

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046085**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.06

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
C12N 15/869 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092165

(22) Дата подачи заявки
2019.03.19

(54) НОВЫЙ ЕHV САЙТ ИНСЕРЦИИ UL-43

(31) **18162636.7**

(32) **2018.03.19**

(33) **EP**

(43) **2021.02.25**

(86) **PCT/EP2019/056749**

(87) **WO 2019/179966 2019.09.26**

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

(72) Изобретатель:
**Мундт Элис, Галлен Андреас, Рехмет
Кристина (DE)**

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

(56) Teng Huang ET AL.: "Equine Herpesvirus 1 Multiply Inserted Transmembrane Protein pUL43 Cooperates with pUL56 in Downregulation of Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class I", Journal of virology, 1 June 2015 (2015-06-01), pages 6251-6263, XP055476721, United States DOI: 10.1128/JVI.00032-15. Retrieved from the Internet: URL:<http://jvi.asm.org/content/89/12/6251.full.pdf> Abstract; p.6251, col.2; p.6254, col.2 - p.6255, col.1; fig.1

WO-A2-0061736
US-A1-2007280960
WO-A1-03087382
WO-A2-0008191
US-B1-6187320

(57) Изобретение относится к области (векторных) вакцин и, в особенности, к новому ЕHV сайту инсерции UL43. Изобретение дополнительно касается родственных экспрессионных кассет и векторов, которые пригодны для экспрессии генов, представляющих интерес, в особенности, антигенкодирующих последовательностей. Вирусные векторы изобретения пригодны для получения иммуногенной композиции или вакцины.

B1

046085

046085 B1

Перечень последовательностей

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

Предпосылки создания изобретения

А. Область техники, к которой относится изобретение.

Настоящее изобретение относится к области (векторных) вакцин, и, в особенности, к новому EHV сайту инсерции UL43. Настоящее изобретение дополнительно касается родственных экспрессионных кассет и векторов, которые пригодны для экспрессии генов, представляющих интерес, в особенности, антигенкодирующих последовательностей. Вирусные векторы настоящего изобретения пригодны для получения иммуногенной композиции или вакцины.

В. Предпосылки и описание предшествующего уровня техники.

Патоген лошадей альфагерпесвирус лошадей 1 типа (вирусный аборт кобыл, EHV-1) относится к роду *Varicellovirus* в подсемействе *Alphaherpesvirinae* в семействе *Herpesviridae* в порядке *Herpesvirales*. Он представляет собой большой, оболочечный вирус с геномом, представленным двухцепочечной ДНК из приблизительно 150000 пар оснований. Другими важными представителями подрода *Varicellovirus* являются альфагерпесвирус человека 3 типа (вирус ветряной оспы), вирус болезни Ауески 1 (вирус псевдобешенства), альфагерпесвирус 1 типа крупного рогатого скота (вирус инфекционного бронхита) и альфагерпесвирус лошадей 4 типа (вирус ринопневмонии лошадей, EHV-4) (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30)). EHV-1 и EHV-4 являются эндемическими и поражают лошадей во всем мире. В то время как EHV-4 вызывает преимущественно умеренную инфекцию верхних дыхательных путей, EHV-1 может вызывать системную инфекцию с рядом заболеваний от респираторных симптомов до аборта и летальной миелоэнцефалопатии в зависимости от штамма и иммунологического статуса хозяина. В настоящее время доступны две лицензированные модифицированные живые вакцины (MLV) против EHV-1 в США и Европе, соответственно, *Rhinomune*® (Boehringer Ingelheim) и *Prevacipol*® (MSD). Обе содержат классически аттенуированный EHV-1 *RacH* штамм, который пассивировали 256 раз в эпителиальных клетках свиней для аттенуирования (Ma и др. 2013). Механизм аттенуирования исследовали на молекулярном уровне. Osterrieder и др. (1996) показали, что в *RacH* отсутствуют две геномные копии *orf67* (IR6) и что восстановления одной копии достаточно для восстановления вирулентности. Кроме того, *RacH* несет 1283 по делецию, удаляющую более чем 90% кодирующей последовательности *orf1*(UL56), которая кодирует иммуносупрессивный вирусный белок. Другие мутации также могут оказывать влияние на аттенуирование, но до сих пор они не были подробно исследованы. Все это делает *RacH* чрезвычайно безопасным вакцинным штаммом, поскольку возобновление вирулентности путем пассивирования у вакцинированных животных крайне маловероятно, если вообще возможно.

Два варианта бактериальной искусственной хромосомы *E.coli* (BAC), заякоривающей полный геном вакцинного штамма *RacH* альфагерпесвируса лошадей 1 типа (EHV-1): *pRacH* и *pRacH-SE* известны в качестве платформы для разработки векторной вакцины. BAC *pRacH-SE* был создан на основе *pRacH*, причем BAC изначально клонировали в лаборатории Klaus Osterrieder, FU Berlin. *pRacH* имеет делецию *orf71* (US5), кодирующую гликопротеин II (*gpII*; Wellington и др., 1996). На это место интродуцировали BAC-векторные последовательности и GFP-экспрессионную кассету. При этом, для того, чтобы восстановить немодифицированный EHV-1 *RacH* из *pRacH*, его необходимо котрансфектировать с применением плазмиды, содержащей полную *orf71* (US5) плюс фланкирующие участки, таким образом, во время репликации вируса части BAC-векторной последовательности и GFP-экспрессионной кассеты заменяются на *orf71* (US5) путем гомологичной рекомбинации таким способом, что исходный геном *RacH* будет восстановлен. *pRacH* был модифицирован в настоящем изобретении таким образом, что BAC-векторные последовательности/GFP-экспрессионная кассета становятся само-усекаемыми (SE) при трансфекции в клеточных культурах (Tischer и др., 2007). Эта улучшенная BAC была обозначена как *pRacH-SE*. *pRacH* и *pRacH-SE* обе могут служить платформами для разработки векторной вакцины, только с единственным отличием, что *pRacH-SE* существенным образом облегчает восстановление *orf71* (US5) -репарированного вируса.

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

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

Штаммы EHV-1 дикого типа имеют три открытые рамки считывания (orf), называемые orf1 (UL56), orf2 и orf3, на одном конце длинного уникального сегмента их генома (координаты последовательности 1298-3614; фиг. 1). Orf1 (UL56) и orf3 последовательно скомпонованы на одной цепи ДНК, в то время как orf2 кодируется комплементарной цепью. Вакцинный штамм RacH имеет делецию 1283 по в этом участке, вовлекающую orf1 и orf2, указывая на то, что эти гены являются незначительными для репликации вируса. По этой причине, данный сайт служит в качестве сайта инсерции трансгена. Этот сайт инсерции называют ORF1/3 (UL56).

Однако, размер и количество трансгенов, которые могут быть инsertированы в ORF1/3 (UL56) сайт инсерции, обычно ограничено. Таким образом, с целью расширения возможностей EHV вектора, существует неудовлетворенная потребность в новых и альтернативных путях инсерции и экспрессии трансгенов из EHV вектора, в особенности, рекомбинантного EHV-1 RacH вектора.

Краткое изложение сущности изобретения

Для того чтобы увеличить способности EHV вектора, настоящая изобретение обеспечивает новые и альтернативные пути инсерции и экспрессии трансгенов из каркаса EHV вектора.

Настоящее изобретение касается нового, альтернативного сайта инсерции трансгена UL43, который можно использовать для инсерции трансгенной последовательности и экспрессии трансгенного белка из EHV вектора, в особенности, рекомбинантного EHV-1 RacH.

Новый "UL43 сайт инсерции" в EHV векторе характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или т.п. по отношению к UL43 (ORF17). Полагают, что делеция полной UL43 будет неблагоприятной для репликации вируса и, таким образом, производства и эффективности вакцины, поскольку полная делеция UL43 будет оказывать влияние на промотор UL44, кодирующий гликопротеин С. Новый UL43 сайт инсерции и/или инсерция (экспрессионной кассеты) в UL43 функционально определяется таким образом, что UL44 остается функциональным или интактным.

В специфическом аспекте, UL43 сайт инсерции охватывает делецию приблизительно части 870 по (SEQ ID NO: 21) в пределах UL43 для RacH (SEQ ID NO: 18) или на 70, 80, 85, 90, 95, 99% его гомологичной последовательности. Делетированная часть в RacH геномной последовательности представлена на SEQ ID NO: 21 (нет доступных номеров нуклеотидов, поскольку полная RacH геномная последовательность не известна). В другом специфическом аспекте, UL43 сайт инсерции охватывает теоретическую 870 по делецию в пределах UL43 (нт 23021 - 24226, с обратной комплементарностью) для EHV-1 штамма V592 дикого типа (номер доступа Genbank AY464052.1) (SEQ ID NO: 23). Делетированная часть соответствует геномной последовательности V592 дикого типа (номер доступа Genbank AY464052.1), нуклеотиды 23353 и 24226, с обратной комплементарностью (SEQ ID NO: 24).

В настоящем изобретении "фланкирующие участки" направляют рекомбинацию экспрессионной кассеты, включающей представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, предпочтительно антигенкодирующую последовательность, в EHV геноме. Эти фланкирующие участки в природе присутствуют в EHV. Up UL43 фланкирующий участок (226 по, SEQ ID NO: 19) и Up UL44 фланкирующий участок (305 по, SEQ ID NO: 20) выбирают для классической гомологичной рекомбинации для всех трансферных векторов/плазмид, используемых для UL43 сайта. В EHV-1 штамме V592 дикого типа (номер доступа Genbank AY464052.1) соответствующие последовательности расположены на нуклеотидах 24227-24452 с обратной комплементарностью (фланкирующий участок up UL43, SEQ ID NO: 26) и 23049-23354 с обратной комплементарностью (фланкирующий участок up UL44, SEQ ID NO: 27).

Карты плазмиды / вектора на фиг. 21 для трансферной плазмиды pU-mC70-BGH (SEQ ID NO: 37), на фиг. 22 для трансферного вектора pU70-p455-71K71 (SEQ ID NO: 28), и на фиг. 3 для трансферной плазмиды pU70-p455-H3-71K71 (SEQ ID NO: 29) являются примерами векторов, содержащих экспрессионную кассету, включающую новый ORF70 сайт инсерции. Карты плазмиды / вектора на фиг. 23 для трансферного вектора pU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO: 30), и на фиг. 4 для трансферной плазмиды pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO: 31) являются примерами векторов, содержащих экспрессионную кассету, включающую ORF1/3 (UL56) сайт инсерции.

Карты плазмиды / вектора на фиг. 24 для трансферного вектора pUUL43-p422-18K18 (SEQ ID NO: 34), на фиг. 14 для трансферной плазмиды pUUL43-422-mC-18K18 (SEQ ID NO: 35), и на фиг. 16 для трансферной плазмиды pUUL43-422-H1pdm-18K18 (SEQ ID NO: 36) являются примерами векторов, содержащих экспрессионную кассету, включающую новый UL43 сайт инсерции.

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

Настоящее изобретение дополнительно касается EHV вектора, экспрессирующего два или три различных трансгена из одного векторного остова без связывания двух или трех трансгенов с помощью функций, имеющих происхождение из РНК-вируса (2а пептиды, IRES сайты), под контролем одного

промотора.

Настоящее изобретение дополнительно касается вектора альфагерпесвируса лошадей (EHV), предпочтительно EHV-1, RasH или RasH-SE, включающего первую(-ый) представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, инсертированную(-ый) в новый UL43 сайт инсерции, и вторую(-ой) представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, инсертированную(-ый) в хорошо известный сайт инсерции, такой как ORF1/3 (UL56) или другой сайт инсерции ORF70 (US4). Кроме того, настоящее изобретение дополнительно касается векторов на основе других герпесвирусов, в частности, альфагерпесвирусов, в частности, Varicelloviruses, включая альфагерпесвирус лошадей 3 типа (EHV-3), альфагерпесвирус лошадей 4 типа (EHV-4), альфагерпесвирус лошадей 8 типа (EHV-8), альфагерпесвирус лошадей 9 типа (EHV-9), альфагерпесвирус крупного рогатого скота 1 типа (BHV-1), альфагерпесвирус крупного рогатого скота 5 типа (BHV-5), альфагерпесвирус собак 1 типа, и альфагерпесвирус кошек 1 типа.

Настоящее изобретение дополнительно касается вектора альфагерпесвируса лошадей (EHV), предпочтительно EHV-1, RasH или RasH-SE, включающего первую(-ый) представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, инсертированную(-ый) в новый UL43 сайт инсерции, и вторую(-ой) представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, инсертированную(-ый) в другой сайт инсерции ORF70 (US4), и третью представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, инсертированную(-ый) в хорошо известный сайт инсерции, такой как ORF1/3 (UL56). Кроме того, настоящее изобретение дополнительно касается векторов на основе других герпесвирусов, в частности, альфагерпесвирусов, в частности, Varicelloviruses, включая альфагерпесвирус лошадей 3 типа (EHV-3), альфагерпесвирус лошадей 4 типа (EHV-4), альфагерпесвирус лошадей 8 типа (EHV-8), альфагерпесвирус лошадей 9 типа (EHV-9), альфагерпесвирус крупного рогатого скота 1 типа (BHV-1), альфагерпесвирус крупного рогатого скота 5 типа (BHV-5), альфагерпесвирус собак 1 типа, и альфагерпесвирус кошек 1 типа.

Настоящее изобретение дополнительно касается клеток-хозяев млекопитающих, включающих такие векторы, и способов создания векторных вакцин, используя такие клетки-хозяева, а также иммунногенных композиций и вакцин, включающих вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV) настоящего изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно касается промоторной последовательности, включающей р422 (SEQ ID NO: 5) или ее комплементарную нуклеотидную последовательность или ее функциональный фрагмент или их комплементарные нуклеотидные последовательности, где указанная промоторная последовательность приводит к экспрессии представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности. Настоящее изобретение также касается функциональных фрагментов промоторной последовательности, имеющих идентичность и/или гомологию последовательности 70, 80, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99.9%.

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

Эти свойства предоставляют возможность создавать рекомбинантные векторные вакцины на основе EHV, предпочтительно EHV-1 RasH, экспрессирующие по меньшей мере один антиген из впервые описанного UL43 сайта инсерции или по меньшей мере два различных антигена параллельно со сходной эффективностью из впервые описанного UL43 сайта инсерции и другого сайта инсерции, подобного ORF1/3 (UL56), и/или другого сайта инсерции ORF70 (US4). Если мишень вакцины состоит из двух различных патогенов, то применение нового UL43 сайта инсерции параллельно с хорошо известным сайтом инсерции, подобным ORF1/3 (UL56), и/или другим сайтом инсерции ORF70 (US4) может снизить стоимость товаров существенным образом и представляет собой очевидное преимущество по сравнению с вектором, экспрессирующим только один антигенный компонент.

Эти свойства предоставляют возможность создавать рекомбинантные векторные вакцины на основе EHV, предпочтительно EHV-1 RasH, экспрессирующие по меньшей мере один антиген из впервые описанного UL43 сайта инсерции, или по меньшей мере два различных антигена параллельно со сходной эффективностью из впервые описанного UL43 сайта инсерции и другого сайта инсерции, подобного ORF1/3 (UL56), или другого сайта инсерции ORF70 (US4), или по меньшей мере три различных антигена параллельно из впервые описанного UL43 сайта инсерции и другого сайта инсерции ORF70 (US4), и другого сайта инсерции, подобного ORF1/3 (UL56). Если мишень вакцины состоит из двух различных патогенов, то применение нового UL43 сайта инсерции параллельно с хорошо известным сайтом инсерции, подобным ORF1/3 (UL56), или другим сайтом инсерции ORF70 (US4) может снизить стоимость товаров существенным образом и представляет собой очевидное преимущество по сравнению с вектором, экспрессирующим только один антигенный компонент. Если мишень вакцины состоит из трех различных патогенов, то применение нового UL43 сайта инсерции параллельно с хорошо известным сайтом инсерции, подобным ORF1/3 (UL56), и другим сайтом инсерции ORF70 (US4) может снизить стоимость товаров существенным образом и представляет собой очевидное преимущество по сравнению с вектором, экспрессирующим только один или два антигенных компонента.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение решает проблемы, присущие известному уровню техники, и обеспечивает значительное усовершенствование известного уровня техники.

В общем, настоящее изобретение обеспечивает экспрессионную кассету, включающую

(i) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, функционально связана с промоторной последовательностью, и

(ii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL43 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 26 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и

(iii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL44 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 27 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает герпесвирус лошадей (EHV), специфически альфагерпесвируса лошадей, такой как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически вектор альфагерпесвируса лошадей 1 типа (EHV-1), наиболее специфически штамм RasH, включающий экспрессионную кассету настоящего изобретения.

Настоящее изобретение обеспечивает вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV), предпочтительно EHV-1 или штамм RasH, включающий экспрессионную кассету настоящего изобретения.

Кроме того, настоящее изобретение касается герпесвируса лошадей (EHV), специфически альфагерпесвируса лошадей, такого как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически вектора альфагерпесвируса лошадей 1 типа (EHV-1), наиболее специфически штамма RasH, включающего

(i) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, функционально связана с промоторной последовательностью, и

(ii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL43 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 26 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и

(iii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL44 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 27 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

Экспериментальные данные, обеспеченные настоящим изобретением, с успехом показывают, что был обеспечен новый сайт инсерции в пределах EHV вектора, который можно использовать для встраивания и экспрессии антигенов. Кроме того, создание нового сайта инсерции теперь предоставляет возможность встраивания и экспрессии антигенов из различных сайтов инсерции и экспрессию более чем одного антигена, соответственно.

Настоящее изобретение дополнительно касается герпесвируса лошадей (EHV), специфически альфагерпесвируса лошадей, такого как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически вектора альфагерпесвируса лошадей 1 типа (EHV-1), наиболее специфически штамма RasH, включающего представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL43.

Настоящее изобретение дополнительно касается герпесвируса лошадей (EHV), специфически альфагерпесвируса лошадей, такого как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически вектора альфагерпесвируса лошадей 1 типа (EHV-1), наиболее специфически штамма RasH, включающего первую нуклеотидную последовательность или ген, представляющий интерес, предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL43, и вторую нуклеотидную последовательность или ген, представляющий интерес, предпочтительно другую антигенкодирующую последовательность, инсертированную во второй сайт инсерции, предпочтительно UL56 (orf1/3) или US4 (orf70). В специфическом аспекте указанного EHV вектора настоящего изобретения по меньшей мере два представляющие интерес гена функционально связаны с регуляторными последовательностями, предпочтительно промоторными последовательностями.

В специфическом аспекте вектора настоящего изобретения инсерция в UL43 характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или т.п. в UL43, причем UL44 остается функциональным.

В другом специфическом аспекте вектора настоящего изобретения инсерция в UL43 характеризуется делецией приблизительно 870 по части в пределах UL43 для RacH (SEQ ID NO: 21) или на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

В другом специфическом аспекте вектора настоящего изобретения инсерция в UL43 характеризуется делецией приблизительно 870 по части в пределах UL43 для RacH (SEQ ID NO: 21) или делецией ее на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности в любом другом штамме.

В дополнительном специфическом аспекте вектора настоящего изобретения инсерция в UL43 характеризуется делецией приблизительно 870 по части в пределах UL43 для EHV-1 штамма V592 дикого типа (номер доступа Genbank AY464052.1), причем делетированная часть расположена в геномной последовательности V592 дикого типа между нуклеотидами 23353 и 24226 (SEQ ID NO: 24), или на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

В другом специфическом аспекте вектора настоящего изобретения EHV вектор, специфически EHV-1 вектор, включает (i) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL43 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 26, и (ii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL44 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 27.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, не встречается в природе и/или является рекомбинантной.

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

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения указанная антигенкодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему животного, такого как животное, выращиваемое в продовольственных целях, такое как свинья, сельскохозяйственная птица или крупный рогатый скот, или животные-компаньоны, такие как кошки, собаки или лошади.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения указанный вектор или экспрессионная кассета дополнительно включает по меньшей мере одну дополнительную регуляторную последовательность, такую как терминирующий кодон или последовательность полиаденилирования.

В другом специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения указанный вектор или экспрессионная кассета дополнительно включает дополнительные регуляторные последовательности, такие как терминирующий кодон и/или последовательность полиаденилирования.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения указанный вектор или экспрессионная кассета дополнительно включает по меньшей мере одну дополнительную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность. В одном аспекте по меньшей мере одна дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в тот же самый сайт инсерции UL43, например, с помощью IRES / 2a пептида(-ов). В другом аспекте указанный вектор или экспрессионная кассета включает по меньшей мере одну дополнительную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в другой сайт инсерции, предпочтительно в UL56 и/или US4.

В дополнительном аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения по меньшей мере одна дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в UL56. UL56 (ORF1/3) сайт инсерции был описан в уровне техники.

В дополнительном аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения по меньшей мере одна дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в US4 (ORF70).

Альтернативный сайт инсерции трансгена US4 (ORF70) можно использовать для инсерции трансгенной последовательности и экспрессии трансгенного белка из EHV вектора, в особенности, рекомбинантного EHV-1 или EHV-1 RacH.

"US4 (ORF70) сайт инсерции" в EHV векторе характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или т.п. по отношению к US4 (ORF70). Полагают, что делеция полной US4 (ORF70) будет неблагоприятной для репликации вируса и, таким образом производства и эффективности вакцины, поскольку полная делеция US4 (ORF70) будет оказывать влияние на промотор US5 (ORF71),

кодирующий gpII. US4 (ORF70) сайт инсерции и/или инсерция (экспрессионной кассеты) в US4 (ORF70) функционально определяется таким образом, что US5 (ORF71) остается функциональным или интактным.

В специфическом аспекте, US4 (ORF70) сайт инсерции охватывает делецию приблизительно части 801 по в пределах US4 (ORF70) для RasH (SEQ ID NO: 17) или на 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% его гомологичной последовательности. Делетированная часть в RasH геномной последовательности представлена на SEQ ID NO: 17 (нет доступных номеров нуклеотидов, поскольку полная RasH геномная последовательности не известна). В другом специфическом аспекте, ORF70 сайт инсерции охватывает теоретическую 801 по делецию в пределах ORF70 для EHV-1 штамма ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1, SEQ ID NO: 16). Делетированная часть расположена на геномной последовательности дикого типа ab4 (номер доступа Genbank AY665713.1) между нуклеотидами 127681 и 128482 (SEQ ID NO: 16).

В настоящем изобретении "фланкирующие участки" направляют рекомбинацию экспрессионной кассеты, включающей представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, предпочтительно антигенкодирующую последовательность, в EHV геном. Эти фланкирующие участки в природе присутствуют в EHV. Up70 фланкирующий участок (417 по, SEQ ID NO: 9) и Up71 фланкирующий участок (431 по, SEQ ID NO: 10) выбирают для классической гомологичной рекомбинации для всех трансферных векторов/плазмид, используемых для orf70 сайта. В EHV-1 штамме ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1) соответствующие последовательности расположены на нуклеотидах 127264 - 127680 (фланкирующий участок up orf70, SEQ ID NO: 11) и 128483 - 128913 (фланкирующий участок up orf71, SEQ ID NO: 12). Для RED рекомбинации фланкирующие участки усечены вследствие расщепления рестриктазой XbaI. Эти усеченные фланкирующие участки являются идентичными к 3' 283 по из 417 по "классического" фланкирующего участка (Up70 фланкирующий участок, SEQ ID NO: 9) и 5' 144 по из 431 по "классического" фланкирующего участка (Up71 фланкирующий участок, SEQ ID NO: 10), которые описаны выше. Эти усеченные фланкирующие участки названы Up70 фланкирующий участок (283 по), включенный как SEQ ID NO: 13, и Up71 фланкирующий участок (144 по), включенный как SEQ ID NO: 14. Эти различные фланкирующие участки определяют один и тот же ORF70 сайт инсерции. Фланкирующие участки всегда используются парами, один "левый" фланкирующий участок, такой как SEQ ID NO: 9, 11, 13, и один "правый" фланкирующий участок, такой как SEQ ID NO: 10, 12, 14.

В дополнительном аспекте вектора настоящего изобретения вектор дополнительно включает

(i) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, функционально связана с промоторной последовательностью, и

(ii) по меньшей мере один левый US4 (ORF70) фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 9 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 11 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и SEQ ID NO: 13 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и

(iii) по меньшей мере один правый US4 (ORF70) фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 10 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 12 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и SEQ ID NO: 14 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

Кроме того, настоящее изобретение касается герпесвируса лошадей (EHV), специфически вектора альфагерпесвируса лошадей 1 типа (EHV-1), наиболее специфически штамма RasH, включающего

(i) первую экзогенную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, функционально связана с промоторной последовательностью, и

по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL43 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 26 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и

по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL44 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 27 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и

(ii) вторую экзогенную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность,

причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, функционально связана с промоторной последовательностью, и

по меньшей мере один левый US4 (ORF70) фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 9 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной

последовательности, SEQ ID NO: 11 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и SEQ ID NO: 13 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и

по меньшей мере один правый US4 (ORF70) фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 10 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 12 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и SEQ ID NO: 14 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

В дополнительном аспекте вектора настоящего изобретения вектор инсерции в US4 (ORF70) характеризуется делецией приблизительно части 801 по в пределах US4 (ORF70) для RacH (SEQ ID NO: 17) или на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

В дополнительном аспекте вектора настоящего изобретения вектор включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичной и/или идентичной последовательности любой из этих последовательностей.

В дополнительном аспекте вектора настоящего изобретения вектор включает (i) по меньшей мере один левый US4 (ORF70) фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, и SEQ ID NO: 13, и (ii) по меньшей мере один правый US4 (ORF70) фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, и SEQ ID NO: 14.

В дополнительном аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения вторая дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в US4, и третья дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в UL56.

В специфическом аспекте вектора настоящего изобретения представляющий интерес ген функционально связан с регуляторной последовательностью, предпочтительно промоторной последовательностью.

В дополнительном аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения представляющий интерес ген функционально связан с регуляторной последовательностью, предпочтительно промоторной последовательностью или EHV вектором согласно настоящему описанию, где по меньшей мере два представляющие интерес гена функционально связаны с регуляторными последовательностями, предпочтительно промоторными последовательностями.

В дополнительном аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения промоторная(-ые) последовательность(-и), функционально связанная(-ые) с одной или двумя или более представляющими интерес последовательностями или генами, выбирают из группы, состоящей из следующих: SV40 большой T, HCMV и MCMV немедленно-ранний ген 1, промотор фактора элонгации альфа человека, бакуловирусный промотор полиэдрина, функциональный фрагмент из 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), предпочтительно указанный функциональный фрагмент представляет собой p430 (SEQ ID NO: 3), функциональный фрагмент из комплементарной нуклеотидной последовательности 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), функциональный фрагмент из 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), предпочтительно указанный функциональный фрагмент представляет собой p455 (SEQ ID NO: 4), функциональный фрагмент из комплементарной нуклеотидной последовательности 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или p422 (SEQ ID NO: 5) или ее функциональный фрагмент или их комплементарные нуклеотидные последовательности.

В дополнительном аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интерес геном, представляет собой p422 (SEQ ID NO: 5) или ее функциональный фрагмент или их комплементарные нуклеотидные последовательности.

В специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения по меньшей мере два представляющие интерес гена функционально связаны с регуляторными последовательностями, предпочтительно промоторными последовательностями.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения промоторные последовательности, функционально связанные с по меньшей мере двумя представляющими интерес генами, являются различными.

В другом специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения

промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интерес геном, представляет собой р422 (SEQ ID NO: 5) или ее функциональный фрагмент или ее производное или их комплементарные нуклеотидные последовательности, и промоторная последовательность, функционально связанная с другим представляющим интерес геном, представляет собой р430 (SEQ ID NO: 3) или ее функциональный фрагмент или ее производное или их комплементарные нуклеотидные последовательности, и промоторная последовательность, функционально связанная с другим представляющим интерес геном, представляет собой р455 (SEQ ID NO: 4) или ее функциональный фрагмент или ее производное или их комплементарные нуклеотидные последовательности.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения последовательность полиаденилирования представляет собой BGHrA, 71pA (SEQ ID NO: 6), или 18pA (SEQ ID NO: 7).

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения EHV вектор или экспрессионная кассета является рекомбинантной.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения указанные последовательности или представляющая интерес экзогенная нуклеотидная последовательность, или представляющий интерес ген представляют(-ет) собой антигенкодирующую последовательность.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения антигенкодирующая последовательность принадлежит к патогену, выбранному из перечня: вирус Шмалленберга, вирус гриппа типа А, вирус свиного респираторного и репродуктивного синдрома, цирковирус свиней, вирус классической чумы свиней, вирус африканской чумы свиней, вирус гепатита Е, вирус диареи крупного рогатого скота, вирус бешенства, морбилливирус кошек, столбнячная палочка, микобактерия туберкулеза, возбудитель актинобациллезной плевропневмонии.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген гриппа, имеет происхождение из вируса свиного гриппа типа А.

Четырьмя наиболее распространенными штаммами гриппа А в Европе являются подтипы H1N2, H3N2 и H1N1 (птичий H1N1 и пандемический H1N1). Таким образом, существует потребность в вакцинах, которые были бы высокоэффективными против подтипов H1N2, H3N2 и H1N1 (птичий H1N1 и пандемический H1N1) и, таким образом, обеспечивали бы очень широкую защиту от этих полевых штаммов свиного IAV.

Кроме того, предпочтительно иметь в распоряжении поливалентную вакцину, поскольку поливалентные вакцины в общем более экономически выгодны и более эффективны по временным параметрам, чем моновалентные вакцины.

Вакцина на основе EHV-вектора согласно настоящему описанию, не являясь модифицированной живой вакциной (MLV), обеспечивает максимальную безопасность в отношении свиного IAV, поскольку не создаются или не вводятся животным живые IAV, что таким образом предотвращает потенциальную реверсию к вирулентности вакцинного(-ых) штамма(-ов) и генетическую рекомбинацию или реассортацию с полевыми штаммами свиней или людей. Более того, в отличие от убитых вакцин (текущий стандарт), ожидается, что векторная вакцина не только будет индуцировать нейтрализующие антитела против свиного IAV, но также сильно стимулировать клеточный иммунитет против свиного IAV по обоим путям МНС классов I и II. Таким образом, существует потребность в вакцинах против SIAV на основе векторов. Кроме того, векторная вакцина, экспрессирующая гемагглютинины IAV, предоставляет возможность дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных (DIVA), поскольку другие белки вируса гриппа, которые индуцируют антитела, не являются частью векторной вакцины. Таким образом, вакцинация не будет индуцировать какие-либо антитела, специфические для NP (нуклеопротеин) или N (нейраминидаза), оба из которых являются структурными белками вируса и содержатся в стандартных убитых вакцинах.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения экзогенная антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и подтип гемагглютинина гриппа выбирают из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H13, H15, H16, H17 и H18.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения экзогенная антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и последовательность, кодирующую гемагглютининовый антиген гриппа, выбирают 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/P1243 9/00, 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 дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения экзогенная антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и последовательность, кодирующую гемагглютининовый антиген гриппа, выбирают 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).

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения экзогенная антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и подтип гемагглютинина гриппа представляет собой H1 и/или H3.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген гриппа, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения EHV вектор или экспрессионная кассета не включает NP (нуклеопротеин) или N (нейраминидаза) последовательностей, кодирующих антиген гриппа.

H1pdm в UL43 с р422.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения промоторная последовательность р422 (SEQ ID NO: 5), или ее функциональный фрагмент или функциональное производное, или любая их комплементарная нуклеотидная последовательность, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 44 (H1pdm).

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения EHV вектор включает две или более последовательности, кодирующие гемагглютининовые антигены гриппа.

H1av в UL56 с р430.

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения дополнительная последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген гриппа, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 46 (H1av).

В дополнительном специфическом аспекте вектора или экспрессионной кассеты настоящего изобретения указанная дополнительная последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген

ность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 44 (H1pdm), инсертированную в UL43, и дополнительно промоторную последовательность p430 (SEQ ID NO: 3), или ее функциональный фрагмент или функциональное производное, или любую их комплементарную нуклеотидную последовательность, функционально связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 46 (H1av), инсертированную в UL56, и дополнительно промоторную последовательность p455 (SEQ ID NO: 4), или ее функциональный фрагмент или функциональное производное, или любую их комплементарную нуклеотидную последовательность, функционально связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 45 (H3), инсертированную в US4.

В другом аспекте вектора настоящего изобретения EHV вектор выбирают из группы, состоящей из EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9.

В другом аспекте вектора настоящего изобретения EHV вектор представляет собой EHV-1 или EHV-4.

В другом аспекте вектора настоящего изобретения EHV вектор представляет собой EHV-1, предпочтительно RasH.

Настоящее изобретение дополнительно касается вектора или герпесвируса лошадей (EHV), включающего:

а) первую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, такую(-ой) как антигенкодирующая последовательность, в UL43, где

б) указанная первая представляющая интерес нуклеотидная последовательность необязательно функционально связана с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты / промоторной последовательностью, предпочтительно p455, p430 или p422,

с) указанная первая представляющая интерес нуклеотидная последовательность необязательно функционально связана с (дополнительной) регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно BGHрA, 71рA (SEQ ID NO: 6) или 18рA (SEQ ID NO: 7).

В специфическом аспекте вектор или EHV дополнительно включает

а) вторую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, такую(-ой) как антигенкодирующая последовательность, во втором сайте инсерции, предпочтительно UL56 или US4, где

б) указанная вторая представляющая интерес нуклеотидная последовательность необязательно функционально связана с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты / промоторной последовательностью, предпочтительно p455, p430 или p422,

с) указанная вторая представляющая интерес нуклеотидная последовательность необязательно функционально связана с (дополнительной) регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно BGHрA, 71рA (SEQ ID NO: 6), или 18рA (SEQ ID NO: 7).

В специфическом аспекте вектор или EHV дополнительно включает

а) третью представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, такую(-ой) как антигенкодирующая последовательность, в третьем сайте инсерции, предпочтительно UL56 или US4, где

б) указанная третья представляющая интерес нуклеотидная последовательность необязательно функционально связана с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты / промоторной последовательностью, предпочтительно p455, p430 или p422,

с) указанная третья представляющая интерес нуклеотидная последовательность необязательно функционально связана с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно 71рA, BGHрA, or 18рA.

Настоящее изобретение дополнительно касается плазмиды, включающей фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (обе описаны выше) в специфический целевой сайт в вирусный векторный геном, предпочтительно в ogf70 (US4) сайт из EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически RasH вектора, такой как трансферная плаزمиды рU-mC70-

NO: 36), и/или трансферная плаزمида pUUL43-422-mC-18K18 (SEQ ID NO: 35).

Настоящее изобретение дополнительно касается способа получения вектора в соответствии с настоящим изобретением, включающего:

- а) инсерцию первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, такой(-ого) как антигенкодирующая последовательность, в UL43,
- б) необязательно функциональное связывание указанной первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты / промоторной последовательностью, предпочтительно р455, р430 или р422.
- с) необязательно функциональное связывание указанной первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности с (дополнительной) регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно BGHPA, 71pA (SEQ ID NO: 6) или 18pA (SEQ ID NO: 7).

В специфическом аспекте способ также включает

- а) инсерцию второй представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, такой(-ого) как антигенкодирующая последовательность, во второй сайт инсерции, предпочтительно UL56 или US4,
- б) необязательно функциональное связывание указанной второй представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты / промоторной последовательностью, предпочтительно р455, р430 или р422,
- с) необязательно функциональное связывание указанной второй представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно BGHPA, 71pA (SEQ ID NO: 6) или 18pA (SEQ ID NO: 7).

В специфическом аспекте способ также включает

- а) инсерцию третьей представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, такой(-ого) как антигенкодирующая последовательность, в третий сайт инсерции, предпочтительно UL56 или US4,
- б) необязательно функциональное связывание указанной третьей представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты / промоторной последовательностью, предпочтительно р455, р430 или р422.
- с) необязательно функциональное связывание указанной третьей представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно BGHPA, 71pA (SEQ ID NO: 6), или 18pA (SEQ ID NO: 7).

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

Настоящее изобретение также касается клетки-хозяина млекопитающего, отличающейся тем, что она включает вектор в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение дополнительно касается способа получения клетки-хозяина, который характеризуется следующими стадиями:

- а) инфицирование клетки-хозяина млекопитающего в соответствии с настоящим изобретением вектором в соответствии с настоящим изобретением,
- б) культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,
- с) необязательно сбор указанных клеток-хозяев.

Настоящее изобретение дополнительно касается применения UL43 в векторе герпесвируса лошадей (EHV), специфически в альфагерпесвирусе лошадей, таком как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически в векторе альфагерпесвируса лошадей 1 типа (EHV-1), наиболее специфически в RasH, в качестве сайта инсерции в указанном векторе герпесвируса лошадей (EHV), где указанный сайт инсерции поддерживает/облегчает экспрессию представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, такой(-ого) как антигенкодирующая последовательность, причем указанный сайт инсерции UL43 включает частичную делецию, усечение, замену, модификацию или т.п. в UL43, и причем UL44 остается функциональным.

Изобретение дополнительно касается применения вектора в соответствии с настоящим изобретением или клетки-хозяина млекопитающего в соответствии с настоящим изобретением для получения иммуногенной композиции или вакцины.

Изобретение дополнительно касается иммуногенной композиции, включающей

- а) вектор в соответствии с настоящим изобретением, и/или
- б) полипептид, экспрессируемый вектором в соответствии с настоящим изобретением, такой как вирус, модифицированный живой вирус, вирусоподобная частица (VLP) или т.п., и
- с) необязательно фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель, причем указанный носитель предпочтительно является пригодным для перорального, внутрикожного, внут-

римышечного или интраназального введения,

причем указанная иммуногенная композиция предпочтительно включает вирус. В специфическом аспекте указанный вирус представляет собой патогенный вирус.

Изобретение дополнительно касается вакцины или фармацевтической композиции, включающей

- a) вектор в соответствии с настоящим изобретением, и/или
- b) полипептид, экспрессируемый вектором в соответствии с настоящим изобретением, такой как модифицированный живой вирус, вирусоподобная частица (VLP) или т.п., и
- c) фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель, причем указанный носитель предпочтительно является пригодным для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального введения,
- d) необязательно указанная вакцина дополнительно включает адъювант.

Предпочтительно, вакцина включает ENV вектор, как описано в настоящем изобретении. Предпочтительно, иммуногенная композиция включает фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой среду для культивирования клеток или физиологический буфер для ресуспендирования.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный буфер для ресуспендирования представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор.

В специфическом аспекте указанная иммуногенная композиция или вакцина или фармацевтическая композиция включает вектор или экспрессионную кассету настоящего изобретения, причем указанная антигенкодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему свиней. В дополнительном специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус свиного гриппа А (IAV). В дополнительном специфическом аспекте указанный антиген представляет собой гемагглютининовый (НА) антиген, в особенности, указанный гемагглютининовый антиген имеет происхождение из вируса гриппа А. Например, вирус гриппа А представляет собой вирус гриппа А (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2)), вирус гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)), вирус гриппа А (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), и/или вирус гриппа А (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2)). В дополнительном специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 44, 45, 46, и 47. В другом специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

Изобретение дополнительно касается вакцины или DIVA вакцины, включающей один или несколько ENV векторов, как описано в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение дополнительно касается промоторной последовательности, включающей р422 (SEQ ID NO: 5) или ее комплементарную нуклеотидную последовательность или ее функциональный фрагмент или их комплементарные нуклеотидные последовательности, где указанная промоторная последовательность приводит к экспрессии представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности.

Настоящее изобретение также касается экспрессионной кассеты, включающей промоторную последовательность р422 (SEQ ID NO: 5) или ее комплементарную нуклеотидную последовательность или функциональный фрагмент и его комплементарную нуклеотидную последовательность,

где промоторная последовательность функционально связана с представляющей интерес последовательностью, предпочтительно представляющим интерес геном, такой как антигенкодирующая последовательность, более предпочтительно представляющей интерес гетерологичной и/или экзогенной последовательностью, представляющим интерес геном или представляющей интерес антигенкодирующей последовательностью,

где указанная промоторная последовательность приводит к экспрессии представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности,

причем указанная промоторная последовательность предпочтительно является гетерологичной промоторной последовательностью, более предпочтительно экзогенной промоторной последовательностью.

Настоящее изобретение также касается вектора, включающего промоторную последовательность или экспрессионную кассету, как описано в настоящем изобретении.

В дополнительном специфическом аспекте промотора или экспрессионной кассеты или вектора настоящего изобретения функциональный фрагмент промоторной последовательности имеет идентичность и/или гомологию последовательности, составляющую 70, 80, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%,

более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99.9% относительно последовательности p422 (SEQ ID NO: 5).

В дополнительном специфическом аспекте промотора или экспрессионной кассеты или вектора настоящего изобретения, указанный функциональный фрагмент промоторной последовательности имеет длину 100 нуклеотидов, предпочтительно 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400 нуклеотидов, наиболее предпочтительно 410 или 420 нуклеотидов, или функциональный фрагмент промоторной последовательности имеет длину от 100 до 422 нуклеотидов, от 200 до 422 нуклеотидов, от 300 до 422 нуклеотидов или от 350 до 422 нуклеотидов.

