

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046680**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.04.09

(21) Номер заявки

202092164

(22) Дата подачи заявки

2019.03.19(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)**A61K 48/00** (2006.01)**A61K 39/145** (2006.01)**C12N 15/869** (2006.01)**A61P 31/00** (2006.01)**(54) НОВЫЙ ЕНУ С ИНАКТИВИРОВАННЫМ UL18 И/ИЛИ UL8**(31) **18162630.0**(32) **2018.03.19**(33) **EP**(43) **2021.02.10**(86) **PCT/EP2019/056804**(87) **WO 2019/179998 2019.09.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ**ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

Коукунтла Рамеш, Ларсен Джейна М.,**Мэнделл Роберт Эрри, Пэлз Лука Н.,****Вон Эрик Мартин (US)**

(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) **WO-A1-9827216****WO-A1-2004020644**

HASSAN Y. A. H. MAHMOUD ET AL. "Characterization of Glycoproteins in Equine Herpesvirus-1", *JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE - NIHON JUIGAKU ZASSHI.*, vol. 75, no. 10, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 1317-1321, XP055478594, JP ISSN: 0916-7250, DOI: 10.1292/jvms.13-0168, page 1317 - page 1318

ZHANG YUNFEI ET AL. "The EHV-1 UL4 protein that tempers viral gene expression interacts with cellular transcription factors", *VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL*, vol. 449, 21 November 2013 (2013-11-21), pages 25-34, XP028669471, ISSN: 0042-6822, DOI:10.1016/J.VIROL.2013.11.005 table 2a

CN-A-105641692**CN-A-105535959**

ISABELLA MUYLEAERT ET AL. "Identification of Conserved Amino Acids in the Herpes Simplex Virus Type 1 UL8 Protein Required for DNA Synthesis and UL52 Primase Interaction in the Virus Replisome", *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 287, no. 40, 28 September 2012 (2012-09-28), pages 33142-33152, XP055504203, US ISSN: 0021-9258, DOI:10.1074/jbc.M112.356782 figure 9; table 1

(57) Изобретение относится к области (векторных) вакцин и, в частности, к новым ЕНУ, имеющим инактивацию UL18 и/или UL8. Изобретение дополнительно охватывает родственные экспрессионные кассеты и векторы, которые пригодны для экспрессии генов, представляющих интерес, в частности антигенкодирующих последовательностей. Вирусные векторы согласно изобретению пригодны для получения иммуногенной композиции или вакцины.

B1**046680****046680****B1**

Перечень последовательностей

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

Предпосылки создания изобретения

А. Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области (векторных) вакцин, и, в частности, к инаktivации UL18 и/или UL8 в EHV. Настоящее изобретение также относится к дефектным по репликации EHV, имеющим инаktivацию UL18 и/или UL8. Настоящее изобретение дополнительно охватывает родственные экспрессионные кассеты и векторы, которые пригодны для экспрессии генов, представляющих интерес, в частности антигенкодирующих последовательностей. Вирусные векторы согласно настоящему изобретению пригодны для получения иммуногенной композиции или вакцины.

Б. Предпосылки и описание предшествующего уровня техники

Патоген лошадей альфагерпесвирус 1 типа у лошадей (вирусный аборт кобыл, EHV-1) относится к роду *Varicellovirus* в подсемействе *Alphaherpesvirinae* в семействе *Herpesviridae* в порядке *Herpesvirales*. Он представляет собой большой, оболочечный вирус с геномом, представленным двухцепочечной ДНК приблизительно 150 тысяч пар оснований. Другими важными представителями подрода *Varicellovirus* являются альфагерпесвирус человека 3 типа (вирус ветряной оспы), вирус болезни Ауески 1 (вирус псевдобешенства), альфагерпесвирус 1 типа крупного рогатого скота (вирус инфекционного бронхита), и альфагерпесвирус лошадей 4 типа (Вирус ринопневмонии лошадей, EHV-4) (*Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30)*).

EHV-1 и EHV-4 являются эндемическими и поражают лошадей во всем мире. В то время как EHV-4 вызывает преимущественно умеренную инфекцию верхних дыхательных путей, EHV-1 может вызывать системную инфекцию с различными заболеваниями от респираторных симптомов до аборта и летальной 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 *Prevaccinol®* (MSD). Обе содержат классически аттенуированный EHV-1 *RacH* штамм, который перевивали 256 раз в эпителиальных клетках свиней для аттенуирования (Ma и др. 2013). Механизм аттенуирования исследовали на молекулярном уровне. Osterrieder и др. (1996) показали, что в *RacH* отсутствуют две геномные копии *orf67* (IR6) и что восстановления одной копии достаточно для восстановления вирулентности. Дополнительно, *RacH* несет делецию 1283 по, удаляющей 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 перевивания у вакцинированных животных крайне маловероятно, если вообще возможна.

