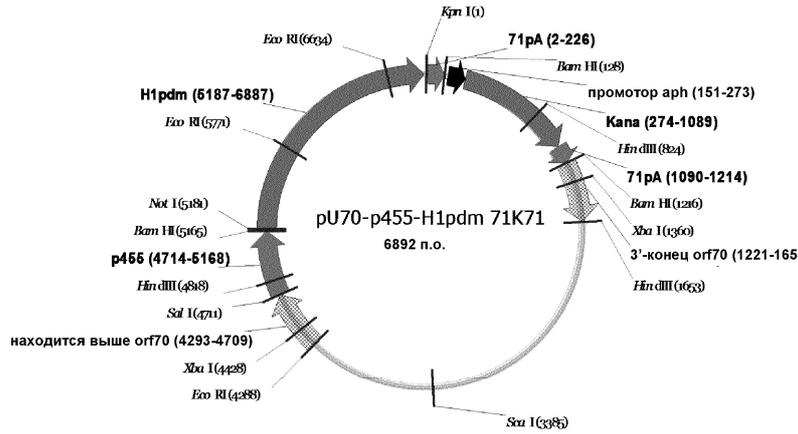


Фиг. 21D



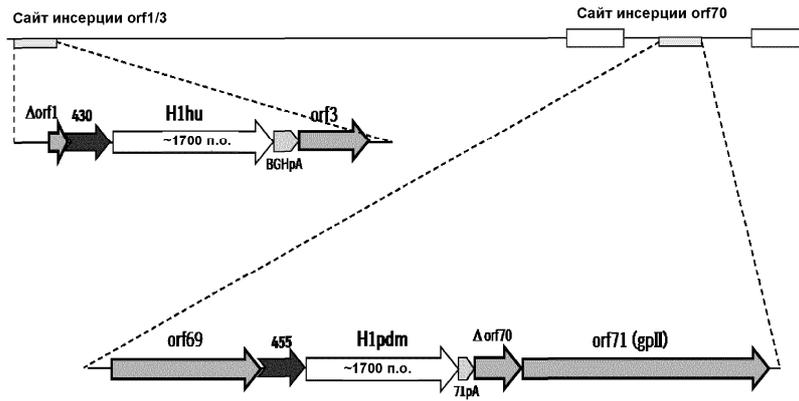
- F flank A** последовательность вирусной геномной ДНК, которая фланкирует сайт инсерции выше
- F flank B** последовательность вирусной геномной ДНК, которая фланкирует сайт инсерции ниже
- p430** промотор, который направляет экспрессию трансгена
- H1hu** трансген (гемагглютинин IAV)
- BGHpA** последовательность полиаденилирования
- I-Sce1** сайт расщепления для I-Sce1
- I-Ceu 1** сайт расщепления для I-Ceu1
- промотор aph** прокариотический промотор, который контролирует экспрессию гена резистентности к канамицину
- Kana** orf резистентности к канамицину
- ScaI, EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI** обозначают сайты рестрикции эндонуклеаз

Фиг. 22

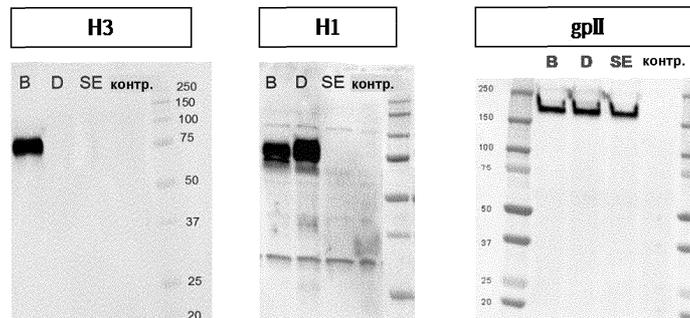


- 3'-конец ORF69 последовательность вирусной геномной ДНК, которая фланкирует сайт инсерции выше
- 3'-конец ORF70 последовательность вирусной геномной ДНК, которая фланкирует сайт инсерции ниже
- p455 промотор, который контролирует экспрессию трансгена
- 71pA последовательность полиаденилирования
- I-Sce1 сайт расщепления I-Sce1
- промотор aph прокариотический промотор, который контролирует экспрессию гена стойкости к канамицину
- Kana orf резистентности к канамицину
- Scal, EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI обозначают сайты рестрикции эндонуклеаз