В дополнительном специфическом аспекте экспрессионной кассеты или вектора настоящего изобретения указанная экспрессионная кассета или вектор включает одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, таких как терминирующий кодон, сигнал полиаденилирования или регуляторный элемент, подобный IRES и/или 2a пептиду.

В дополнительном специфическом аспекте экспрессионной кассеты или вектора настоящего изобретения экспрессионная кассета или вектор дополнительно включает последовательность полиаденилирования, предпочтительно BGHPA, 71pA (SEQ ID NO: 6), или 18pA (SEQ ID NO: 7).

В дополнительном специфическом аспекте вектора настоящего изобретения указанный вектор является рекомбинантным, и/или гетерологичным и/или экзогенным вектором.

В дополнительном специфическом аспекте вектора настоящего изобретения указанный вектор представляет собой вирусный вектор, предпочтительно, выбранный из группы, состоящей из Herpesviridae, таких как альфагерпесвирус лошадей 1 типа (EHV-1), альфагерпесвирус лошадей 4 типа (EHV-4) и других Varicellovirus, подобных PrV (вирус псевдобешенства) и BHV-1 (герпесвирус крупного рогатого скота 1 типа), Adenoviridae (AdV), таких как CAdV (аденовирус собак), адено-ассоциированные вирусы, Baculoviridae, Lentiviridae, таких как ретровирусы, и Poxviridae.

В дополнительном специфическом аспекте вектора настоящего изобретения указанный вектор является членом семейства Herpesviridae, предпочтительно рода Alphaherpesvirinae, более предпочтительно подрода Varicellovirus, наиболее предпочтительно указанный вектор представляет собой альфагерпесвирус лошадей 1 типа (EHV-1).

DIVA.

Основным преимуществом эффективной вакцины DIVA является то, что она предоставляет возможность выявлять животных, выращиваемых в продовольственных целях (предпочтительно свиней), остро инфицированных или инфицированных некоторое время (по меньшей мере приблизительно 3 недели) до взятия образцов в популяции вакцинированных животных, и таким образом, дает возможность контролировать в популяции животных распространение или повторное заражение патогеном (предпочтительно вирусом свиного гриппа). Таким образом, это позволяет с определенной степенью уверенности утверждать, что вакцинированная популяция свиней не заражена вирусом свиного гриппа типа А на основании результатов лабораторных исследований.

Маркерная вакцина обеспечивает быстрое и эффективное введение и предоставляет возможность различать животных, инфицированных полевым вирусом (ассоциированным с заболеванием) и вакцинированных животных.

Иммуногенная композиция или DIVA вакцина настоящего изобретения не содержит какой-либо антигенкодирующей последовательности, кодирующей последовательности, кодирующие антиген гриппа N (нейраминидаза) и/или кодирующей последовательности, кодирующие антиген гриппа NP (нуклеопротеин).

В отличие от этого, после инфицирования животных вирусом свиного гриппа типа А дикого типа или вакцинирования модифицированной живой вакциной, или вакцинирования инактивированной цельновирусной вакциной, или в случае животных, у которых присутствуют остаточные материнские антитела, такие инфицированные/вакцинированные животных вырабатывают/имеют специфические антитела против N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин). Однако у животных, вакцинированных иммуногенной композицией в соответствии с настоящим изобретением, такие специфические антитела против N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) не могут быть обнаружены.

С помощью иллюстративных иммунотестов и/или геномных аналитических тестов, животных, вакцинированных только иммуногенной композицией настоящего изобретения, можно отличить от животных, которые были инфицированы вирусом свиного гриппа дикого типа или вакцинированы модифицированной живой вакциной, или вакцинированы инактивированной цельновирусной вакциной, или у которых есть остаточные материнские антитела, посредством того, что у животных, вакцинированных только иммуногенной композицией настоящего изобретения отсутствуют какие-либо специфические антитела против N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) и какие-либо специфические последовательности вируса свиного гриппа типа А, кодирующие N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин), соответственно.

Настоящее изобретение обеспечивает способ дифференциации животных, выращиваемых в продовольственных целях, инфицированных вирусом свиного гриппа типа А, от животных, выращиваемых в продовольственных целях, вакцинированных иммуногенной композицией или DIVA вакциной, как описано в настоящем изобретении, включающий

- а) получение образца от животного, выращиваемого в продовольственных целях, и
- б) проведение анализа указанного образца с помощью иммунотеста и/или геномного аналитического теста.

В одном аспекте настоящего изобретения иммунотест включает проверку того, содержит ли образец антитела, специфически распознающие белок N (нейраминидаза) или белок NP (нуклеопротеин) свиного гриппа.

В одном аспекте настоящего изобретения животное, выращиваемое в продовольственных целях, является инфицированным вирусом свиного гриппа типа А, если были обнаружены антитела, специфически распознающие белок N (нейраминидаза) или белок NP (нуклеопротеин) свиного гриппа.

В одном аспекте настоящего изобретения геномный аналитический тест включает проверку того, содержит ли образец специфические последовательности вируса свиного гриппа типа А, кодирующие N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин).

В одном аспекте настоящего изобретения животное, выращиваемое в продовольственных целях, является инфицированным вирусом свиного гриппа типа А, если были обнаружены специфические последовательности вируса свиного гриппа типа А, кодирующие N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин).

В одном аспекте настоящего изобретения иммунотест представляет собой EIA (иммуноферментный анализ) или ELISA (иммуноферментный твердофазный анализ), или геномный аналитический тест представляет собой PCR (полимеразная цепная реакция), RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой) или PCR (полимеразная цепная реакция) в режиме реального времени.

В одном аспекте настоящего изобретения животное, выращиваемое в продовольственных целях, представляет собой свинью.

В одном аспекте настоящего изобретения образец является образцом сыворотки.

Предпочтительно, антитело, специфичное для N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) SIAV дикого типа, используется для обнаружения антигена SIAV в отделах дыхательных путей свиньи, которую подозревают на инфицирование SIAV или которая вакцинирована вакциной в соответствии с изобретением. В таком случае, только образец от инфицированной свиньи или свиньи, вакцинированной модифицированной живой вакциной или вакцинированной инактивированной цельновиральной вакциной, или имеющей остаточные материнские антитела, покажет положительные результаты с указанным специфическим к N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) антителом. В отличие от этого образец от свиньи, вакцинированной вакциной настоящего изобретения, не покажет результатов с указанным специфическим к N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) антителом из-за отсутствия таких антигенов (только гемагглютинин) в вакцине настоящего изобретения.

Однако эпитоп N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) эволюционно консервативен и специфичен для SIAV и является мишенью для нейтрализующих антител.

Таким образом, тест мог бы, например, содержать лунки с эпитопом N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) SIAV дикого типа, перекрестно связанным с микролуночными аналитическими планшетами. Указанное перекрестное связывание предпочтительно осуществляют через якорный белок, такой как, например, поли-L-лизин. Экспрессионные системы для получения эпитопов N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) дикого типа хорошо известны специалисту в данной области техники. Альтернативно, указанные эпитопы N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) могут быть синтезированы химическим путем.

У животных, вакцинированных только вакциной в соответствии с настоящим изобретением, не повышается уровень антител против эпитопа N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) дикого типа. Однако, у таких животных повышается уровень антител против эпитопа HA (гемагглютинин) в соответствии с настоящим изобретением. Как следствие, антитела не связываются с лункой, покрытой эпитопом N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) дикого типа. В отличие от этого, если лунка была покрыта эпитопом HA в соответствии с настоящим изобретением, антитела связываются с указанным замещенным эпитопом HA.

В одном аспекте настоящего изобретения ELISA представляет собой непрямой ELISA, сэндвич-вариант ELISA, конкурентный ELISA или блокирующий ELISA.

Однако, различные методики ELISA хорошо известны специалисту в данной области техники. Методики ELISA были описаны иллюстративно 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, тест для дифференциации животного, которое инфицировано полевым SIAV или вакцинировано модифицированной живой вакциной, или вакцинировано инактивированной цельновиральной вакциной, или которое имеет остаточные материнские антитела, и животного, которое вакцинировано только вакциной настоящего изобретения, осуществляют путем выделения РНК из респираторных клеток и обратной транскриптазы с последующей амплификацией кДНК. Используя специфический праймер для N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин) может быть выполнена PCR. В таком случае, при наличии положительного сигнала PCR, свинья является инфицированной SIAV дикого типа.

Однако, если невозможно амплифицировать специфическую последовательность N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин), животное является вакцинированным вакциной настоящего изобретения.

При этом можно использовать методики, обеспечивающие работу в реальном времени, с применением праймеров и/или зондов, распознающих N (нейраминидаза) и/или NP (нуклеопротеин), и/или специфический HA (гемагглютинин). Однако, такие способы хорошо известны в данной области техники.

Можно использовать праймеры и/или зонды, основанные на методике работы в реальном времени, распознающие или N (нейраминидазу), и/или NP (нуклеопротеин), и/или специфический HA (гемагглютинин). Однако такие методы хорошо известны специалистам.

В другом аспекте настоящего изобретения геномный аналитический тест представляет собой PCR (полимеразная цепная реакция), RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой) или PCR в режиме реального времени (полимеразная цепная реакция).

Изобретение дополнительно касается способа получения иммуногенной композиции или вакцины для уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических симптомов, связанных с или вызываемых инфекцией, включающего следующие стадии:

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

б) культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,

с) сбор инфицированных клеточных культур,

д) необязательно очистка собранных инфицированных клеточных культур со стадии с),

е) необязательно смешивание указанной собранной инфицированной клеточной культуры с фармацевтически приемлемым носителем.

Медицинское применение:

Изобретение дополнительно касается способа иммунизации животного, включающего введение такому животному иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины, как описано в настоящем изобретении.

Изобретение дополнительно касается способа уменьшения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном у животного, которое нуждается в этом, который включает введение животному терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины, как описано в настоящем изобретении.

Изобретение дополнительно касается способа уменьшения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых вирусом свиного гриппа у животного, которое нуждается в этом, который включает введение животному терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины, как описано в настоящем изобретении.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения указанное животное представляет собой свинью, поросенка или свиноматку, сельскохозяйственную птицу, крупный рогатый скот, лошадь, собаку или кошку.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят один раз.

Следует понимать, что однократную дозу вводят только один раз. Предпочтительно, однократная доза имеет общий объем между приблизительно 0.2 мл и 2.5 мл, более предпочтительно между приблизительно 0.2 мл и 2.0 мл, еще более предпочтительно между приблизительно 0.2 мл и 1.75 мл, еще более предпочтительно между приблизительно 0.2 мл и 1.5 мл, еще более предпочтительно между приблизительно 0.4 мл и 1.25 мл, еще более предпочтительно между приблизительно 0.4 мл и 1.0 мл, причем однократная доза 0.5 мл или 1.0 мл является наиболее предпочтительной. Наиболее предпочтительная однократная доза имеет общий объем 0.5 мл, 1 мл, 1.5 мл или 2 мл.

Предпочтительно, иммуногенную композицию или DIVA вакцину вводят поросятам перед тем, как они достигают трехнедельного возраста. Предпочтительно, иммуногенную композицию или DIVA вакцину вводят каждому из поросят на 1 день жизни - 21 день жизни, более предпочтительно, между 1 днем жизни и 10 днем жизни, еще более предпочтительно, между 1 днем жизни и 9 днем жизни, еще более предпочтительно между 1 днем жизни и 8 днем жизни, еще более предпочтительно между 1 днем жизни и 7 днем жизни, еще более предпочтительно между 1 днем жизни и 6 днем жизни, еще более предпочтительно между 1 днем жизни и 5 днем жизни, еще более предпочтительно между 1 днем жизни и 4 днем жизни, еще более предпочтительно между 1 днем жизни и 3 днем жизни, еще более предпочтительно на 1 или 2 день жизни, и наиболее предпочтительно на 1 день жизни.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят животному в течение первых трех недель жизни, в течение первых двух недель жизни, в течение первой недели жизни или в течение первого дня жизни.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят в два приема.

Однако иммуногенную композицию можно вводить животному в двух или более дозах, с введением первой дозы перед введением второй (бустер) дозы. Предпочтительно, первую дозу вводят в течение

первых двух недель жизни, более предпочтительно в течение первой недели жизни и еще более предпочтительно в течение первого дня жизни. Предпочтительно, вторую дозу вводят по меньшей мере через 15 дней после первой дозы. Более предпочтительно, вторую дозу вводят между 15 днем и 40 днем после первой дозы. Еще более предпочтительно, вторую дозу вводят по меньшей мере через 17 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно, вторую дозу вводят между 17 днем и 30 днем после первой дозы. Еще более предпочтительно, вторую дозу вводят по меньшей мере через 19 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно, вторую дозу вводят между 19 днем и 25 днем после первой дозы. Наиболее предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 21 день после первой дозы. В предпочтительном аспекте схемы с двукратным введением, обе, и первую и вторую, дозы иммуногенной композиции вводят в одинаковом количестве. Предпочтительно, каждая доза находится в рамках предпочтительных количеств, указанных выше, при этом наиболее предпочтительной является доза 1 мл как для первой, так и для второй дозы. В дополнение к первой и второй схеме введения доз, альтернативный вариант осуществления включает дополнительные последующие дозы. Например, в этих аспектах может быть введена третья, четвертая или пятая доза. Предпочтительно, в такой схеме с последующим введением дополнительных доз, третью, четвертую и пятую дозу вводят в том же количестве, что и первую дозу, с временными промежутками между дозами, соответствующими временным интервалам между первой и второй дозами, упомянутыми выше.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят животному первый раз в течение первой недели жизни и второй раз в течение второй, третьей или четвертой недели жизни.

Иммуногенную композицию или DIVA вакцину предпочтительно вводят местно или системно. Обычно используемым подходящим путем введения является пероральный или парентеральный, такой как интраназальный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, подкожный, а также ингаляционный путь. Однако, в зависимости от природы и механизма действия соединения, иммуногенную композицию или DIVA вакцину также можно вводить другими путями. Однако наиболее предпочтительно иммуногенную композицию или DIVA вакцину вводят внутримышечно или интраназально.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения указанную иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят внутримышечно или интраназально.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения указанная иммуногенная композиция или DIVA вакцина включает вектор EHV в полуинфицирующей дозе для культуры ткани (TCID₅₀), составляющей от 1×10^4 до 1×10^9 , предпочтительно от 1×10^4 до 1×10^8 TCID₅₀, еще более предпочтительно от 1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения иммуногенная композиция, вакцина или DIVA вакцина включает EHV вектор в дозе от 1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀.

В дополнительном специфическом аспекте медицинского применения или способа настоящего изобретения указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из: уменьшения потери веса, снижения ректальной температуры, уменьшения клинических симптомов, повышения индукции (нейтрализующих) антител, или их комбинаций, по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

В специфическом аспекте медицинского применения настоящего изобретения, описанного выше, или способа иммунизации животного, описанного выше, указанная антигенкодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему свиней. В дополнительном специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус свиного гриппа А (IAV). В дополнительном специфическом аспекте указанный антиген представляет собой гемагглютининовый (HA) антиген, в особенности, указанный гемагглютининовый антиген имеет происхождение из вируса гриппа А. Например, вирус гриппа А представляет собой вирус гриппа А (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2)), вирус гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)), вирус гриппа А (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), и/или вирус гриппа А (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2)). В дополнительном специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 44, 45, 46, и 47. В другом специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

Изобретение также касается набора для иммунизации животного, предпочтительно животного, выращиваемого в продовольственных целях, такого как свинья, сельскохозяйственная птица или крупный рогатый скот, или животных-компаньонов, таких как кошки, собаки или лошади, от заболевания, связан-

ного с и/или уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических симптомов, связанных с или вызываемых патогеном у животного, включающего:

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

Определения

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

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

Перед описанием настоящего изобретения более подробно следует отметить, что данное изобретение не ограничивается конкретной ДНК, полипептидными последовательностями или параметрами процессов, которые, конечно, могут варьировать. Также следует понимать, что используемая в данном изобретении терминология предназначена только для цели описания конкретных вариантов изобретения, и не предназначена для ограничения. Следует также отметить, что, как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из содержания явно не следует иное. Так, 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 он известен в данной области техники, относится к полинуклеотидной конструкции, типично плазмиде или бактериальной искусственной хромосоме, используемой для передачи генетического материала в клетку-хозяин. Векторы могут представлять собой, например, бактерии, вирусы, фаги, бактериальные искусственные хромосомы, космиды или плазмиды. Вектор, как используется в данном изобретении, может состоять из или содержать либо ДНК, либо РНК. В некоторых вариантах осуществления, вектор состоит из ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой патогенный вирус. Такой вирусный вектор содержит вирусный геном, который обрабатывают таким образом, что он несет чужеродный ген, который не принимает участие в репликации вирусного вектора ни в клеточной культуре, ни в животном-хозяине. В соответствии со специфическими аспектами настоящего изобретения, вектор можно использовать в различных аспектах, таких как только передача генетического материала, для трансфекции клеток-хозяев или организмов, для применения в качестве вакцин, например, ДНК вакцин, или для целей экспрессии генов. Экспрессия генов представляет собой термин, описывающий биосинтез белка в клетке, управляемый специфической полинуклеотидной последовательностью, называемой геном. В специфическом аспекте вектор может представлять собой "экспрессионный вектор", который представляет собой вектор, способный управлять экспрессией белка, кодируемого одним или несколькими генами, которые несет вектор, когда он находится в подходящей окружающей среде.

Векторы и способы получения и/или использования векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут представлять собой таковые или являться аналогичными описанным, в частности, в следующих документах: патенты США №№ 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, РСТ публикации WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update," *PNAS USA* 93: 11349-11353, October 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety" *PNAS USA* 93: 11341-11348, October 1996; Smith и др., патент США № 4,745,051 (рекомбинантный бакуловироз); Richardson, C. D. (ред.), *Methods in Molecular Biology* 39, "Baculovirus

Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith и др., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", *Molecular and Cellular Biology*, December, 1983, т. 3, № 12, сс. 2156-2165; Pennock и др., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus Vector", *Molecular and Cellular Biology*, March 1984, т. 4, № 3, с. 406; EP АО 370 573; заявка на патент США № 920,197, поданная 16 октября 1986 г.; EP патентная публикация № 265785; патент США № 4,769,331 (рекомбинантный герпесвирус); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors", *PNAS USA* 93:11307-11312, October 1996; Andreansky и др., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors", *PNAS USA* 93: 11313-11318, October 1996; Robertson и др., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", *PNAS USA* 93: 11334-11340, October 1996; Frolov и др., "Alphavirus-based Expression Vectors: Strategies and applications", *PNAS USA* 93: 11371-11377, October 1996; Kitson и др., *J. Virol.* 65, 3068-3075, 1991; патенты США №№ 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; принятые к рассмотрению заявки на патент США сер. №№ 08/675,556 и 08/675,566, обе поданные 3 июля 1996 г. (рекомбинантный аденовирус); Grunhaus и др., 1992, "Adenovirus as cloning vectors", *Seminars in Virology* (т. 3) сс. 237-52, 1993; Ballay и др. *EMBO Journal*, том 4, с. 3861-65, *Graham, Tibtech* 8, 85-87, April, 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, October 1996; и патенты США №№ 5,591,639, 5,589,466 и 5,580,859, а также WO 90/11092, WO 93/19183, WO 94/21797, WO 95/11307, WO 95/20660; Tang и др., *Nature*, и Furth и др., *Analytical Biochemistry*, relating to DNA Expression Vectors. См. также WO 98/33510; Ju и др., *Diabetologia*, 41: 736-739, 1998 (лентивирусная экспрессионная система); Sanford и др., патент США № 4,945,050; Fischbach и др. (Intracel); WO 90/01543; Robinson и др., *Seminars in Immunology* т. 9, сс. 271-283 (1997), (ДНК векторные системы); Szoka и др., патент США № 4,394,448 (способ инсерции ДНК в живые клетки); McCormick и др., патент США № 5,677,178 (применение цитопатических вирусов); и патент США № 5,928,913 (векторы для доставки генов); а также другие документы, процитированные в настоящем изобретении.

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

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

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

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

Предпочтительные вирусные векторы включают векторы герпесвирусов, такие как имеющие происхождение из EHV-1 или EHV-4 или других Varicellovirus, подобных PrV (вирус псевдобешенства) или

BHV-1 (герпесвирус крупного рогатого скота 1 типа).

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

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

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

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

Как используется в настоящем изобретении, 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" или "ДНК последовательность", как используется в данном изобретении, относится к олигонуклеотиду, нуклеотиду или полинуклеотиду и их фрагментам и частям, и к ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными и представляют собой смысловую или антисмысловую цепь. Последовательность может представлять собой некодирующую последовательность, кодирующую последовательность или смесь обеих. Последовательности нуклеиновой кислоты настоящего изобретения можно получить, используя стандартные методики, хорошо известные специалисту в данной области техники.

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

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

"Внутренний участок посадки рибосомы" или "IRES" описывает последовательность, которая функционально способствует инициации трансляции независимой от гена 5' IRES и предоставляет возможность трансляции двух цистронов (открытые рамки считывания) из единичного транскрипта в животной клетке. IRES обеспечивает независимый сайт посадки рибосомы для трансляции открытой рамки считывания, расположенный по ходу транскрипции сразу после нее. В отличие от бактериальной мРНК, которая может быть полицистронной, т.е., кодировать несколько различных полипептидов, которые транслируются последовательно из мРНК, большинство мРНК животных клеток являются моноцистронными и кодируют синтез только одного полипептида. С полицистронным транскриптом в эукариотической клетке, трансляция будет инициироваться с 5' крайнего сайта инициации трансляции, терминируясь на первом стоп-кодоне, и транскрипт будет высвобождаться с рибосомы, что будет приводить к трансляции только первого кодируемого полипептида в мРНК. В эукариотической клетке, полицистронный транскрипт, имеющий IRES, функционально связанный со второй или последующей открытой рамкой считывания в транскрипте, предоставляет возможность последовательной трансляции открытой рамки считывания, которая расположена по ходу транскрипции, для выработки двух или более полипептидов, кодируемых тем же самым транскриптом. IRES может быть различной длины и из различных источников, например, вируса энцефаломиокардита (EMCV), пикорнавирусов (например, вируса ящура, FMDV или полиовируса (PV) или вируса гепатита С (HCV)). Были описаны различные IRES последовательности и их применение в векторных конструкциях и они хорошо известны в данной области техники. Коди-

рующая последовательность по ходу транскрипции функционально связана с 3 концом IRES на любом расстоянии, которое не оказывает отрицательного влияния на экспрессию расположенного по ходу транскрипции гена. Оптимальное или допустимое расстояние между IRES и началом расположенного по ходу транскрипции гена легко может быть определено путем изменения расстояния и измерения экспрессии в зависимости от расстояния.

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

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

Как используется в данном изобретении, в контексте настоящего изобретения термин промотор относится, в особенности, к функциональному фрагменту, например, усечению 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или его комплементарной нуклеотидной последовательности, где идентичность последовательности предпочтительно составляет (по меньшей мере) 72% относительно всей длины (или выше). Кроме того, как используется в данном изобретении, в контексте настоящего изобретения термин промотор относится, в особенности, к функциональному фрагменту, например, усечению 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) или его комплементарной нуклеотидной последовательности, где идентичность последовательности предпочтительно составляет (по меньшей мере) 78% относительно всей длины (или выше). Кроме того, как используется в данном изобретении, в контексте настоящего изобретения термин промотор относится, в особенности, к р422 (SEQ ID NO: 5) или его функциональному фрагменту или его комплементарным нуклеотидным последовательностям. Наиболее предпочтительно "промотор" относится к р430 (SEQ ID NO: 3), р455 (SEQ ID NO: 4) или р422 (SEQ ID NO: 5). Как дополнительно используется в данном изобретении, в контексте настоящего изобретения термин промотор относится, в особенности, к функциональному производному р430 (SEQ ID NO: 3) или р455 (SEQ ID NO: 4) или 4pgG600 (SEQ ID NO: 1) или 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), имеющему, например, небольшую замену, мутацию или инверсию, таким образом, что идентичность последовательности составляет 70, 80, 85, 90, 95, 99% идентичности или гомологичности.

Термины "4pgG430", "р430", "gG 430" и "430" используются синонимично и взаимозаменяемо по всему объему описания, фигур, перечня последовательностей и т.д. Термины "4pMCP455", "р455", "MCP 455" и "455" используются синонимично и взаимозаменяемо по всему объему описания, фигур, перечня последовательностей и т.д. Термины р422 и 422 используются синонимично и взаимозаменяемо по всему объему описания, фигур, перечня последовательностей и т.д.

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

ных до настоящего времени. Одним из примеров индуцибельного энхансера является металлотионеиновый энхансер, который может стимулироваться глюкокортикоидами или тяжелыми металлами.

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

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

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

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

Термин "UL (длинный уникальный)" представляет собой аббревиатуру для описания длинного уникального сегмента ENV, предпочтительно ENV-1 генома.

Термин "US (короткий уникальный)" представляет собой аббревиатуру для описания короткого уникального сегмента ENV, предпочтительно ENV-1 генома.

Термин "транскрипция" описывает биосинтез мРНК в клетке.

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

Термин "экспрессионная кассета" или "транскрипционная единица" или "экспрессионная единица" определяет участок в векторе, конструкции или полинуклеотидной последовательности, который содержит один или несколько транскрибируемых генов, где нуклеотидные последовательности, кодирующие транскрибируемый(-е) ген(-ы), а также полинуклеотидные последовательности, содержащие регулятор-

ные элементы, содержащиеся в экспрессионной кассете, функционально связаны друг с другом. Они транскрибируются из промотора и транскрипция терминируется по меньшей мере одним сигналом полиаденилирования. В одном специфическом аспекте, они транскрибируются из одного единичного промотора. В результате этого, различные гены являются по меньшей мере транскрипционно связанными. Более чем один белок или продукт можно транскрибировать и экспрессировать из каждой транскрипционной единицы (мультицистронная транскрипционная единица). Каждая транскрипционная единица будет включать регуляторные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции любой из выбранных последовательностей, которые содержатся в этой единице. И каждая транскрипционная единица может содержать одинаковые или различные регуляторные элементы. Например, каждая транскрипционная единица может содержать один и тот же терминатор, IRES элемент, или интроны можно использовать для функционального связывания генов в транскрипционной единице. Вектор или полинуклеотидная последовательность может содержать более чем одну транскрипционную единицу.

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

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

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

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

Термин "титр вируса" является показателем инфекционных единиц на объем вирусного препарата. Титр вируса является конечной точкой биологической процедуры и определяется как разведение, при котором определенная часть тестов, осуществляемых параллельно, проявляет эффект (Reed и Muench, 1938). Специфически, полуинфицирующая доза для культуры ткани на миллилитр (TCID₅₀/мл) обеспечивает разведение вирусного препарата, при котором 50% количества клеточных культур, инокулируемых параллельно таким разведением, являются инфицированными.

"Элементы, регулирующие транскрипцию" обычно включают промотор, расположенный против

хода транскрипции последовательности экспрессируемого гена, сайты инициации и терминации транскрипции, и сигнал полиаденилирования.

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

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

"Регуляторные элементы трансляции" включают сайт инициации трансляции (AUG), стоп-кодон и polyA сигнал для каждого индивидуального экспрессируемого полипептида. В некоторые конструкции может быть включен внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Для того чтобы оптимизировать экспрессию может оказаться желательным удалять, добавлять или изменять 5'-и/или 3'-нетранслируемые участки экспрессируемой последовательности нуклеиновой кислоты для элиминации любых потенциальных дополнительных неподходящих альтернативных кодонов инициации трансляции или других последовательностей, которые могут препятствовать или уменьшать экспрессию, либо на уровне транскрипции, либо трансляции. Консенсусные сайты связывания рибосом (последовательность Козак) могут быть инsertированы сразу против хода транскрипции старт-кодона для усиления трансляции и, таким образом, экспрессии. Повышенное содержание A/U вокруг этого сайта связывания рибосомы способствует более эффективному связыванию рибосом.

Согласно определению, каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, инsertированный в клетку-хозяин, и соответствующий белок или РНК, кодируемая таким образом, обозначается как "экзогенная", "экзогенная последовательность", "экзогенный ген", "экзогенная кодирующая последовательность", по отношению к клетке-хозяину, если она (он) имеет происхождение из различных (вирусных) видов. Соответственно, промоторы на основе ENV-4 настоящего изобретения являются экзогенными по отношению к ENV-1 вирусному вектору. Как используется в данном изобретении, по отношению к представляющей(-ему) интерес последовательности или гену, такой(-му) как антиген, термин "экзогенный" означает, что указанная(-ый) представляющая(-ий) интерес последовательность или ген, специфически указанный антиген, экспрессируется за пределами окружения его природных видов. Соответственно, антигены H3, H1av или H1pdm из свиного IAV являются примерами экзогенных антигенов по отношению к ENV-1 вектору. Следовательно, любая последовательность, имеющая происхождение из другого патогена, чем ENV-1, представляет собой экзогенную(-ый) представляющую(-ий) интерес последовательность или ген или антиген в соответствии со специфическим аспектом настоящего изобретения.

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

Термин "не встречающийся в природе" означает любую(-ой) представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, такой как антиген, которая(-ый) не встречается в этом окружении природно, такую как гибридная последовательность или представляющая(-ий) интерес последовательность или ген, такой как антиген, из различных видов, или представляющую(-ий) интерес последовательность или ген, такой как антиген, который не является природным продуктом вследствие искусственной мутации, ин-

серции, делеции или т.п.

Термин "рекомбинантный" используется взаимозаменяемо с терминами "не встречающийся в природе", "гетерологичный" и "экзогенный" по всему объему описания настоящего изобретения. Таким образом, "рекомбинантный" белок представляет собой белок, экспрессируемый либо из гетерологичной, либо из экзогенной полинуклеотидной последовательности. Термин "рекомбинантный", как используется по отношению к вирусу, означает вирус, продуцируемый путем искусственной манипуляции с вирусным геномом. Вирус, включающий гетерологичную или экзогенную последовательность, такую как экзогенная антигенкодирующая последовательность, представляет собой рекомбинантный вирус. Термин "рекомбинантный вирус" и термин "не встречающийся в природе вирус" используются взаимозаменяемо.

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

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

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

стандартного гена. Это предоставляет возможность интерпретировать активности различных промоторов и их фрагментов.

"Гомология последовательностей", как используется в настоящем изобретении, относится к способу определения родства двух последовательностей. Для определения гомологии последовательностей, две или больше последовательностей оптимально выравнивают, и интродуцируют гэпы, если это необходимо. Однако, в отличие от "идентичности последовательности", консервативные аминокислотные замены считают как совпадение при определении гомологии последовательностей.

Другими словами, для получения сопоставимого полипептида или полинуклеотида, имеющего 95% гомологию последовательности с последовательностью сравнения, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, еще более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99.9% аминокислотных остатков или нуклеотидов в последовательности сравнения должны совпадать или включать консервативную замену на другую аминокислоту или нуклеотид. Альтернативно, количество аминокислот или нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10, 9, 8, 7, 6%, еще более предпочтительно вплоть до 5, 4, 3, 2, 1, 0.1% общих аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включая консервативные замены, в последовательности сравнения могут быть инсертированы в последовательность сравнения. Предпочтительно гомологичная последовательность включает по меньшей мере протяженность 50, еще более предпочтительно 100, еще более предпочтительно 250, еще более предпочтительно 500 нуклеотидов.

Термин "идентичность последовательности", как он известен в данной области техники, относится к взаимосвязи двух или более полипептидных последовательностей или двух или более полинуклеотидных последовательностей, а именно последовательности сравнения и данной последовательности, которую сравнивают с последовательностью сравнения. Идентичность последовательности определяют путем сравнения данной последовательности с последовательностью сравнения после оптимального выравнивания последовательностей для получения наибольшей степени сходства последовательностей, как определяется путем совпадения между полосками таких последовательностей. При таком выравнивании, идентичность последовательности устанавливают на основании сравнения по положениям, например, последовательности являются "идентичными" в конкретном положении, если в этом положении, нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. После этого общее число таких идентичных положений разделяют на общее количество нуклеотидов или остатков в последовательности сравнения, получая % идентичности последовательностей. Идентичность последовательности легко может быть рассчитана с помощью известных методов, включая, но не ограничиваясь только ими, те, которые описаны в *Computational Molecular Biology*, ред. Lesk, A. N., Oxford University Press, New York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, ред. Smith, D.W., Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, ред. Griffin, A.M. и Griffin, H.G., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, ред. Gribskov, M. и Devereux, J., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., и Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), сведения из которых включены в настоящее изобретение путем ссылки. Создаются предпочтительные способы определения идентичности последовательностей для получения наибольшего совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей систематизированы в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичность последовательностей между данными последовательностями. Примеры таких программ включают, но не ограничиваясь только ими, пакет программ GCG (Devereux, J., и др., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). BLASTX программа является общедоступной из NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. и др., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), сведения из которых включены в настоящее изобретение путем ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности, используя штрафы за открытие гэпа по умолчанию для получения наивысшего уровня идентичности последовательностей между данной и сравнительной последовательностями. В качестве иллюстрации, под полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, еще более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99.9% "идентичность последовательности" к сравниваемой нуклеотидной последовательности, понимают, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида является идентичной последовательности сравнения за исключением того, что данная полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной последовательности сравнения. Другими словами, в полинуклеотиде, имеющем нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, еще более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99.9% идентичность по отношению к нуклеотидной последовательности сравнения, вплоть до 15%, предпочтительно 10, 9, 8, 7, 6%, еще более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% нуклеотидов в последовательности сравнения могут быть делетированы или заменены на другой нуклеотид, или количество нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно 10, 9, 8, 7, 6%, еще более предпочтительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,1% от всех нуклеотидов в последовательности сравнения могут быть инсертированы в последовательность сравнения. Эти мутации последовательности сравнения могут происходить на 5' или 3' концевых

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

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

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

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

Белковые последовательности или последовательности нуклеиновых кислот настоящего изобретения дополнительно могут использоваться в качестве "искомой последовательности" для осуществления поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации других представителей семейств или родственных последовательностей. Такие поиски можно осуществлять, используя программы BLASTN и BLASTP (версия 2.0) от Altschul, и др. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST поиски белков можно осуществлять с помощью программы BLASTP, оценка=50, длина слова=3 для получения амино-

кислотных последовательностей, гомологичных к молекулам белков согласно изобретению. Для получения выравниваний с брешью для сравнений, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul и др. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST, можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTP и BLASTN). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

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

Термин "лошадиный" или "конский" или "непарнокопытный" обозначает или относится к семейству лошадиных (Equidae), которое включает лошадей, ослов и зебр, предпочтительно лошадей. Кроме того, термин "лошадиный" или "конский" или "непарнокопытный" охватывает также гибриды представителей семейства Equidae (например, мулы, лошаки и т.д.).

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

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

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

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

Термин "инsertированный в ORF70" означает, что ДНК фрагмент был инsertирован в геномную ДНК в локализацию, кодирующую открытую рамку считывания 70 альфагерпесвируса лошадей 1 типа. В специфическом аспекте настоящего изобретения указанная инsertция приводит к делеции 801 5' пар оснований ORF70, сохраняя оставшиеся 423 по на 3' конце интактными, но отменяя экспрессию продукта гена *orf70* гликопротеина G. Было показано, что гликопротеин G нескольких альфагерпесвирусов, включая EHV-1, секретируется из инфицированных клеток и действует в качестве иммуномодулирующего белка путем связывания провоспалительных цитокинов. Отмена его экспрессии в вирусном векторе будет повышать иммуногенность вирусной инфекции по сравнению с EHV-1 дикого типа с экспрессией интактного гликопротеина G.

Термин "инsertированный в UL43" означает, что ДНК фрагмент был инsertирован в геномную ДНК в локализацию, кодирующую открытую рамку считывания UL43 (ORF17) альфагерпесвируса лошадей 1 типа. В специфическом аспекте настоящего изобретения указанная инsertция приводит к делеции 870 5' пар оснований UL43, сохраняя оставшиеся 336 по на 3' конце интактными, но отменяя экспрессию продукта UL43 гена *pUL43*. Было показано, что *pUL43* из EHV-1 действует в качестве иммуномодулирующего белка вместе с *pUL56*, влияя на представление MHC-I.

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

Определения вакцины.

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

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

Термин "животное, выращиваемое в продовольственных целях" означает животных, которые используются для потребления людьми, таких как свинья, крупный рогатый скот, сельскохозяйственная птица, рыба и т.п., предпочтительно животное, выращиваемое в продовольственных целях, означает свинью и крупный рогатый скот, наиболее предпочтительно свинью.

"Иммуногенная композиция", как используется в данном изобретении, может относиться к полипептиду или белку, такому как, например, вирусный поверхностный белок, который вызывает иммунологический ответ, как описано в настоящем изобретении. Термин "иммуногенный фрагмент" или "имму-

ногенная часть" относится к фрагменту или усеченной и/или замещенной форме белка или полипептида, который включает один или несколько эпитопов и, таким образом, вызывает иммунологический ответ, описанный в настоящем изобретении. В общем, такие усеченные и/или замещенные формы или фрагменты будут включать по меньшей мере шесть последовательных аминокислот из полноразмерного белка. Такие фрагменты могут быть идентифицированы при использовании любой из ряда методик, которые используются для картирования эпитопов, хорошо известных в данной области техники. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, т. 66 (Glenn E. Morris, ред., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены с помощью одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, определения пептидов, соответствующих частям белковой молекулы, и взаимодействия пептидов с антителами, в то время как пептиды все еще остаются присоединенными к подложкам. Такие методики известны и описаны в данной области техники, см., например, патент США № 4,708,871; Geysen и др. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; и Geysen и др. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. Подобным образом, конформационные эпитопы легко идентифицируются с помощью определения пространственной конформации аминокислот, например, путем рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См. *Epitope Mapping Protocols*, как описано выше. Синтетические антигены также включены в данное 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. и Cell Biol.* 75:402-408; и Gardner и др., (1998) 12-ая всемирная конференция по СПИДу, Женева, Швейцария, 28 июля 1998 г. (Раскрытие и содержание которых являются включенными в данное изобретение в качестве ссылки.)

Термин "иммунизирование" относится к активной иммунизации путем введения иммуногенной композиции животному, выращиваемому в продовольственных целях, подлежащему иммунизации, таким образом вызывая иммунологический ответ на антиген, включенный в такую иммуногенную композицию.

Термин "нуждающийся" или "который в этом нуждается", как используется в данном изобретении, означает, что введение/лечение связано с бустированием или улучшением состояния здоровья или клинических симптомов, или любым другим положительным медицинским влиянием на состояние здоровья животных, которые получают иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением.

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

Термин "множественность заражения (M.O.I.)" описывает, сколько инфекционных единиц, например, TCID₅₀, вирусного препарата используют на клетку для инфицирования культивируемых клеток. Например, M.O.I. 0.01 означает, что на каждые 100 клеток в сосуде для культивирования инокулируют одну инфекционную единицу.

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

В данной области техники известны различные физические и химические способы инактивации. Термин "инактивированный" относится к ранее вирулентному или невирулентному вирусу или бактерии, который(-ая) был(-а) облучен(-а) (ультрафиолетом (УФ), рентгеновскими лучами, электронным пучком или гамма-лучами), нагрет(-а) или химически обработан(-а) для инактивации или убивания такого вируса

или бактерии с сохранением при этом его иммуногенности. Подходящие инактивирующие агенты включают бета-пропиолактон, бинарный или бета- или ацетил-этиленмин, глутаральдегид, озон и формалин (формальдегид).

В случае инактивации с помощью формалина или формальдегида, формальдегид типично смешивают с водой и метиловым спиртом для создания формалина. Добавление метилового спирта предотвращает разложение или перекрестную реакцию во время процесса активации. В одном варианте осуществления используют приблизительно 0.1 - 1% 37% раствора формальдегида для инактивации вируса или бактерии. Является очень важным корректировать количество формалина для обеспечения инактивации материала, но не настолько много, чтобы проявлялись побочные эффекты от использования высокой дозы.

Более предпочтительно, термин "инактивированный" в контексте вируса означает, что вирус неспособен к репликации *in vivo* или *in vitro* и, соответственно, термин "инактивированный" в контексте бактерии означает, что бактерия неспособна к репродукции в условиях *in vivo* или *in vitro*. Например, термин "инактивированный" может относиться к вирусу, который был размножен *in vitro*, и затем был инактивирован с использованием химических или физических средств таким образом, что он больше не способен к репликации. В другом примере, термин "инактивированный" может относиться к бактерии, бактерии, которая была размножена, и затем инактивирована с использованием химических или физических средств, что привело к получению суспензии бактерий, фрагментов или компонентов бактерии, например, к получению бактериина, который можно использовать в качестве компонента вакцины.

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

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

"Фармацевтическая композиция" по существу состоит из одного или нескольких компонентов, способных модифицировать физиологические, например, иммунологические функции, организма, в который ее вводят, или других организмов, живущих в указанном организме или на нем. Термин включает, но не ограничиваясь только ими, антибиотики или противопаразитарные средства, а также другие составляющие, которые обычно используются для достижения определенных других задач, таких как, но не ограничиваясь только ими, способности к обработке, стерильность, стабильность, возможность введения композиции посредством энтерального или парентерального путей, таких как пероральный, интраназальный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный или другой подходящий путь, переносимость после введения, или свойства контролируемого высвобождения. Один неограничивающий пример такой фармацевтической композиции, представленный только для целей демонстрации, может быть приготовлен следующим образом: супернатант клеточной культуры, представляющей собой инфицированную клеточную культуру, смешивают со стабилизатором (например, спермидином и/или бычьим сывороточным альбумином (BSA)) и затем смесь лиофилизируют или дегидратируют с помощью других методов. Перед вакцинацией, смесь затем восстанавливают в водных (например, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) или неводных растворах (например, масляная эмульсия, адьювант на основе алюминия).