Известно два варианта бактериальной искусственной хромосомы *E.coli* (BAC), закодирующей полный геном вакцинного штамма *RacH* альфагерпесвируса 1 типа лошадей (EHV-1): *pRacH* и *pRacH-SE* в качестве платформы для разработки векторной вакцины. BAC *pRacH-SE* был создан на основании *pRacH*, BAC изначально клонировали в лаборатории Klaus Osterrieder, FU Berlin. *pRacH* имеет делецию *orf71* (US5), кодирующую гликопротеин II (*gpII*; Wellington и др., 1996). На это место интродуцировали BAC-векторные последовательности и GFP-экспрессионную кассету. Для восстановления немодифицированного EHV-1 *RacH* из *pRacH*, его необходимо котрансфектировать с применением плазмиды, содержащей полную *orf71* (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, вследствие этого будет восстановлен исходный геном *RacH*. *pRacH* был модифицирован в настоящем изобретении таким образом, что BAC-векторные последовательности/GFP-экспрессионная кассета становятся само-усекаемыми (SE) при трансфекции в клеточных культурах (Tischer и др., 2007). Эта улучшенная BAC была обозначена как *pRacH-SE*. *pRacH* и *pRacH-SE* оба сами могут служить платформами для разработки векторных вакцин, только с единственным отличием, что *pRacH-SE* существенным образом облегчает восстановление *orf71* (US5) репарированного вируса.

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

от RacH.

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

Штаммы EHV-1 дикого типа имеют три открытые рамки считывания (orf), называемые orf1 (UL56), orf 2 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 orf 2 кодируется комплементарной цепью. Вакцинный штамм RacH имеет делецию 1283 по в этом участке, вовлекающей orf 1 и 2, указывая на то, что эти гены являются несущественными для репликации вируса. По этой причине, сайт служит как сайт инсерции трансгена. Этот сайт инсерции называют ORF1/3 (UL56).

Тем не менее, размер и количество трансгенов, которые могут быть встроены в ORF1/3(UL56) сайт инсерции, обычно ограничен. Таким образом, для увеличения способностей EHV вектора, существует неудовлетворенная потребность в новых и альтернативных путях инсерции и экспрессии трансгенов из EHV вектора, в особенности, рекомбинантного EHV-1 RacH вектора. Может быть благоприятным иметь дефектную по репликации EHV векторную вакцину. Такая дефектная по репликации EHV векторная вакцина не может реплицироваться в животном-хозяине и не распространяется от одного животного к другому животному и, следовательно, является благоприятной по соображениям безопасности и соответствия регламенту.

Barnard и др. 1997 (*Virology*; 237, 97-106) описали, что некоторые мутанты UL8 в вирусе простого герпеса, тип 1, продемонстрировали некоторое ингибирование репликации. Кроме того, Muylaert и др. 2012 (*Journal of Biological Chemistry*; том 287, № 40, сс. 33142-33152) описали некоторых мутантов UL8 в вирусе простого герпеса, тип 1, имеющих дефекты в синтезе ДНК. Дополнительно, некоторые мутации интродуцировали в EHV и наблюдали сходные фенотипы, когда соответствующие мутации интродуцировали в EHV-1 UL8.

В CN 105641692 А описана полная делеция (нокаут) UL18 в вирусе простого герпеса, тип 1 (HSV-1). Тем не менее, в CN 105641692 А описано, что скорость ингибирования бляшкообразования уменьшена для указанного HSV-1 UL18 нокаут на приблизительно 80%, но репликация не полностью отменена. Кроме того, CN 105535959 также изучали фенотип HSV-1 UL18 нокаут и описали, что репликация и инфицирование существенно снижены и что практически не наблюдается инфицирования. Таким образом, по отношению к репликации, в CN 105535959 описан сходный фенотип, как в CN 105641692 А (уменьшение, но не полная отмена репликации). Кроме того, в CN 105535959 описано практически отсутствие инфицирования для HSV-1 UL18 нокаут, что является проблематическим для векторной вакцины (такой как рекомбинантная EHV вакцина), поскольку векторные вакцины должны инфицировать клетки-хозяева для обеспечения адекватного иммунного ответа. В частности, инфекционность и экспрессия трансгена в инфицированных клетках являются существенно важными для эффективности векторных вакцин, экспрессирующих чужеродные антигены. Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в дефектных по репликации (но инфекционных) EHV векторных системах.