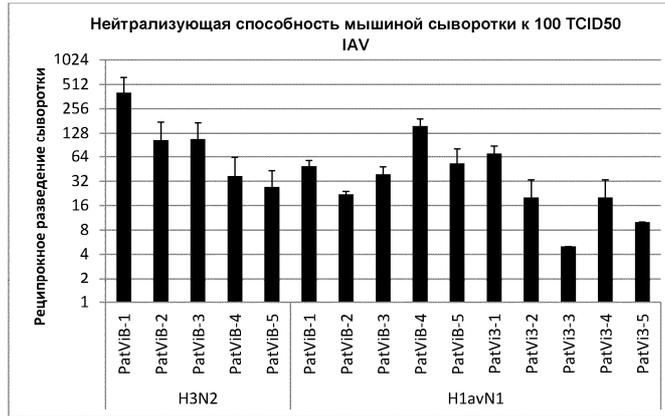
Фиг. 23



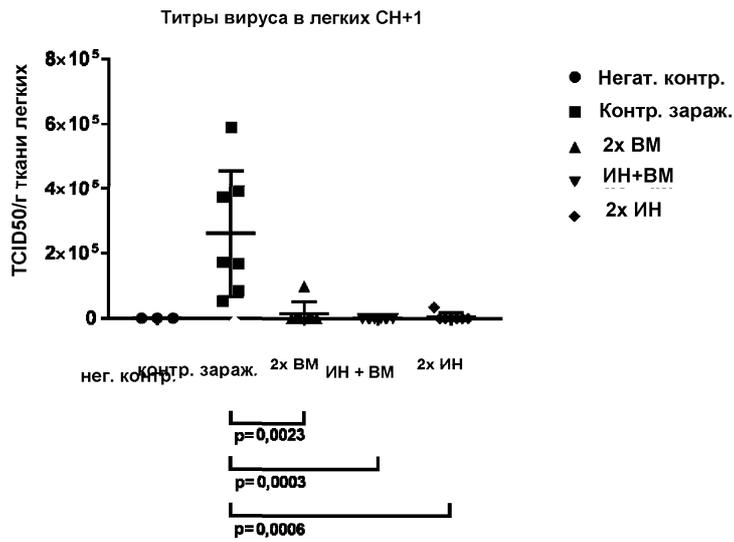
Фиг. 24



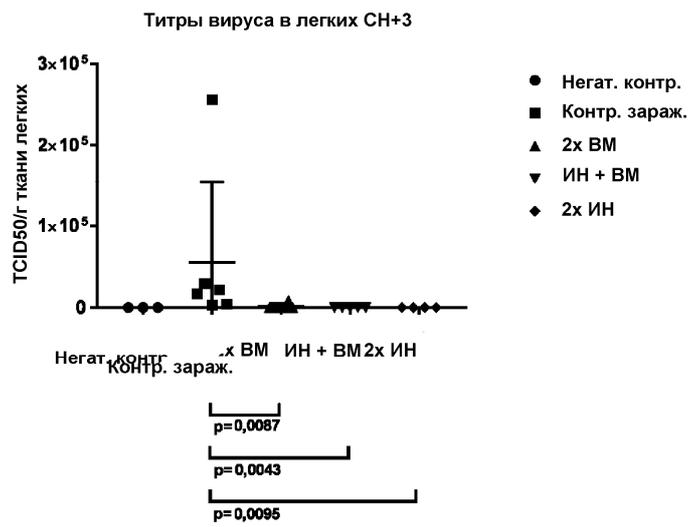
Фиг. 25



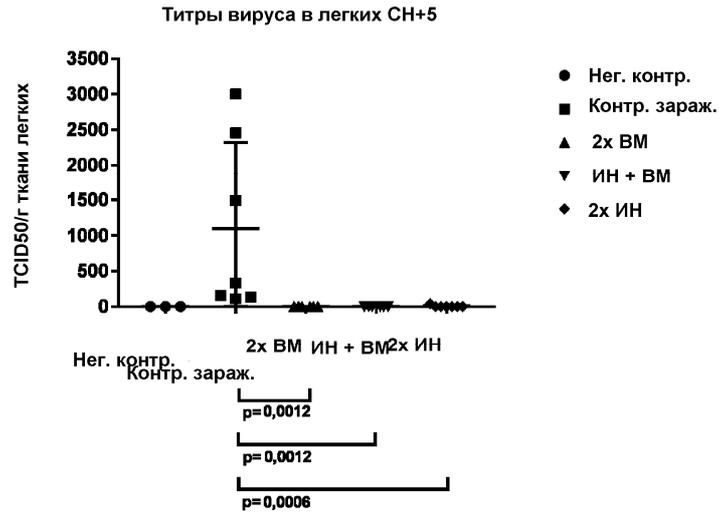
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



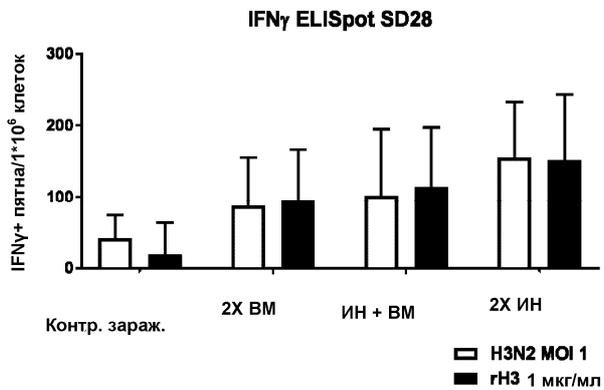
Фиг. 29



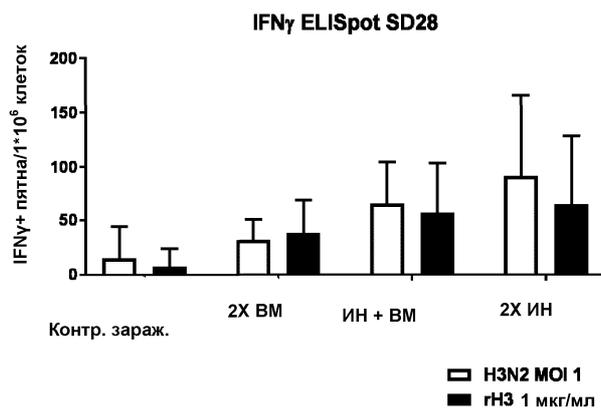
Фиг. 30



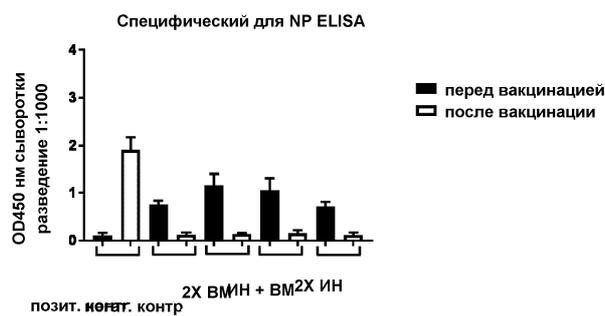
Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34