Как используется в настоящем изобретении, термин "фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, адьюванты, стабилизирующие агенты, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты, замедляющие адсорбцию, и т.п. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, и, в особенности, в тех, которые включают лиофилизованные иммуногенные композиции, стабилизирующие агенты для использования в настоящем изобретении включают стабилизаторы для лиофилизации или сушки вымораживанием.

В некоторых вариантах осуществления, иммуногенная композиция настоящего изобретения содержит адьювант. "Адьюванты", как используются в настоящем изобретении, могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию вода-в-масле, масло-в-воде, вода-в-масле-в-воде. Эмульсия может быть на основе, в частности, легкого вазелинового масла (в соответствии с европейской фармакопеей); изопреноидного масла, такого как сквалан или сквален; масла, полученного в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; сложных эфиров кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более предпочтительно растительного масла, этилолеата, пропиленгликоль ди-(каприлата/капрата), глицерил три-(каприлата/капрата) или пропиленгликоль диолеата; сложных эфиров разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложных эфиров изостеариновой кислоты. Масло используют в комбинации с эмульгаторами с образованием эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбитана, маннина (например, олеат ангидроманнита), глицоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистерариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропиленполиоксиэтилена, в частности, продукты Pluronic, в особенности, L121. См. Hunter и др., The Theory and

Practical Application of Adjuvants (ред. Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley и Sons, NY, стр. 51-94 (1995) и Todd и др., Vaccine 15:564-570 (1997). Иллюстративными адьювантами являются SPT эмульсия, описанная на стр. 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под ред. M. Powell и M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на стр. 183 этого же источника.

Еще одним примером адьюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного. Предпочтительные адьювантные соединения представляют собой полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые являются поперечно сшитыми, в особенности, с помощью полиалкениловых эфиров сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения являются известными под термином карбомер (Phameurora т. 8, № 2, июнь 1996). Специалисты в данной области техники могут также сослаться на патент США № 2,909,462, который описывает такие акриловые полимеры, поперечно сшитые с помощью полигидроксилированного соединения, имеющего по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, при этом атомы водорода, по меньшей мере, трех гидроксильных групп заменены ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по меньшей мере 2 атомов углерода. Предпочтительные радикалы представляют собой такие, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие этилен-ненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие как метил. Продукты, которые продаются под названием CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, USA) являются особенно приемлемыми. Они являются поперечно сшитыми с помощью аллилсахарозы или аллилпентаэритрита. Среди них могут быть упомянуты Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является использование CARBOPOL® 971P. Среди сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного следует упомянуть сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к получению кислотного раствора, который следует нейтрализовать, предпочтительно до физиологического значения рН, для того, чтобы получить раствор адьюванта, в который будет включена сама композиция иммуногенной или иммунологической вакцины.

Дополнительные подходящие адьюванты включают, но не ограничиваются только ими, адьювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блок сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, адьювант Avridine на основе липид-амин, термолабильный энтеротоксин из E. coli (рекомбинантный или иной), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид, либо природные, либо рекомбинантные цитокины или их аналоги или стимуляторы высвобождения эндогенных цитокинов, среди многих других.

Ожидается, что адьювант может быть добавлен 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, еще более предпочтительно в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2.5 мг на дозу, и наиболее предпочтительно в количестве от приблизительно 1 мг на дозу. Альтернативно, адьювант может находиться в концентрации приблизительно от 0.01 до 50%, предпочтительно в концентрации приблизительно от 2 до 30%, более предпочтительно в концентрации приблизительно от 5 до 25%, еще более предпочтительно в концентрации приблизительно от 7 до 22%, и наиболее предпочтительно в концентрации от 10 до 20% от объема конечного продукта.

"Разбавители" могут включать воду, физиологический раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Изотонические агенты могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу, среди прочих. Стабилизаторы включают альбумин и соли щелочных металлов с этилендиаминтетрауксусной кислотой, 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 удален из своей первоначальной окружающей среды, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, который в природе присутствуют в живом организме, не является "изолированным", но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от сосуществующих с ним материалов в его естественном состоянии, является "изолированным", в том значении, как этот термин используется в данном изобретении.

"Аттенуирование" означает уменьшение вирулентности патогена. В настоящем изобретении "аттенуирование" является синонимом "авирулентности". В настоящем изобретении, аттенуированный вирус представляет собой вирус, в котором вирулентность была уменьшена таким образом, что он не вызывает клинических симптомов инфекции, но способен индуцировать иммунный ответ у целевого животного, но также может обозначать, что клинические симптомы снижаются в отношении частоты или тяжести у животных, инфицированных аттенуированным вирусом, в особенности, ЕНУ-1 РасН вирусным вектором, как заявляется, по сравнению с "контрольной группой" животных, инфицированных неаттенуированным вирусом или патогеном и не получавших аттенуированный вирус. В этом контексте, термин "снижение/сниженный" означает уменьшение по меньшей мере на 10%, предпочтительно на 25%, еще более предпочтительно на 50%, еще более предпочтительно на 60%, еще более предпочтительно на 70%, еще более предпочтительно на 80%, еще более предпочтительно на 90% и наиболее предпоч-

тительно на 100% по сравнению с контрольной группой, как определено выше. Таким образом, аттенуированный, авирулентный патоген, такой как, например, заявляемый аттенуированный вирусный вектор, в особенности, заявляемый EHV-1 (предпочтительно RacH) вирусный вектор, является пригодным для создания модифицированной живой вакцины (MLV) или модифицированной живой иммуногенной композиции.

Термин "лечение и/или профилактика" относится к уменьшению частоты инфицирования (в частности, инфицирования вирусом свиного гриппа типа А) в стаде или уменьшения тяжести клинических симптомов, вызываемых или связанных с конкретным инфицированием (в частности, инфицированием вирусом свиного гриппа типа А). Таким образом, термин "лечение и/или профилактика" также относится к уменьшению количества животных в стаде, которые становятся инфицированными патогеном (в частности, вирусом свиного гриппа типа А = уменьшению частоты конкретного инфицирования вирусом свиного гриппа типа А) или к уменьшению тяжести клинических симптомов обычно связанных с или вызываемых инфицированием (в частности, инфицированием вирусом свиного гриппа типа А) в группе животных, где животные получают эффективное количество иммуногенной композиции, как обеспечивается в данном изобретении, по сравнению с группой животных, где животные не получают такой иммуногенной композиции.

"Лечение и/или профилактика" в общем включает введение эффективного количества иммуногенной композиции настоящего изобретения животному или стаду животных, которые в этом нуждаются, или которые будут иметь преимущество от такого лечения/профилактики. Термин "лечение" относится к введению эффективного количества иммуногенной композиции один раз животному или по меньшей мере некоторым животным стада, которое(-ые) уже было(-и) инфицировано(-ы) таким патогеном (в частности, вирусом свиного гриппа типа А) и где такие животные уже проявляют некоторые клинические симптомы, вызываемые или связанные с инфицированием таким патогеном (в частности, вирусом свиного гриппа типа А). Термин "профилактика" относится к введению данной композиции животному перед каким-либо инфицированием такого животного патогеном (в частности, вирусом свиного гриппа типа А) или, по меньшей мере, в случае, когда такое животное или ни одно из животных в группе животных не проявляют каких-либо клинических симптомов, вызываемых или связанных с инфицированием таким патогеном (в частности, вирусом свиного гриппа типа А). Термины "профилактика" и "предотвращение" используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении.

Термин "клинические симптомы", как используется в данном изобретении, относится к симптомам инфицирования животного патогеном (в частности, вирусом свиного гриппа типа А). Клинические симптомы инфицирования зависят от выбранного патогена. Примеры таких клинических симптомов включают, но не ограничиваясь только ими, нарушение дыхательных функций, отит, огрубение шерстного покрова, небольшую температуру, депрессию и снижение аппетита. Однако клинические симптомы также включают, но не ограничиваясь только ими, клинические симптомы, которые непосредственно наблюдаются у живого животного. Примеры клинических симптомов, которые непосредственно наблюдаются у живого животного, включают выделения из носа и глаз, летаргию, кашель, хрипение, пульсирование, повышенную температуру, потерю веса, обезвоживание, прихрамывание, истощение, бледность кожных покровов, хилость и т.п.

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

Как используется в настоящем изобретении, термин "эффективное количество" означает в контексте композиции, количество иммуногенной композиции, способное индуцировать иммунный ответ, который уменьшает частоту или тяжесть инфицирования, или частоту возникновения заболевания у животного. В частности, эффективное количество относится к колониеобразующим единицам (CFU) на дозу. Альтернативно, в контексте терапии, термин "эффективное количество" относится к количеству терапии, которое является достаточным для того, чтобы снизить или ослабить тяжесть или продолжительность заболевания или расстройства, или один или несколько их симптомов, предотвратить развитие заболевания или расстройства, вызвать регрессию заболевания или расстройства, предотвратить рецидив, развитие, начало или прогрессирование одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или расстройством, или усилить или улучшить профилактику или лечение другой терапии или терапевтического агента.

"Иммунный ответ" или "иммунологический ответ" означает, но не ограничивается таковыми, развитие клеточного и/или опосредованного антителами иммунного ответа на представляющую интерес (иммуногенную) композицию или вакцину. Обычно иммунный или иммунологический ответ включает, но не ограничивается таковыми, один или несколько из следующих эффектов: выработка или активация антител, В-клеток, Т-хелперов, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, специфически направленных на антиген или антигены, включенные в представляющие интерес композиции или вакцины. Предпочтительно, хозяин будет демонстрировать либо терапевтический, либо защитный иммунологический (иммунологическая память) ответ так, что сопротивление новой инфекции будет усиливаться и/или клиническая тяжесть заболевания будет снижаться. Такая защита будет проявляться либо умень-

шением количества симптомов, тяжести симптомов, либо отсутствием одного или нескольких симптомов, связанных с инфицированием патогеном, задержкой наступления вирусемии, снижением вирусной персистенции, снижением общей вирусной нагрузки и/или уменьшением экскреции вируса.

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

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

Термин "повышенная защита" в данном изобретении означает, но не ограничивается таковым, статистически достоверное снижение одного или нескольких клинических симптомов, которые связаны с инфицированием инфекционным агентом, в группе вакцинированных субъектов против невакцинированной контрольной группы субъектов. Термин "статистически достоверное уменьшение клинических симптомов" означает, но не ограничивается таковой, частоту возникновения по меньшей мере одного клинического симптома в группе вакцинированных субъектов, которая является, по меньшей мере, на 10%, предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, еще более предпочтительно на 50%, и еще более предпочтительно на 70% ниже, чем в невакцинированной контрольной группе после заражения инфекционным агентом.

"Длительная защита" относится к "улучшенной эффективности", которая сохраняется в течение по меньшей мере 3 недель, но более предпочтительно по меньшей мере 3 месяца, еще более предпочтительно по меньшей 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 "уменьшение вирусемии", индуцируемой вирусом, означает, но не ограничивается только ими, уменьшения количества вируса, проникающего в систему кровообращения животного, где уровень вирусемии, т.е. количество копий вирусной ДНК или РНК на мл сыворотки крови или количество бляшкообразующих колоний на децилитр сыворотки крови, уменьшается в сыворотке крови животных, получающих композицию настоящего изобретения, по меньшей мере на 50% по сравнению с животными, которые не получали композицию и могут инфицироваться. Более предпочтительно, уровень вирусемии уменьшается у животных, получающих композицию настоящего изобретения по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 99.9%, более предпочтительно по меньшей мере на 99.99%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99.999%.

Термин "патоген" является хорошо известным специалисту в данной области техники. Однако, термин "патоген" включает бактерии и вирусы. Термин "патоген" включает патогены, такие как вирус Шмалленберга, вирус гриппа типа А, вирус свиного респираторного и репродуктивного синдрома, цирковирус свиней, вирус классической чумы свиней, вирус африканской чумы свиней, вирус гепатита Е, вирус диареи крупного рогатого скота, вирус бешенства, морбилливирус кошек, столбнячная палочка, микобактерия туберкулеза, возбудитель актинобациллезной плевропневмонии

Термин "животное, выращиваемое в продовольственных целях" означает животных, которые используются для потребления людьми, таких как свинья, крупный рогатый скот, сельскохозяйственная птица, рыба и т.п., предпочтительно свинья.

Как используется в настоящем изобретении, термин "вирусемия", в особенности, понимают как состояние, при котором вирусные частицы репродуцируются и/или циркулируют в системе кровообраще-

ния животного, в частности, млекопитающего, птицы или насекомого.

"Безопасность" относится к отсутствию побочных эффектов у вакцинированного животного после вакцинации, включая, но не ограничиваясь только ими: потенциальное превращение вакцины на основе вируса в вирулентную, клинически значимые побочные эффекты, такие как стойкие, системные болезни или неприемлемое воспаление в месте введения вакцины.

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

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

Составы.

Субъект, которому вводят композицию, предпочтительно представляет собой животное, включая, но не ограничиваясь только ими, крупный рогатый скот, лошадей, овец, свиней, сельскохозяйственную птицу (например, кур), коз, кошек, собак, хомяков, мышей и крыс, наиболее предпочтительно млекопитающее представляет собой свинью.

Составы в соответствии с изобретением включает эффективное иммунизирующее количество одной или нескольких иммуногенных композиций и физиологически приемлемый носитель. Вакцины включают эффективное иммунизирующее количество одной или нескольких иммуногенных композиций и физиологически приемлемый носитель. Состав должен соответствовать способу введения.

Иммуногенная композиция, если это является желательным, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов, или рН буферизирующих агентов. Иммуногенная композиция может представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетки, пилюли, капсулы, состав замедленного высвобождения или порошок. Пероральный состав может включать стандартные носители, такие как маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, натрия сахарин, целлюлоза, карбонат магния и т.д., имеющие фармацевтическую степень чистоты.

Способы лечения.

Предпочтительные пути введения включают, но не ограничиваясь только ими, интраназальное, пероральное, внутрикожное и внутримышечное. Желательным является введение в питьевой воде, наиболее предпочтительно в единичной дозе. Специалисту в данной области будет понятно, что композиции в соответствии с изобретением также можно вводить в одной, двух или более дозах, а также с использованием других путей введения. Например, такие другие пути включают подкожное, внутрикожное, внутривенное, внутримышечное, внутривенное введение, и в зависимости от желательной продолжительности и эффективности лечения, композиции в соответствии с изобретением могут быть введены один или несколько раз, а также периодически, например на ежедневной основе в течение нескольких дней, недель или месяцев, и в различных дозировках, таких как от приблизительно 10^3 до 10^8 TCID₅₀ (см. титр вируса выше). В специфическом аспекте настоящего изобретения дозировка составляет приблизительно от 10^3 до 10^8 TCID₅₀, в особенности, для живого вируса / живой вакцины.

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

Определения антигена.

Термин "вирус свиного гриппа" известен специалисту в данной области техники. Термин вирус свиного гриппа относится к вирусу гриппа типа А или типа С из семейства ортомиксовирусов, которые вызывают свиным гриппом. В то время как ортомиксовирус имеет три группы: тип А, тип В и тип С, только вирусы гриппа типа А и типа С инфицируют свиней. Предпочтительно, вирус свиного гриппа представляет собой вирус свиного гриппа типа А. Подтипы вируса свиного гриппа включают H1N1, H1N2, H3N2 и H3N1. H9N2 и H5N1 также могут быть обнаружены у свиней. Предпочтительно, вирус свиного гриппа представляет собой вирус гриппа, который был выделен из свиней.

Термины "НА" или "Н", "NA" или "N" и "NP" известны специалисту в данной области техники. Однако, в общем, вирусы гриппа типа А разделены на 17 Н (гемагглютинин) и 10 N (нейраминидаза) подтипов, которые могут привести к появлению многих различных комбинаций (обозначаемых как H1N1, H1N2...H2N1, H2N2...H5N1, H5N2... и так далее). Н (гемагглютинин) и N (нейраминидаза) представляют собой поверхностные гликопротеины в вирусах гриппа А, такие как SIAV. Кроме того, N является основной антигенной мишенью нейтрализующих антител. Кроме того, NP (нуклеопротеин) образует

нуклеокапсид.

Определения DIVA.

Термин "DIVA (дифференциация между инфицированными и вакцинированными животными)" относится к вакцине, которую можно использовать для дифференциации вакцинированного животного от животного, инфицированного природным путем.

Термин "образец" относится к образцу жидкости организма, образцу отделенных клеток или образцу ткани или органа. Образцы жидкостей организма можно получить с помощью хорошо известных методик и включают, предпочтительно, образцы крови, плазмы, сыворотки или мочи, более предпочтительно, образцы крови, плазмы или сыворотки. Образцы ткани или органа можно получить из любой ткани или органа, например, путем биопсии. Отделенные клетки можно получить из жидкостей организма или тканей, или органов с помощью методик разделения, таких как центрифугирование или сортировка клеток.

Термин "полученный" может предусматривать стадию выделения и/или очистки, известную специалисту в данной области техники, предпочтительно с использованием осаждения, колонок и т.д.

Термин "иммунотесты" и "геномные аналитические тесты" является основой для дифференциации животных, вакцинированных иммуногенной композицией в соответствии с настоящим изобретением, и животных, инфицированных природным (ассоциированным с заболеванием) вирусом свиного гриппа. Примеры иммунотестов включают любой ферментно-иммунологический или иммунохимический способ обнаружения, такой как ELISA (иммуноферментный твердофазный анализ), EIA (иммуноферментный анализ), RIA (радиоиммуноанализ), иммуноферментные "сэндвич-методы", проба с флуоресцирующими антителами (FAT) электрохемолуминесцентные иммунохимические "сэндвич-методы" анализа (ECLIA), усиленный диссоциацией лантанидный флуоресцентный иммуноанализ (DELFA) или твердофазные иммунные тесты, иммунофлуоресцентный тест (IFT), метод иммуногистохимического окрашивания, анализ вестерн-блоттинга или любой другой подходящий способ, доступный специалистам в данной области техники. В зависимости от используемого анализа, антигены или антитела могут быть помечены ферментом, флуорофором или радиоизотопом. См., например, Coligan и др. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. (1994); и Frye и др., Oncogen 4: 1153-1157, 1987.

Термин "геномный аналитический тест" относится к геномному аналитическому способу, основанному на полимеразной цепной реакции (PCR), полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR), PCR в реальном времени (r-PCR) или PCR в реальном времени с обратной транскрипцией (rRT-PCR), Templex-PCR, амплификации на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), и способам изотермической амплификации с использованием полимераза и специфических олигонуклеотидов в качестве праймеров. Вышеупомянутые способы амплификации хорошо известны в данной области техники.

Пункты.

Следующие пункты описаны в настоящем изобретении: изобретение обеспечивает следующие пункты.

1. Экспрессионная кассета, включающая

(i) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность функционально связана с промоторной последовательностью, и

(ii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL43 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 26 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и

(iii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL44 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 27 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

2. Вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающий экспрессионную кассету по пункту 1.

3. Вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающий

(i) по меньшей мере одну представляющую интерес экзогенную нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, функционально связана с промоторной последовательностью, и

(ii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL43 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 26 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, и

(iii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL44 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности, SEQ ID NO: 27 и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

4. Вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающий представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL43.

5. Вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающий первую нуклеотидную последовательность или ген, представляющий интерес, предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL43, и вторую нуклеотидную последовательность или ген, представляющий интерес, предпочтительно другую антигенкодирующую последовательность, инсертированную во второй сайт инсерции, предпочтительно UL56 или US4.

6. EHV вектор по любому из пунктов 2-5, причем инсерция в UL43 характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или т.п. в UL43, причем UL44 остается функциональным.

7. EHV вектор по любому из пунктов 2-6, причем инсерция в UL43 характеризуется делецией приблизительно части 870 по в пределах UL43 для RacH (SEQ ID NO: 21) или на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ее гомологичной и/или идентичной последовательности.

8. EHV вектор по любому из пунктов 2-7, причем EHV вектор включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, и на 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичной и/или идентичной последовательности любой из этих последовательностей.

9. EHV вектор по любому из пунктов 2-8, причем EHV вектор включает (i) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL43 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 26, и (ii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL44 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 27.

10. EHV вектор по любому из пунктов 2-9 или экспрессионная кассета по пункту 1, причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность не встречается в природе и/или является рекомбинантной.

11. EHV вектор по любому из пунктов 2-10 или экспрессионная кассета по пункту 1 или 10, причем указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность является рекомбинантной и/или гетерологичной и/или экзогенной.

12. EHV вектор по любому из пунктов 2-11 или экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 или 10-11, причем указанная антигенкодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему животного, такого как животное, выращиваемое в продовольственных целях, такое как свинья, сельскохозяйственная птица или крупный рогатый скот, или животные-компаньоны, такие как кошки, собаки или лошади.

13. EHV вектор по любому из пунктов 2-12 или экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 или 10-12, также включающий(-ая) дополнительные регуляторные последовательности, такие как терминирующий кодон или последовательность полиаденилирования.

14. EHV вектор по любому из пунктов 2-13, дополнительно включающий по меньшей мере одну дополнительную представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, необязательно инсертированную в другой сайт инсерции, такой как UL56 и/или US4.

15. EHV вектор по любому из пунктов 2-14, где по меньшей мере одна дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в UL56.

16. EHV вектор по любому из пунктов 2-15, где по меньшей мере одна дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в US4.

17. EHV вектор по любому из пунктов 2-14, где вторая дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в US4 и где третья дополнительная представляющая интерес нуклеотидная последовательность, предпочтительно другой представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующая последовательность, инсертирована в UL56.

18. EHV вектор по любому из пунктов 2-17, где представляющий интерес ген функционально связан с регуляторной последовательностью, предпочтительно промоторной последовательностью или EHV вектором по пунктам 5-17, где по меньшей мере два представляющие интерес гена функционально связаны с регуляторными последовательностями, предпочтительно промоторными последовательностями.

19. EHV вектор по любому из пунктов 2-18 или экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 или 10-13, где промоторную(-ые) последовательность(-и) функционально связанную(-ые) с одной или

двумя или более представляющими интерес последовательностями или генами выбирают из группы, состоящей из следующих: SV40 большой Т, HCMV и MCMV немедленно-ранний ген 1, промотор фактора элонгации альфа человека, бакуловирусный промотор полиэдрина, функциональный фрагмент из 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), предпочтительно указанный функциональный фрагмент представляет собой р430 (SEQ ID NO: 3), функциональный фрагмент из комплементарной нуклеотидной последовательности 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), функциональный фрагмент из 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), предпочтительно указанный функциональный фрагмент представляет собой р455 (SEQ ID NO: 4), функциональный фрагмент из комплементарной нуклеотидной последовательности 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), или р422 (SEQ ID NO: 5) или ее функциональный фрагмент, или их комплементарные нуклеотидные последовательности.

20. EHV вектор по любому из пунктов 2-19 или экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 или 10-13 или 19, где промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интересом геном, представляет собой р422 (SEQ ID NO: 5) или ее функциональный фрагмент или их комплементарные нуклеотидные последовательности.

21. EHV вектор по любому из пунктов 5-20, где промоторные последовательности, функционально связанные с по меньшей мере двумя представляющими интерес генами, являются различными.

22. EHV вектор по любому из пунктов 2-21 или экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 или 10-13 или 19 - 20, где EHV вектор или экспрессионная кассета является рекомбинантной.

23. EHV вектор по любому из пунктов 2-22 или экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 или 10-13 или 19-20 или 22, где указанные последовательности или представляющая интерес экзогенная нуклеотидная последовательность, или представляющий интерес ген, представляют собой антигенкодирующую последовательность.

24. EHV вектор по любому из пунктов 2-23 или экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 или 10-13 или 19, 20 или 22, 23, где антигенкодирующая последовательность принадлежит к патогену, выбранному из перечня: вирус Шмалленберга, вирус гриппа типа А, вирус свиного респираторного и репродуктивного синдрома, цирковир свиней, вирус классической чумы свиней, вирус африканской чумы свиней, вирус гепатита Е, вирус диареи крупного рогатого скота, вирус бешенства, морбилливирус кошек, столбнячная палочка, микобактерия туберкулеза, возбудитель актинобациллезной плевропневмонии.

25. EHV вектор по любому из пунктов 2-24 или экспрессионная кассета по любому из пунктов 1 или 10-13 или 19, 20 или 22-24, где антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин.

26. EHV вектор или экспрессионная кассета по пункту 25, где последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген гриппа, имеет происхождение из вируса свиного гриппа типа А.

27. EHV вектор или экспрессионная кассета по пункту 25 или 26, где экзогенная антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и подтип гемагглютинина гриппа выбирают из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 и H18.

28. EHV вектор или экспрессионная кассета по любому из пунктов 25-27, где экзогенная антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и последовательность, кодирующую гемагглютининовый антиген гриппа, выбирают 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.

29. EHV вектор или экспрессионная кассета по любому из пунктов 25 - 28, где экзогенная антиген-кодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и последовательность, кодирующую гемагглютининовый антиген гриппа, выбирают 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).

30. EHV вектор или экспрессионная кассета по любому из пунктов 25 - 29, где экзогенная антиген-кодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и подтип гемагглютинина гриппа представляет собой H1 и/или H3.

31. EHV вектор или экспрессионная кассета по любому из пунктов 25-30, где антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген гриппа, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

32. EHV вектор или экспрессионная кассета по любому из пунктов 25-31, где EHV вектор или экспрессионная кассета не включает NP (нуклеопротеин) или N (нейраминидаза) последовательностей, кодирующих антиген гриппа.

33. EHV вектор или экспрессионная кассета по любому из пунктов 25 - 32, где промоторная последовательность p422 (SEQ ID NO: 5), или ее функциональный фрагмент или функциональное производное, или любая их комплементарная нуклеотидная последовательность функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 44 (H1pdm).

34. EHV вектор по пункту 2-33, где EHV вектор включает две или более последовательности, кодирующие гемагглютининовые антигены гриппа.

35. EHV вектор по пункту 34, где дополнительная последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген гриппа, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 46 (H1av).

36. EHV вектор по пункту 35, где указанная дополнительная последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген гриппа, инсертирована в UL56.

37. EHV вектор по пункту 35 или 36, где последовательность, кодирующая гемагглютининовый антиген гриппа, по пункту 35 функционально связана с промоторной последовательностью p430 (SEQ ID NO: 3) или ее функциональным фрагментом или функциональным производным или их комплементарными нуклеотидными последовательностями.

38. EHV вектор по пункту 34-37, где дополнительная последовательность, кодирующую гемагглютининовые антигены гриппа, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 45 (H3).

39. EHV вектор по пункту 38, где указанная дополнительная последовательность, кодирующая гемагглютининовые антигены гриппа, инсертирована в US4.

40. EHV вектор по пункту 38 или 39, где последовательность, кодирующую гемагглютининовые антигены гриппа, по пункту 38 функционально связана с промоторной последовательностью p455 (SEQ ID NO: 4) или ее функциональным фрагментом или функциональным производным или их комплементарными нуклеотидными последовательностями.

41. EHV вектор по любому из пунктов 2-40, где EHV вектор выбирают из группы, состоящей из EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9.

42. EHV вектор по любому из пунктов 2-41, где EHV вектор представляет собой EHV-1 или EHV-4.

43. EHV вектор по любому из пунктов 2-42, где EHV вектор представляет собой EHV-1, предпочти-

тельно РаСН.

44. Клетка-хозяин млекопитающего, отличающаяся тем, что она включает вектор в соответствии с пунктами 2-43.

45. Применение вектора в соответствии с пунктами 2-43 или клетки-хозяина млекопитающего в соответствии с пунктом 44 для получения иммуногенной композиции или вакцины.

46. Иммуногенная композиция, включающая

а) вектор в соответствии с пунктами 2-43, и/или

б) полипептид, экспрессируемый вектором в соответствии с пунктами 2-43, такой как вирус, модифицированный живой вирус, вирусоподобная частица (VLP) или т.п., и

с) необязательно фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель, где указанный носитель предпочтительно является пригодным для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального введения,

предпочтительно указанная иммуногенная композиция включает вирус, такой как патогенный вирус.

47. Вакцина или фармацевтическая композиция, включающая

а) вектор в соответствии с пунктами 2-43, и/или

б) полипептид, экспрессируемый вектором в соответствии с пунктами 2-43, такой как модифицированный живой вирус, вирусоподобная частица (VLP) или т.п., и

с) фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель, где указанный носитель предпочтительно является пригодным для перорального, внутрикожного, внутримышечного или интраназального введения, необязательно указанная вакцина дополнительно включает адъювант.

48. Вакцина или DIVA вакцина, включающая один или несколько ENV векторов в соответствии с любым из пунктов 2-43.

49. Способ получения иммуногенной композиции или вакцины для уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических симптомов, связанных с или вызываемых инфекцией, включающий следующие стадии:

а) инфицирование клетки-хозяина млекопитающего в соответствии с пунктом 41 с помощью вектора в соответствии с пунктами 2-43,

б) культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,

с) сбор инфицированных клеточных культур,

д) необязательно очистка собранных инфицированных клеточных культур со стадии с) и

необязательно смешивание указанной собранной инфицированной клеточной культуры с фармацевтически приемлемым носителем.

50. Иммуногенная композиция, вакцина или DIVA вакцина в соответствии с любым из пунктов 46 - 48 для применения в способе иммунизации животного, включающем введение указанному животному указанной иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины.

51. Иммуногенная композиция, вакцина или DIVA вакцина в соответствии с любым из пунктов 46 - 48 для применения в способе уменьшения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном у животного, которое нуждается в этом, который включает введение животному терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины.

52. Иммуногенная композиция, вакцина или DIVA вакцина в соответствии с любым из пунктов 46 - 48 для применения в способе уменьшения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых вирусом свиного гриппа у животного, которое нуждается в этом, который включает введение животному терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины.

53. Способ иммунизации животного, включающий введение такому животному иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины по любому из пунктов 46-48.

54. Способ уменьшения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном у животного, которое нуждается в этом, который включает введение животному терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины в соответствии с любым из пунктов 46-48.

55. Способ уменьшения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых вирусом свиного гриппа у животного, которое нуждается в этом, который включает введение животному терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, вакцины или DIVA вакцины в соответствии с любым из пунктов 46-48.

56. Способ или применение по любому из пунктов 50-55, где животное представляет собой свинью, поросенка или свиноматку, сельскохозяйственную птицу, крупный рогатый скот, лошадь, собаку или кошку.

57. Способ или применение по любому из пунктов 50-56, где иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят один раз.

58. Способ или применение по любому из пунктов 50-57, где иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят животному в течение первых шести недель жизни, в течение первых двух не-

дель жизни, в течение первой недели жизни или в течение первого дня жизни.

59. Способ или применение по любому из пунктов 50-58, где иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят в два приема.

60. Способ или применение по пункту 59, где иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят животному первый раз в течение первой недели жизни и второй раз в течение второй, третьей или четвертой недели жизни.

61. Способ или применение по любому из пунктов 50-60, где указанную иммуногенную композицию, вакцину или DIVA вакцину вводят внутримышечно или интраназально.

62. Способ или применение по любому из пунктов 50-61, где иммуногенная композиция, вакцина или DIVA вакцина включает от 1×10^4 до 1×10^7 TCID₅₀ EHV вектора.

63. Способ или применение по любому из пунктов 50 - 62, где указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из: уменьшение потери веса, снижение ректальной температуры, уменьшение клинических симптомов, повышение индукции (нейтрализующих) антител, или их комбинаций, по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

64. Набор для иммунизации животного, предпочтительно животного, выращиваемого в продовольственных целях, такого как свинья, сельскохозяйственная птица или крупный рогатый скот, или животных-компаньонов, таких как кошки, собаки или лошади, от заболевания, связанного с и/или уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических симптомов, связанных с или вызываемых патогеном у животного, включающий:

- a) дозатор, способный вводить вакцину указанному животному; и
- b) иммуногенную композицию в соответствии с пунктом 46, вакцину в соответствии с пунктом 47 или DIVA вакцину в соответствии с пунктом 48, и
- c) необязательно листок-вкладыш с инструкцией.

65. Промоторная последовательность, включающая p422 (SEQ ID NO: 5) или ее комплементарную нуклеотидную последовательность или ее функциональный фрагмент или их комплементарные нуклеотидные последовательности, где указанная промоторная последовательность приводит к экспрессии представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности.

66. Экспрессионная кассета, включающая промоторную последовательность p422 (SEQ ID NO: 5) или ее комплементарную нуклеотидную последовательность или функциональный фрагмент и их комплементарные нуклеотидные последовательности,

где промоторная последовательность функционально связана с представляющей интерес последовательностью, предпочтительно представляющим интерес геном, как, например, антигенкодирующая последовательность, более предпочтительно представляющей интерес гетерологичной и/или экзогенной последовательностью, представляющим интерес геном или представляющей интерес антигенкодирующей последовательностью,

где указанная промоторная последовательность приводит к экспрессии представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности,

причем указанная промоторная последовательность предпочтительно является гетерологичной промоторной последовательностью, более предпочтительно экзогенной промоторной последовательностью.

67. Вектор, включающий промоторную последовательность или экспрессионную кассету по пункту 65 или 66.

68. Промотор или экспрессионная кассета или вектор по любому из пунктов 65-67, где функциональный фрагмент промоторной последовательности имеет идентичность и/или гомологию последовательности, составляющую 70, 80, 85%, предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94%, более предпочтительно 95, 96, 97, 98, 99, 99.9% относительно последовательности p422 (SEQ ID NO: 5).

69. Промотор или экспрессионная кассета или вектор по любому из пунктов 65 - 68, где указанный функциональный фрагмент промоторной последовательности имеет длину 100 нуклеотидов, предпочтительно 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400 нуклеотидов, наиболее предпочтительно 410 или 420 нуклеотидов, или где функциональный фрагмент промоторной последовательности имеет длину от 100 до 422 нуклеотидов, от 200 до 422 нуклеотидов, от 300 до 422 нуклеотидов или от 350 до 422 нуклеотидов.

70. Экспрессионная кассета или вектор по любому из пунктов 66-69, где экспрессионная кассета или вектор дополнительно включает последовательность полиаденилирования, предпочтительно BGHrA, 71pA (SEQ ID NO: 6), или 18pA (SEQ ID NO: 7).

71. Экспрессионная кассета или вектор по любому из пунктов 66-70, где указанная экспрессионная кассета или вектор включает одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, таких как терминирующий кодон, сигнал полиаденилирования или регуляторный элемент, подобный IRES и/или 2a пептиду.

72. Вектор по любому из пунктов 67-71, где указанный вектор представляет собой рекомбинантный и/или гетерологичный и/или экзогенный вектор.

73. Вектор по любому из пунктов 67-72, где указанный вектор представляет собой вирусный вектор, предпочтительно, выбранный из группы, состоящей из Herpes viridae, таких как альфагерпесвирус лошадей 1 типа (EHV-1), альфагерпесвирус лошадей 4 типа (EHV-4) и других Varicellovirus, подобных PrV (вирус псевдобешенства) и BHV-1 (герпесвирус крупного рогатого скота 1 типа), Adenoviridae (AdV), таких как CAcV (аденовирус собак), адено-ассоциированные вирусы, Baculoviridae, Lentiviridae, таких как ретровирусы, и Poxviridae.

74. Вектор по любому из пунктов 67-73, где указанный вектор является членом семейства Herpesviridae, предпочтительно рода Alphaherpesvirinae, более предпочтительно подрода Varicellovirus, наиболее предпочтительно указанный вектор представляет собой альфагерпесвирус лошадей 1 типа (EHV-1).

Обзор последовательностей.

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

Промоторные и polyA последовательности.

(SEQ ID NO: 1) 600 по ДНК фрагмент 4pgG600.

(SEQ ID NO: 2) 600 по ДНК фрагмент 4pMCP600:

(SEQ ID NO: 3) В частности, 600 по промоторы были усечены до 430 по для 4pgG, новое название: p430.

(SEQ ID NO: 4) и до 449 по для 4pMCP, новое название: p455.

(SEQ ID NO: 5) Последовательность p422 промотора.

(SEQ ID NO: 6) Последовательность 71pA, последовательность полиаденилирования.

(SEQ ID NO: 7) Последовательность 18pA, последовательность полиаденилирования.

Последовательности участков инсерции.

(SEQ ID NO: 8) US4 (orf70) последовательность RacH.

(SEQ ID NO: 9) Up70 фланкирующий участок (417 по).

(SEQ ID NO: 10) Up71 фланкирующий участок (431 по).

(SEQ ID NO: 11) 127264-127680 (фланкирующий участок up orf70).

(SEQ ID NO: 12) 128484-128913 (фланкирующий участок up orf71).

(SEQ ID NO: 13) Up70 фланкирующий участок (283 по) = идентичный к 3' 283 по "классического" фланкирующего участка 417 по.

(SEQ ID NO: 14) Up71 фланкирующий участок (144 по) = идентичный к 5' 144 по "классического" фланкирующего участка 431 по.

(SEQ ID NO: 15) Последовательность US4 (orf70) wt - штамма ab4 нт 127681-128916.

(SEQ ID NO: 16) Делетированная часть orf70 (US4) в геномной последовательности ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1): нт 127681-128482.

(SEQ ID NO: 17) Делетированная часть orf70 (US4) в геномной последовательности RacH (нет доступных нт номеров, поскольку полная геномная последовательность неизвестна).

(SEQ ID NO: 18) UL43 последовательность RacH.

(SEQ ID NO: 19) Последовательность рекомбинационного участка против хода транскрипции Up UL43.

(SEQ ID NO: 20) Последовательность рекомбинационного участка по ходу транскрипции Up UL44.

(SEQ ID NO: 21) Последовательность делетированной части UL43 в RacH.

(SEQ ID NO: 22) Последовательность сохраненного 3' конца UL43 в RacH.

(SEQ ID NO: 23) Последовательность UL43 в wt EHV-1 V592 (нт 23021-24226, с обратной комплементарностью).

(SEQ ID NO: 24) Делетированная часть (870 по) UL43 в wt EHV-1 V592 (нт 23353-24226, с обратной комплементарностью).

(SEQ ID NO: 25) Сохраненная часть рамки считывания UL43 в wt EHV-1 V592 (нт 23021-23354, с обратной комплементарностью).

(SEQ ID NO: 26) Последовательность расположенного против хода транскрипции соответствующего рекомбинационного участка Up UL43 в wt EHV-1 V592 (нт 24227-24452, с обратной комплементарностью).

(SEQ ID NO: 27) Последовательность расположенного по ходу транскрипции соответствующего рекомбинационного участка Up UL44 в wt EHV-1 V592 (нт 23049-23354, с обратной комплементарностью).

Последовательности плазмид.

(SEQ ID NO: 28) Нуклеотидная последовательность трансферного вектора pU70-p455-71K71.

(SEQ ID NO: 29) Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU70-p455-H3-71K71.

(SEQ ID NO: 30) Нуклеотидная последовательность трансферного вектора pU-1-3-p430-BGHKBGH.

(SEQ ID NO: 31) Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH.

(SEQ ID NO: 32) Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU70-p455-H1pdm-

71K71.

(SEQ ID NO: 33) Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU1-3-p430-H1hu-BGNKBGH.

(SEQ ID NO: 34) Нуклеотидная последовательность трансферного вектора pUUL43-p422-18K18.

(SEQ ID NO: 35) Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pUUL43-p422-mC-18K18.

(SEQ ID NO: 36) Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pUUL43-p422-H1pdm-18K18.

(SEQ ID NO: 37) Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pUmC70.

Последовательности праймеров.

Для участка инсерции orf70/US4.

(SEQ ID NO: 38) Прямой праймер AGGCTCGTGC GCGGATACATCG.

(SEQ ID NO: 39) Обратный праймер TTCGGGGCTGTTAGACTCCTCC.

Для участка инсерции orf1/3/UL56.

(SEQ ID NO: 40) Прямой праймер CCAACTCGCCGCCATGAGACCC.

(SEQ ID NO: 41) Обратный праймер AGCGCGCCCCGTACCCAGTGGG.

Для участка инсерции UL43.

(SEQ ID NO: 42) Прямой праймер CGACGCGCGTCCGGAGG.

(SEQ ID NO: 43) Обратный праймер GTTATAAACATACCATGCACC.

Аминокислотные последовательности гемагглютининов вируса гриппа А.

(SEQ ID NO: 44) гемагглютинин [вирус гриппа А (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2))]; GenBank: ADR01746.1 H1pdm.

(SEQ ID NO: 45) гемагглютинин [вирус гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2))]; GenBank: ABS50302.2 H3.

(SEQ ID NO: 46) гемагглютинин [вирус гриппа А (A/swine/Gent/132/2005(H1N1))]; GenBank: AFR76623.1 H1av.

(SEQ ID NO: 47) гемагглютинин [вирус гриппа А (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2))]; GenBank: ADK98476.1* H1hu.

Краткое описание фигур

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

Фиг. 1. Схематическая иллюстрация сравнения UL56 (orf1/3) участков EHV-1 штамма ab4 дикого типа (wt) и аттенуированного вакцинного штамма EHV-1 RacH. orf1, orf2, orf3 = первые три открытые рамки считывания в EHV-1 геноме, orf1 имеет гомолога в других альфагерпесвирусах, обозначенного UL56 Фланк А, Фланк В = участки рекомбинации для инсерции трансгенной экспрессионной кассеты в orf1/3 (UL56) сайт (уровень техники).