Краткое изложение сущности изобретения

Для увеличения способностей EHV вектора, настоящее изобретение обеспечивает пути для получения дефектных по репликации EHV и для инсерции и экспрессии трансгенов из каркаса EHV вектора.

Настоящее изобретение обеспечивает дефектный по репликации EHV, содержащий инактивацию UL18 и/или UL8 и новые, альтернативные сайты инсерции трансгена UL18 и/или UL8, которые можно использовать для инсерции трансгенных последовательностей и экспрессии трансгенных белков из EHV вектора.

Инактивация UL8 и/или UL18 представляет собой полную или частичную делецию, полное или частичное усечение, полную или частичную замену, полную или частичную инверсию, инсерцию.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает клетки-хозяева млекопитающих, содержащие дефектный по репликации EHV вектор согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает клеточные линии, экспрессирующие UL8 и/или UL18 из EHV или его функциональные части для культивирования дефектного по репликации EHV вектора согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает клеточные линии, включающие плазмиду, включающую экспрессионную кассету, включающую UL8 и/или UL18 из EHV или его функциональные части, где клеточная линия экспрессирует UL8 и/или UL18 или его функциональные части. Настоящее изобретение дополнительно охватывает способы продуцирования дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающий инактивированный UL18 и/или UL8 в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает способы продуцирования дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающие стадии:

- а) обеспечение EHV дикого типа или ослабленного EHV;

б) инактивирование UL18 и/или UL8 из EHV со стадии а) и селекцию EHV клонов, которые не несут полную или функциональную часть UL18 и/или UL8;

в) обеспечение комплементарной клеточной линии, экспрессирующей UL18 и/или UL8 или его функциональные части;

г) обеспечение дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV) путем культивирования EHV со стадии б) с комплементарной клеточной линией со стадии в).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает иммуногенные композиции, включающие один или несколько EHV векторов согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает способы иммунизации субъекта, включающие введение такому субъекту иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает способы лечения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном, у субъекта, который в этом нуждается, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению.

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

Эти свойства предоставляют возможность создания рекомбинантных векторных вакцин на основе EHV, который является дефектным по репликации, путем инактивирования UL18 и/или UL8. Кроме того, антигены могут быть инсертированы в указанный EHV вектор. По меньшей мере один антиген из другого сайта инсерции ORF1/3 (UL56) и/или US4 (ORF70) или по меньшей мере два различных антигена параллельно со сходной эффективностью могут экспрессироваться из ORF1/3 (UL56) и/или US4 (ORF70). Кроме того, по меньшей мере один антиген из впервые описанного UL18 и/или UL8 сайта инсерции или по меньшей мере два различных антигена параллельно со сходной эффективностью из впервые описанного UL18 и/или UL8 могут экспрессироваться. Более того, антигены из обоих впервые описанных UL18 и/или UL8 сайта инсерции и указанного другого сайта инсерции ORF1/3 (UL56) и/или US4 (ORF70) могут экспрессироваться. Дефектная по репликации EHV векторная вакцина является благоприятной по соображениям безопасности и соответствия регламенту. Кроме того, если вакцинальная мишень состоит из двух или более различных патогенов/антигенов, то применение нового UL18 и/или UL8 сайта инсерции параллельно с установленным сайтом инсерции, таким как ORF1/3 (UL56) и/или US4 (ORF70), может значительно уменьшить стоимость товаров и обеспечивать очевидное преимущество по сравнению с вектором, экспрессирующим только один антигенный компонент.

Краткое описание фигур

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

Фиг. 1: Плазмидная карта экспрессионной плазмиды, pCEP-ORF43(CO). Этот вектор экспрессирует кодон-оптимизированный EHV-1 ORF43 ген с помощью CMV промотора и используется для создания одной из стабильных клеточных линий.

Фиг. 2: Плазмидная карта экспрессионной плазмиды, pCEP-ORF54(CO). Этот вектор экспрессирует кодон-оптимизированный EHV-1 ORF54 ген с помощью CMV промотора и используется для создания одной из стабильных клеточных линий.

Фиг. 3: Схематическая иллюстрация клонирования mCMV контролируемого RFP в ORF 43 сайте в EHV-1 ВАС ДНК, с удлиненным ORF42-ORF45 участком.