Фиг. 2. Схематическое изображение US4 (orf70) сайта инсерции.

UL = длинный уникальный сегмент,

US = короткий уникальный сегмент,

IR = внутренний инвертированный повтор,

TR = концевой инвертированный повтор,

gG = гликопротеин G,

pA = последовательность полиаденилирования на конце кодирующей последовательности,

gpII = гликопротеин II,

orf = открытая рамка считывания,

orf69, orf70, orf71 = US3, US4, US5 (открытые рамки считывания, релевантные для orf70/US4 сайта инсерции),

Loorf1/3 = orf1/3 (UL56) сайт инсерции (уровень техники),

по = пары оснований.

Фиг. 3. Плазмидная карта трансферной плазмиды pU-p455-H3-71K71.

H3 = открытая рамка считывания, кодирующая гемагглютинин H3 вируса гриппа А,

71pA = новая polyA последовательность, как описано в раскрытии изобретения, EM P2016-022,

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

промотор arh = прокариотический промотор устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину ген,

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

ORI = точка начала репликации плазмиды,

AP_r = устойчивый к ампициллину ген плазмиды,

против хода транскрипции orf70 = рекомбинационный участок, расположенный

против хода транскрипции сайта инсерции,

p455 = новый промотор p455,

по = пары оснований.

Фиг. 4. Плазмидная карта трансферного вектора pU1-3-p430-H1av-BGNKBGN.

H1av = открытая рамка считывания, кодирующая гемагглютинин H1av вируса гриппа А,

BGNpA = polyA последовательность гена бычьего гормона роста,

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

промотор arh = прокариотический промотор устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину ген,

Фланк А = рекомбинационный участок, расположенный против хода транскрипции сайта инсерции,

ORI = точка начала репликации плазмиды,

AP_r = устойчивый к ампициллину ген плазмиды,

Фланк В = рекомбинационный участок, расположенный по ходу транскрипции сайта инсерции,

p430 = новый промотор p430,

по = пары оснований.

Фиг. 5. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 с удлиненным US4 (orf70)

участком инсерции.

orf69/US3: открытая рамка считывания номер 69 (US3) против хода транскрипции сайта инсерции в orf70 (US4),

p455: новый промотор, описанный в данном изобретении,

H3: трансген гемагглютинина вируса гриппа,

71pA: новая последовательность полиаденилирования,

Δorf70 (US4): остаток из orf70 (US4), содержащий промотор для orf71 (US5), который кодирует структурный вирусный гликопротеин II (gpII),

по = пары оснований.

Фиг. 6. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av с удлиненным UL56

(orf1/3) участком инсерции.

p430: новый промотор, описанный в данном изобретении,

H1av: трансген гемагглютинина вируса гриппа,

BGNpA: последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста,

Δorf1/UL56: остаток из orf1 (UL56),

Orf3 : EHV-1 открытая рамка считывания orf3 (нет гомолога у других Alphaherpesviridae),

по = пары оснований.

Фиг. 7. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (гEHV-1-RacH-SE В) с двумя удлиненными участками инсерции.

p430: новый промотор, описанный в данном изобретении,

H1av: трансген гемагглютинина вируса гриппа,

BGNpA: последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста,

Δorf1/UL56: остаток из orf1 (UL56),

Orf3 : EHV-1 открытая рамка считывания orf3 (нет гомолога у других Alphaherpesviridae),

orf69/US3: открытая рамка считывания номер 69 (US3) против хода транскрипции сайта инсерции в orf70 (US4),

p455: новый промотор, описанный в данном изобретении,

H3: трансген гемагглютинина вируса гриппа,

71pA: новая последовательность полиаденилирования,

Δorf70 (US4): остаток из orf70 (US4), содержащий промотор для orf71 (US5), который кодирует структурный вирусный гликопротеин II (gpII),

по = пары оснований.

Фиг. 8. Плазмидная карта трансферной плазмиды pU1/3-p430-H1hu-BGNKBGN.

p430 = онный промотор p430,

H1hu = открытая рамка считывания, кодирующая гемагглютинин H1hu вируса гриппа А,

BGNpA = polyA последовательность гена бычьего гормона роста,

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

промотор arh = прокариотический промотор устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину ген,

Фланк А = рекомбинационный участок, расположенный против хода транскрипции сайта инсерции,

ORI = точка начала репликации плазмиды,

Фланк В = рекомбинационный участок, расположенный по ходу транскрипции сайта инсерции,

I-Seu = хоминг-эндонуклеаза для высвобождения фрагмента для RED рекомбинации,

по = пары оснований.

Фиг. 9. Плазмидная карта трансферной плазмиды pU70-p455-H1pdm-71K71.

против хода транскрипции ofg 70 = рекомбинационная последовательность, расположенная против хода транскрипции сайта инсерции,

p455 = новый промотор, описанный в данном изобретении,

H1pdm = трансген гемагглютинина H1pdm вируса гриппа,

71pA = новая последовательность полиаденилирования,

3' конец ofg70 = рекомбинационная последовательность, расположенная по ходу транскрипции сайта инсерции,

промотор arh = прокариотический промотор устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину ген,

по = пары оснований,

ScaI, EcoRI, SalI, NotI, KpnI, BamHI, XbaI = сайты рестрикции рестриktionной эндонуклеазы.

Фиг. 10. Схематическая иллюстрация генома гЕНВ-1 RacH-SE-70-p455-H1pdm с удлиненным US4 (orf70) участком инсерции.

orf69/US3 = открытая рамка считывания номер 69 (US3) против хода транскрипции сайта инсерции в ofg70 (US4),

p455 = новый промотор, описанный в данном изобретении,

H1pdm = трансген гемагглютинина H1pdm вируса гриппа,

71pA = новая последовательность полиаденилирования,

Δorf70 (US4): остаток из ofg70 (US4), содержащий промотор для ofg71 (US5), который кодирует структурный вирусный гликопротеин II (gpII),

по = пары оснований.

Фиг. 11. Схематическая иллюстрация генома гЕНВ-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu с удлиненным UL56 (orf1/3) участком инсерции.

p430 = новый промотор, описанный в данном изобретении,

H1hu = трансген гемагглютинина H1hu вируса гриппа,

BGHpA = последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста,

Δorf1/UL56 = остаток из ofg1 (UL56),

Orf3 = EHV-1 открытая рамка считывания ofg3 (нет гомолога у других Alphaherpesviridae),

по = пары оснований.

Фиг. 12. Схематическая иллюстрация генома гЕНВ-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm (вирус D) с удлиненным участком инсерции.

p430 = новый промотор, описанный в данном изобретении,

H1hu = трансген гемагглютинина H1hu вируса гриппа,

BGHpA = последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста,

Δorf1/UL56 = остаток из ofg1 (UL56),

Orf3 = EHV-1 открытая рамка считывания ofg3 (нет гомолога у других Alphaherpesviridae),

orf69/US3 = открытая рамка считывания номер 69 (US3) против хода транскрипции сайта инсерции в ofg70 (US4),

p455 = новый промотор, описанный в данном изобретении,

H1pdm = трансген гемагглютинина H1pdm вируса гриппа,

71pA = новая последовательность полиаденилирования,

Δorf70 (US4) = остаток из ofg70 (US4), содержащий промотор для ofg71 (US5), который кодирует структурный вирусный гликопротеин II (gpII),

по = пары оснований.

Фиг. 13. Схематическая иллюстрация конструирования нового сайта инсерции трансгена UL43

UL44, UL43, UL42 открытые рамки считывания в участке инсерции,

18pA: новый сайт полиаденилирования,

422 промотор: новый p422 промотор,

по: пары оснований.

Фиг. 14. Плазмидная карта трансферной плазмиды pUUL43-422-mC-18K18.

UpUL43 = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт, инсерции, расположенный против хода транскрипции,

UpUL44 = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный по ходу транскрипции,

422 промотор = промотор, управляющий экспрессией трансгена,

mC = трансген (аутофлуоресцентный белок mCherry),

18pA = новая последовательность полиаденилирования,

I-SceI = сайт рестрикции для I-SceI,

промотор arh = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину ofg,

P(BLA) = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к ампициллину гена,

AP(R) = устойчивый к ампициллину ген,

ORI = плазмидная точка начала репликации,

P(LAC) = прокариотический промотор *lacZ*, кодирующего бета-галактозидазу,

I-Ceu = сайт распознавания хоминг-эндонуклеазы I-Ceu.

Фиг. 15. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-UL43-422-mC с удлинённым UL43 участком инсерции.

UL = Уникальный длинный сегмент EHV генома,

US = Уникальный короткий сегмент EHV генома,

IRS и TRS = Внутренний и концевой участки повтора, вставляющие в рамку короткий уникальный сегмент,

UL44, UL43, UL42 = открытые рамки считывания в участке инсерции,

AUL43 = остаток из UL43,

18pA = новый сайт полиаденилирования,

p422 = новый p422 промотор,

по = пары оснований.

Фиг. 16. Плазмидная карта трансферной плазмиды pUUL43-422-H1pdm-18K18.

UpUL43 = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный против хода транскрипции,

UpUL44 = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный по ходу транскрипции,

422 промотор = промотор, управляющий экспрессией трансгена,

H1pdm = трансген (гемагглютинин H1pdm гриппа А),

18pA = новая последовательность полиаденилирования,

I-SceI = сайт рестрикции для I-SceI,

промотор arh = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину *orf*,

P(BLA) = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к ампициллину гена,

AP(R) = устойчивый к ампициллину ген,

ORI = плазмидная точка начала репликации,

P(LAC) = прокариотический промотор *lacZ*, кодирующего бета-галактозидазу,

I-Ceu = сайт распознавания хоминг-эндонуклеазы I-Ceu.

Фиг. 17. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-UL43-422-H1pdm с удлинённым UL43 участком инсерции.

UL = Уникальный длинный сегмент EHV генома,

US = Уникальный короткий сегмент EHV генома,

IRS и TRS = Внутренний и концевой участки повтора, вставляющие в рамку короткий уникальный сегмент,

UL44, UL43, UL42 = открытые рамки считывания в участке инсерции,

AUL43 = остаток из UL43,

18pA = новый сайт полиаденилирования,

H1pdm = трансген (гемагглютинин H1pdm гриппа А),

p422 = новый промотор p422,

по = пары оснований.

Фиг. 18. Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-UL43-422-H1pdm-70-p455-H3 с удлинённым участком инсерции.

Dorf1/UL56: остаток из UL56 на границе экспрессионной кассеты,

p430: новый промотор p430,

BGHpA: сайт полиаденилирования бычьего гормона роста,

H1av, H3, H1pdm: трансгены (гемагглютинины гриппа А),

Dorf70/US4: остаток из US4 на границе экспрессионной кассеты,

orf69 (US3) и orf71 (US5) открытые рамки считывания в US4 участке инсерции,

71pA: новая последовательность полиаденилирования,

UL44, UL43, UL42 открытые рамки считывания в UL43 участке инсерции,

18pA: новый сайт полиаденилирования,

p422: новый p422 промотор,

по: пары оснований.

Фиг. 19. Вестерн-блоттинг.

Блоты в четырех повторностях, инкубированные с четырьмя различными антителами,
 а: блот, инкубированный с запатентованным моноклональным антителом против HA H1av гриппа,
 б: блот, инкубированный с коммерческой кроличьей антисывороткой, специфичной к HA H3 гриппа,
 в: блот, инкубированный с запатентованным моноклональным антителом против HA H1pdm гриппа,
 г: блот, инкубированный с запатентованным моноклональным антителом против EHV-1 gpII,
 М = маркер молекулярного веса (кДа = килодальтон, 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20)

Название вируса	Сокращенное название	Используемые сайты инсерции	Экспрессируемые трансгены
rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3	US4-H3	US4	H3
rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av	UL56-H1av	UL56	H1av
rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H1pdm	US4-H1pdm	US4	H1pdm
rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu	UL56-H1hu	UL56	H1hu
rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-455-H3	B	US4 и UL56	H3 и H1av
rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-455-H1pdm	D	US4 и UL56	H1pdm и H1hu
rEHV-1 RacH-SE-UL43-H1pdm	UL43-H1pdm	UL43	H1pdm
rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-UL43-422-H1pdm70-455-H3	E	US4 и UL56 и UL43	H3, H1av, и H1pdm
rEHV-1 RacH-SE	SE	отсутствуют	отсутствуют

Фиг. 20. Результаты тестов на нейтрализацию вируса гриппа А мышинных сывороток.

Тесты на нейтрализацию вируса выполняли в двух или трех повторностях в зависимости от доступных количеств мышинных сывороток. Титры нейтрализации нормировали к 100 TCID₅₀ и показывали в виде реципрокных нейтрализующих способностей. *"Усы" погрешностей указывают среднеквадратическое отклонение.

Фиг. 21. Плазмидная карта трансферной плазмиды pUmC70 3'конец ofg69 = часть ofg69(US3), содержащаяся в трансферном векторе.

up70 = рекомбинационная последовательность, расположенная против хода транскрипции сайта инсерции,

mCherry = трансген (аутофлуоресцентный белок mCherry),

BGHpA = последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста,

up71 = рекомбинационная последовательность, расположенная по ходу транскрипции сайта инсерции,

3' конец ofg70 = остаток из ofg70 (US4), расположенный по ходу транскрипции инсера,

по = пары оснований,

ScaI, EcoRI, SalI, NotI, KpnI, BamHI, XbaI = сайты рестрикции рестрикционной эндонуклеазы.

Фиг. 22. Плазмидная карта трансферного вектора pU70-p455-71K71.

Up70 = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный против хода транскрипции,

Up71 = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный по ходу транскрипции,

4pMCP455 = промотор, управляющий экспрессией трансгена,

EHV-4orf71pApA = новая последовательность полиаденилирования 71pA,

I-SceI = сайт рестрикции для I-SceI,

промотор arh = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину ofg,

P(BLA) = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к ампициллину гена,

AP(R) = устойчивый к ампициллину ген,
 ORI = плазмидная точка начала репликации,
 P(LAC) = прокариотический промотор lacZ, кодирующего бета-галактозидазу,
 I-Ceu = сайт распознавания хоминг-эндонуклеазы I-Ceu,
 KpnI, NotI, XbaI = сайты рестрикции рестрикционной эндонуклеазы,
 по = пары оснований.

Фиг. 23. Плазмидная карта трансферного вектора pU1/3-p430-BGHNKBGH.

Фланк А = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный против хода транскрипции.

Фланк В = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный по ходу транскрипции,

4pgG430 = промотор, управляющий экспрессией трансгена,

BGHPA = последовательность полиаденилирования гена бычьего гормона роста,

I-SceI = сайт рестрикции для I-SceI,

промотор arh = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину orgf,

I-Ceu = сайт распознавания хоминг-эндонуклеазы I-Ceu,

KpnI, NotI = сайты рестрикции рестрикционной эндонуклеазы,

по = пары оснований.

Фиг. 24. Плазмидная карта трансферной плазмиды pUUL43-422-N1pdm-18K18.

UpUL43 = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный против хода транскрипции,

UpUL44 = геномная ДНК последовательность вируса, фланкирующая сайт инсерции, расположенный по ходу транскрипции,

p422 = промотор, управляющий экспрессией трансгена,

18pA = новая последовательность полиаденилирования,

I-SceI = сайт рестрикции для I-SceI,

промотор arh = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к канамицину гена,

Kana = устойчивый к канамицину orgf,

P(BLA) = прокариотический промотор, управляющий экспрессией устойчивого к ампициллину гена,

AP(R) = устойчивый к ампициллину ген,

ORI = плазмидная точка начала репликации,

P(LAC) = прокариотический промотор lacZ, кодирующего бета-галактозидазу,

I-Ceu = сайт распознавания хоминг-эндонуклеазы I-Ceu по = пары оснований.

Примеры

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

Пример 1.

Создание нового сайта инсерции ORF70/US4.

Для того чтобы увеличить способности EHV-1 вектора, изобретателями был обнаружен путь экспрессии двух различных трансгенов из одного векторного остова без связывания двух трансгенов с помощью функций, имеющих происхождение из РНК-вируса под контролем одного промотора. Изобретатели выдвинули гипотезу о том, что геном вируса герпеса будет толерантным к применению двух независимых сайтов инсерции трансгенов параллельно. Для определения того, является ли EHV-1 ORF70/US4 подходящим сайтом инсерции трансгена, 801 пар оснований на 5'конце orgf70/US4 (1236 по) заменяли на экспрессионную кассету, кодирующую аутофлуоресцентный mCherry белок (Shaner и др. 2004) с помощью классической гомологичной рекомбинации. Карта плазмиды pU-mC70-BGH представлена на фиг. 21 (ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID NO: 37). ДНК фрагмент, используемый для гомологичной рекомбинации, вырезали из pU-mC70-BGH с помощью XbaI. Гель-очищенный фрагмент ко-трансфектировали с помощью вирусной геномной ДНК из EHV-1 RasH в RK13 клетки. Эффективное освобождение рекомбинантного векторного вируса и эффективную репликацию в культивируемых клетках продемонстрировали с помощью живой флуоресценции и титрований вируса (не показано). Делеция двух третей orgf70/US4 имела дополнительное преимущество, поскольку экспрессия гликопротеина G,

кодируемого *orf70/US4*, была отменена. Было показано, что гликопротеин G из EHV-1 представляет собой неструктурный, секретлируемый хемокин-связывающий белок, противодействующий иммунной ответной реакции хозяина (Drummer и др., 1998; Bryant и др., 2003). Поскольку векторная вакцина предназначена для стимуляции иммунного ответа на вакцину, то удаление этой конкретной иммуносупрессивной функции вирусного вектора должна дополнительно улучшать платформу функционирования вирусного вектора EHV-1 *RacH-SE*.

Пример 2.

Применение нового ORF70/US4 сайта инсерции с *p455* промотором в рекомбинантном EHV-1 векторе вакцин и конструирование рекомбинантного вируса.

p455 промотор.

Для первого эксперимента на животном, использовали гемагглютинин подтипа H3 гриппа из вируса свиного гриппа А (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), номер доступа GenBank:ABS50302.2). Синтезировали его кодирующую последовательность и субклонировали в трансферном векторе *pU70-p455-71K71* (SEQ ID NO: 28), создавая трансферную плазмиду *pU70-p455-H3-71K71*, помещая H3 под контроль нового *p455* промотора и нового 71pA сигнала полиаденилирования, и вставляя в рамку кассету с участками рекомбинации для инсерции в *orf70* (фиг. 3, SEQ ID NO: 29).

С помощью мутагенеза *en-passant*, используя систему рекомбинации RED (Tischer и др. 2006), экспрессионную кассету *p455-H3-71* инсертировали в *orf70/US4* из *pRacH-SE* для получения *pRacH-SE70-p455-H3*.

PK/WRL клетки трансфектировали с помощью *pRacH-SE70-p455-H3*, рекомбинантный вирус *gEHV-1 RacH-SE70-p455-H3* (фиг. 5) высвобождали и два раза очищали от бляшек. Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продукта с использованием высокоточной PCR с корректирующей экзонуклеазной активностью участка инсерции. Экспрессию трансгена в инфицированных клетках анализировали с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа.

Восстановление *orf71*, кодирующей EHV-1 *gpII*, подтверждали с помощью IFA (не показано) и вестерн-блоттинга (фиг. 19), используя моноклональное антитело *Ai2G7* (принадлежащее BI). Появление тримеров H3 на плазматической мембране инфицированных клеток анализировали с помощью реакции гемадсорбции, используя эритроциты цыплят (не показано). Пики титров, определенные в виде TCID₅₀/мл в PK/WRL клетках, находились в том же самом диапазоне, что и титры родительского вируса *gEHV-1 RacH-SE*, что указывает на то, что экспрессия трансгена не оказывает отрицательного влияния на репликацию вируса (не показано). Это подтверждается путем пассивирования *gEHV-1 RacH-SE70-p455-H3* в PK/WRL клетках вплоть до пассажа 20 (P20) после высвобождения. В пассажах P5, P10, P15, и P20 вирус характеризовали путем титрования, секвенирования и вестерн-блоттинга, в PP10 и P20 дополнительно путем IFA, и подтверждали HA экспрессию и генетическую стабильность инсерта, который кодирует HA, вместе с промотором и *polyA* последовательностями.

Методом двойного иммунофлуоресцентного анализа (dIFA) вирусных бляшек в клетках, инфицированных с применением P20, и используя моноклональное антитело к H3 и лошадиную анти-EHV сыворотку, было подтверждено, что практически все EHV-1 индуцированные бляшки также экспрессируют H3 (не показано). Все тесты подтвердили стабильность рекомбинантного EHV-1 *RacH-SE-70-p455-H3*.

Пример 3.

Применение нового *p430* промотора в рекомбинантном EHV-1 векторе вакцин и конструирование рекомбинантного вируса.

p430 промотор.

Новый идентифицированный *p430* промотор использовали для управления экспрессией другого гемагглютинина из вируса гриппа H1N1 ((A/swine/Gent/132/2005(H1N1), номер доступа GenBank:AFR76623.1). Поскольку ген гемагглютинина в этом изоляте вируса имел происхождение из IAV птиц, то его обозначали как H1av. H1av синтезировали и субклонировали в трансферном векторе *pU1/3-p430-BGHKBGH* (SEQ ID NO: 30) для участка инсерции *orf1/3/UL56* для получения *pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH* (фиг. 4, SEQ ID NO: 31). Экспрессию H1av размещали под контролем *p430* промотора и *polyA* сигнала бычьего гормона роста (BGH).

С помощью мутагенеза *en-passant*, используя систему рекомбинации RED (Tischer и др. 2006), экспрессионную кассету *p430-H1av-BGH* инсертировали в *orf1/3/UL56* из *pRacH-SE* для получения *pRacH-SE1/3-p430-H1av*.

PK/WRL клетки трансфектировали с помощью *pRacH-SE1/3-p430-H1av*, рекомбинантный вирус *gEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av* (фиг. 6) высвобождали и два раза очищали от бляшек. Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продукта с использованием высокоточной PCR с корректирующей экзонуклеазной активностью участка инсерции. Экспрессию трансгена в инфицированных клетках анализировали с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA) и вестерн-блоттинга, используя моноклональные и поликлональные антитела (фиг. 19). Специфическое определение широкой полосы, мигрирующей при 75 кДа, с помощью антитела PA-34929, согласуется с ожидаемым появлением рекомбинантного гликопротеина HA как предсказано из его последовательности. Восстановление *orf71/US5*, кодирующей EHV-1 *gpII*, подтверждали с помощью IFA и вестерн-

блоттинга, используя моноклональное антитело Ai2G7 (принадлежащее В1), (фиг. 19). Пики титров, определенные в виде TCID₅₀/мл в PK/WRL клетках, находились в том же самом диапазоне, что и титры родительского вируса RacH-SE, что указывает на то, что экспрессия трансгена не оказывает отрицательного влияния на репликацию вируса (не показано).

Для того чтобы проверить, будут ли экспрессируемые рекомбинантные гемагглютинины процессироваться и транспортироваться, как и ожидалось, VERO-клетки инфицировали с применением гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, гEHV-1 RacH-SE (родительский) при М.О.И. 0.01, или оставляли неинфицированными. Через 24 ч п.и. живые инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали с суспензией эритроцитов цыплят в PBS, промывали PBS и окрашивали флуоресцентным Hoechst 33342 для окрашивания ядер. Поскольку эритроциты птиц содержат клеточные ядра, то они могут быть окрашены с помощью Hoechst33342 и обнаруживаются в виде миниатюрных синих пятен с помощью флуоресцентной микроскопии. По сравнению с клетками, которые были инфицированы с применением гEHV-1 RacH-SE, которые не экспрессируют гемагглютинин, адсорбция эритроцитов цыплят была существенно повышена для клеток, инфицированных либо посредством гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, либо гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (не показано). На основании этого можно сделать вывод о том, что гемагглютинины были транслированы, процессированы и транспортированы на плазматическую мембрану клеток, инфицированных векторным вирусом таким образом, как если бы они были продуцированы путем аутентичного инфицирования вирусом гриппа.

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

Пример 4.

Применение нового ORF70 сайта инсерции и ORF1/3(UL56) сайта инсерции в рекомбинантном EHV-1 векторе вакцин параллельно.

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

Специфичность и отсутствие перекрестной реакционной способности поликлональных коммерчески доступных антител к H3 (PA5-34930) и запатентованных моноклональных антител к H1av и H1pdm очевидно из вестерн-блоттингов инфицированных клеток, как показано на фиг. 19. Идентичные образцы подвергали в четырех повторностях SDS-PAGE и переносили на нейлоновые мембраны перед инкубацией с четырьмя различными антителами.

Синтезировали открытую рамку считывания, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа А (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)) и клонировали в трансферном векторе pU1-3-p430-BGNKBGN (SEQ ID NO: 30), что обеспечивало pU1-3-p430-H1av-BGNKBGN (фиг. 4, SEQ ID NO: 31). Используя в качестве исходного рекомбинантный ВАС pRacH-SE-70-p455-H3, экспрессионную кассету p430-H1av-BGN, которую собирали в pU1/3-p430-H1av-BGNKBGN (фиг. 4, SEQ ID NO: 31), инsertировали вorf1/3/UL56 сайт инсерции путем двухстадийной RED рекомбинации для получения pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. PK/WRL клетки трансфектировали с помощью pRacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, и рекомбинантный вирус гEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (фиг. 7) высвобождали и два раза очищали от бляшек.

Коротким обозначением этого рекомбинантного вируса является гEHV-1 RacH-SEB. Правильность инсерции экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования продуктов высокоточной PCR с корректирующей экзонуклеазной активностью участков инсерции вместе с фланкирующими последовательностями. Экспрессию трансгенов в инфицированных клетках анализировали с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA, не показано) и вестерн-блоттинга, используя моноклональные и поликлональные антитела (фиг. 19). Восстановлениеorf71/US5, кодирующей EHV-1 gpII, подтверждали с помощью IFA (не показано) и вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело Ai2G7 (принадлежащее В1), (фиг. 19).

Как показано на фиг. 19, оба трансгена H3 и H1av экспрессировались параллельно в клеточных культурах, инфицированных двойным рекомбинантным инсертом гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (В). Экспрессия трансгена была стабильной и не ухудшала вирусные титры, тестируемые до пассажа 11 в AI-ST A1 клетках (В1 запатентованная линия клеток семенников свиней, табл. 3).

Было показано, что два новых промотора p430 и p455 являются функциональными в контексте репликации гEHV1-RacH-SE в клеточных культурах. Уровни активности во время цикла репликации вируса оказались очень сходными, как это следует из сопоставимых интенсивностей сигналов в вестерн-блоттингах, специфичных для отдельных трансгенов. Эти свойства предоставляют возможность создавать рекомбинантные векторные вакцины на основе EHV-1 RacH или других векторных платформ, экспрессирующих два различных антигена параллельно со сходной эффективностью. Если мишень вакцины состоит из двух различных патогенов, то применение двух новых промоторов в двух сайтах инсерции в сочетании с двумя последовательностями полиаденилирования может снизить стоимость товаров существенным образом и представляет собой очевидное преимущество по сравнению с вектором, экспресси-

рующим только один антигенный компонент.

Пример 5.

Создание. Определение характеристик *in vitro* и тестирование *in vivo* двухвалентной вакцины против гриппа а на основе вектора ehv-1.

Как описано ниже, в описанном изобретении два из четырех описанных выше гемагглютининовых (НА) антигена свиного IAV, имеющие происхождение из суб-/серотипов H3N2 и H1N1 птичьего/свиного IAV, экспрессируются одним рекомбинантным EHV-1 векторным вирусом. Эта новая двухвалентная вакцина против свиного IAV обеспечивает характерную черту DIVA, например, путем обнаружения антител против белков NP или NA свиного IAV у животных, которые инфицированы полевыми штаммами свиного IAV, но не у животных, вакцинированных только вакциной, описанной в данном изобретении, поскольку они экспрессируют только НА белки свиного IAV.

Новая двухвалентная вакцина против свиного IAV была охарактеризована *in vitro* и протестирована *in vivo* на ее способность индуцировать нейтрализующие антитела к вирусу гриппа А у мышей.

Для того чтобы проверить, будут ли экспрессируемые рекомбинантные гемагглютининовые процессироваться и транспортироваться, как и ожидалось, VERO-клетки инфицировали с применением гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, гEHV-1 RacH-SE (родительский) при М.О.И. 0.01, или оставляли неинфицированными. Через 24 ч п.и. живые инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали с суспензией эритроцитов цыплят в PBS, промывали PBS и окрашивали флуоресцентным Hoechst 33342 для окрашивания ядер. Поскольку эритроциты птиц содержат клеточные ядра, то они могут быть окрашены с помощью Hoechst33342 и обнаруживаются в виде миниатюрных синих пятен с помощью флуоресцентной микроскопии. По сравнению с клетками, которые были инфицированы с применением гEHV-1 RacH-SE, которые не экспрессируют гемагглютинин, адсорбция эритроцитов цыплят была существенно повышена для клеток, инфицированных либо посредством гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, либо гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (не показано). На основании этого можно сделать вывод о том, что гемагглютининовые были транслированы, процессированы и транспортированы на плазматическую мембрану клеток, инфицированных векторным вирусом таким образом, как если бы они были продуцированы путем аутентичной репликации вируса гриппа.

Фенотип гемадсорбции инфицированных клеток подтверждают результаты вестерн-блоттингов (фиг. 19) и иммунофлуоресцентных анализов (не показано), которые показывают эффективную экспрессию трансгенных белков и предполагают образование функциональных тримеров НА на клеточной поверхности клеток, инфицированных вектором EHV-1.

Было показано, что улучшенный EHV-1 вектор с двумя сайтами инсерции и двумя новыми промоторами экспрессирует два гемагглютинина вируса гриппа параллельно. Субклеточная локализация, определенная с помощью IFA, и подвижность в SDS-PAGE, определенная с помощью вестерн-блоттинга (фиг. 19) соответствовали аутентичным нерасщепленным гемагглютининовым, экспрессируемым в клетках, инфицированных вирусом гриппа А, известным из литературы.

Генетическая и фенотипическая стабильность рекомбинантного гEHV-1 была продемонстрирована путем пассивирования в клеточной культуре с определением титров вирусов каждые 5 пассажей. Последовательности участков инсерции подтверждали каждые десять пассажей, как и экспрессию трансгена с помощью вестерн-блоттинга (не показано). Точность экспрессии оценивали с помощью двойного IFA бляшек под верхним шаром метилцеллюлозы, подсчитывая бляшки, окрашенные антителами к EHV и трансген-специфическим антителом (не показано).

Пример 6.

Индукция ответа нейтрализующих антител против двух антигенов у мышей, вакцинированных двухвалентной векторной вакциной гEHV-1 RacH.

гEHV-1 RacH SE B (гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 см. фиг. 7) использовали для иммунизации Balb/c мышей для демонстрации того, что экспрессируемые трансгены являются иммуногенными в других видах, чем свинья, и что нейтрализующие антитела индуцировались против одного из двух антигенов путем интраназального введения.

Более подробно, три группы из пяти мышей Balb/c на группу, в возрасте 3-5 недель, интраназально инокулировали в дни исследования 0 и 21 либо 40 мкл гEHV-1 RacH SE B (гEHV-1 RacH-SE-1/3-430-H1av-7-455-H3, группа 1), либо 40 мкл пустого вектора (гEHV-1 RacH-SE, группа 2, векторный контроль), либо 40 мкл среды для культивирования тканей (группа 3, отрицательный контроль), соответственно. Для групп 1 и 2, инфекционные дозировки рекомбинантного EHV-1 составляли 1×10^5 TCID50/40 мкл, соответственно. У мышей брали образцы крови в дни исследования 0 (перед 1^{-й} инокуляцией), 7, 14, 21 (перед 2^{-й} инокуляцией), 28, и 35. Сыворотку приготавливали из образцов крови и хранили замороженной при -80°C.

Иммунофлуоресцентный анализ для обнаружения антител к векторному вирусу.

AI-ST клетки инфицировали при множественности заражения (MOI) 0.001 с помощью гEHV-1 RacH-SE1212, вирус освобождали из пустого вектора BAC pRacH-SE1.2. Через 24 ч п.и. наблюдали четкие бляшки, и клетки обрабатывали для непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA). Тестировали сыворотки со всех трех групп конечного забора крови (полученной через 14 дней после второй вакцина-

ции), разведенные 1:50 в PBS. В качестве положительного контроля использовали сыворотку вакцинированной EHV-1 лошади в разведении 1:500. В качестве вторичных антител использовали коммерчески доступный FITC-конъюгированный кроличий анти-мышиный IgG для сывороток мышей и Cy5-конъюгированный козий анти-лошадиный IgG для сыворотки лошадей, и использовали при разведении 1:200. Связывание антител оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. У всех вакцинированных мышей развивались антитела, реагирующие в IFA с гEHV-1 RasH-SE-инфицированными клетками. Неинфицированные клетки не связывались с любой из тестируемых сывороток. Сыворотки из отрицательной контрольной группы мышей не проявляли никакого специфического связывания ни с инфицированными, ни с неинфицированными клетками. Данные обобщены в таблице ниже.

Таблица 4

Результаты флуоресцентной микроскопии IFA для антител к EHV-1

Лечение	Номер мыши	Идент. номер эксперимента	Разведение	Неинфицированные клетки	Инфицированные клетки
Группа 3 (Отрицательный контроль)	1	1	1:50	отриц.	отриц.
	2	2	1:50	отриц.	отриц.
	3	3	1:50	отриц.	отриц.
	4	4	1:50	отриц.	отриц.
	5	5	1:50	отриц.	отриц.
Группа 2 (Пустой вектор)	1	6	1:50	отриц.	положит.
	2	7	1:50	отриц.	положит.
	3	8	1:50	отриц.	положит.
	4	9	1:50	отриц.	положит.
	5	10	1:50	отриц.	положит.
Группа 1 (гEHV-1 RasH SE B)	1	11	1:50	отриц.	положит.
	2	12	1:50	отриц.	положит.
	3	13	1:50	отриц.	положит.
	4	14	1:50	отриц.	положит.
	5	15	1:50	отриц.	положит.
Контрольное антитело	Специфическое для				
Лошадиная сыворотка	EHV-1	22	1:500	отриц.	положит.
Вторичные антитела	Специфическое для				
FITC-козье анти-	мышь	23	1:200	отриц.	отриц.
Cy5 козье анти-	лошадь	24	1:200	отриц.	отриц.

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

Тесты на нейтрализацию вируса (VNT).

Для того чтобы показать индукцию защитного иммунитета против экспрессируемых трансгенов, имеющих происхождение либо из вируса гриппа А (IAV) (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)), либо (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)), сыворотки мышей тестировали относительно нейтрализации активности против соответствующих вирусов (Allwin и др. 2010; Trombetta и др. 2014). IAV, который использовался для тестов нейтрализации, представлял собой изоляты, полученные от свиней в Германии с 2014 г., в особенности, A/swine/Germany/AR452/2014 (H3N2) и A/swine/Germany/AR1181/2014 (H1N1). Поскольку они являются гетерологичными по отношению к штаммам, из которых имеют происхождение исследуемые вакцины, то любая нейтрализация этих вирусов мышинными сыворотками будет указывать на широкую и эффективную индукцию защитного иммунитета путем вакцинации гЕНВ-1. В качестве сыворотки отрицательного контроля, использовали сыворотку свиньи, которая была продемонстрирована как отрицательная относительно антител к вирусу гриппа.

Тесты на нейтрализацию вируса гриппа А.

MDCK клетки для нейтрализации вируса, а также обратное титрование в планшетах на 96 лунок инкубировали в течение двух дней при 37°C/5%CO₂ перед использованием. Соответствующие IAV запасы H3N2 и H1avN1 размораживали на льду и разводили в MEM, содержащей гентамицин и двойную концентрацию трипсина (MEM/Genta/2x трипсин).

Исследуемые сыворотки получали из последнего забора крови группы 1 (гЕНВ-1 RacH SE B), группы 2 (пустой вектор), положительного контроля (сыворотка от свиньи, вакцинированной инактивированной мультивалентной вакциной IAV), и отрицательного контроля.

Сыворотки инактивировали нагреванием и в двух и трех независимых экспериментах, соответственно, серийно разводили 1:2, начиная с 1:16 вплоть до 1:4096. IAV разводили до уровня приблизительно 100 TCID₅₀/реакционная смесь для реакции нейтрализации. Реакционные смеси для реакции нейтрализации инкубировали в течение 2 часов при 37°C, 5% CO₂. Обратное титрование используемого вируса осуществляли в четырехкратном повторе. Ростовую среду удаляли и MDCK-клетки промывали средой, содержащей гентамицин и трипсин перед добавлением реакционной смеси для реакции нейтрализации или разведений вирусов обратных титрований. VNT и планшеты для титрования инкубировали при 37°C /5% CO₂ в течение 1 часа после добавления реакционной смеси для реакции нейтрализации или разведений вирусов к MDCK-клеткам, соответственно. После этого инокуляты удаляли и на клетки наносили свежую среду, содержащую гентамицин и трипсин. Через пять дней п.и. мониторили и документировали CPE. Фактически используемый титр вируса в анализе был рассчитан как TCID₅₀/мл в соответствии с Reed и Munch, и разведения, при которых тестируемые сыворотки предотвращали индукцию типичного для вируса гриппа CPE, регистрировали, см. таблицы ниже.

Результаты VNT вируса гриппа H1avN1

H1avN1	VNT#1		VNT#2		VNT#3		Среднее значение способности к нейтрализации	SD (средне-квадратическое отклонение)
	146 TCID50/лунку	Способность	32 TCID50/лунку	Способность	181 TCID50/лунку	Способность		
мышь	Реципрокное нейтрализующее разведение		Реципрокное нейтрализующее разведение		Реципрокное нейтрализующее разведение			
rEHV-1 RasH SE В-1	32	4672	128	4096	32	5792	4853	862
rEHV-1 RasH SE В-2	16	2336	64	2048	отриц.		2192	204
rEHV-1 RasH SE В-3	32	4672	128	4096	16	2896	3888	906
rEHV-1 RasH SE В-4	128	18688	512	16384	64	11584	15552	3624
rEHV-1 RasH SE В-5	32	4672	256	8192	16	2896	5253	2695
Пустой	н.о.	н.д.	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	н.д.	н.д.
вектор-1								
Пустой вектор-2	н.о.	н.д.	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-3	н.о.	н.д.	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-4	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-5	н.о.	н.д.	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	н.д.	н.д.
Положит. контроль, свиная сыворотка	32	н.д.	н.о.	н.д.	н.о.	н.д.	н.д.	н.д.

Таблица 6

Результаты VNT вируса гриппа H3N2

H3N2	VNT#1		VNT#2		VNT#3		Среднее значение способности к нейтрализации	SD (средне-квадратическое отклонение)
	16 TCID50/лунку	способность	24 TCID50/лунку	способность	15 TCID50/лунку	способность		
мышь	Реципрокное нейтрализующее разведение		Реципрокное нейтрализующее разведение		Реципрокное нейтрализующее разведение			
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	2611
гEHV-1 RacH SE B - 5	256	4096	128	3072	64	960	2709	1599
Пустой вектор-1	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-2	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	н.д.	н.д.
Пустой вектор-3	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	отриц.	н.д.	н.д.	н.д.

Для того чтобы сравнить результаты независимых тестов, нейтрализующую способность рассчитывали путем умножения реципрокного разведения сыворотки на соответствующий титр, который был нейтрализован ей же. Затем средние значения трех тестов делили на 100 для отображения нейтрализации 100 TCID50 (табл. 4, 5, и 6). Данные обобщены и представлены графически на фиг. 20.

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

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

Вестерн-блоттинг.

1. Инфицирование: Три лунки каждого из слившихся монослоев AI-ST клеток в планшетах на 6 лунок инфицировали при М.О.И, приблизительно 1 рекомбинантными вирусами путем прямого добавления 10 мкл размороженных запасов вируса в ростовую среду. Три лунки оставляли неинфицированными. Инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали в течение двух дней и затем обрабатывали для вестерн-блоттинга. Вирусы, используемые для инфицирования, обобщены в таблице ниже (табл. 2).

Таблица 2

Вирусы, тестируемые в вестерн-блоттинг

Название вируса	Сокращенное название	Используемые сайты инсерции	Экспрессируемые трансгены
гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3	H3	US4	H3
гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av	av	UL56	H1av
гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H1pdm	4p	US4	H1pdm
гEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu	hu	UL56	H1hu

rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-455-H3	B	US4 и UL56	H3 и H1av
rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-455-H1pdm	D	US4 и UL56	H1pdm и H1hu
rEHV-1 RacH-SE-UL43-H1pdm	43p	UL43	H1pdm
rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-UL43-422-H1pdm70-455-H3	E	US4 и UL56 и UL43	H3, H1av, и H1pdm
rEHV-1 RacH-SE	SE	отсутствует	отсутствует

2. Приготовление лизатов: RIPA буфер, дополненный коктейлем ингибитора протеазы (RIPA+PI), приготавливали следующим образом: 0,7 мл 10x RIPA лизирующего буфера Millipore Кат. №20-188 добавляли к 6,3 мл H₂O, Fisher Scientific Кат. № BP2470-1, и 1 таблетку Complete™ Mini Protease коктейля ингибиторов (Roche кат. №11 836 153 001) растворяли в 7 мл 1xRIPA буфера. Неинфицированные контроли соскабливали в среду и суспензии из лунок трех повторов объединяли в центрифужных пробирках объемом 15 мл и помещали на лед. Инфицированные клетки смывали в среду и суспензии из лунок трех повторов объединяли в центрифужных пробирках объемом 15 мл и помещали на лед. Клетки осаждали путем центрифугирования при 1000×g 4°C в течение 5 мин. Супернатанты осторожно аспирировали и осадок клеток ресуспендировали в RIPA +PI (неинфицированные клетки в 300 мкл, инфицированные клетки в 150 мкл). Суспензии инкубировали на льду в течение 30 минут и встряхивали каждые 10 минут. Суспензии переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и нерастворенный материал осаждали путем центрифугирования при 15000 об./мин, 4°C, в течение 10 мин в микроцентрифуге. Прозрачные супернатанты переносили в новые микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и хранили при -80°C до использования.

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

Образцы приготавливали без добавления восстановителя. Образцы размораживали на льду и смешивали с 1 объемом 4x буфера Laemmli, кипятили в течение 6 минут при 96°C, и выдерживали при КТ до загрузки на гель. Гель прогоняли в течение 30 минут при 230 мА и затем собирали для электроблоттинга, используя систему BioRad Trans Blot Turbo. Перенос устанавливали на 2,5 А 25 В 10 минут. Мембрану промывали в стерильной дистиллированной H₂O и инкубировали с 25 мл блокирующего раствора 5% FBS в PBST в течение 30 минут при 4°C.

Инкубирование и обнаружение антител.

Материалы: набор Immun-Star WesternC Chemiluminescent Kit (Bio Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 Munchen) Кат. №170-5070

Первичные антитела: см. легенду к фиг. 19 a-d.

Вторичное антитело: конъюгированное с пероксидазой козы анти-мышинное, (Jackson Immune Research #115-035-146) 1:5000.

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

Титрования вируса.

AI-ST клетки высеивали в планшеты на 96 лунок (Corning Incorporated -Life Sciences, One Becton Circle, Durham, NC 27712, USA; REF 353072) в количестве 2×10⁴ клеток/лунку в MEM, дополненной 10% FBS за один день до инфицирования. Запасы вирусов быстро размораживали и помещали на лед. Приготавливали десять серийных разведений 1:10 в MEM в объеме 1.2 мл на разведение. Разведения вирусов в количестве 100 мкл/лунку добавляли к клеткам, 8 лунок в одном вертикальном ряду на разведение. Вертикальные ряды 11 и 12 каждого планшета служили в качестве контрольной среды путем добавления 100 мкл/лунку MEM. Титрования осуществляли в трех повторах и клетки инкубировали в течение 5 дней при

37°C/5%CO₂. Клеточные культуры анализировали микроскопически и записывали лунки, в которых наблюдали EHV-1 RAcH типичный CPE. Титры рассчитывали в виде TCID₅₀/мл в соответствии с методом Reed и Muench (1938).

Пример 7.

Создание нового сайта инсерции UL43.

Используя EHV-векторную платформу, как описано в предыдущих примерах, можно экспрессировать параллельно только два антигена в их аутентичных формах. Смесь двух векторных вакцин приведет к увеличению стоимости продукта и также может привести к несбалансированной экспрессии трансгенов, если эффективность репликации варьируется между разными рекомбинантными вирусами, что весьма вероятно. Хотя существуют способы связать два антигена в одном сайте инсерции либо с помощью внутреннего участка посадки рибосомы (IRES), либо с помощью пептида пикорнавируса 2a (2a), таких методик недостаточно для этой цели. Если два трансгена связаны пептидом 2a, который запускает рибосомный прорыв, что приводит к синтезу дискретного продукта трансляции, расположенного по ходу транскрипции (Donnelly и др., 2001), 2a пептид структурно изменяет первый из экспрессируемых белков, который в результате будет иметь 19 аминокислотных остатка из 2a пептида, добавленных к С-концу. Один аминокислотный остаток, пролин, будет добавлен к N-концу второго белка (Ryan и др., 1994). Поскольку эта одна дополнительная аминокислота будет отщеплена сигнальным пептидом HA, это, вероятнее всего, не будет иметь никаких последствий. Тем не менее, хвост из 19 аминокислот на первом HA может мешать тримеризации и препятствовать достаточной эффективности. Чтобы найти решение для преодоления описанных препятствий, изобретатели установили третий сайт экспрессии трансгена в pRacH-SE.

Использование единой номенклатуры альфагерпесвирусов.

При доступности первых геномных последовательностей различных альфагерпесвирусов, идентифицированные *in-silico* открытые рамки считывания (orfs) были пронумерованы для каждого вируса индивидуально в соответствии с их положением в соответствующих геномах. Позже было обнаружено, что большинство генов альфагерпесвирусов были гомологами, присутствующими у разных видов. Для того, чтобы облегчить сравнение данных, в настоящее время обычной практикой является присвоение генам и генным продуктам обозначения их гомологов в геноме вируса герпеса человека типа 1. Соответственно, мы изменили старые обозначения EHV orfs в соответствии с новой номенклатурой, как указано в табл. 1.

Таблица 1

EHV orf	Единая номенклатура	Генный продукт
orf1	UL56	pUL56
orf2	(отсутствует)	orf2 белок
orf3	(отсутствует)	orf3 белок
orf16	UL44	Гликопротеин С
orf17	UL43	pUL43
orf18	UL42	Фактор процессивности ДНК-полимеразы
orf70	US4	Гликопротеин G
orf71	US5	Гликопротеин II (или гликопротеин J)

Однако, для конструирования сайта инсерции, необходимо соблюдать осторожность, чтобы не разрушить сигналы предполагаемого промотора и *polyA*, расположенных против хода и по ходу транскрипции гена UL42, кодирующего фактор процессивности ДНК-полимеразы, и гена UL44, кодирующего гликопротеин С.

Конструирование нового UL43 сайта инсерции проиллюстрировано на фиг. 13.

Таким образом, 870 пар оснований (SEQ ID NO: 21) 5' конца UL43 (SEQ ID NO: 18) заменяли на экспрессионную кассету, кодирующую аутофлуоресцентный mCherry белок путем рекомбинации ВАС pRacH-SE. Открытую рамку считывания (orf) для mCherry размещали под контролем предполагаемого промотора (p422, SEQ ID NO: 5) и *polyA* последовательности (SEQ ID NO: 7) EHV-4 UL18, кодирующей капсидную триплексную субъединицу 2.

Последовательность полиаденилирования 18pA (SEQ ID NO: 7) вводили в трансферный вектор для RED рекомбинации против хода транскрипции и по ходу транскрипции канамицин-устойчивой экспрессионной кассеты (Kana) для выполнения двойной функции: 1. Во время второй стадии "en-passant" мутагенеза (2-х стадийная Red-опосредованная стратегия) она служит в качестве гомологичного участка для делеции Kana, 2. Она действует в качестве сигнала полиаденилирования для трансгена. Карта трансферного вектора pUUL43-422-mC-18K18 представлена на фиг. 14.

Фрагмент pUUL43-422-mC-18K18 (фиг. 14; SEQ ID NO: 35), охватывающий фланкирующие участки для рекомбинации в вирусном геноме, экспрессионную кассету и канамицин-устойчивую кассету, вырезали из трансферного вектора с использованием рестрикционной хоминг-эндонуклеазы I-CeuI и

очищали с помощью электрофореза в агарозном геле. Очищенный фрагмент ДНК затем инсертировали в ВАС pRacH-SE с помощью "en-passant" RED рекомбинации (Tischer и др. 2006). После подтверждения целостности последовательности, рекомбинантный EHV-1 RacH-SE-UL43-422-mCherry (фиг. 15) высвобождали вслед за трансфекцией перmissive клеточных культур, и очищали от бляшек. Экспрессия флуоресцентного mCherry белка при исследовании с помощью флуоресцентной микроскопии показала, что новая экспрессионная кассета в новом сайте инсерции была функциональной (не показано).

Для тестирования функционирования третьего сайта инсерции в качестве векторной вакцины, гемагглютинин гриппа подтипа H1pdm (SEQ ID NO: 44) из вируса свиного гриппа А ((A/swine/Italy/116114/2010 (H1N2), номер доступа GenBank: ADR01746) был инсертирован в новый сайт pRacH-SE.

Для этой цели, *orf*, кодирующую mCherry, вырезали из трансферного вектора pUUL43-422-mC-18K18 (фиг. 14; SEQ ID NO: 35) и взамен инсертировали *orf*, кодирующую H1pdm. Полученную трансферную плазмиду называли, соответственно, pUUL43-422-H1pdm-18K18 (фиг. 16, SEQ ID NO: 36). Фрагмент pUUL43-422-H1pdm-18K18, охватывающий фланкирующие участки для рекомбинации в вирусном геноме, экспрессионную кассету и канамидин-устойчивую кассету, вырезали из трансферного вектора с использованием рестрикционной хоминг-эндонуклеазы I-CeuI и очищали с помощью электрофореза в агарозном геле. Очищенный ДНК фрагмент затем инсертировали в ВАС pRacH-SE с помощью "en-passant" RED рекомбинации (Tischer и др. 2006). После подтверждения целостности последовательности, рекомбинантный EHV-1 RacH-SE-UL43-422-H1pdm (фиг. 17) высвобождали вслед за трансфекцией перmissive клеточных культур, и очищали от бляшек.

Такую же методику использовали для создания рекомбинантного EHV-1 RacH-SE на основе гEHV-1 RacH-SE-B (гEHV-1 RacH-SE-*orf*1/3-p430-H1av-70-p455-H3, фиг. 7). Созданный рекомбинант, содержащий тройной инсерт, называли гEHV-1 RacH-SE-UL56-430-H1av-UL43-422-H1pdm-US4-455-H3 (сокращенно гEHV-1 RacH-SE-E, фиг. 18).

Схематическое изображение генома с тройным инсертом гEHV-1 RacH-SE-UL56-430-H1av-UL43-422-H1pdm-US4-455-H3 (сокращенно гEHV-1-E) изображено на фиг. 18. В то время как в названии конструкции-предшественника используется исходная EHV-*orf* номенклатура, новое название вируса с тройным инсертом основано на единой номенклатуре альфагерпесвирусов, где гены названы в соответствии с их гомологами в вирусе герпеса человека типа 1.

Рекомбинантные вирусы, очищенные от бляшек, характеризовали с помощью секвенирования участков сайта инсерции (не показано), операциями вестерн-блоттинга (фиг. 19) и титрования вирусов (табл. 3).

Рекомбинантный EHV-1 с двойным инсертом, гEHV-1 RacH-SE-UL56-430-H1hu-US4-455-H1pdm (сокращенно гEHV-1 RacH-SE-D, фиг. 12) использовали для сравнения силы экспрессии транскриптов. Кроме того, в исследовании был включен гEHV-1 RacH-SE с одним инсертом, гEHV-1 RacH-SE-*orf*70-p455-H1pdm (фиг. 10), который экспрессирует IAV HA H1pdm из нового сайта экспрессии *orf*70/US4 под контролем промотора p455.

Для того чтобы оценить силу экспрессии новых рекомбинантных EHV-1 RacH-SE-UL43-422-H1pdm и EHV-1 RacH-SE-E в сравнении с двумя другими гEHV-1 RacH-SE, экспрессирующими H1pdm, выполняли вестерн-блоттинг. Кроме того, были включены все гEHV-1 RacH-SE с одним инсертом, экспрессирующие различные IAV HA, и гEHV-1 RacH-SE B и D, с двойным инсертом, соответственно. Перечень используемых вирусов см. в табл. 2.

Таблица 2

Перечень вирусов, проанализированных с помощью вестерн-блоттинга (фиг. 19)

Длинное название	Сокращенное	Трансгены
гEHV-1 RacH-SE-UL56-430-H1av- US4-455-H3	B	H1av H3
гEHV-1 RacH-SE-UL56-430-H1hu- US4-455-	D	H1hu H1pdm
гEHV-1 RacH-SE-UL56-430-H1av-UL43-422-	E	H1av H1pdm H3
гEHV-1 RacH-SE-UL56-430-H1av	av	H1av
гEHV-1 RacH-SE-UL56-430-H1hu	hu	H1hu
гEHV-1 RacH-SE-US4-455-H3	H3	H3
гEHV-1 RacH-SE-US4-455-H1pdm	4p	H1pdm
гEHV-1 RacH-SE-UL43-H1pdm	43p	H1pdm
гEHV-1 RacH-SE	SE	отсутствует

Использовали три запатентованных моноспецифических моноклональных антитела, направленных против гемагглютининов H1av или H1pdm, или против EHV-1 гликопротеина II, и коммерческое поликлональное антитело к H3. Этот способ позволил провести полуколичественную оценку количества

трансгенов, экспрессируемых в клетках, инфицированных различными тестируемыми рекомбинантными вирусами. В качестве контрольной клеточной культуры, клетки оставляли неинфицированными, а в качестве фонового вирусного контроля использовали гЕНВ-1 RasH-SE, который был "спасен" и очищен от бляшек из остова пустого вектора ВАС (SE). AI-ST клеточные культуры, инфицированные рекомбинантными ЕHV-1 В, D, E, SE, av, hu, H3, 4p, 43p (см. табл. 2), или оставшиеся неинфицированными, собирали через 30 часов п.и. и обрабатывали SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. После электрофореза белки подвергали электропереносу на нейлоновые мембраны и инкубировали с моноклональными антителами либо к НА H1av, H1pdm, либо к ЕHV-1 гликопротеину II, либо с коммерческим кроличьим поликлональным антителом к НА H3. Вестерн-блоттинг (фиг. 19d) подтверждает успешное инфицирование и репликацию всех девяти вирусов. Количества gpII, экспрессируемые в В, D, av, hu, H3, 4p, 43p и SE-инфицированных клетках оказываются схожими, что указывает на сравнимую эффективность репликации. Количество gpII в Е-инфицированных клетках немного снижено по сравнению с другими. Методы вестерн-блоттинга (фиг. 19a и 19b) подтверждают экспрессию гемагглютининов H1av и H3, соответственно, новым рекомбинантным Е. По сравнению с В, количества оказываются сопоставимыми. В отличие от этого, количество гемагглютинина H1pdm, экспрессируемого новыми рекомбинантными ЕHV-1 RasH-SE-E и -43p (вестерн-блоттинг (фиг. 19c)) оказываются значительно сниженными по сравнению с D и 4p, где идентичный белок экспрессируется в US4 (orf70) сайте инсерции под контролем промотора 455.

Чтобы оценить, будет ли экспрессия трех гемагглютининов параллельно ухудшать эффективность репликации вируса, гЕНВ-1 RasH-SE-B, -D и -E пассивировали в AI-ST клетках до одиннадцатого пассажа, и параллельно определяли титры в трех повторностях (табл. 3). Все титры находились в сопоставимом диапазоне, что указывает на то, что третья экспрессионная кассета трансгена не оказывала очевидного влияния на приспособленность вируса в условиях культивирования клеток.

Таблица 3

Сравнение титров вирусов на 11 пассаже

ID вируса	Пассаж №	TCID ₅₀ /мл	Среднеквадратическое отклонение
гЕНВ-1RasH-SE-B	11	2,01E+08	1,09E+07
гЕНВ-1RasH-SE-D	11	1,76E+08	8,59E+07
гЕНВ-1RasH-SE-E	11	1,67E+08	8,88E+07

В целом было показано, что рекомбинантный ЕHV-1 экспрессировал три различных гемагглютинина гриппа А из трех различных сайтов экспрессии параллельно. В то время как экспрессия из сайтов инсерции UL56 (orf1/3) и US4 (orf70) под контролем промоторов 430 и 455, соответственно, была сопоставимой по силе, экспрессия из нового сайта UL43 под контролем нового промотора 422 была слабее. Также и в рекомбинантном ЕHV-1 RasH-SE, экспрессирующем только гемагглютинин H1pdm из нового сайта инсерции в UL43 под контролем промотора p422, количество оказалось уменьшенным по сравнению с тем же белком, экспрессируемым из US4 (orf70) сайта инсерции под контролем промотора p455. Таким образом, новая экспрессионная система представляет собой вариант для решения задачи, которая требует менее сильной экспрессии третьего трансгена в дополнение к тем, которые экспрессируются из сайта UL56 и сайта US4. Более низкая экспрессия из сайта UL43 сайта является преимуществом, когда известно, что экспрессируемые белки оказывают токсичное воздействие в клеточных культурах, когда они присутствуют в больших количествах. Кроме того, можно использовать комбинацию сайтов сильной и слабой экспрессии, если для определенной цели необходимо определенное соотношение белков, например, для образования вирусоподобных частиц, состоящих из различных вирусных структурных белков в специфических соотношениях. Кроме того, может быть желательна более слабая экспрессия трансгена, если экспрессируемый белок имеет тенденцию дестабилизировать рекомбинантный векторный вирус.

Улучшенный ЕHV-1 вектор ВАС pRasH-SE можно использовать в качестве платформы для создания векторных вакцин против различных патогенов видов млекопитающих, включая лошадей, собак и свиней (Trapp и др. 2005, Rosas и др. 2007a, 2007b, 2008). Три различных трансгена можно экспрессировать параллельно улучшенным векторным вирусом в их аутентичной форме. Три различных антигена могут представлять три серотипа одного патогена или происходить из различных патогенов вида, для которого предназначена вакцина. Кроме того, векторная вакцина, созданная на основе улучшенного ЕHV-1 вектора pRasH-SE, экспрессирующего антигены патогены лошадей, имеет предполагаемый потенциал быть четырехвалентной, поскольку она также будет вакцинировать против инфицирования ЕHV-1.

Информация об улучшенном ЕHV-1 векторе ВАС pRasH-SE не была опубликована или не представлялась за рамками ВІ.

Все композиции и способы, раскрытые и заявленные в данном изобретении, могут быть получены и осуществлены без излишних экспериментов в свете настоящего описания. Хотя композиции и способы в

соответствии с данным изобретением были описаны в контексте предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидным, что в композиции и способы, а также в стадии или в последовательности стадий описанного в данном изобретении способа могут быть внесены изменения без отступления от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. Более конкретно, будет очевидным, что определенные агенты, которые являются как химически, так и физиологически, родственными, могут быть заменены на агенты, описанные в данном изобретении при достижении тех же или аналогичных результатов. Все такие подобные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, подразумеваются как такие, которые соответствуют сущности, объему и концепции изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Ссылки

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

1. 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* т. 22 (4), 833-846.
2. 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.

3. Donnelly, M.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D., и Ryan, M.D. **2001**. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol.* May;82(ч. 5):1013-25
4. 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
5. Fields, B, Knipe, D.M.; and Howley, P.M. 2013. *Virology*. 6th ред. Philadelphia; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams&Wilkins
6. Jang, S.K., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Witherell, G.W., Wimmer, E. **1990**. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme.*;44(1-4):292-309.
7. Jöns A., and Mettenleiter TC. **1997**. Green fluorescent protein expressed by recombinant pseudorabies virus as an *in vivo* marker for viral replication. *J. Virol. Meth.* 66: 283-292.
8. Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A. и др. **2001**. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73: 56-65.
9. 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.
10. Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Kaaden, O.R., и 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.
11. Proudfoot, N.J. **2011**. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes&Development* 25:1770-1782.
12. 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.

13. C.T. Rosas, B.K. Tischer, G.A. Perkins, B. Wagner, L.B. Goodman, N. Osterrieder Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV) *Virus Research*, 125 **2007b**, cc. 69–78.
14. 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.
15. Ryan, M.D., и Drew J. **1994**. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J*Feb 15;13(4):928-33.
16. Tischer, B.K, Smith, G.A., и Osterrieder, N. в: Jeff Braman (ред.), *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition*, Methods in Molecular Biology, т. 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.
17. 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.
18. Tischer, B.K., Kaufer, B.B., Sommer, M., Wussow, F., Arvin, A., и Osterrieder, N. **2007**. Self-Excisable Infectious Bacterial Artificial Chromosome Clone of Varicella-Zoster Virus Allows Analysis of the Essential Tegument Protein Encoded by *ORF9*. *J. Virol.* 81 (23), 13200–13208.
19. Thompson, S.R. **2012**. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol.* Nov;20(11):558-66. doi: 10.1016/j.tim.2012.08.002. Epub 2012 Aug 31.
20. 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.
21. 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
22. Wellington, J.E., Allen, G.P., Gooley, A.A., Love, D.N., Packer, N.H., Yan, J.X., Whalley, J.M. **1996**. The highly O-glycosylated glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 is encoded by gene 71. *J Virol.* 70(11):8195-8.

Перечень последовательностей

- <110> Бёрингер Ингельхайм Ветмедика ГмбХ
- <120> Новый EHV сайт инсерции UL43
- <130> P01- 3304
- <160> 47
- <170> PatentIn version 3.5

046085

<210> 1
 <211> 600
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 4 типа

<400> 1
 gcagactttg gagcagcaca atttccgggt gtggacccca tggaccttg tttggctggt 60
 accgtggaaa ctaacgctcc ggaagttttg gccagagcaa aatacaattc gaaggtagac 120
 atatggagcg ccggaatagt tctgtttgaa atgctcgcat atccatcaac tctatattgag 180
 gaccgcgcca gtacccsaca agagtatgta aaaagctgtc attctcaact actgagaata 240
 atatcaaagc taaagataaa ccctgaggag tttccacggg aaccagagtc taggctcgtg 300
 cgcggataca tcgaatacgc cagcctagag cgtaagccac atacgcgcta tccttgcttc 360
 cagcgcgtga acctacacat tgacggggaa tttttgatcc ataaaatgct agcgttcaat 420
 gctgcgatgc gcccatccgc agaagagttg ttgtcctacc caatgtttat gaatctgtag 480
 gatgactaac agatttgggg tggagacggc gtgggcgata ctgtataaag ttgtactact 540
 taccagccca gtcagtgtgc tgtagtgcc caccctgtaa agctgtgata agctgcagtt 600

<210> 2
 <211> 600
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 4 типа

<400> 2
 agctggggga gtttgtacta tagtgtatta catgcccgtt gcaataactg cctggtttat 60
 gtttcgcaac attcaagcag acatgctacc gctaaacact ttgcaacaat tttttattgg 120
 gtgtttggcc tttggtagaa ctgtcgcgtt tttggtggt gcatatacta ccttatttat 180
 acgctccgag ctgtttttca gcatgctagc acccaacgcc gagcgagagt atataactcc 240
 catcattgcc cacaagctta tgccacttat tagcgtccgc tctgccgttt gcttagtcat 300
 aatatctacc gccgtttacg cagcagacgc tatctgcgac acaattggat ttgcgatacc 360
 gcgcatgtgg atgtgtatth taatgagatc aacctccatg aagcgtaact agggggcctc 420
 ccaactgaggc actaccggct tagcagctga ctaacacagt ataaaacgtg agaagaaatc 480
 agtctcatgc gccattagcg ctaggctagt tagcgtggag gaccggagcg ctaccgccag 540
 cagtttcatc cgcctgggta cggggttggt aacacctacc ggtggttttac cgctaccata 600

<210> 3
 <211> 430
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 4 типа

<400> 3
 tctatattgag gaccgcgcca gtacccsaca agagtatgta aaaagctgtc attctcaact 60

046085

actgagaata atatcaaagc taaagataaa cctgaggag tttccacggg aaccagagtc 120
taggctcgtg cgcggataca tcgaatacgc cagcctagag cgtaagccac atacgcgcta 180
tccttgcttc cagcgcgtga acctacacat tgacggggaa tttttgatcc ataaaatgct 240
agcgttcaat gctgcatgac gcccatccgc agaagagttg ttgtcctacc caatgtttat 300
gaatctgtag gatgactaac agatttgggg tggagacggc gtgggcgata ctgtataaag 360
ttgtactact taccagccca gtcagtgtgc tgtagtgcc aacactgtaa agctgtgata 420
agctgcagtt 430

<210> 4
<211> 449
<212> ДНК
<213> Герпесвирус лошадей 4 типа

<400> 4
ttggtggtag catatactac cttatattata cgctccgagc tgtttttcag catgctagca 60
cccaacgccg agcgagagta tataactccc atcattgccc acaagcttat gccacttatt 120
agcgtccgct ctgccgtttg cttagtcata atatctaccg ccgtttacgc agcagacgct 180
atctgcgaca caattggatt tgcgataccg cgcagtgtgga tgtgtatddd aatgagatca 240
acctccatga agcgtaacta gggggcctcc cactgaggca ctaccggctt agcagctgac 300
taacacagta taaaacgtga gaagaaatca gtctcatgcg ccattagcgc taggctagtt 360
agcgtggagg accggagcgc taccgccagc agtttcatcc gcctggttac gggtttgta 420
aacactaccg gtgttttacc gctaccata 449

<210> 5
<211> 422
<212> ДНК
<213> Герпесвирус лошадей 4 типа

<400> 5
ccatggatcg tcagacttgg tggaagacc atgttcggtg tttcaagaag cgtatcctct 60
actcagctcc actgatacag cattgctacg cagcctcac gttggcgaaa ttggcgcaga 120
tgaaggacat tttgccagt acctaatcgc cgcagatcc cccctgaaag gctgttttcc 180
acgaatttag gttgtgcccg cctacaactt ttcacttgca aactcaataa aacgcacagt 240
ttgtatattc agttgtcagt ttgctctact cgagcgtcgg cgctttgtct agccctotta 300
gtgggtattg ttaccggctg ggggtttatt ggcgttgta ttggggagat tttagttgat 360
agaaagcata ccgaggtttt ggggggtgct cttaatctgc gtgtctgtaa acgtaaaaag 420
ag 422

<210> 6
<211> 125

046085

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность полиаденилирования 71pA

<400> 6
 aataaacgсg gtatgtctac cttcaagcct atgatgaacg gatgtttggт gtttgсggct 60
 attataacgc tcttgagttt tatgctatct ctgggaacat gcgaaaatta caggcgtgtg 120
 gttcг 125

<210> 7
 <211> 123
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность полиаденилирования 18pA

<400> 7
 ataaaaactg agactgttat attcatttca gtgtgtttaa taagaattgt gaacataact 60
 tattctatat ctсattgcgt ggaagactg gaaaacgcат tggтggtagg тggaaggctc 120
 gcc 123

<210> 8
 <211> 1235
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 8
 atgttgactg tcttagcagc tctgagtctg ctсagcttgc ttacgagcgc aaccggacгг 60
 ctсgccccag atgaactctg ttatgcсgaa ccccgсgaa ctggcagccc accaaacacc 120
 cagcccgaac gccсaccgт aatatttgag cccсcaacaа ttgcgattaa agctgaatcc 180
 aagggttgтg agctaatttt attagatcca cccatagatg таagctatcг cagagaagat 240
 aaggтgaatg cгtccattgc ttggттtttt gactттggcг ctтgcccгat gcccatcгca 300
 tacagagagt attacгgtтg tattggcaat gctгттccct cccсagagac ttgtgatгcг 360
 tactcattta ccттattag gaccгagгgt atcгтggagт ttaccatcгt aaacatgagc 420
 ctсctгtttc агcттgгаat atacгatagт ggcaatttta tctacagcгt tctcттggac 480
 тaccacatat ttacagгacг тgтаacгттg gaagtгgaaa агgacacaaa ctatccттgt 540
 гgcatgattc atggactcac тgcttacгga aacatcaacг tagatgaaac catгgгacaac 600
 gccagcccac acccгcгтgc cгтggгггтgc тttcccгagc ccatcгgaaa cгаagcгтгг 660
 гcaaacгtta catttactga attгggгgata ccagaccсaa actcatttct cгatgacгag 720
 гgtгattacc cгаatatatc агactгtсac тcгтggгagт catacacta cccaaatacг 780
 ctгagгcagг ccacagгacc ccagaccттg ttggтggгггг cггттггact cagaatctтg 840

046085

gcgcaggcat ggaagtttgt cggtgacgaa acatacgaca ccatccgcgc agaagcaaag 900
aatttagaga cccacgtacc ctcaagtgct gcagagtcgt ctctagaaaa ccaatcgaca 960
caggaggagt ctaacagccc cgaagttgcc cacctgcgaa gcgtcaacag cgatgacagt 1020
acacacacgg gggtgcgtcg aacggcatcc aggactgtga cagtcagctc aaaactgtgt 1080
atgctgctt ggctctaatt ggactcggca catgtgccat gatagggttg atagtttaca 1140
tttgtgtatt aagggtcaaaa ctgtcctctc ggaatTTTTc gcgcgcgcaa aatgtaaaac 1200
atagaaatta ccagcgactt gagtacgttg cttaa 1235

<210> 9
<211> 417
<212> ДНК
<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 9
ctccgagtac cccagaggag tatgtgaaaa gctgccactc gcaactactg aagataatTT 60
caacgctcaa gataaatccg gaggagtTTc ctcgagacc cgggtcgagg ctcgTgcgcg 120
gatacatcga gtattctaga ctcgagcgcga agccctacac gcgctacccc tgctttcaac 180
gcgtcaacct gcacattgac ggggagTTc tggttcacia gatgctagcg ttcaatgccg 240
cgatgcgccc atcggccgag gagctgctgt catacccaat gtttgcTcaa ctttaggatg 300
actaacctgt ttctgggagg agacagcgtg ggcgacggtg tataaagttg gtctgctTTc 360
aagccctgcc actgcgctac agtgccacca actgtaaagc ggtagtaagc tgcagtg 417

<210> 10
<211> 431
<212> ДНК
<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 10
gaccctgTTg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg 60
tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagacc acgtaccctc 120
aagtgtgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag gaggagtcta acagccccga 180
agttgcccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca cacacggggg gtgcgTcgaa 240
cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat gcctgctTgg ctctaattgg 300
actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt tgtgtattaa ggtcaaaact 360
gtcctctcgg aatTTTTcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat agaaattacc agcgactTga 420
gtacgTTgct t 431

<210> 11
<211> 417
<212> ДНК

<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 11

ctccgagtag cccagaggag tatgtgaaaa gctgccactc gcaactactg aagataatTT 60
 caacgctcaa gataaatccg gaggagtttc ctcgagaccc cgggtcgagg ctcggtgcgcg 120
 gatacatcga gtattctaga ctcgagcgca agccctacac gcgctacccc tgctttcaac 180
 gcgtcaacct gcacattgac ggggagtttc tggttcacia gatgctagcg ttcaatgccg 240
 cgatgcgccc atcggccgag gagctgctgt catacccaat gtttgcacia ctttaggatg 300
 actaacctgt ttctgggagg agacagcggtg ggcgacgggtg tataaagttg gtctgctttc 360
 aagccctgcc actgcgctac agtgccacca actgtaaagc ggtagtaagc tgcagtg 417

<210> 12

<211> 530

<212> ДНК

<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 12

gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg 60
 tgacgaaaca tacgacacca tccgcgca ga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc 120
 aagtgcgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag gaggagtcta acagccccga 180
 agttgccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca cacacggggg gtgcgctcgaa 240
 cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat gcctgcttgg ctctaattgg 300
 actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt tgtgtattaa ggtcaaaact 360
 gtcctctcgg aatTTTTcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat agaaattacc agcgacttga 420
 gtacgttgct taacacctgt caaataaaag tttcaaatca aaaacattgt tgtctgtaat 480
 aactgagtgt ggttttaaaa atactaaatc gcggcaattc cggaaatagc 530

<210> 13

<211> 283

<212> ДНК

<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 13

tctagactcg agcgcaagcc ctacacgcgc taccctgct ttcaacgcgt caacctgcac 60
 attgacgggg agtttctggt tcacaagatg ctacggttca atgccgcgat gcgcccacg 120
 gccgaggagc tgctgtcata cccaatgttt gctcaacttt aggatgacta acctgtttct 180
 gggaggagac agcgtgggcg acggtgtata aagttgggtc gctttcaagc cctgccactg 240
 cgctacagtg ccaccaactg taaagcggta gtaagctgca gtg 283

<210> 14

<211> 144

<212> ДНК

<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 14

gaccctggtg gtgggtgctg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg 60
 tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc 120
 aagtgctgca gagtcgtctc taga 144

<210> 15

<211> 1236

<212> ДНК

<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 15

atggtgactg tcttagcagc cctgagtctg ctgagcttgc ttacgagcgc aaccggacgg 60
 ctgccccag atgaactctg ttatgccgaa cccgcgagaa ctggcagccc accaaacacc 120
 cagcccgaac gccacccgt aatatttgag ccccaacaa ttgcgattaa agctgaatcc 180
 aagggttgtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat 240
 aaggtgaatg cgtccattgc ttggtttttt gactttggcg cttgccggat gcccatcgca 300
 tacagagagt attacggttg tattggcaat gctgttccct cccagagac ttgtgatgcg 360
 tactcattta cccttattag gaccgagggg atcgtggagt ttaccatcgt aaacatgagc 420
 ctctgtttc agcctggaat atacgatagt ggcaatttta tctacagcgt tctcctggac 480
 taccacatat ttacaggacg tgtaacggtg gaagtggaaa aggacacaaa ctatccctgt 540
 ggcatgattc atggactcac tgcttacgga aacatcaacg tagatgaaac catggacaac 600
 gccagcccac acccgcgtgc cgtgggggtgc tttcccagac ccatcgacaa cgaagcgtgg 660
 gcaaacgtta catttactga attggggata ccagacccaa actcatttct cgatgacgag 720
 ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta cccaaatcag 780
 ctgaggcagg ccacaggacc ccagaccctg ttggtgggtg cggttggact cagaatcttg 840
 gcgcaggcat ggaagtttgt cgggtgacgaa acatacgaca ccatccgcgc agaagcaaag 900
 aatttagaga cccacgtacc ctcaagtgct gcagagtcgt ctctagaaaa ccaatcgaca 960
 caggaggagt ctaacagccc cgaagttgcc cacctgcgaa gcgtcaacag cgatgacagt 1020
 acacacacgg ggggtgctgc gaacggcacc caggactgtg acagtcagct caaaactgtg 1080
 tatgcctgct tggctctaат tggactcggc acatgtgcca tgatagggtt gatagtttac 1140
 atttgtgtat taaggtaaaa actgtcctct cggaaattttt cgcgcgcgca aaatgtaaaa 1200
 catagaaatt accagcgact tgagtacggt gcttaa 1236

<210> 16

<211> 801

<212> ДНК

<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

046085

<400> 16
atggttgactg tcttagcagc cctgagctctg ctacagcttgc ttacgagcgc aaccggacgг 60
ctcgcgccag atgaactctg ttatgcccga ccccgagaa ctggcagccc accaaacacc 120
cagcccgaac gccaccggt aatatttgag ccccaaca ttgcgattaa agctgaatcc 180
aagggttggtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat 240
aaggtgaatg cgtccattgc ttgggttttt gactttggcg cttgccggat gcccatcgca 300
tacagagagt attacgggtg tattggcaat gctgttccct cccagagac ttgtgatgcg 360
tactcattta cccttattag gaccgagggt atcgtggagt ttaccatcgt aaacatgagc 420
ctcctgtttc agcctggaat atacgatagt ggcaatttta tctacagcgt tctcctggac 480
taccacatat ttacaggacg tgtaacggtg gaagtggaaa aggacacaaa ctatccctgt 540
ggcatgattc atggactcac tgcttacgga aacatcaacg tagatgaaac catggacaac 600
gccagcccac acccgcggtgc cgtgggggtgc tttcccagc ccatcgacaa cgaagcgtgg 660
gcaaacgtta catttactga attggggata ccagacccaa actcatttct cgatgacgag 720
ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta ccaaatacг 780
ctgaggcagg ccacaggacc c 801

<210> 17
<211> 803
<212> ДНК
<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 17
atggttgactg tcttagcagc tctgagctctg ctacagcttgc ttacgagcgc aaccggacgг 60
ctcgcgccag atgaactctg ttatgcccga ccccgagaa ctggcagccc accaaacacc 120
cagcccgaac gccaccggt aatatttgag ccccaaca ttgcgattaa agctgaatcc 180
aagggttggtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat 240
aaggtgaatg cgtccattgc ttgggttttt gactttggcg cttgccggat gcccatcgca 300
tacagagagt attacgggtg tattggcaat gctgttccct cccagagac ttgtgatgcg 360
tactcattta cccttattag gaccgagggt atcgtggagt ttaccatcgt aaacatgagc 420
ctcctgtttc agcctggaat atacgatagt ggcaatttta tctacagcgt tctcctggac 480
taccacatat ttacaggacg tgtaacggtg gaagtggaaa aggacacaaa ctatccctgt 540
ggcatgattc atggactcac tgcttacgga aacatcaacg tagatgaaac catggacaac 600
gccagcccac acccgcggtgc cgtgggggtgc tttcccagc ccatcgacaa cgaagcgtgg 660
gcaaacgtta catttactga attggggata ccagacccaa actcatttct cgatgacgag 720
ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta ccaaatacг 780

ctgaggcagg ccacaggacc cca	803
<210> 18	
<211> 1206	
<212> ДНК	
<213> Герпесвирус лошадей 1 типа	
<400> 18	
atgatgtacc agccagatag agagcccggg gaagactcgt gtctgggtgct aagctcatct	60
tcgggtccaac gctgcaccgg ctcccagagg ggctgcatgc catgtacctg ggcggcctcc	120
aaagctttcg ttggaatcgg actacaagct tgcgtcctca cttcatcgat cttacacatt	180
gacctgctaa cccggaactc aacatgtctg attctgatga tcatctcgat gtatgtgttg	240
agcctgatcc gcgtaccat atctaagatg gaaactatag taaccgatg tcgatcgata	300
caggcgctgg ccaactctagt ggcagccagt gtctgggtcg cgggatctgc agtcaaaaag	360
gaacatttac ttatagttgt taccgtttgc attttgtttg tgtttatagc cggaactcaa	420
atttccctat tttacgtcat atgctcagcc aatggaacgg ggactcactt tagagcgagc	480
ctattggcta ttatcgggtg atgtgtgcta ggggtttccg taaagctcgt tgagctgaaa	540
gatgtacca tagggatagg gatagctatc gctattatag cttcctgtca agactttggg	600
cttgctcttc gagacacatg ccaactatcga atcggacggg atgcgtgcat gcgcaccttt	660
acggaccttg gccgggggat taactacaga tgggtgacgg acgttgaagc cgtccccaa	720
atcgaagaag tcgcggaaga aaaggtttgc ctgttcaagt ttttcaagga gatgccgggg	780
gtgattttct ccccagcggg cggaactcac gcaaccccc taatatggat cgtcctacgc	840
ttgggtctac gaatttccaa cgtgtggcaa accccggcgt atgttgtctt ctgtctgact	900
gttggacacg tctctcgat gctgctggag cagcttgtca tcagagtaaa ctacacggca	960
gaggcgagtt ccggcatcca ctccacggcc cacgctgtct gcatgggtgct tgccgccttt	1020
gggtacggcg tggccgggtc cctctcgctc gcatttactg tatccggggg tatactgggg	1080
gcgctatacc ttcgcaagcg cgcaacgggc gcgcgccgcc tggcggcaac tcacatttcg	1140
aggtggctta ttgtttgtgt atatgttgcc gccggtttgt gttatgcaac tataatcaca	1200
cattaa	1206
<210> 19	
<211> 226	
<212> ДНК	
<213> Герпесвирус лошадей 1 типа	
<400> 19	
gtataccatg cttgctatac tgaaaataaa aacgcatatt gtaaaccgaca gacgcggaaa	60
tgtttattgc ttagtttcac tatttgggta aaactattta cactttaga aacacgcca	120
ctaagtattt gttttatgac taatacctgg tgcataaaac catcctcttg ggtccctgta	180

cctcaaactc tccaaagggtt ggcttgctac atcaaggtta tcaatc 226

<210> 20
 <211> 305
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 20
 accccggcgt atgttgtctt ctgtctgact gttggacacg tctctgcgat gctgctggag 60
 cagcttgtca tcagagtaaa ctacacggca gaggcgagtt ccggcatcca ctccacggcc 120
 cacgctgtct gcatgggtgt tgcgccttt gggtagggcg tggccgggtcc cctctcgctc 180
 gcatttactg tatccggggg tatactgggg gcgctatacc ttcgcaagcg cgcaacgggc 240
 gcgcgccgcc tggcggcaac tcacatttcg aggtggctta ttgtttgtgt atatgttgcc 300
 gccgg 305

<210> 21
 <211> 870
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 21
 atgatgtacc agccagatag agagcccggg gaagactcgt gtctgggtgct aagctcatct 60
 tcggtccaac gctgcaccgg ctcccagagg ggctgcatgc catgtacctg ggcggcctcc 120
 aaagcttttcg ttggaatcgg actacaagct tgcgtcctca cttcatcgat cttacacatt 180
 gacctgctaa cccggaactc aacatgtctg attctgatga tcatctcgat gtatgtgttg 240
 agcctgatcc gcgtaccat atctaagatg gaaactatag taaccgatg tcgatcgata 300
 caggcgtg ccaactctagt ggcagccagt gtctgggtcg cgggatctgc agtcaaaaag 360
 gaacatttac ttatagttgt taccgtttgc attttgtttg tgtttatagc cggaactcaa 420
 atttccctat tttacgtcat atgctcagcc aatggaacgg ggactcactt tagagcgagc 480
 ctattggcta ttatcgggtg atgtgtgcta ggggtttccg taaagctcgt tgagctgaaa 540
 gatgtacca tagggatagg gatagctatc gctattatag cttcctgtca agactttggg 600
 cttgctcttc gagacacatg ccaactatoga atcggacggg atgctgcat gcgcaccttt 660
 acggaccttg gccgggggat taactacaga tgggtgacgg acgttgaagc cgtccccaag 720
 atcgaagaag tcgcggaaga aaaggtttcg ctgttcaagt ttttcaagga gatgccgggg 780
 gtgattttct cccagcggg cggaactcac gcaacccccca taatatggat cgtcctacgc 840
 ttggtctacg gaatttcaa cgtgtggcaa 870