U_L=длинный уникальный сегмент;

U_S=короткий уникальный сегмент;

IR=внутренний инвертированный повтор;

TR=концевой инвертированный повтор;

ogf=открытая рамка считывания;

по=пар оснований.

Фиг. 4: Схематическая иллюстрация клонирования RFP в ORF 43 сайте в EHV-1 ВАС ДНК, с удлиненным ORF42-ORF45 участком.

U_L=длинный уникальный сегмент;

U_S=короткий уникальный сегмент;

IR=внутренний инвертированный повтор;

TR=концевой инвертированный повтор;

ogf=открытая рамка считывания;

по=пар оснований.

Фиг. 5: Модифицированная RED рекомбинация используется для клонирования RFP в ORF43 участке. Верхняя панель: Плазмиды без соблюдения масштаба. ScaI/Kan плаزمиды расщеплена с помощью I-SceI рестрикционной эндонуклеазы. ScaI/Kan фрагмент (фланкированный с помощью ORF 43 последо-

вательностей) трансформируют в GS183 клетки, несущие EHV-/RacH ВАС ДНК. Селекцию на основе хлорамфеникола и канамицина используют для селекции EHV-1/RacH клоны, где ORF43 заменена на *SceI/Kan*. Промежуточный клон обозначен EHV-1/*SceI-Kan*. Нижняя панель: Плазмиды без соблюдения масштаба. RFP (фланкированный с помощью ORF 43 последовательностей) g-блок ДНК трансформировали в GS1783 клетки, несущие EHV-1/*SceI-Kan*, инкубировали с арабинозой и селектировали с хлорамфениколом/арабинозой. RFP ДНК замененный *SceI/Kan* фрагмент на ORF43 в EHV-1/*SceI-Kan* создавал клоны EHV-1-43-RFP.

Фиг. 6: Схематическая иллюстрация клонирования mCMV-RFP-pA в EHV-1 ORF 54 сайте в EHV-1 ВАС ДНК, с удлиненным ORF53-ORF55 участком.

U_L =длинный уникальный сегмент;

U_S =короткий уникальный сегмент;

IR=внутренний инвертированный повтор;

TR=концевой инвертированный повтор;

ogf=открытая рамка считывания;

по=пар оснований.

Фиг. 7: ST (верхняя панель), ST-43-CO и (средняя панель), ST-54-CO клетки, инфицированные с помощью EHV-1/RacH вируса, проявляют сходный СРЕ. Инфицированные клетки экспрессируют GFP (правая панель), но не RFP (данные не представлены).

Фиг. 8: ST (верхняя панель) и ST-43-CO и (нижняя панель) гEHV-1-43-RFP вирус. Инфицированные клетки экспрессируют GFP (средняя панель) и RFP (правая панель), но вирус распространяется и СРЕ наблюдалось только в гEHV-1-43-RFP инфицированных вирусом ST-43-CO клетках.

Фиг. 9: ST (верхняя панель) и ST-43-CO и (нижняя панель) гEHV-1-43-mCMV-RFP вирус. Инфицированные клетки экспрессируют GFP (средняя панель) и RFP (правая панель), но вирус распространяется и СРЕ наблюдалось только в гEHV-1-43-mCMV-RFP инфицированных вирусом ST-43-CO клетках.

Фиг. 10: ST (верхняя панель) и ST-54-CO и (нижняя панель) гEHV-1-54-mCMV-RFP вирус. Инфицированные клетки экспрессируют GFP (средняя панель) и RFP (правая панель), но вирус распространяется и СРЕ наблюдалось только в гEHV-1-54-mCMV-RFP инфицированных вирусом ST-54-CO клетках.

Фиг. 11: Плазмидная карта трансферного вектора pU70-p455-71K71.

Фиг. 12: Плазмидная карта трансферной плазмиды для инсерции экспрессионной кассеты p455-H3-71 в ORF70 из EHV-1 RacH.

Фиг. 13: Схематическая иллюстрация генома гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 с удлиненным ogf70 участком инсерции. ogf69: открытая рамка считывания номер 69 против хода транскрипции сайта инсерции в ogf70; p455: новый промотор, описанный в настоящей заявке, см., например, пример 1; H3: транскенгемагглютинаина вируса гриппа; 71pA: новая последовательность полиаденилирования; Dogf70: остаток из ogf70, содержащий промотор для ogf71, который кодирует структурный вирусный гликопротеин II (gpII).