<210> 22
 <211> 336
 <212> ДНК

<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 22

```

accccggcgt atgttgtctt ctgtctgact gttggacacg tctctgcat gctgctggag      60
cagcttgtca tcagagtaaa ctacacggca gaggcgagtt ccggcatcca ctccacggcc      120
cacgctgtct gcatggtgct tgccgccttt gggtacggcg tggccggtcc cctctcgctc      180
gcatttactg tatccggggg tatactgggg gcgctatacc ttcgcaagcg cgcaacgggc      240
gcgcgccgcc tggcggcaac tcacatttcg aggtggctta ttgtttgtgt atatgttgcc      300
gccggtttgt gttatgcaac tataatcaca cattaa                                  336

```

<210> 23

<211> 1206

<212> ДНК

<213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 23

```

atgatgtacc agccagatag agagcccggg gaagactcgt gtctgggtgct aagctcatct      60
tcgggccaaac gctgcaccgg ctcccagagg ggtgcatgc catgtacctg ggcggcctcc      120
aaagctttcg ttggaatcgg actacaagct tgcgtcctca cttcatcgat cttacacatt      180
gacctgctaa cccggaactc aacatgtctg attctgatga tcatctcgat gtatgtggtg      240
agcctgatcc gcgtaccat atctaagatg gaaactatag taaccgatg tcgatcgata      300
cagggcgtgg ccaactctagt ggcagccagt gtctgggtcg cgggatctgc agtcaaaaag      360
gaacatttac ttatagttgt taccgtttgc attttgtttg tgtttatagc cggaaactcaa      420
atttccctat tttacgtcat atgctcagcc aatggaacgg ggactcactt tagagcgagc      480
ctattggcta ttatcgggtg atgtgtgcta ggggtttccg taaagctcgt tgagctgaaa      540
gatgtacca tagggatagg gatagctatc gctattatag cttcctgtca agactttggg      600
cttgctcttc gagacacatg ccaactatcga atcggacggg atgcgtgcat gcgcaccttt      660
acggaccttg gccgggggat taactacaga tgggtgacgg acgttgaagc cgtccccaaag      720
atcgaagaag tcgcggaaga aaaggtttcg ctgttcaagt ttttcaagga gatgccgggg      780
gtgattttct ccccagcggg cggaaactcac gcaaccccc taatatggat cgtcctacgc      840
ttgggtctacg gaatttccaa cgtgtggcaa accccggcgt atgttgtctt ctgtctgact      900
gttggacacg tctctgcat gctgctggag cagcttgtca tcagagtaaa ctacacggca      960
gaggcgagtt ccggcattca ctccacggcc caogetgtct gcatggtgct tgccgccttt      1020
gggtacggcg tggccgctcc cctctcgctc gcatttactg tatccggggg tatactgggg      1080
gcgctatacc ttcgcaagcg cgcaacgggc gcgcgccgcc tggcggcaac tcacatttcg      1140
aggtggctta ttgtttgtgt atatgttgcc gccggtttgt gttatgcaac tataatcaca      1200
cattaa                                  1206

```

<210> 24
 <211> 870
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 24
 atgatgtacc agccagatag agagcccggg gaagactcgt gtctgggtgct aagctcatct 60
 tcggtccaac gctgcaccgg ctcccagagg ggctgcatgc catgtacctg ggcggcctcc 120
 aaagctttcg ttggaatcgg actacaagct tgcgtcctca cttcatcgat cttacacatt 180
 gacctgctaa cccggaactc aacatgtctg attctgatga tcatctcgat gtatgtgttg 240
 agcctgatcc gcgtaccat atctaagatg gaaactatag taaccgtatg tcgatcgata 300
 cagggcgtgg ccaactctagt ggcagccagt gtctgggtcg cgggatctgc agtcaaaaag 360
 gaacatttac ttatagttgt taccgtttgc attttgtttg tgtttatagc cggaactcaa 420
 atttccctat tttacgtcat atgctcagcc aatggaacgg ggactcactt tagagcgagc 480
 ctattggcta ttatcgggtg atgtgtgcta ggggtttccg taaagctcgt tgagctgaaa 540
 gatgtacca tagggatagg gatagctatc gctattatag cttcctgtca agactttggg 600
 cttgctcttc gagacacatg ccaactatcga atcggacggg atgcgtgcat gcgcaccttt 660
 acggaccttg gccgggggat taactacaga tgggtgacgg acgttgaagc cgtccccaa 720
 atcgaagaag tcgcggaaga aaaggtttcg ctgttcaagt ttttcaagga gatgccgggg 780
 gtgattttct cccagcggg cggaactcac gcaaccccc taatatggat cgtcctacgc 840
 ttggtctacg gaatttccaa cgtgtggcaa 870

<210> 25
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 25
 accccggcgt atgttgtctt ctgtctgact gttggacacg tctctgcgat gctgctggag 60
 cagcttgtca tcagagtaaa ctacacggca gaggcgagtt ccggcattca ctccacggcc 120
 cacgctgtct gcatgggtgct tgccgccttt gggtaacggc tggccgctcc cctctcgctc 180
 gcatttactg tatccggggg tatactgggg gcgctatacc ttcgcaagcg cgcaacgggc 240
 gcgcgccgcc tggcggcaac tcacatttcg aggtggctta ttgtttgtgt atatgttgcc 300
 gccggtttgt gttatgcaac tataatcaca catta 336

<210> 26
 <211> 226
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 1 типа

046085

<400> 26
 gtataccatg cttgctatac tgaaaataaa aacgcatatt gtaaaccgaca gacgcggaaa 60
 tgtttattgc ttagtttcac tatttgggta aaactattta cacttgtaga aacacgcccc 120
 ctaagtattt gttttatgac taatacctgg tgcataaaac catcctcttg ggtccctgta 180
 cctcaaactc tccaaagggt ggcttgctac atcaaggta tcaatc 226

<210> 27
 <211> 305
 <212> ДНК
 <213> Герпесвирус лошадей 1 типа

<400> 27
 accccggcgt atgttgtctt ctgtctgact gttggacacg tctctgcgat gctgctggag 60
 cagcttgtca tcagagtaaa ctacacggca gaggcgagtt ccggcattca ctccacggcc 120
 cacgctgtct gcatgggtgct tgccgccttt gggtagcggcg tggccgctcc cctctcgctc 180
 gcatttactg tatccggggg tatactgggg gcgctatacc ttcgcaagcg cgcaacgggc 240
 gcgcgccgcc tggcggcaac tcacatttcg aggtggctta ttgtttgtgt atatgttgcc 300
 gccgg 305

<210> 28
 <211> 5191
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеотидная последовательность трансферного вектора pU70-p455-71K71

<400> 28
 caataaacgc ggtatgtcta cttcaagcc tatgatgaac ggatgtttg tgtttgcggc 60
 tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcgtgt 120
 ggttcgggat cctagggata acagggtaat cgatttattc aacaaagcca cgtttgtgtct 180
 caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaactg 240
 tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct 300
 tgctcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct 360
 cgcgataatg tcgggcaatc aggtgogaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg 420
 ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaagggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg 480
 gtcagactaa actggctgac ggaatztatg cctcttcoga ccatcaagca ttttatccgt 540
 actcctgatg atgcatgggt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta 600
 ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcbc 660
 cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc 720
 gctcaggcgc aatcacgaat gaataacgggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag 780

cgtaatggct	ggcctggtga	acaagtctgg	aaagaaatgc	ataagctttt	gccattctca	840
ccggattcag	tcgtcactca	tggtgatttc	tcacttgata	accttatttt	tgacgagggg	900
aaattaatag	gttgatttga	tgttggacga	gtcggaatcg	cagaccgata	ccaggatctt	960
gccatcctat	ggaactgcct	cggtgagttt	tctccttcat	tacagaaacg	gctttttcaa	1020
aaatatggta	ttgataatcc	tgatatgaat	aaattgcagt	ttcatttgat	gctcgatgag	1080
tttttctaaa	ataaacgcgg	tatgtctacc	ttcaagccta	tgatgaacgg	atgtttggtg	1140
tttgcggtca	ttataacgct	cttgagtttt	atgctatctc	tgggaacatg	cgaaaattac	1200
aggcgtgtgg	ttcgggatcc	gaccctgttg	gtgggtgcgg	ttggactcag	aatcttgccg	1260
caggcatgga	agtttgtcgg	tgacgaaaca	tacgacacca	tccgcgcaga	agcaaagaat	1320
ttagagacc	acgtaccctc	aagtgctgca	gagtcgtctc	tagaaaacca	atcgacacag	1380
gaggagtcta	acagccccga	agttgcccac	ctgcgaagcg	tcaacagcga	tgacagtaca	1440
cacacggggg	gtgcgtcgaa	cggcatccag	gactgtgaca	gtcagctcaa	aactgtgtat	1500
gcctgcttgg	ctctaattgg	actcggcaca	tgtgccatga	tagggttgat	agtttacatt	1560
tgtgtattaa	ggtcaaaaact	gtcctctcgg	aatttttcgc	gcgcgcaaaa	tgtaaaacat	1620
agaaattacc	agcgacttga	gtacgttgct	taagcttggc	gtaatcatgg	tcatagctgt	1680
ttcctgtgtg	aaattgttat	ccgctcacia	ttccacacia	catacgagcc	ggaagcataa	1740
agtgtaaagc	ctgggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	attaattgcg	ttgcgctcac	1800
tgcccgcctt	ccagtcggga	aacctgtcgt	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	1860
cggggagagg	cggtttgctg	attgggcgct	cttccgcttc	ctcgctcact	gactcgctgc	1920
gctcggctcgt	tcggctgcgg	cgagcgggat	cagctcactc	aaaggcggta	atacggttat	1980
ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	2040
ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	2100
atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	ggcgaaacc	gacaggacta	taaagatacc	2160
aggcgtttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	2220
gatacctgtc	cgcttttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	2280
ggtatctcag	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaacccccg	2340
ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaaagc	2400
acgacttata	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggatgttag	2460
gcggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	2520
ttggatatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	2580
ccggcaaaaca	aaccaccgct	ggtagcggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	2640

gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 2700
ggaacgaaaa ctcacgtaa gggatthttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 2760
agatcctttt aaattaaaaa tgaagthttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaaactt 2820
ggctctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcatc tgtctatthtc 2880
gttcatccat agttgctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 2940
catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctaccggct ccagatttat 3000
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actthtatccg 3060
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagthtc ccagthtaata 3120
gtthgcaaa cgtthgtgca attgctacag gcatcgtggg gtcacgctcg tctthttgta 3180
tggcttcatt cagctccggg tccccacgat caagggcaggt tacatgatcc cccatgttht 3240
gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggctctc cgatcgttht cagaagtaag ttggccgcag 3300
tgttatcact catggttatg gcagcaactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 3360
gatgctthtc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgccc 3420
gaccgagtht ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 3480
taaaagtgtc catcattgga aaacgtthct cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 3540
tgttgagatc cagthctgat taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctthta 3600
ctthcaccag cgtthctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgcccga aaaaagggaa 3660
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt thttcaatat tattgaagca 3720
thtatcaggg thattgtctc atgagcggat acataththga atgtaththag aaaaataaac 3780
aaataggggt tccgcgcaca thtccccgaa aagthccacc tgacgtctaa gaaaccatta 3840
thtatcatgac athaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctthctg ctccgcgctt 3900
tccgtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagctthtc 3960
tgaagcggg tgcggggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gthggcgggt 4020
gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagathgt actgagagtg caccatathgc 4080
ggthtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcagggc cattcggccat 4140
tcaggctgca caactgthgg gaagggcgat cggthcgggc ctcttctgta thacggcagc 4200
tggcgaaaag gggatgtgct gcaagggcat taagthgggt aacgccaggg thttcccagth 4260
cacgacgtht taaaacgacg gccagthgat tctctcaggt accccagagg agthaththgaa 4320
aagthccacc tgcgaactac tgaagataat thcaacgctc aagataaatc cggaggagth 4380
tctctgagac cccgggtcga ggctcgtgca cggatacath gagthathcta gactcagagc 4440
caagccctac acgcgctacc cctgctthca acgcgthcaac ctgcacathg acggggagth 4500
tctggthcac aagathctag cgtthcaatgc cgcgathcgc ccatcggccc aggagctgct 4560

gtcataccca atgtttgctc aacttttagga tgactaacct gtttctggga ggagacagcg 4620
 tgggcgacgg tgtataaagt tggctctgctt tcaagccctg ccaactgcgct acagtgccac 4680
 caactgtaaa gcggtagtaa gctgcagtggtg tgcactgggtg gtagcatata ctaccttatt 4740
 tatacgctcc gagctgtttt tcagcatgct agcaccacaac gccgagcgag agtatataac 4800
 tcccatcatt gcccaacaagc ttatgccact tattagcgtc cgctctgccg tttgcttagt 4860
 cataatatct accgccgttt acgcagcaga cgctatctgc gacacaattg gatttgcgat 4920
 accgcgcatg tggatgtgta ttttaatgag atcaacctcc atgaagcgta actagggggc 4980
 ctcccactga ggcactaccg gcttagcagc tgactaacac agtataaaac gtgagaagaa 5040
 atcagtctca tgcgccatta gcgctaggct agttagcgtg gaggaccgga gcgctaccgc 5100
 cagcagtttc atccgcctgg ttacggggtt gttaacacct accggtgttt taccgctacc 5160
 ataggatccg atccatgggc ggccgcggta c 5191

<210> 29

<211> 6892

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды рU70-р455-Н3-71К71

<400> 29

caataaacgc ggtatgtcta ccttcaagcc tatgatgaac ggatgtttgg tgtttgcggc 60
 tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcgtgt 120
 ggttcgggat cctagggata acagggtaat cgatttattc aacaaagcca cgttgtgtct 180
 caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaaactg 240
 tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct 300
 tgctcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct 360
 cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg 420
 ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaagggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg 480
 gtcagactaa actggctgac ggaatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt 540
 actcctgatg atgcatgggt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta 600
 ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc 660
 cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc 720
 gctcagggcg aatcacgaat gaataacgggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag 780
 cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca 840
 ccgattcag tcgtcactca tggtgatttc tcaactgata accttatttt tgacgagggg 900

aaattaatag gttgtattga tgttggacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt 960
gccatcctat ggaactgcct cgggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa 1020
aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag 1080
tttttctaaa ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg atgtttggtg 1140
tttgcggtta ttataacgct cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg cgaaaattac 1200
aggcgtgtgg ttcgggatcc gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg 1260
caggcatgga agtttgcgg tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat 1320
ttagagacc acgtaccctc aagtgcgtgca gagtgcgtctc tagaaaacca atcgacacag 1380
gaggagtcta acagccccga agttgcccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca 1440
cacacggggg gtgcgtcgaa cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat 1500
gcctgcttgg ctctaattgg actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt 1560
tgtgtattaa ggtcaaaact gtcctctcgg aatTTTTcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat 1620
agaaattacc agcgacttga gtacgttgct taagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt 1680
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa 1740
agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac 1800
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 1860
cggggagagg cggtttgcgt attgggogct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgtctc 1920
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 1980
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2040
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc 2100
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc 2160
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 2220
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 2280
ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgt ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 2340
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc 2400
acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 2460
gcggtgctac agagtctctg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 2520
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat 2580
ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 2640
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 2700
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 2760

agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt 2820
 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc 2880
 gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 2940
 catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat 3000
 cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg 3060
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 3120
 gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggg gtcacgctcg tcgtttggta 3180
 tggcttcatt cagctccggg tcccacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 3240
 gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 3300
 tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 3360
 gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 3420
 gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 3480
 taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 3540
 tgttgagatc cagttcgatg taaccctctc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta 3600
 ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgcccga aaaaagggaa 3660
 taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca 3720
 tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 3780
 aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta 3840
 ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctcgcgctt 3900
 tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc 3960
 tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt 4020
 gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatattg 4080
 ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc cattcgccat 4140
 tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc 4200
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 4260
 cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tctccgagt accccagagg agtatgtgaa 4320
 aagctgccac tcgcaactac tgaagataat ttcaacgctc aagataaatc cggaggagt 4380
 tcctcgagac cccgggtcga ggctcgtgcg cggatacatc gagtattcta gactcgagcg 4440
 caagccctac acgcgctacc cctgctttca acgcgtcaac ctgcacattg acggggagtt 4500
 tctggttcac aagatgctag cgttcaatgc cgcgatgcmc ccatcgcccg aggagctgct 4560
 gtcataacca atgtttgctc aactttagga tgactaacct gtttctggga ggagacagcg 4620
 tgggcgacgg tgtataaagt tggctcgtt tcaagccctg ccactgcgct acagtgccac 4680

caactgtaaa gcggtagtaa gctgcagtgg tcgactgggtg gtagcatata ctaccttatt 4740
 tatacgctcc gagctgtttt tcagcatgct agcaccacaac gccgagcagag agtatataac 4800
 tcccatcatt gccacaago ttatgccact tattagcgtc cgctctgccg tttgcttagt 4860
 cataatatct accgccgttt acgcagcaga cgctatctgc gacacaattg gatttgcgat 4920
 accgcgcatg tggatgtgta ttttaatgag atcaacctcc atgaagcgtg actagggggc 4980
 ctcccactga ggcactaccg gcttagcagc tgactaacac agtataaac gtgagaagaa 5040
 atcagtctca tgcgccatta gcgctaggct agttagcgtg gaggaccgga gcgctaccgc 5100
 cagcagtttc atccgcctgg ttacgggttt gttaacacct accggtgttt taccgctacc 5160
 ataggatccg atccatgggc ggccgcatga agaccgtgat cgccctgagt tacatcttct 5220
 gcctgggtgtt tgggcaggac ctccctggta aaggcaaca caccggccacg ctgtgccttg 5280
 ggcaccacgc cgtgccgaac ggcacccttg tgaaaactat taccgacgat cagatcgagg 5340
 tgaccaacgc caccgaactg gttcagaatt ttagcatggg caaaatttgc aataaccgcg 5400
 accgcattct ggacggggcc aactgcacgc tgatcgattc attgctgggt gatccccact 5460
 gcgatggctt tcaaaacgaa aagtgggact tgttcatcga acgcagcaag gcattcagca 5520
 actgctacco atacgacgtg cccgaataca ccagcctgcg aagcctgatc gcgagctctg 5580
 ggaccctgga gttcaccaat gagaacttca attggaccgg agtgacccaa aacggtggct 5640
 ccagcgcctg taaaagggga cccaataaca gtttctttag caagttgaat tggctttaca 5700
 agagcggcaa tacttaccgc atggtgaatg tgaccatgcc caacagtgac gactttgata 5760
 aactgtacat atggggcgtg caccatocca gcacggaccg cgaacagata aacctgtacg 5820
 tgcaggccag cgggaagata atcgtgagca ccaagcgcag ccagcagacc atcattccca 5880
 acattggcag ccgaccgtgg gtgcgcggtc tgagctcccg catcagcata tactggacca 5940
 ttgtcaagcc gggagacatc ctgatcatca actctaattg caatcttatc gccccacgcg 6000
 gctacttcaa gatgcagacc ggcaaaagca gtgtgatgag gagcgcgccc cccatcgaca 6060
 cctgcaatag cgaatgcate acccccaatg gcagcatccc caacgacaag cctttccaga 6120
 acgtgaataa gatcacctac ggcgcgtgcc ccaagtacat caagcagaac accctgaagc 6180
 tggccaccgg catgcgcaac atccccgagc gacagacacg gggcattttt ggcgcaatcg 6240
 cagggttcat tgagaatggc tgggagggaa tggttaacgg ctggtacggc ttccgccatc 6300
 agaactctga aggaatcggc caagctgcgg atctgaagtc cacgcaagca gccatcaacc 6360
 agatcaacgg caagcttaac cgcgtgattg aaaagacgaa cgagaaattc caccaaatag 6420
 agaaagaatt cagcagagtg gagggccgca tccaagacct cgagcgtac gtggaggaca 6480
 ccaagatcga cctgtggagc tacaatgccg agctcctggg cgccctggaa aaccaacaca 6540

046085

ccattgacct gaccgacagc gagatgaata aactcttcga gaagacccgg aagcaactcc 6600
gagagaacgc cgaagacatg ggtaatgggt gttttaagat ctaccacaag tgcgacaata 6660
gctgcatgga gagcatccga aacggaacct acgaccacaa cgagtaccgc gatgaggcag 6720
ttaataaccg cttccaaatc aaaagcgtgg aactgaagag tggctataag gactggatac 6780
tgtggatcag ctttgccata agctgcttcc tgctgtgccc cgtttggttg ggtttcatca 6840
tgtgggcctg tcaaaagggc aatattcgct gtaacatctg catttgaggt ac 6892

<210> 30

<211> 4977

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность трансферного вектора рU-1-3-р430-
BGHKBGH

<400> 30

cctgtgcctt ctagttgcca gccatctggt gtttgcccct cccccgtgcc ttccttgacc 60
ctggaaggtg ccactcccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt 120
ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat 180
tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggatcc tagggataac 240
agggtaatcg atttattcaa caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg 300
cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata 360
caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt 420
ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag 480
gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatgccc agagttggtt ctgaaacatg 540
gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt cagactaac tggtgacgg 600
aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac 660
tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat cctgattcag 720
gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtggt tctgcccgg gttgcattcg attcctgttt 780
gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttogtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga 840
ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctggtgaac 900
aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg 960
gtgatttctc acttgataac cttatTTTTT acgaggggaa attaataggt tgtattgatg 1020
ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg 1080
gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg 1140
atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt tttctaacca tggctgtgcc 1200

ttctagttgc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctcccccggtg	ccttccttga	ccctggaagg	1260
tgccactccc	actgtccttt	cctaataaaa	tgaggaaatt	gcatcgcatt	gtctgagtag	1320
gtgtcattct	attctggggg	gtggggtggg	gcaggacagc	aagggggagg	attgggaaga	1380
caatagcagg	catgctgggg	atgcggtggg	ctctatggat	ccgaccctcc	ccggggctaa	1440
aaagctgcgt	cttcacgccc	gaggcgctta	ttgcccactg	ggtacggggc	gcgcttttat	1500
atgtgtaacg	tcccaccggt	gtgacgcacg	tactacgggt	gttctaaata	gctgtccccg	1560
tgattgcctc	ggctgcacac	atcgccatag	tttccgcggt	gcctgggtgtc	gagggcccac	1620
ccctgtaacc	aacatcgatg	ggggcctgct	gctccttcgc	taccttagga	ccgttatagt	1680
tacgtcaagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	1740
cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaattg	1800
agtgagctaa	ctcacattaa	ttgcggttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	1860
gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcca	acgcgcgggg	agaggcgggt	tgcgtattgg	1920
gcgctcttcc	gcttcctcgc	tactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	1980
ggtatcagct	caactcaaag	cggtaatagc	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	2040
aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	2100
ggcgtttttc	cataggetcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	2160
gaggtggcga	aaccgcagac	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	2220
cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgcccgt	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	2280
gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	2340
tcgctccaag	ctgggctgtg	tgacagcaac	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttatac	2400
cggtaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	2460
cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcgggt	gctacagagt	tcttgaagtg	2520
gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	atctgcgctc	tgctgaagcc	2580
agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	2640
cgggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	2700
tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgaocg	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	2760
tttggctcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaatt	aaaaatgaag	2820
ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttgggtct	gacagttacc	aatgcttaat	2880
cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcggtca	tccatagttg	cctgactccc	2940
cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	3000
accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	3060
ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcta	ttaattggtg	3120

ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 3180
 tacaggcatc gtgggtgtcac gctcgtcgtt tgggatggct tcattcagct ccggttccca 3240
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg 3300
 tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgta tcaactcatgg ttatggcagc 3360
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 3420
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgctc 3480
 aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 3540
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc 3600
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 3660
 aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggataaagg gcgacacgga aatggtgaat 3720
 actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 3780
 cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc 3840
 ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa 3900
 taggcgtatc acgaggccct ttcgtctcgc gcgtttcggg gatgacggtg aaaacctctg 3960
 acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca 4020
 agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc 4080
 atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcgggtg gaaataccgc acagatgcgt 4140
 aaggagaaaa taccgcatca ggcgcattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg 4200
 gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag 4260
 gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag 4320
 tgaattcgac gtaactataa cggctctaag gtagegaatt tttccattgg gccctccct 4380
 tttggctctg ggtatttagc ttccctcca cttctcattc cactttctcc acctgcacct 4440
 tttccatctc ctctccaact cgccgccatg agaccgagg gagtttcgcg gggccgcgcc 4500
 tcctctgtct ccatctccaa ctagtgtcga cctctatctg aggaccgcc gagtacccca 4560
 caagagtatg taaaaagctg tcattctcaa ctactgagaa taatatcaa gctaaagata 4620
 aaccctgagg agtttccacg ggaaccagag tctaggctcg tgcgcggata catcgaatac 4680
 gccagcctag agcgtaaacc acatacgcgc tatecttgct tccagcgcgt gaacctacac 4740
 attgacgggg aatTTTTgat ccataaaatg ctagegttca atgctgcgat gcgcccattc 4800
 gcagaagagt tgttgtccta cccaatgttt atgaatctgt aggatgacta acagatttgg 4860
 ggtggagacg gcgtgggcga tactgtataa agttgtacta cttaccagcc cagtcagtg 4920
 gctgtagtgc caccacctgt aaagctgtga taagctgcag ttgcggccgc cgggtac 4977

<210> 31
 <211> 6678
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU1-3-p430-Hlav-BGHKBGH

<400> 31

cctgtgcctt ctagttgcca gccatctggt gtttgccct cccccgtgcc ttccttgacc	60
ctggaagggtg ccactcccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt	120
ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat	180
tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggatcc tagggataac	240
agggtaatcg atttattcaa caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg	300
cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata	360
caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt	420
ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag	480
gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatgcgcc agagtgttt ctgaaacatg	540
gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt cagactaaac tggctgacgg	600
aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac	660
tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat cctgattcag	720
gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtggt tcctgcgccg gttgcattcg attcctgttt	780
gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga	840
ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctgttgaac	900
aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcaactcatg	960
gtgatttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa attaatagggt tgtattgatg	1020
ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg	1080
gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg	1140
atatgaataa attgcagttt cttttgatgc tcgatgagtt tttctaacca tggctgtgcc	1200
ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccctggaagg	1260
tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag	1320
gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attggaaga	1380
caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggat ccgaccctcc ccggggctaa	1440
aaagctgctg cttcacgccc gaggcgctta ttgcccactg ggtacggggc gcgcttttat	1500
atgtgtaacg tcccaccggt gtgacgcacg tactacgggt gttctaaata gctgtccccg	1560

tgattgcctc	ggctgcacac	atcgcttagg	tttccgccgt	gcctggtgtc	gagggccac	1620
ccctgtaacc	aacatcgatg	ggggcctgct	gctccttcgc	taccttagga	ccgttatagt	1680
tacgtcaagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	1740
cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaattg	1800
agtgagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgog	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	1860
gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcca	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgtattgg	1920
gcgctcttcc	gcttcctcgc	tactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	1980
ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	2040
aaagaacatg	tgagcaaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	2100
ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	2160
gaggtggcga	aaccgcacag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	2220
cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgcccgt	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	2280
gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcaag	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	2340
tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttatc	2400
cggtaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	2460
cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcgggt	gctacagagt	tcttgaagtg	2520
gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	atctgcgctc	tgctgaagcc	2580
agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	2640
cgggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaggat	ctcaagaaga	2700
tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	2760
tttggctcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaatt	aaaaatgaag	2820
ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttggctc	gacagttacc	aatgcttaat	2880
cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	tccatagttg	cctgactccc	2940
cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	3000
accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	3060
ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgctcc	atccagtcta	ttaattgttg	3120
ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	3180
tacaggcatc	gtgggtgtcac	gctcgtcggt	tggtatggct	tcattcagct	ccggttccca	3240
acgatcaagg	cgagttacat	gatccccat	gttgtgcaaa	aaagcggtta	gctccttcgg	3300
tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgta	tcactcatgg	ttatggcagc	3360
actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	ttttctgtga	ctggtgagta	3420
ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	agttgctctt	gccccgcgtc	3480

aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	gtgctcatca	ttggaaaacg	3540
ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctggtg	agatccagtt	cgatgtaacc	3600
cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcadc	ttttactttc	accagcgttt	ctgggtgagc	3660
aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	gcgacacgga	aatggtgaat	3720
actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	cagggttatt	gtctcatgag	3780
cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	ggggttccgc	gcacatttcc	3840
ccgaaaagtg	ccacctgacg	tctaagaaac	cattattatc	atgacattaa	cctataaaaa	3900
taggcgtatc	acgaggccct	ttcgtctcgc	gcgtttcggg	gatgacggtg	aaaacctctg	3960
acacatgcag	ctcccggaga	cggtcacagc	ttgtctgtaa	gcggatgccg	ggagcagaca	4020
agcccgtcag	ggcgcgtcag	cgggtggttg	cgggtgtcgg	ggctggctta	actatgcggc	4080
atcagagcag	attgtactga	gagtgcacca	tatgcgggtg	gaaataccgc	acagatgcgt	4140
aaggagaaaa	taccgcatca	ggcgccattc	gccattcagg	ctgcgcaact	gttgggaagg	4200
gcgatcggtg	cgggcctctt	cgctattacg	ccagctggcg	aaagggggat	gtgctgcaag	4260
gcgattaagt	tgggtaacgc	cagggttttc	ccagtcacga	cgttgtaaaa	cgacggccag	4320
tgaattcgac	gtaactataa	cggtcctaag	gtagcgaatt	tttccattgg	gcccctccct	4380
tttggtctctg	ggtattttagc	ttccctccca	cttctcattc	cactttctcc	acctgcacct	4440
tttccatctc	ctctccaact	cgccgcoatg	agacccgagg	gagtttcgcg	gggccgcgcc	4500
tcctctgtct	ccatctccaa	ctagtgtcga	cctctatttg	aggaccgcc	gagtacccca	4560
caagagtatg	taaaaagctg	tcattctcaa	ctactgagaa	taatataaaa	gctaaagata	4620
aaccctgagg	agtttccacg	ggaaccagag	tctaggctcg	tgcgcggata	catcgaatac	4680
gccagcctag	agcgtaaagc	acatacgcgc	tatccttgct	tccagcgcgt	gaacctacac	4740
attgacgggg	aatttttgat	ccataaaatg	ctagcgttca	atgctgcgat	gcgcccattc	4800
gcagaagagt	tgttgccta	cccaatgttt	atgaatctgt	aggatgacta	acagatttgg	4860
ggtggagacg	gcgtgggcga	tactgtataa	agttgtacta	cttaccagcc	cagtcagtgt	4920
gctgtagtgc	caccacctgt	aaagctgtga	taagctgcag	ttgcggccgc	cgatggaggc	4980
aaaattgttc	gtgctgttct	gcgccttcac	tgctctgaag	gcagacacca	tctgcgtggg	5040
ttaccacgcc	aataattcca	ccgacacggt	ggataccatc	ctggagaaga	acgtgaccgt	5100
gactcattcc	gtgaacctct	tggagaactc	acacaatggt	aaattgtgca	gccttaacgg	5160
caaagccccg	ctgcaattgg	ggaattgtaa	cgtggccgga	tggatactgg	ggaacccccg	5220
gtgcgacctt	ctcctgaccg	ccaacagttg	gtcctacatc	attgagacga	gcaacagcaa	5280
gaatggcgcc	tgctatcctg	gggagttcgc	tgactacgag	gagctgcgcg	agcagttgtc	5340

046085

tacagtcagc agcttcgaaa gattcgagat cttcccaaag gccactagct ggcccaacca 5400
 cgatactacc aagggcacta cagtgagttg cagccacagc ggtgccaata gcttctaccg 5460
 caacctgctg tggatcgtga agaagggtaa cagctacccc aagctgagca aatcttacac 5520
 aaacaacaaa ggcaaagagg tgttggttat ctggggcgtg catcatcccc caaccgactc 5580
 cgatcagcaa accctgtacc agaacaacca cacctacgtg agcgtcggta gctctaagta 5640
 ttaccagcgc ttcacccccg aaatcgtcgc acgaccgaag gtgagagggc aggccgggag 5700
 aatgaactac tactggacce tgctggatca aggcgacact attaccttcg aggctaccgg 5760
 caacttgatc gccccgtggc acgcgttcgc cctcaataaa ggatctaata gcggcataat 5820
 gatgagtgat gccacgtgc ataactgcac cacgaagtgc cagaccctc acggcgcact 5880
 gaaaagcaat ctgcccttc agaatgtgca ccccatcacc atcggcgagt gcccgaagta 5940
 tgttaaaagc actcagctcc gcatggccac cggactgcgc aacatcccga gcatccaatc 6000
 ccgcgactg ttcggcgcaa tcgcgggctt tatagagggc ggctggaccg gcatgatcga 6060
 cggctggtac ggctaccacc atcaaaatga gcaaggttcc ggctacgccg cagaccagaa 6120
 gagcacccaa atagcaatcg atggcatctc caacaaggtg aacagcgtga tcgaaaagat 6180
 gaacatccag ttcacaagcg tggggaagga gttcaataac ctggaaaagc gcatcgagaa 6240
 tctgaacaag aaggttgacg atgggttctt cgatgtctgg acctataacg ccgagctcct 6300
 gatactgctt gagaacgagc gcaccctgga cttccacgac ttcaacgtga aaaacctgta 6360
 cgaaaaggtc aagtcacagt tgcgaaacaa tgcgaaggag ataggcaacg gctgcttcga 6420
 gttctatcac aagtgtgaca acgagtgcac ggagagcgtc aagaacggca cttacaacta 6480
 cccgcgctac tctgaggaga gtaagctcaa ccgcgaagag attgacggcg tgaaactgga 6540
 aagcgttggt gtccatcaga tcttgccat ctacagcacc gtggctagct ctctggttct 6600
 gttggtgagc ctgggcgcta taagcttttg gatgtgttct aatgggagcc tgcagtgccg 6660
 catctgcatc tgaggtag 6678

<210> 32

<211> 6892

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU70-p455-H1pdm-71K71

<400> 32

caataaacgc ggtatgtcta cttcaagcc tatgatgaac ggatgtttg tgtttgcggc 60
 tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcgtgt 120
 ggttcgggat cctagggata acagggtaat cgatttattc aacaaagcca cgttgtgtct 180

caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaaactg	240
tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct	300
tgctcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct	360
cgcgataatg tccgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg	420
ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg	480
gtcagactaa actggctgac ggaatztatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt	540
actcctgatg atgcatgggt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta	600
ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc	660
cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt ctttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc	720
gctcagggcg aatcacgaat gaataacgggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag	780
cgtaatggct ggctgttgga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca	840
ccggattcag tcgtcactca tgggtgatttc tcaattgata accttatttt tgacgagggg	900
aaattaatag gttgtattga tgttggaocga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt	960
gccatcctat ggaactgcct cgggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa	1020
aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag	1080
tttttctaaa ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg atgtttggtg	1140
tttgccgcta ttataacgct cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg cgaaaattac	1200
aggcgtgtgg ttcgggatcc gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg	1260
caggcatgga agtttgtcgg tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat	1320
ttagagacc acgtaccctc aagtgctgca gagtgcgtctc tagaaaacca atcgacacag	1380
gaggagtcta acagccccga agttgcccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca	1440
cacacggggg gtgcgtcgaa cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat	1500
gcctgcttgg ctctaattgg actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt	1560
tgtgtattaa ggtcaaaaact gtcctctcgg aatttttcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat	1620
agaaattacc agcgacttga gtaogttgct taagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt	1680
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa	1740
agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac	1800
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	1860
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgctgc	1920
gctcggctcg tccggctgcgg cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	1980
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	2040
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc	2100

atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	2160
aggcgtttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	2220
gatacctgtc	cgcccttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	2280
ggtatctcag	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	2340
ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	2400
acgacttatac	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggatatgtag	2460
gcgggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	2520
ttgggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	2580
ccggcaaaaa	aaccaccgct	ggtagcggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	2640
gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacggggctc	gacgctcagt	2700
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	2760
agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtataat	gagtaaactt	2820
ggctctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	2880
gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	2940
catctggccc	cagtgtctgca	atgataccgc	gagaccacag	ctcaccggct	ccagatttat	3000
cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	agcgcagaag	tggctctgca	actttatccg	3060
cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	aagctagagt	aagtagttcg	ccagtttaata	3120
gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctacag	gcacgtggg	gtcacgctcg	tcgtttggta	3180
tggcttcatt	cagctccggg	tcccaacgat	caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	3240
gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggctctc	cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgcag	3300
tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	3360
gatgcttttc	tgtgactggg	gagtactcaa	ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	3420
gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	3480
taaaagtgct	catcattgga	aaacgttctt	cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	3540
tgttgagatc	cagttcgatg	taaccactc	gtgcacccaa	ctgatcttca	gcacttttta	3600
ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	caggaaggca	aatgcccga	aaaaagggaa	3660
taagggcgac	acggaaatgt	tgaatactca	tactcttctc	ttttcaatat	tattgaagca	3720
tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	acatatttga	atgtatttag	aaaaataaac	3780
aaataggggt	tccgcgca	tttccccgaa	aagtgccacc	tgacgtctaa	gaaaccatta	3840
ttatcatgac	attaacctat	aaaaataggc	gtatcacgag	gccctttcgt	ctcgcgcggt	3900
tcggtgatga	cggtgaaaac	ctctgacaca	tgcagctccc	ggagacggtc	acagcttgtc	3960

tgtaagcggga	tgccggggagc	agacaagccc	gtcagggcgc	gtcagcgggt	gttggcgggt	4020
gtcggggctg	gcttaactat	gcggcatcag	agcagattgt	actgagagtg	caccatatgc	4080
ggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgtaagga	gaaaataccg	catcagggcg	cattcgccat	4140
tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cggtgcgggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	4200
tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggggat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	4260
cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgaat	tcctccgagt	accccagagg	agtatgtgaa	4320
aagctgccac	tcgcaactac	tgaagataat	ttcaacgctc	aagataaatc	cggaggagtt	4380
tcctcgagac	cccgggtcga	ggctcgtgcg	cggtacatc	gagtattcta	gactcgagcg	4440
caagccctac	acgcgctacc	cctgctttca	acgcgtcaac	ctgcacattg	acggggagtt	4500
tctggttcac	aagatgctag	cgttcaatgc	cgcgatgcgc	ccatcggccg	aggagctgct	4560
gtcataccca	atgtttgctc	aactttagga	tgactaacct	gtttctggga	ggagacagcg	4620
tgggcgacgg	tgtataaagt	tggctctgct	tcaagccctg	ccactgcgct	acagtgccac	4680
caactgtaaa	gcggtagtaa	gctgcagtg	tcgactgggtg	gtagcatata	ctaccttatt	4740
tatacgctcc	gagctgtttt	tcagcatgct	agcaccacaac	gccgagcgag	agtatataac	4800
tcccatcatt	gccacaagc	ttatgccact	tattagcgtc	cgctctgccg	tttgcctagt	4860
cataatatct	accgcggtt	acgcagcaga	cgctatctgc	gacacaattg	gatttgcgat	4920
accgcgcatg	tggatgtgta	ttttaatgag	atcaacctcc	atgaagcgta	actagggggc	4980
ctcccactga	ggcactaccg	gcttagcagc	tgactaacac	agtataaaac	gtgagaagaa	5040
atcagtctca	tgccgcat	gcgctaggct	agttagcgtg	gaggaccgga	gcgctaccgc	5100
cagcagtttc	atccgcctgg	ttacgggttt	gttaacacct	accggtgttt	taccgctacc	5160
ataggatccg	atccatgggc	ggccgcatga	aggcgatcct	ggttggtgctg	ctgtacacct	5220
ttgccaccgc	caacgccgat	acgctgtgca	tcggctatca	cgccaacaac	agcaccgaca	5280
cagtggatac	cgttttggag	aaaaatgtga	cggtgacgca	cagtgtgaat	ctggtggagg	5340
acaaacataa	cggcaagctg	tgtaagctga	gaggtgtggc	tccccttcac	ctgggcaagt	5400
gtaacatcgc	cggctggatt	cttggaaaacc	ccgagtgcga	gagcctgagc	accgcaagct	5460
cctggagcta	catcgttgaa	accagttcat	ccgacaatgg	cacctgctac	cccggagact	5520
tcacgacta	cgaggagctg	cgcgacaac	ttagcagcgt	ctcctcattc	gagcgcttcg	5580
agatcttccc	gaagaccagc	agctggcca	accacgacag	caataaggga	gtgacagccg	5640
cctgtcccca	cgccgggtgc	aagagcttct	ataagaatct	gatttggtg	gtgaaaaagg	5700
ggaactccta	tccaaagctg	tccaagtctt	atatcaatga	taagggcaag	gaggtgctgg	5760
tgttggtggg	aattcaccac	ccaagcaca	gcgccgatca	gcagagcctc	taccagaacg	5820
cggatgctta	tgtgttcgtc	ggtacgtcac	gctacagcaa	gaagttcaag	cccgagattg	5880

ccatccgccc gaaagtgcgg gaccaagaag gccgcatgaa ctactactgg accctggtgg 5940
 aacctggcga caagatcacg tttgaggcta ccggcaacct ggtcgttccc cgctacgcct 6000
 tcgccatgga gcgcaaagcg ggctctggca tcataatcag cgacacacct gtgcacgact 6060
 gcaaacactac ctgccagacc cccaagggcg ccattaacac tagcctcctt ttccagaaca 6120
 ttcaccccat caccatagggc aaatgcccc aagtatggtta gagcactaag ctgctggctcg 6180
 cactggcct gagaaacatc ccgagcatcc agtctcgcgg tctgttcgga gccattgccg 6240
 gatttatcga aggaggctgg accggtatgg tggacggctg gtatggctac caccatcaaaa 6300
 atgagcaggg cagcggctat gccgctgac ttaaaagtac ccaaaatgca atcgacgaaa 6360
 tcactaaciaa ggtaaacagc gtgattgaaa agatgaatac ccagtttact gcggtgggca 6420
 aagagtttaa ccacctggaa aaacgcatcg aaaacctgaa caaaaaagtg gacgacggct 6480
 tcctggatat ctggacatac aatgcagaac tgcttgtgtt gcttgagaac gagcgcactc 6540
 tggactacca cgatagcaac gtcaaaaatc tctatgaaaa ggtgcgcagc cagctcaaaa 6600
 acaatgcgaa agaaatcggg aatggctgct tcgaattcta ccacaagtgc gacaacacgt 6660
 gcatggagag cgttaagaac gggacgtatg attatcctaa gtatagcgaa gaagccaagc 6720
 tgaatcgcga agagatcgac ggagtgaaac tggaaatccac ccgcatatat cagatactgg 6780
 ccatttacag cacagttgcg agcagcctgg tctgatcgt gagcctgggt gctatatcat 6840
 tctggatgtg cagcaacggc tctctccagt gccgcatctg tatctgaggt ac 6892

<210> 33

<211> 6670

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU1-3-p430-H1hu-BGHKBGH

<400> 33

cctgtgcctt ctagttgcca gccatctggt gtttgccct cccccgtgcc ttccttgacc 60
 ctggaagggtg ccaactccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgattgt 120
 ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat 180
 tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggatcc tagggataac 240
 agggtaatcg atttattcaa caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg 300
 cacaagataa aaatatatca tcatgaacia taaaactgtc tgcttacata aacagtaata 360
 caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt 420
 ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag 480
 gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt ctgaaacatg 540

gcaaaggtag cgttgccaat gatggttacag atgagatggt cagactaaac tggctgacgg 600
aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac 660
tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat cctgattcag 720
gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtgt tcctgcgccg gttgcattcg attcctgttt 780
gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga 840
ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctggtgaac 900
aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg 960
gtgattttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa attaataggt tgtattgatg 1020
ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg 1080
gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg 1140
atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt tttctaacca tggctgtgcc 1200
ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccctggaagg 1260
tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgatt gtctgagtag 1320
gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attggaaga 1380
caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggat ccgaccctcc ccggggctaa 1440
aaagctgctt cttcacgccc gaggcgctta ttgcccactg ggtacggggc gcgcttttat 1500
atgtgtaacg tcccaccggt gtgacgcaag tactacggtt gttctaaata gctgtccccg 1560
tgattgcctc ggctgcacac atcgccctagg tttccgcccgt gcctggtgtc gagggcccac 1620
ccctgtaacc aacatcgatg ggggcctgct gctccttcgc taccttagga ccgttatagt 1680
tacgtcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 1740
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaag 1800
agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct 1860
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 1920
gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 1980
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacag gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2040
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct 2100
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 2160
gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 2220
cgtgcgctct cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtcccctt ttctcccttc 2280
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcaag ctgtaggtat ctcaagttcgg tgtaggtcgt 2340
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 2400

cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 2460
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 2520
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 2580
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 2640
 cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 2700
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 2760
 tttggatcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 2820
 ttttaaataca atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat 2880
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 2940
 cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 3000
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 3060
 ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg 3120
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 3180
 tacaggcatc gtgggtgtcac gctcgtcgtt tgggatggct tcattcagct ccggttccca 3240
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg 3300
 tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgta tcaactcatgg ttatggcagc 3360
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta 3420
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc 3480
 aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 3540
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc 3600
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcadc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 3660
 aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggataaagg gcgacacgga aatggtgaat 3720
 actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 3780
 cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taacaaata ggggttccgc gcacatttcc 3840
 ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa 3900
 taggcgtatc acgaggccct ttcgtctcgc gcgtttcggg gatgacggtg aaaacctctg 3960
 acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca 4020
 agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtggttg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc 4080
 atcagagcag attgtactga gagtgacca tatgcgggtg gaaataccgc acagatgcgt 4140
 aaggagaaaa taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg 4200
 gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag 4260
 gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag 4320

tgaattcgac gtaactataa cggctcctaag gtagcgaatt tttccattgg gccctccct	4380
tttggctctg ggtatthtagc ttccctccca cttctcattc cactttctcc acctgcacct	4440
tttccatctc ctctccaact cgccgccatg agaccgcagg gagtttcgcg gggccgcgcc	4500
tcctctgtct ccatctccaa ctagtgtoga cctctatthg aggaccgcgc gagtacccca	4560
caagagtatg taaaaagctg tcattctcaa ctactgagaa taatatcaaa gctaaagata	4620
aaccctgagg agtttccacg ggaaccagag tctaggctcg tgcgcggata catcgaatac	4680
gccagcctag agcgtaaacc acatacgcgc tacccttgct tccagcgcgt gaacctacac	4740
attgacgggg aatthttgat ccataaaatg ctagcgttca atgctgcgat gcgccatcc	4800
gcagaagagt tgttgctcta cccaatgtht atgaatctgt aggatgacta acagatthg	4860
ggtggagacg gcgtgggca tactgtataa agttgtacta cttaccagcc cagtcagtgt	4920
gctgtagtgc caccacctgt aaagctgtga taagctgcag ttgcggccgc atgaaggcca	4980
agcttcttat actgtggtgc gccctcagcg ctaccgacgc tgacaccatt tgcacggtt	5040
accacgcca caacagcacc gataccgttg acaccgtgct ggaaaagaac gtgaccgtta	5100
cccacagtgt taatctgctg gaggacaacc acaacggaaa gttgtgtaag ttgaaggcg	5160
tcgcaccct gcagctggga aagtgcagca tagcaggctg gattctcggg aaccgcgagt	5220
gcgagagcct gtttagcaaa aagtcttggg catacatcgc ggaaaccca aacgccgaaa	5280
atggtatthg ctaccccggc tacttcagcg actacgaaga gctccgcgag cagttgagca	5340
gcgttagtag ctttgaacgc ttcgagatct tccccaaaga aagctcctgg ccaaagcact	5400
ccatcggagc caccgccagc tgttccaagc agggccgcag cagcttctac cgcaacctcc	5460
tgtggctcac cgaaaaaac ggttcttacc ccaaccttag caagagctac gtcaacgaca	5520
aggagagaga ggtgcttgtt ctgtggggcg ttcacaccc ctctaacatc gaggaccaa	5580
gagccatata tcgaaaggag accgcctacg tgagcgttat gagtagtctg tacaacaggc	5640
gcttcacccc cgagatcgc aagcgcacca agatcaggaa ccaggagggc aggatcaact	5700
attattggac cttctggaa cccaaggaca ctatcatctt cgaggccaac gggaaacctca	5760
tcgccccgtg gtacgccttc gccctgtcac gcggctthga gagcgggatc atcgtgagca	5820
acgcctctat ggatgagtgt gacgccagt gccaaacccc gcagggcgcg atcaatagca	5880
gtcttcatt tcagaatgtg caccgggtga ccattgggga gtgcccgaag tatgtgaaga	5940
gtaccaagct gaagatggcc acgggcctgc gcaacatccc cagcattcag acacggggtc	6000
tgttcggcgc taccgccggc ttcattgaag gcggttgac tggcatgatt gatggctggt	6060
atggctatca ccatcagaac gaacaaggaa gcggctacgc ggcagatcag aagtcaaccc	6120
agaacgctat aaacggcata actaacaagg tgaacagcgt cattgacaaa atgaataccc	6180

046085

agtttaccgc cgtgggcaaa gagttcaata agcttgaaaa acgcatggaa aaccttaaca 6240
 aaaaggtgga cgacggcttc ctggacatct ggacctataa tgccgaactg ttggtgctcc 6300
 ttgagaatga gcggacgctt gatttccacg acagcaacgt gaagtcactc tacgagaag 6360
 ttaagggaca gcttaaaaaac aacgctaaag aaatcggcaa cggctgtttc gagttctacc 6420
 acaagtgcaa caacgagtgc atggatagcg tgaaaaatgg gacctatgac taccctcgct 6480
 actcagagga gagcaagctc aaccgcgaga agatcgacgg cgtggagctg aaaagcatgg 6540
 gcgtgtacca gatactggcc atatacagca ctgtcgccag cagccttgtg ttgcttgtga 6600
 gccttggagc gaccagtttt tggatgtgct ccaatggcag cttgcagtgc cgcactgca 6660
 tctgaggtac 6670

<210> 34
 <211> 4916
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеотидная последовательность трансферного вектора pUUL43-p422-18K18

<400> 34
 aattctaact ataacgggtcc taaggtagcg aagtatacca tgcttgctat actgaaaata 60
 aaaacgcata ttgtaaacga cagacgcgga aatgtttatt gcttagtttc actatttggt 120
 taaaactatt tacacttgta gaaacacgcc cactaagtat ttgttttatg actaatacct 180
 ggtgcataaa accatcctct tgggtccctg tacctcaaac tctccaaagg ttggcttgct 240
 acatcaaggt tatcaatccc atggatcgtc agacttgggtg gaagacccat gttcgttggt 300
 tcaagaagcg tatectctac tcagctccac tgatacagca ttgctacgca cgcctcacgt 360
 tggcgaaatt ggcgcagatg aaggacattt tgcccagtac ctaattcgcg acgaatcccc 420
 cctgaaaggc tgttttccac gaatttaggt tgtgcccgcc tacaactttt cacttgcaaa 480
 ctcaataaaa cgcacagttt gtatattcag ttgtcagttt gctctactcg agcgtcggcg 540
 ctttgtctag ccctcttagt ggggtattgtt accggctggg gttttattgg cgttgttatt 600
 ggggagattt tagttgatag aaagcatacc gaggttttgg ggggtgtcgt taatttcggt 660
 gtctgtaaac gtaaaaagag ggcgcgcctc agcggccgca ggtaccaata aaaactgaga 720
 ctgttatatt catttcagtg tgtttaataa gaattgtgaa cataacttat tctatatctc 780
 attgcgtgga aagactggaa aacgcattgg tggtaggtgg aaggctcgcc ggatcctagg 840
 gataacaggg taatcgattt attcaacaaa gccacgttgt gtctcaaaat ctctgatggt 900
 acattgcaca agataaaaat atatcatcat gaacaataaa actgtctgct tacataaaca 960
 gtaatacaag ggggtgttatg agccatattc aacgggaaac gtcttgctcg aggccgcgat 1020

taaattccaa	catggatgct	gatttatatg	ggtataaatg	ggctcgcgat	aatgtcgggc	1080
aatcaggtgc	gacaatctat	cgattgtatg	ggaagcccga	tgcgccagag	ttgtttctga	1140
aacatggcaa	aggtagcggt	gccaatgatg	ttacagatga	gatggtcaga	ctaaactggc	1200
tgacggaatt	tatgcctctt	ccgaccatca	agcattttat	ccgtactcct	gatgatgcat	1260
ggttactcac	cactgcgatc	cccgggaaaa	cagcattcca	ggtattagaa	gaatatcctg	1320
attcaggtga	aaatattggt	gatgcgctgg	cagtgttcct	gcgccggttg	cattcgattc	1380
ctgtttgtaa	ttgtcctttt	aacagcgatc	gcgtatttcg	tctcgcctcag	gcgcaatcac	1440
gaatgaataa	cggtttggtt	gatgcgagtg	attttgatga	cgagcgtaat	ggctggcctg	1500
ttgaacaagt	ctggaaagaa	atgcataagc	ttttgccatt	ctcaccggat	tcagtcgtca	1560
ctcatggtga	tttctcactt	gataacctta	tttttgacga	ggggaaatta	ataggttgta	1620
ttgatggttg	acgagtcgga	atcgcagacc	gataaccagga	tcttgccatc	ctatggaact	1680
gcctcgggtga	gttttctcct	tcattacaga	aacggctttt	tcaaaaatat	ggtattgata	1740
atcctgatat	gaataaattg	cagtttcatt	tgatgctcga	tgagtttttc	taaaataaac	1800
gtcgacaata	aaaactgaga	ctgttatatt	catttcagtg	tgtttaataa	gaattgtgaa	1860
cataacttat	tctatatctc	attgcgtgga	aagactggaa	aacgcattgg	tggtaggtgg	1920
aaggctcgcc	tctagaacce	cggcgtatgt	tgtcttctgt	ctgactgttg	gacacgtctc	1980
tgcgatgctg	ctggagcagc	ttgtcatcag	agtaaactac	acggcagagg	cgagtccggg	2040
catccactcc	acggcccacg	ctgtctgcat	ggtgcttgcc	gcctttgggt	acggcgtggc	2100
cggccccctc	tcgctcgcat	ttactgtatc	cgggggtata	ctgggggcgc	tataccttcg	2160
caagcgcgca	acgggcgcgc	gccgcctggc	ggcaactcac	atctcgaggt	ggcttattgt	2220
ttgtgtatat	gttgccgccg	gttcgctacc	ttaggaccgt	tatagttact	gcaggcatgc	2280
aagcttggcg	taatcatggt	catagctggt	tctgtgtgga	aattgttatc	cgctcacaat	2340
tccacacaac	atacgagccg	gaagcataaa	gtgtaaagcc	tgggggtgcct	aatgagtgag	2400
ctaactcaca	ttaattgcgt	tgcgctcact	gcccgccttc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	2460
ccagctgcat	taatgaatcg	gccaacgcgc	ggggagaggg	ggtttgcgta	ttgggcgctc	2520
ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgtcgog	ctcggtcggt	cggctgcggc	gagcggtatc	2580
agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	2640
catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	2700
tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagaggtg	2760
gcgaaaccgg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	ccctcgtgcg	2820
ctctcctggt	ccgaccctgc	cgcttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	2880
cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	tcgggtgtagg	tcgttcgctc	2940

caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgcg cgctgcgcct tatccggtaa 3000
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg 3060
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggcc 3120
taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctctg gctctgctga agccagttac 3180
cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg gtagcgggtg 3240
tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 3300
gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 3360
catgagatta tcaaaaagga tcttcacctg gatcctttta aattaaaat gaagttttta 3420
atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 3480
ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctcg 3540
gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg 3600
agaccacgc tcaccggctc cagatcttct agcaataaac cagccagccg gaagggccga 3660
gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 3720
agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg 3780
catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccgggt cccaacgatc 3840
aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctcc 3900
gatcgttctc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 3960
taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac 4020
caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg 4080
ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc 4140
ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc 4200
tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 4260
aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggggat aagggcgaca cggaaatggt gaatactcat 4320
actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 4380
catatctgaa tgtatctaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgccatc tccccgaaa 4440
agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg 4500
tatcacgagg ccctttcgtc tcgcgcggtt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat 4560
gcagctcccg gagacgggtc cagcttctct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc 4620
tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga 4680
gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag 4740
aaaataccgc atcaggcgcc attcgcatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc 4800

046085

ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt 4860
 aagttgggta acgccagggg tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtg 4916

<210> 35
 <211> 5626
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pUUL43-p422-mC-18K18

<400> 35
 aattctaact ataacgggtcc taaggtagcg aagtatacca tgcttgctat actgaaaata 60
 aaaacgcata ttgtaaacga cagacgcgga aatgtttatt gcttagtttc actatttggt 120
 taaaactatt tacacttgta gaaacacgcc cactaagtat ttgttttatg actaatacct 180
 ggtgcataaaa accatcctct tgggtccctg tacctcaaac tctccaaagg ttggcttgct 240
 acatcaaggt tatcaatccc atggatcgtc agacttgggtg gaagacccat gttcgttggt 300
 tcaagaagcg tatectctac tcagctccac tgatacagca ttgctacgca cgcctcacgt 360
 tggcgaaatt ggcgcagatg aaggacattt tgcccagtac ctaattcgcg acgaatcccc 420
 cctgaaaggc tgttttccac gaatttaggt tgtgcccgcc tacaactttt cacttgcaaaa 480
 ctcaataaaa cgcacagttt gtatattcag ttgtcagttt gctctactcg agcgtcggcg 540
 ctttgtctag ccctcttagt gggatattgtt accggctggg gttttattgg cgttggttatt 600
 ggggagattt tagttgatag aaagcatacc gaggttttgg ggggtgctgct taatttcggt 660
 gtctgtaaac gtaaaaagag ggcgcgcctc agcggccgca tggtgagcaa gggcgaggag 720
 gataacatgg ccatcatcaa ggagttcatg cgcttcaagg tgcacatgga gggctccgtg 780
 aacggccacg agttcgagat cgagggcgag ggcgagggcc gccctacga gggcaccacg 840
 accgccaagc tgaaggtgac caaggggtggc ccctgcctt tcgcctggga catcctgtcc 900
 cctcagttca tgtacggctc caaggcctac gtgaagcacc ccgccgacat ccccgactac 960
 ttgaagctgt ccttccccga gggcttcaag tgggagcgcg tgatgaactt cgaggacggc 1020
 ggcgtgggtga ccgtgaccca ggactcctcc ctgcaggacg gcgagttcat ctacaagggtg 1080
 aagctgcgcg gcaccaactt ccctccgac ggccccgtaa tgcagaagaa gaccatgggc 1140
 tgggaggcct cctccgagcg gatgtacccc gaggacggcg ccctgaaggg cgagatcaag 1200
 cagaggctga agctgaagga cggcggccac tacgacgctg aggtcaagac cacctacaag 1260
 gccaagaagc ccgtgcagct gcccggcgcc tacaacgtca acatcaagtt ggacatcacc 1320
 tcccacaacg aggactacac catcgtggaa cagtacgaac gcgccgaggg ccgccactcc 1380
 accggcggca tggacgagct gtacaagtaa ggtaccaata aaaactgaga ctgttatatt 1440

catttcagtg	tgtttaataa	gaattgtgaa	cataacttat	tctatatctc	attgcgtgga	1500
aagactggaa	aacgcattgg	tggtaggtgg	aaggctcgcc	ggatcctagg	gataacaggg	1560
taatcgattt	attcaacaaa	gccacgttgt	gtctcaaaaat	ctctgatggt	acattgcaca	1620
agataaaaaat	atatcatcat	gaacaataaa	actgtctgct	tacataaaca	gtaatacaag	1680
gggtgttatg	agccatattc	aacgggaaac	gtcttgctcg	aggccgcgat	taaattccaa	1740
catggatgct	gatttatatg	ggtataaatg	ggctcgcgat	aatgtcgggc	aatcaggtgc	1800
gacaatctat	cgattgtatg	ggaagcccga	tgcgccagag	ttgtttctga	aacatggcaa	1860
aggtagcggt	gccaatgatg	ttacagatga	gatggtcaga	ctaaactggc	tgacggaatt	1920
tatgcctctt	ccgaccatca	agcattttat	ccgtactcct	gatgatgcat	ggttactcac	1980
cactgcgatc	cccgggaaaa	cagcattcca	ggtattagaa	gaatatcctg	attcaggtga	2040
aaatattggt	gatgcgctgg	cagtgttcoct	gcgcgggttg	cattcgattc	ctgtttgtaa	2100
ttgtcctttt	aacagcgatc	gcgtatttcg	tctcgctcag	gcgcaatcac	gaatgaataa	2160
cggtttggtt	gatgcgagtg	atthttgatga	cgagcgtaat	ggctggcctg	ttgaacaagt	2220
ctggaaagaa	atgcataagc	ttttgccatt	ctcaccggat	tcagtcgtca	ctcatggtga	2280
tttctcactt	gataacctta	tttttgacga	ggggaaatta	ataggttgta	ttgatggtgg	2340
acgagtcgga	atcgagacc	gataaccagga	tcttgccatc	ctatggaact	gcctcggatga	2400
gttttctcct	tattacaga	aacggctttt	tcaaaaatat	ggtattgata	atcctgatat	2460
gaataaattg	cagtttcatt	tgatgctcga	tgagtttttc	taaaataaac	gtcgacaata	2520
aaaactgaga	ctgttatatt	catttcagtg	tgtttaataa	gaattgtgaa	cataacttat	2580
tctatatctc	attgcgtgga	aagactggaa	aacgcattgg	tggtaggtgg	aaggctcgcc	2640
tctagaacct	cggcgtatgt	tgtcttctgt	ctgactggtg	gacacgtctc	tgcgatgctg	2700
ctggagcagc	ttgtcatcag	agtaaaactac	acggcagagg	cgagttccgg	catccactcc	2760
acggcccacg	ctgtctgcat	ggtgcttgcc	gcctttgggt	acggcgtggc	cggtcccctc	2820
tcgctcgcat	ttactgtatc	cgggggtata	ctgggggcgc	tataccttcg	caagcgcgca	2880
acgggcgcgc	gccgcctggc	ggcaactcac	atthcgaggt	ggcttattgt	ttgtgtatat	2940
gttgccgccc	gttcgctacc	ttaggacogt	tatagttact	gcaggcatgc	aagcttggcg	3000
taatcatggt	catagctggt	tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaat	tccacacaac	3060
atacgagccg	gaagcataaa	gtgtaaagcc	tgggggtgct	aatgagtgag	ctaactcaca	3120
ttaattgctg	tgcgctcact	gcccgccttc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcat	3180
taatgaatcg	gccaacgcgc	ggggagaggc	ggtttgcgta	ttgggcgctc	ttccgcttcc	3240
tcgctcactg	actcgctgcg	ctcggtcggt	cggctgcggc	gagcggatc	agctcactca	3300
aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	3360

aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg 3420
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg 3480
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt 3540
ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt 3600
tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcggtcgtc caagctgggc 3660
tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccagc cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 3720
gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt 3780
agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc 3840
tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa 3900
agagttggta gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg gtagcgggtg tttttttggt 3960
tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 4020
acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta 4080
tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat gaagttttaa atcaatctaa 4140
agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 4200
tcagcgatct gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctcg gtagataact 4260
acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc 4320
tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt 4380
ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta 4440
agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg catcgtggtg 4500
tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt 4560
acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgtc 4620
agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt 4680
actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcatc 4740
tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc 4800
gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa 4860
ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcagatg aaccactcg tgcaccaac 4920
tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa 4980
aatgccgcaa aaaaggaat aagggcgaca cggaaatggt gaatactcat actcttcctt 5040
tttcaatatt attgaagcat ttatcagggg tattgtctca tgagcggata catatttgaa 5100
tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct 5160
gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg 5220

046085

ccctttcgtc tcgcgcggtt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg 5280
 gagacgggtca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg 5340
 tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta 5400
 ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc 5460
 atcagggcgc attcggcatt caggctgcbc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc 5520
 tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caagggcatt aagttgggta 5580
 acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtg 5626

<210> 36
 <211> 6616
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pUUL43-p422-
 H1pdm-18K18

<400> 36
 aattctaact ataacgggtc taaggtagcg aagtatacca tgcttgctat actgaaaata 60
 aaaacgcata ttgtaaacga cagacgcgga aatgtttatt gcttagtttc actatttggt 120
 taaaactatt tacacttgta gaaacacgcc cactaagtat ttgttttatg actaatacct 180
 ggtgcataaa accatcctct tgggtccctg tacctcaaac tctccaaagg ttggcttctg 240
 acatcaaggt tatcaatccc atggatcgtc agacttgggtg gaagacccat gttcgttgtt 300
 tcaagaagcg tatcctctac tcagctccac tgatacagca ttgctacgca cgcctcacgt 360
 tggcgaaatt ggcgcagatg aaggacattt tgcccagtac ctaattcgcg acgaatcccc 420
 cctgaaaggc tgttttccac gaatttaggt tgtgcccgcc tacaactttt cacttgcaaa 480
 ctcaataaaa cgcacagttt gtatattcag ttgtcagttt gctctactcg agcgtcggcg 540
 ctttgtctag ccctcttagt gggatattgtt accggctggg gttttattgg cgttgttatt 600
 ggggagattt tagttgatag aaagcatacc gaggttttgg ggggtgctgct taatttcggt 660
 gtctgtaaac gtaaaaagag ggcgcgcctc agcggccgca tgaaggcgat cctggttgtg 720
 ctgctgtaca cttttgccac cgccaacgcc gatacgtgtg gcatcggcta tcacgccaac 780
 aacagcaccg acacagtgga taccgttttg gagaaaaatg tgacggtgac gcacagtgtg 840
 aatctgttgg aggacaaaca taacggcaag ctgtgtaagc tgagaggtgt ggctcccctt 900
 cacctgggca agtgtaacat cgccggctgg attcttggaa accccgagtg cgagagcctg 960
 agcaccgcaa gctcctggag ctacatcgtt gaaaccagtt catccgacaa tggcacctgc 1020
 taccgggag acttcatcga ctacgaggag ctgcgcgaac aacttagcag cgtctcctca 1080
 ttcgagcgtc tcgagatctt cccgaagacc agcagctggc ccaaccacga cagcaataag 1140

ggagtgcacag	ccgcctgtcc	ccacgccggt	gccaaagagct	tctataagaa	tctgatttgg	1200
ctggtgaaaa	aggggaactc	ctatccaaag	ctgtccaagt	cttatatcaa	tgataagggc	1260
aaggaggtgc	tgggtgttg	gggaattcac	cacccaagca	ccagcgccga	tcagcagagc	1320
ctctaccaga	acgcggatgc	ttatgtgttc	gtcggtagct	cacgctacag	caagaagttc	1380
aagcccgaga	ttgccatccg	cccgaaagtg	cgggaccaag	aaggccgcat	gaactactac	1440
tggaccctgg	tggaacctgg	cgacaagatc	acgtttgagg	ctaccggcaa	cctggtcggt	1500
ccccgctacg	ccttcgccat	ggagcgcgaaa	gcgggctctg	gcatcataat	cagcgacaca	1560
cctgtgcacg	actgcaaac	tacctgccag	acccccaagg	gcgccattaa	cactagcctc	1620
cctttccaga	acattcacc	catcaccata	ggcaaagtc	ccaagtatgt	taagagcact	1680
aagctgcggc	tcgccactgg	cctgagaaac	atcccagagca	tccagtctcg	cggctctgttc	1740
ggagccattg	ccggatttat	cgaaggaggc	tggaccggta	tggtaggacg	ctggtatggc	1800
taccaccatc	aaaatgagca	gggcagcggc	tatgccgctg	atcttaaaag	tacccaaaat	1860
gcaatcgacg	aaatcactaa	caaggttaac	agcgtgattg	aaaagatgaa	taccagttt	1920
actgcgggtg	gcaaagagtt	taaccacctg	gaaaaacgca	tcgaaaacct	gaacaaaaaa	1980
gtggacgacg	gcttcctgga	tatctggaca	tacaatgcag	aactgcttgt	gttgcctgag	2040
aacgagcgcg	ctctggacta	ccacgatagc	aacgtcaaaa	atctctatga	aaaggtgcgc	2100
agccagctca	aaaacaatgc	gaaagaaatc	gggaatggct	gcttcgaatt	ctaccacaag	2160
tgcgacaaca	cgtgcatgga	gagcgttaag	aacgggacgt	atgattatcc	taagtatagc	2220
gaagaagcca	agctgaatcg	cgaagagatc	gacggagtga	aactggaatc	caccgcgata	2280
tatcagatac	tggccattta	cagcacagtt	gcgagcagcc	tggctcctgat	cgtgagcctg	2340
ggtgctatat	cattctggat	gtgcagcaac	ggctctctcc	agtgccgcat	ctgtatctga	2400
ggtaccaata	aaaactgaga	ctgttatatt	catttcagtg	tgtttaataa	gaattgtgaa	2460
cataacttat	tctatatctc	attgcgtgga	aagactggaa	aacgcattgg	tggtaggtgg	2520
aaggctcgcc	ggatcctagg	gataacaggg	taatcgattt	attcaacaaa	gccacgttgt	2580
gtctcaaaa	ctctgatggt	acattgcaca	agataaaaa	atatcatcat	gaacaataaa	2640
actgtctgct	tacataaaca	gtaatacaag	gggtgttatg	agccatattc	aacgggaaac	2700
gtcttgctcg	aggccgcgat	taaattccaa	catggatgct	gatttatatg	ggtataaatg	2760
ggctcgcgat	aatgtcgggc	aatcaggtgc	gacaatctat	cgattgtatg	ggaagcccga	2820
tgcgccagag	ttgtttctga	aacatggcaa	aggtagcgtt	gccaatgatg	ttacagatga	2880
gatggtcaga	ctaaactggc	tgacggaatt	tatgcctctt	ccgaccatca	agcattttat	2940
ccgtactcct	gatgatgcat	ggttactcac	cactgcgatc	cccgggaaaa	cagcattcca	3000
ggtattagaa	gaatatcctg	attcaggtga	aaatattggt	gatgcgctgg	cagtgttcct	3060

gcgccgggtg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgcgc gcgtatttgc 3120
tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga 3180
cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataagc ttttgccatt 3240
ctcaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta tttttgacga 3300
ggggaaatta ataggttgta ttgatggttg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga 3360
tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt 3420
tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga 3480
tgagtttttc taaaataaac gtcgacaata aaaactgaga ctgttatatt catttcagtg 3540
tgtttaataa gaattgtgaa cataacttat tctatatctc attgcgtgga aagactggaa 3600
aacgcattgg tggtaggtgg aaggctcgcc tctagaacct cggcgtatgt tgtcttctgt 3660
ctgactggtg gacacgtctc tgcgatgctg ctggagcagc ttgtcatcag agtaaaactac 3720
acggcagagg cgagttccgg catccactcc acggcccacg ctgtctgcat ggtgcttgcc 3780
gcctttgggt acggcgtggc cggctccctc tcgctcgcac ttactgtatc cgggggtata 3840
ctgggggccc tataccttcg caagcgcgca acgggcccgc gccgcctggc ggcaactcac 3900
atctcgaggt ggcttattgt ttgtgtatat gttgccgccc gttcgcctacc ttaggacctg 3960
tatagttact gcagggcatgc aagcttgccg taatcatggt catagctgtt tcctgtgtga 4020
aattgttata cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc 4080
tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc 4140
cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggg 4200
ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgcctgc ctccgctcgtt 4260
cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca 4320
ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa 4380
aaggccgctg tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat 4440
cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacctg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 4500
cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc 4560
gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt 4620
tcggtgtagg tcgctcgcct caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac 4680
cgctgcccct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg 4740
ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca 4800
gagttcttga agtggggccc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctgc 4860
gctctgctga agccagttac ctccggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa 4920

046085

accaccgctg gtagcgggtg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa 4980
 ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac 5040
 tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta 5100
 aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt 5160
 taccaatgct taatcagtgga ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcattccata 5220
 gttgcctgac tccccgctgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc 5280
 agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagattttatc agcaataaac 5340
 cagccagccg gaagggccga ggcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag 5400
 tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac 5460
 gttggttcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc 5520
 agctccgggt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg 5580
 gttagctcct tcggctctcc gatcgtttgc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc 5640
 atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct 5700
 gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc 5760
 tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc 5820
 atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc 5880
 agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc 5940
 gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca 6000
 cggaaatggt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggc 6060
 tattgtctca tgagcggata catatctgaa tgtatctaga aaaataaaca aatagggggt 6120
 ccgcgacat tccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca 6180
 ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc tcgcgcggtt cggatgatgac 6240
 ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca cagcttgtct gtaagcggat 6300
 gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg 6360
 cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata 6420
 ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagcgcc attcgccatt caggctgcgc 6480
 aactggtggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaagg 6540
 ggatgtgctg caagggcatt aagttgggta acgccaggg tttcccagtc acgacgttgt 6600
 aaaacgacgg ccagtg 6616

<210> 37

<211> 4435

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pUmC70

<400> 37

tcgcgcggtt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccc	gagacggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccc	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcggggc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caagggcatt	aagttgggta	acgccaggg	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cctccgagta	ccccagagga	420
gtatgtgaaa	agctgccact	cgcaactact	gaagataatt	tcaacgctca	agataaatcc	480
ggaggagttt	cctcgagacc	ccgggtcgag	gctcgtgcgc	ggatacatcg	agtattctag	540
actcgagcgc	aagccctaca	cgcgctacct	ctgctttcaa	cgcgtcaacc	tgcacattga	600
cggggagttt	ctggttcaca	agatgctagc	gttcaatgcc	gcgatgcgcc	catcggccga	660
ggagctgctg	tcatacccaa	tgtttgctca	actttaggat	gactaacctg	tttctgggag	720
gagacagcgt	gggcgacggg	gtataaagtt	ggtctgcttt	caagccctgc	cactgcgcta	780
cagtgccacc	aactgtaaag	cggtagtaag	ctgcagtggg	cgacatggg	agcaagggcg	840
aggaggataa	catggccatc	atcaaggagt	tcatgcgctt	caaggtgcac	atggagggct	900
ccgtgaacgg	ccacgagttc	gagatcgagg	gcgagggcga	gggccgcccc	tacgagggca	960
cccagaccgc	caagctgaag	gtgaccaagg	gtggccccct	gcccttcgcc	tgggacatcc	1020
tgtcccctca	gttcatgtac	ggctccaagg	cctacgtgaa	gcacccccgc	gacatccccg	1080
actacttgaa	gctgtccttc	cccgagggct	tcaagtggga	gcgctgatg	aacttcgagg	1140
acggcggcgt	ggtgaccgtg	accaggact	cctccctgca	ggacggcgag	ttcatctaca	1200
aggtgaagct	gcgcggcacc	aacttcccct	ccgacggccc	cgtaatgcag	aagaagacca	1260
tgggctggga	ggcctcctcc	gagcggatgt	accccagagga	cggcgccctg	aagggcgaga	1320
tcaagcagag	gctgaagctg	aaggacggcg	gccactacga	cgctgaggtc	aagaccacct	1380
acaaggccaa	gaagcccgtg	cagctgcccg	gcgcctacaa	cgtcaacatc	aagttggaca	1440
tcacctcca	caacgaggac	tacaccatcg	tggaacagta	cgaacgcgcc	gagggccgcc	1500
actccaccgg	cggcatggac	gagctgtaca	agtaactgtg	ccttctagtt	gccagccatc	1560
tgttgtttgc	ccctcccccg	tgccttcctt	gaccctggaa	ggtgccactc	ccactgtcct	1620
ttcctaataa	aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	aggtgtcatt	ctattctggg	1680
gggtggggtg	gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	ggcatgctgg	1740

ggatgCGgtg ggctctatgg atccgaccct gttggtgggt gcggttggac tcagaatctt 1800
 ggcgcaggca tggaagtttg tCGgtgacga aacatacgac accatccgcg cagaagcaaa 1860
 gaatttagag acccacgtac cctcaagtgc tgcagagtcg tctctagaaa accaatcgac 1920
 acaggaggag tctaacagcc cGgaagttgc ccacctgcga agcgtcaaca gcgatgacag 1980
 tacacacacg gggggtgcgt cgaacggcat ccaggactgt gacagtcagc tcaaaactgt 2040
 gtatgcctgc ttggctctaa ttggactcgg cacatgtgcc atgatagggt tgatagttta 2100
 cttttgtgta ttaaggtcaa aactgtcctc tCGgaatTTT tCGcgcgcgc aaaatgtaaa 2160
 acatagaaat taccagcgac ttgagtaagt tGcttaagct tggcgtaatc atgggtcatag 2220
 ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 2280
 ataaagtgta aagcctgggg tgcctaataga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc 2340
 tcactgcccG ctttccagtc gggaaacctg tCGtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 2400
 cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cGctcttccg cttcctcGct cactgactcg 2460
 ctgcgctcgg tCGttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg 2520
 ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag 2580
 gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 2640
 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagG actataaaga 2700
 taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 2760
 accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cGctttctca tagctcacgc 2820
 tgtaggtatc tcagttcggT gtaggtcgtt cGctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc 2880
 cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccCGgta 2940
 agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat 3000
 gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 3060
 gtatttggtA tctgcgctct gctgaagcca gttacctcG gaaaaagagt tggtagctct 3120
 tgatccggca aacaaaccac cGctggtagc ggtggTTTT ttgtttgcaa gcagcagatt 3180
 acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat ctttgatct tttctacggg gtctgacgct 3240
 cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggTcatga gattatcaa aaggatcttc 3300
 acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa 3360
 acttggctcG acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta 3420
 tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtCGtGtaga taactacgat acgggagggc 3480
 ttaccatctg gccccagTgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat 3540
 ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggTcc tgcaacttta 3600
 tccgcctcca tccagTctat taattgtTgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgCCagtt 3660

aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acagggcatcg tgggtgtcacg ctcgctcgttt 3720
ggataggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg 3780
ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggg cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc 3840
gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc 3900
gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg 3960
cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga 4020
actttaaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta 4080
ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct 4140
tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag 4200
ggaataaggg cgacacggaa atggtgaata ctcatactct tcctttttca atattattga 4260
agcatttata agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat 4320
aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc 4380
attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtc 4435

<210> 38
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Прямой праймер

<400> 38
aggctcgtgc gcgatacat cg 22

<210> 39
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Обратный праймер

<400> 39
ttcggggctg ttagactcct cc 22

<210> 40
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Прямой праймер

<400> 40
ссаастсгсс гссатгагас сс 22

<210> 41
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Обратный праймер

<400> 41
 агсгсгсгсгсгс гтасссгагг гг 22

<210> 42
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Прямой праймер

<400> 42
 сгасгсгсгсгт сггагг 16

<210> 43
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Обратный праймер

<400> 43
 гттатаааса тассатгсас с 21

<210> 44
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> вирус свиного гриппа

<400> 44

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
 50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

046085

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Ser Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
130 135 140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145 150 155 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Thr Ser Arg Tyr Ser
210 215 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Met Glu Arg Lys Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
325 330 335

046085

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
 500 505 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
 515 520 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Ile
 530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 45

046085

<211> 566
 <212> PRT
 <213> вирус свиного гриппа

<400> 45

Met Lys Thr Val Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Gly
 1 5 10 15

Gln Asp Leu Pro Gly Lys Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
 20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp
 35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Asn Phe Ser Met
 50 55 60

Gly Lys Ile Cys Asn Asn Pro His Arg Ile Leu Asp Gly Ala Asn Cys
 65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ser Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Gly Phe Gln
 85 90 95

Asn Glu Lys Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Lys Ala Phe Ser Asn
 100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Glu Tyr Thr Ser Leu Arg Ser Leu Ile
 115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Asn Glu Asn Phe Asn Trp Thr
 130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Gly Ser Ser Ala Cys Lys Arg Gly Pro Asn
 145 150 155 160

Asn Ser Phe Phe Ser Lys Leu Asn Trp Leu Tyr Lys Ser Gly Asn Thr
 165 170 175

Tyr Pro Met Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Ser Asp Asp Phe Asp Lys
 180 185 190

Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp Arg Glu Gln Ile
 195 200 205

Asn Leu Tyr Val Gln Ala Ser Gly Lys Ile Ile Val Ser Thr Lys Arg
 210 215 220

Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg

046085

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ser Cys Met Glu Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asn Glu Tyr Arg Asp Glu Ala Val
500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Ser Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540

Ala Val Trp Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 46

<211> 566

<212> PRT

<213> вирус свиного гриппа

<400> 46

Met Glu Ala Lys Leu Phe Val Leu Phe Cys Ala Phe Thr Ala Leu Lys
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Ile Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Asn Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Asn Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Asn Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Ile Glu Thr Ser Asn Ser Lys Asn Gly Ala Cys Tyr Pro Gly Glu Phe
100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Thr Val Ser Ser Phe
115 120 125

046085

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Ala Thr Ser Trp Pro Asn His Asp
 130 135 140

Thr Thr Lys Gly Thr Thr Val Ser Cys Ser His Ser Gly Ala Asn Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Ile Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Ile Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Asp Ser Asp Gln Gln Thr Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Asn His Thr Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr
 210 215 220

Gln Arg Phe Thr Pro Glu Ile Val Ala Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln
 225 230 235 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Asp Gln Gly Asp Thr
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp His Ala Phe
 260 265 270

Ala Leu Asn Lys Gly Ser Asn Ser Gly Ile Met Met Ser Asp Ala His
 275 280 285

Val His Asn Cys Thr Thr Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Leu Lys
 290 295 300

Ser Asn Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Ile Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Gln Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380

046085

Thr Gln Ile Ala Ile Asp Gly Ile Ser Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ser Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn
405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
420 425 430

Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Ile Leu Leu Glu Asn
435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Phe Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Arg Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Arg Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
500 505 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Val Gly Val His
515 520 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 47
<211> 564
<212> PRT
<213> вирус свиного гриппа

<220>
<221> прочий_признак
<222> (531)..(531)
<223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 47

Met Lys Ala Lys Leu Leu Ile Leu Trp Cys Ala Leu Ser Ala Thr Asp

046085

Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu
 260 265 270

Ser Arg Gly Phe Glu Ser Gly Ile Ile Val Ser Asn Ala Ser Met Asp
 275 280 285

Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315

Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Lys Met Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ile
 325 330 335

Pro Ser Ile Gln Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350

Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365

Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln
 370 375 380

Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Asp Lys
 385 390 395 400

Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu
 405 410 415

Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp
 420 425 430

Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg
 435 440 445

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Ser Leu Tyr Glu Lys Val
 450 455 460

Lys Gly Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe
 465 470 475 480

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Asp Ser Val Lys Asn
 485 490 495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Arg Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg
 500 505 510

Glu Lys Ile Asp Gly Val Glu Leu Lys Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile
515 520 525

Leu Ala Xaa Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Ser
530 535 540

Leu Gly Ala Thr Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV) RacH, включающий каскету экспрессии в UL43, где каскета экспрессии включает:

(i) по меньшей мере одну экзогенную антигенкодирующую последовательность, функционально связанную с промоторной последовательностью, и

(ii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL43 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: последовательности, по меньшей мере на 90% гомологичной и/или идентичной SEQ ID NO: 19, последовательности, по меньшей мере на 90% гомологичной и/или идентичной SEQ ID NO: 26, и

(iii) по меньшей мере один расположенный против хода транскрипции UL44 фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из: последовательности, по меньшей мере на 90% гомологичной и/или идентичной SEQ ID NO: 20, и последовательности, по меньшей мере на 90% гомологичной и/или идентичной SEQ ID NO: 27.

2. Вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV) RacH по п.1, включающий по меньшей мере одну дополнительную антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL56 и/или US4.

3. Вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV) RacH по п.1, где инсерция в UL43 приводит к частичной делеции, усечению или замене в UL43, причем UL44 остается функциональным.

4. EHV вектор по п.1, где инсерция в UL43 приводит к делеции приблизительно части 870 по в пределах UL43 для RacH (SEQ ID NO: 21) или по меньшей мере 90% делеции SEQ ID NO: 21.

5. EHV вектор по п.1, где EHV вектор включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, состоящей из последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной и/или гомологичной SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

6. EHV вектор по п.1, где указанная антигенкодирующая последовательность относится к инфекционному патогену животного, выбранному из группы, состоящей из свиньи, сельскохозяйственной птицы, крупного рогатого скота, кошек, собак или лошадей.

7. EHV вектор по п.1, где антигенкодирующая последовательность функционально связана с промоторной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из большого T SV40, HCMV и немедленно-раннего гена 1 MCMV, промотора фактора элонгации человека альфа, промотора полиэдрина бакуловируса, 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), p430 (SEQ ID NO: 3), нуклеотидной последовательности, комплементарной 4pgG600 (SEQ ID NO: 1), 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2), p455 (SEQ ID NO: 4), нуклеотидной последовательности, комплементарной 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) или p422 (SEQ ID NO: 5).

8. EHV вектор по п.1, где антигенкодирующая последовательность получена от патогена, выбранного из группы, состоящей из вируса Шмалленберга, вируса гриппа типа А, вируса свиного респираторного и репродуктивного синдрома, цирковируса свиней, вируса классической чумы свиней, вируса африканской чумы свиней, вируса гепатита Е, вируса диареи крупного рогатого скота, вируса бешенства, морбилливируса кошек, столбнячной палочки, микобактерии туберкулеза, возбудителя актинобациллезной плевропневмонии.

9. EHV вектор по п.1, где антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, или где антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютининовый антиген гриппа, имеющую происхождение из вируса свиного гриппа типа А.

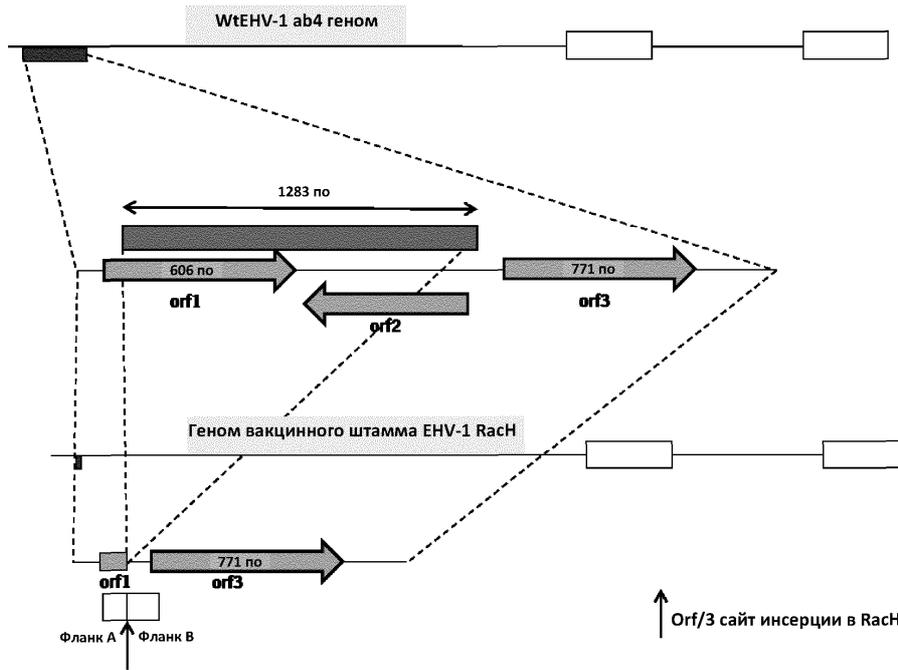
10. EHV вектор по п.9, где антигенкодирующая последовательность представляет собой последовательность, кодирующую гемагглютинин, и последовательность, кодирующая гемагглютининовый анти-

ген гриппа, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

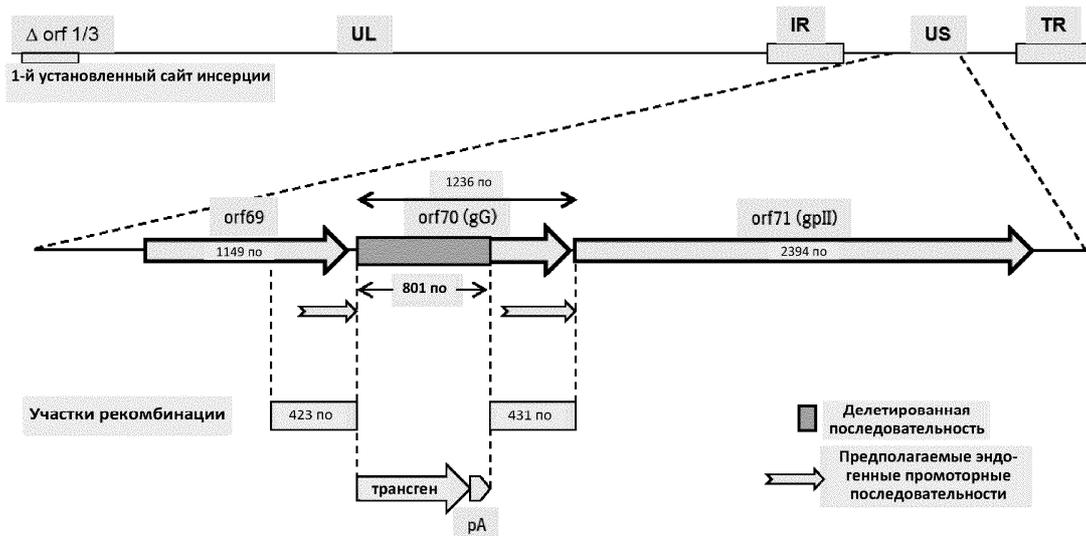
11. Иммуногенная композиция, включающая EHV-1 вектор по любому из пп.1-10.

12. Способ иммунизации животного свиньи, включающий введение такому животному иммуногенной композиции по п.11, где антигенкодирующая последовательность кодирует по меньшей мере один антиген гриппа А.

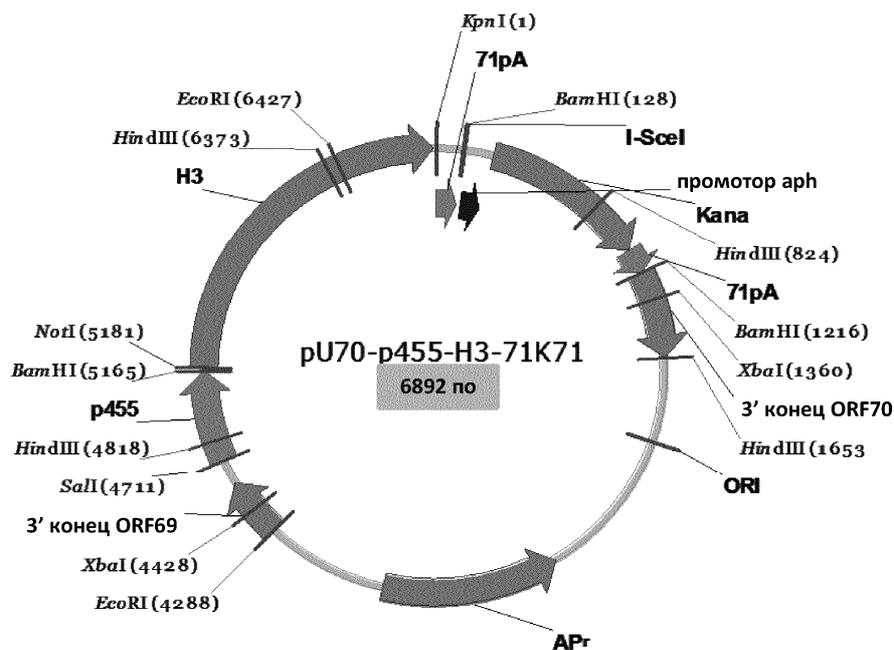
13. Способ уменьшения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном у животного свиньи, который включает введение животному терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по п.11, где антигенкодирующая последовательность кодирует по меньшей мере один антиген гриппа А.



Фиг. 1

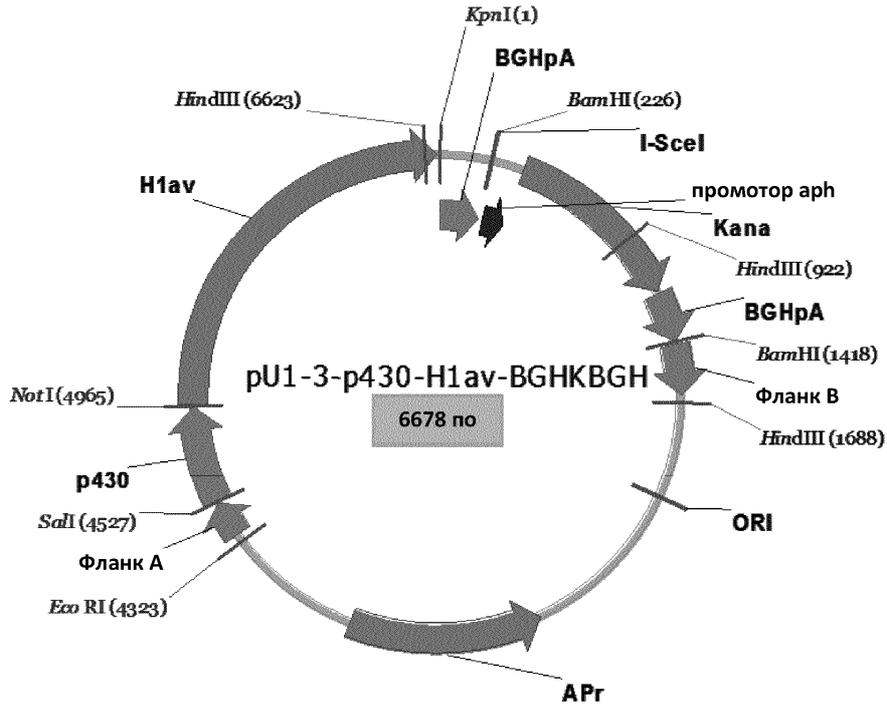


Фиг. 2



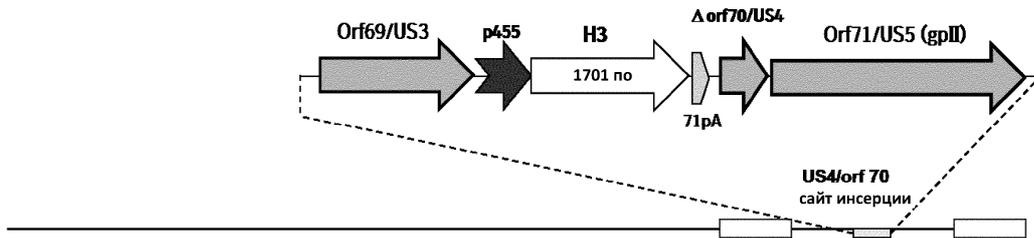
- 3' конец ORF69** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции против хода транскрипции
- 3' конец ORF70** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции по ходу транскрипции
- p455** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- H3** трансген (гемагглютинин IAV)
- 71pA** последовательность полиаденилирования
- I-Sce1** сайт расщепления для I-Sce1
- промотор aph** запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
- Kana** устойчивая к канамицину *orf*
- ORI** точка начала репликации плазмидного вектора
- APr** ген устойчивости к ампициллину
- EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 3

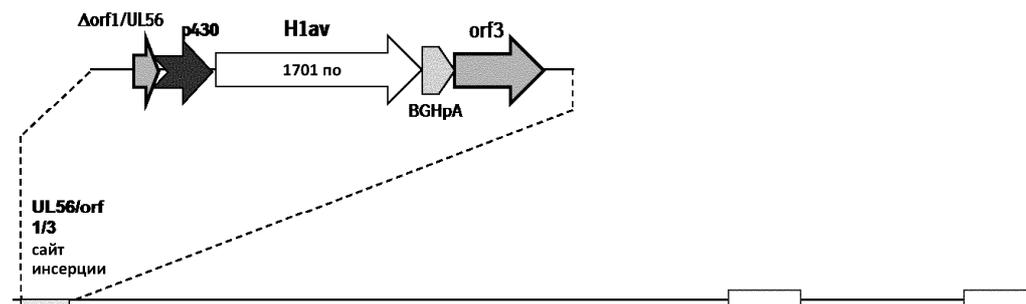


- Фланк А** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции против хода транскрипции
- Фланк В** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции по ходу транскрипции
- p430** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- H1av** трансген (гемагглютинин IAV)
-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

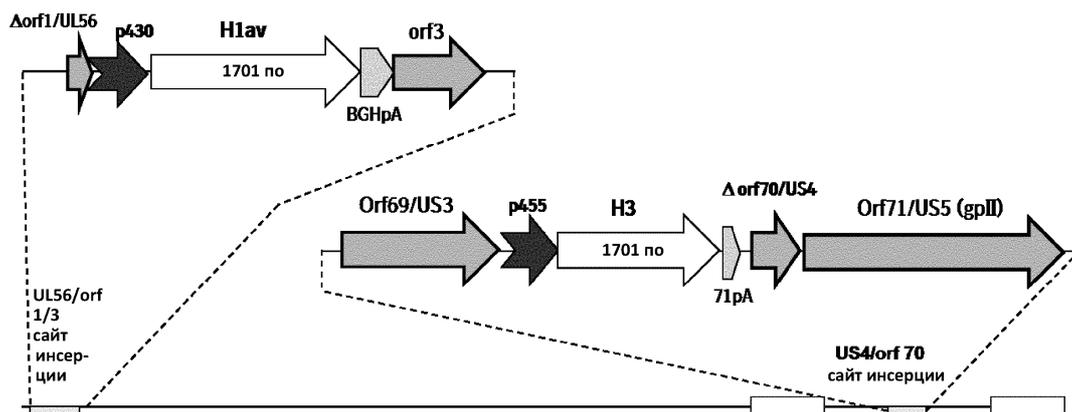
Фиг. 4



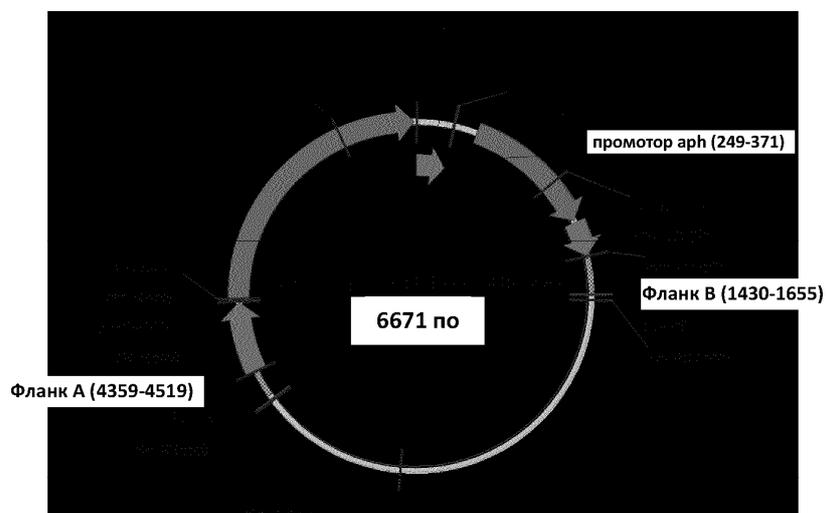
Фиг. 5



Фиг. 6

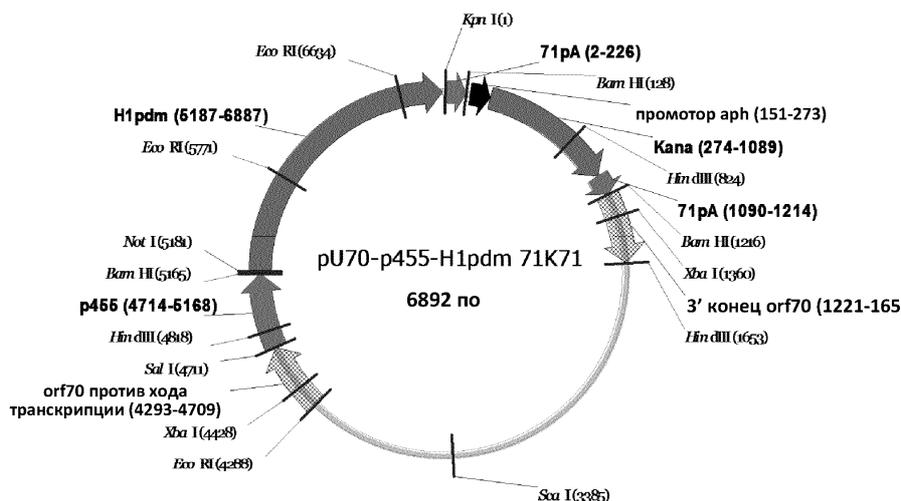


Фиг. 7



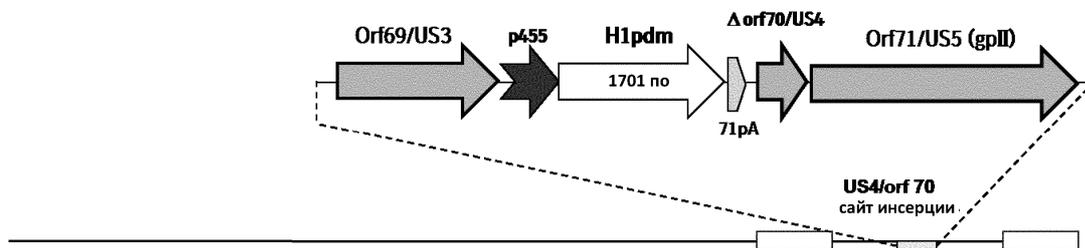
- Фланк А** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции против хода транскрипции
- Фланк В** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции по ходу транскрипции
- p430** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- H1hu** трансген (гемагглютинин IAV)
- BGHра** последовательность полиаденилирования
- I-Sce1** сайт расщепления для I-Sce1
- I-Ceu 1** сайт расщепления для I-Ceu1
- промотор aph** запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
- Капа** устойчивая к канамицину *orf*
- ScaI, EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI** указывают сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой

Фиг. 8

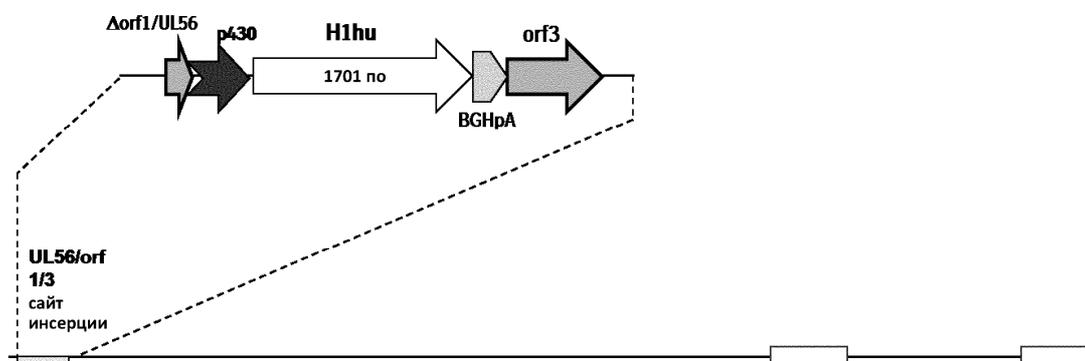


- 3' конец ORF69** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции против хода транскрипции
- 3' конец ORF70** вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции по ходу транскрипции
- p455** запускаемая промотором экспрессия трансгена
- H1pdm** трансген (IAV гемагглютинин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

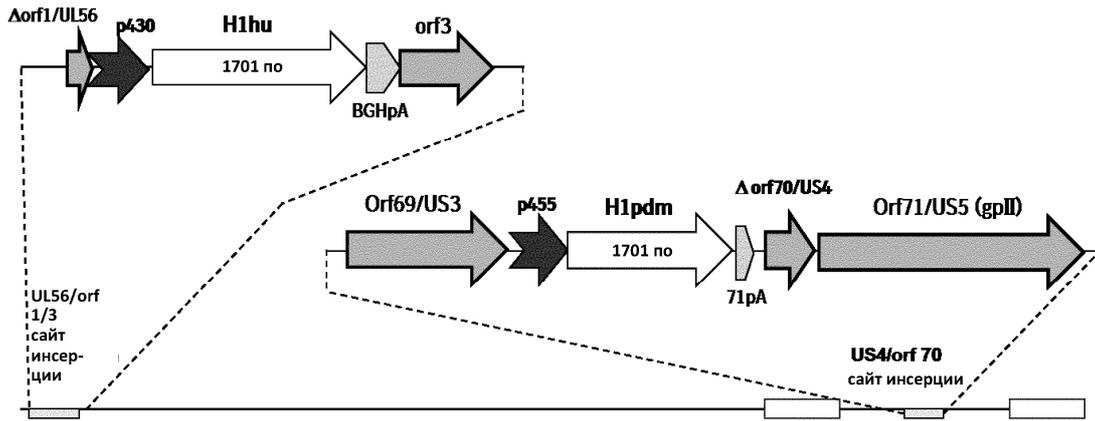
Фиг. 9



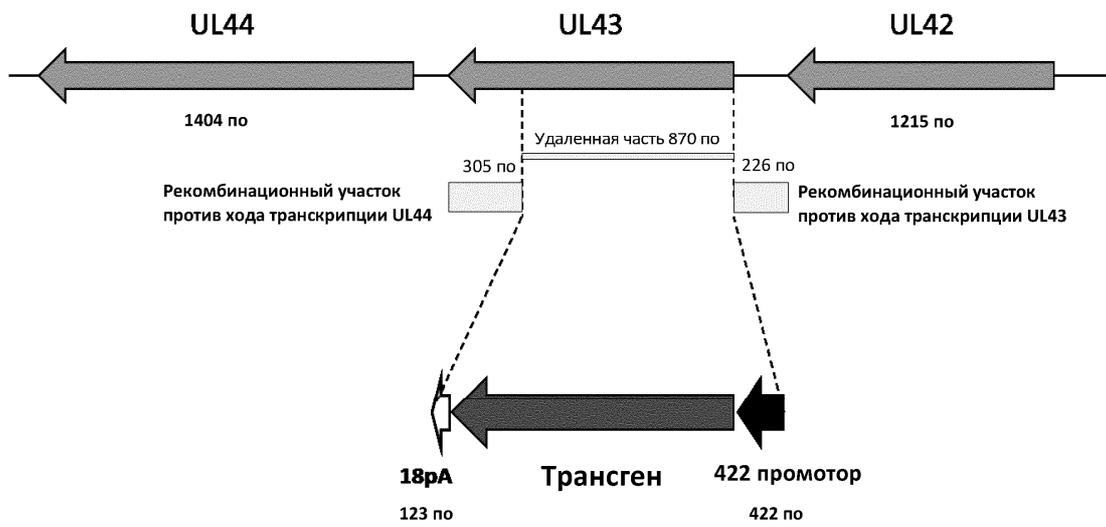
Фиг. 10



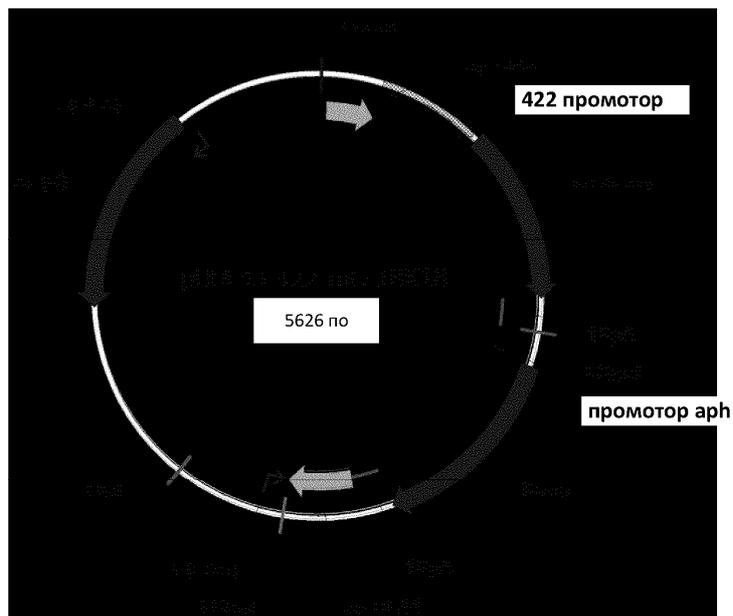
Фиг. 11



Фиг. 12

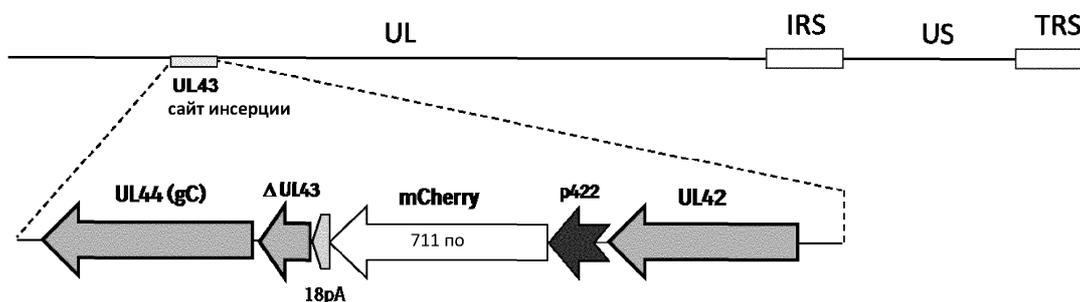


Фиг. 13

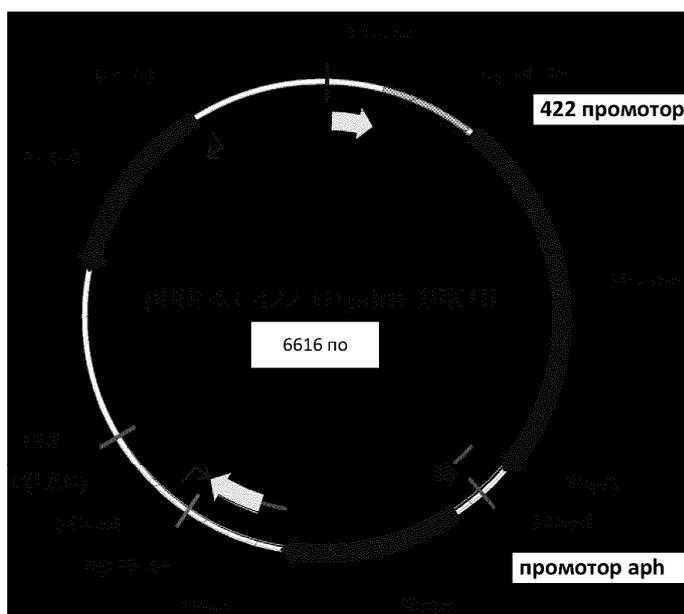


UpUL43	вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции против хода транскрипции
UpUL44	вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции по ходу транскрипции
422 промотор	запускаемая промотором экспрессия трансгена
mCherry	трансген (красный аутофлуоресцентный белок)
18pA	последовательность полиаденилирования
I-Sce1	сайт расщепления для I-Sce1
промотор aph	запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
Kana	устойчивая к канамицину <i>orf</i>
P(BLA)	запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к ампициллину гена
AP(R)	устойчивый к ампициллину ген
ORI	точка начала репликации плазмиды
P(LAC)	прокариотический промотор <i>lacZ</i> , кодирующего бета-галактозидазу
I-Ceu	сайт распознавания хоминг-эндонуклеазы I-Ceu

Фиг. 14

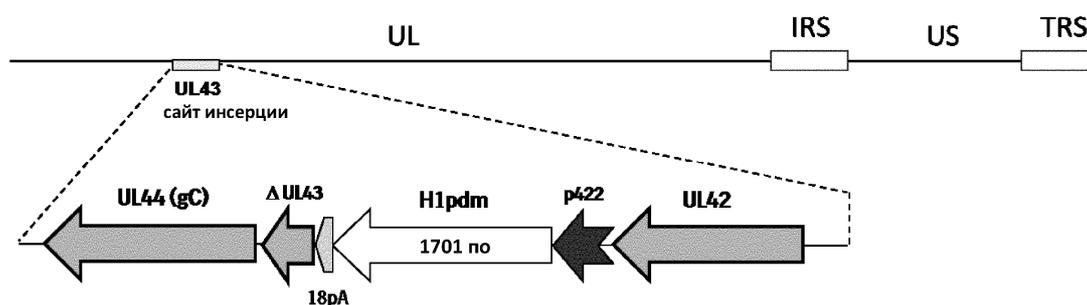


Фиг. 15

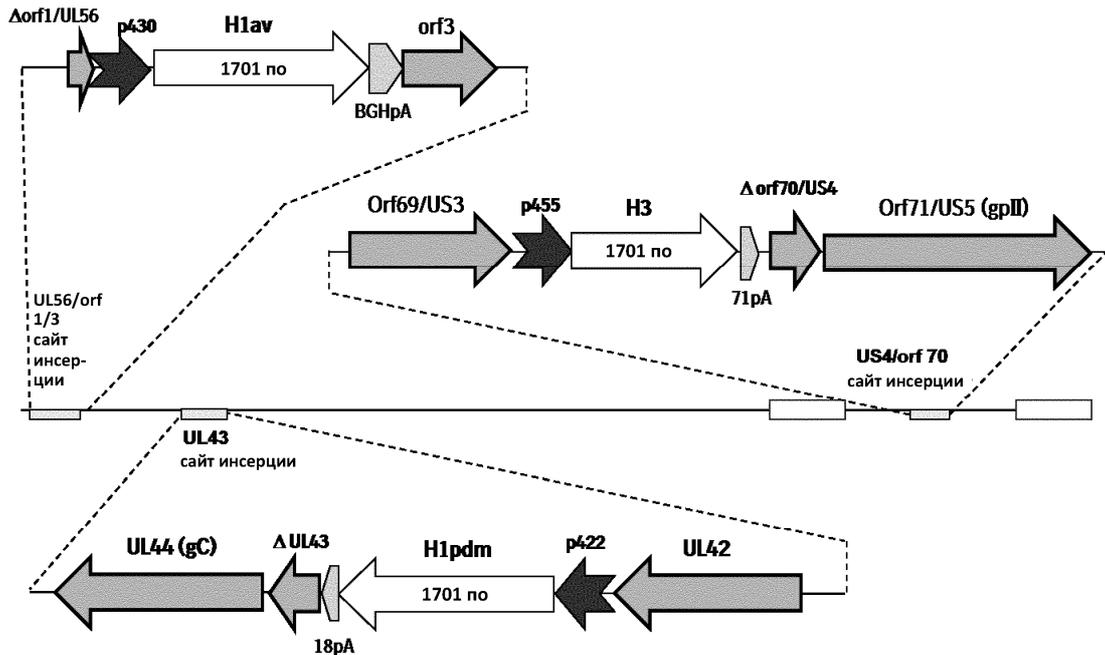


UрUL43	вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции против хода транскрипции
UрUL44	вирусная геномная ДНК последовательность, фланкирующая сайт инсерции по ходу транскрипции
422 промотор	запускаемая промотором экспрессия трансгена
H1pdm	трансген (гемагглютинин гриппа А)
18pA	последовательность полиаденилирования
I-Sce1	сайт расщепления для I-Sce1
промотор aph	запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к канамицину гена
Kana	устойчивая к канамицину <i>orf</i>
P(BLA)	запускаемая прокариотическим промотором экспрессия устойчивого к ампициллину гена
AP(R)	устойчивый к ампициллину ген
ORI	точка начала репликации плазмиды
P(LAC)	прокариотический промотор <i>lacZ</i> , кодирующего бета-галактозидазу
I-Ceu	сайт распознавания хоминг-эндонуклеазы I-Ceu

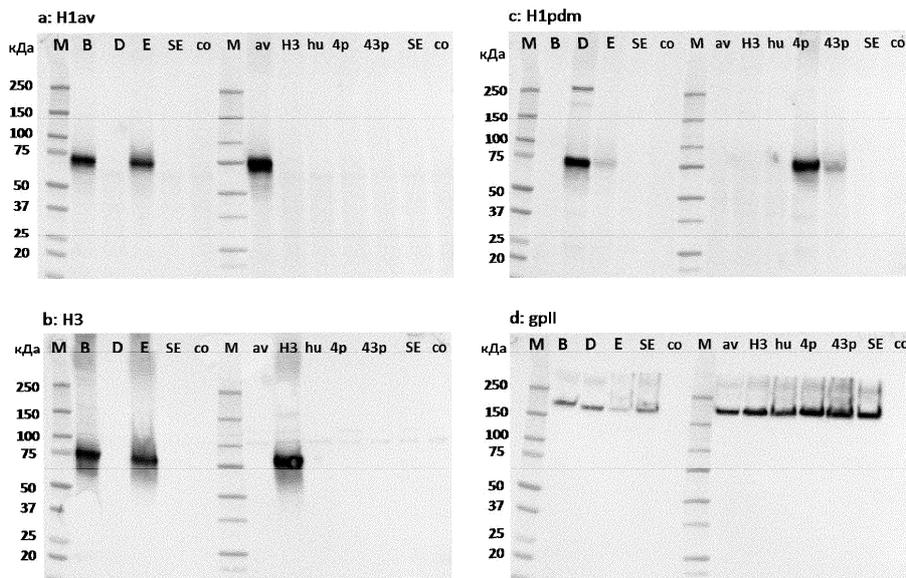
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

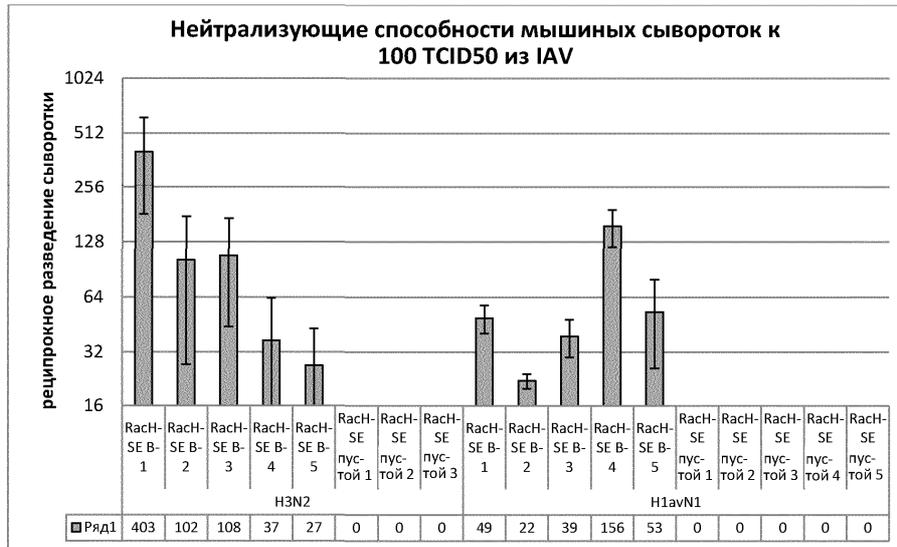
Легенда Фигуры 19 :

- a : Блот, инкубированный с запатентованным моноклональным антителом против HA H1av гриппа
- b : Блот, инкубированный с коммерческой кроличьей антисывороткой, специфичной к HA H3 гриппа
- c : Блот, инкубированный с запатентованным моноклональным антителом против HA H1pdm гриппа
- d : Блот, инкубированный с запатентованным моноклональным антителом против EHV-1 gpII

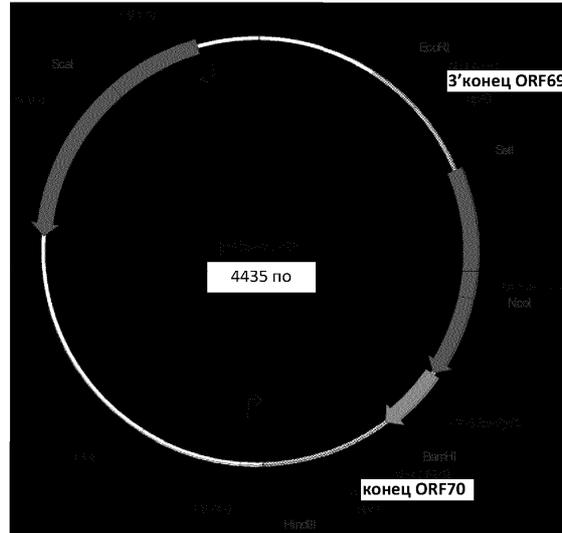
M = маркер молекулярного веса (кДа = килодальтон, 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20)

- B = UL56-H1av-US4-H3
- D = UL56-H1hu-US4-H1pdm
- E = UL56-H1av-UL43-H1pdmUS4-H3
- SE = пустой вектор
- co = неинфицированные клетки
- av = только H1av (в UL56 сайте)
- H3 = только H3 (в US4 сайте)
- hu = только H1hu (в UL56 сайте)
- 4p = только H1pdm в US4 сайте
- 43p = только H1pdm в UL43 сайте

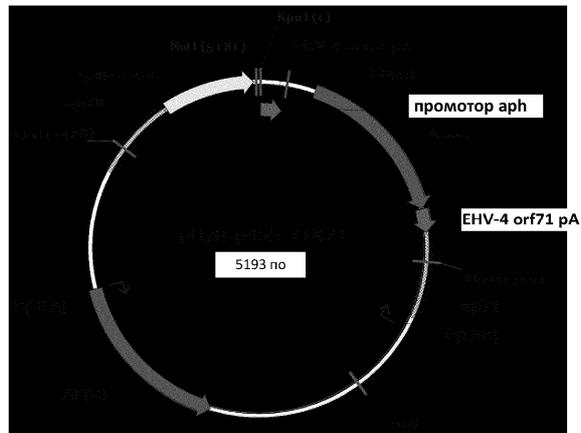
Фиг. 19 (продолжение)



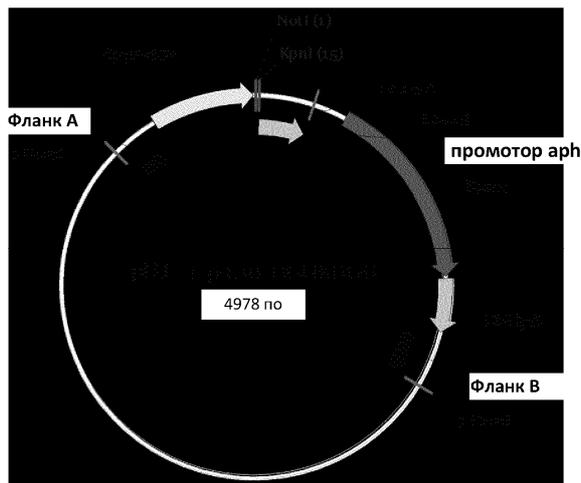
Фиг. 20



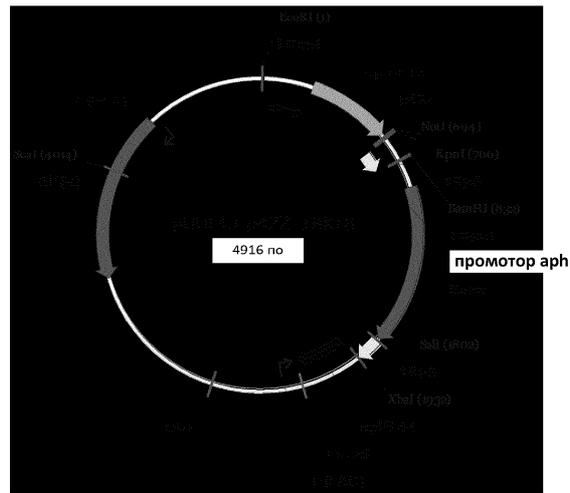
Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24