Фиг. 14: Непрямой иммунофлуоресцентный анализ: Непрямой иммунофлуоресцентный анализ VERO-клеток, инфицированных с помощью гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 через 24 ч п.и. клетки фиксировали с помощью этанола и высушивали на воздухе. Используя коммерчески доступное моноклональное антитело к H3 в качестве первичного антитела и FITC-конъюгированный кроличий анти-мышинный IgG в качестве вторичного антитела, H3 присутствовал в клетках, инфицированных с применением рекомбинантного EHV-1 RacHSE-70-p455-H3 с помощью флуоресцентной микроскопии.

Фиг. 15: Среднегрупповые температуры тела до и через 1, 2 и 3 дня после заражения. "Усы" погрешностей, стандартные отклонения. Слева направо для исследуемого дня: отрицательная контрольная группа (отр. контр.), зараженная контрольная группа (зараж. контр.), животные, вакцинированные один раз с применением RacH-SE-70-p455-H3 (1× EHV-1), вакцинированные два раза с применением RacH-SE-70-p455-H3 (2× EHV-1), или дважды с применением инактивированной свиной IAV вакцины (2× убитая).

Фиг. 16: Средние легочные показатели для групп через один и три дня после заражения. "Усы" погрешностей, стандартные отклонения. Отрицательная контрольная группа (отр. контр.), зараженная контрольная группа (зараж. контр.), животные, вакцинированные один раз с применением RacH-SE-70-p455-H3 (1× EHV-1), вакцинированные два раза с применением RacH-SE-70-p455-H3 (2× EHV-1), или дважды с применением инактивированной свиной IAV вакцины (2× убитая).

Фиг. 17: Титры вирусов: На графиках представлены вирусные загрузки образцов легких вакцинированных или невакцинированных свиней после заражения. Инакт= коммерчески доступная инактивированная вакцина. EHV=гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3.

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

Фиг. 19: ИФА анализ с инфицированными gEHV-1-ΔORF43-NA вирусом ST-43-CO (верхняя панель) и некомплементарными ST клетками (нижняя панель). Инфицированные клетки экспрессируют EHV-1 (левая панель) и NA белки (правая панель), но вирус распространяется и СРЕ наблюдалось только в gEHV-1-ΔORF43-NA инфицированных вирусом ST-43-CO клетках.

Фиг. 20: HI анализ с сывороткой от контрольных и вакцинированных вирусом gEHV-1-ΔORF43-NA свиней (5 свиней на каждую группу).

Подробное описание изобретения

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

Настоящее изобретение дополнительно охватывает герпесвирус лошадей (EHV), специфически альфагерпесвирус лошадей, такой как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически альфагерпесвирус 1 типа лошадей (EHV-1) вектор, наиболее специфически штамм RacH, содержащий инактивацию UL18 и/или UL8.

В целом, настоящее изобретение обеспечивает дефектный по репликации альфагерпесвирус лошадей (EHV) вектор, предпочтительно штамм RacH, содержащий инактивацию UL18 и/или UL8.

Благоприятно, EHV векторы, как описано в настоящей заявке, имеют дефектный по репликации фенотип. Такая дефектная по репликации EHV векторная вакцина не реплицируется в животном-хозяине и не распространяется от одного животного к другому животному и, следовательно, является благоприятной по соображениям безопасности и соответствия регламенту. В одном аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению UL18 является инактивированным.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению UL8 является инактивированным.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению UL18 и UL8 являются инактивированными.

Инактивация UL18 и UL8

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению инактивация UL18 представляет собой полную или частичную делецию, полное или частичное усечение, полную или частичную замену, полную или частичную инверсию, инсерцию.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению инактивация UL8 представляет собой полную или частичную делецию, полное или частичное усечение, полную или частичную замену, полную или частичную инверсию, инсерцию.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению стартовый кодон UL18 (ATG, нуклеотиды 1-3 из SEQ ID NO: 1) является инактивированным.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению указанная инактивация стартового кодона (ATG) UL18 представляет собой делецию, замену, инверсию или инсерцию.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению стартовый кодон UL8 (ATG, нуклеотиды 1-3 из SEQ ID NO: 2) является инактивированным.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению указанная инактивация стартового кодона (ATG) UL8 представляет собой делецию, замену, инверсию или инсерцию.

Инактивация UL18

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению по меньшей мере 1 нуклеотид, по меньшей мере 2 нуклеотида, по меньшей мере 3 нуклеотида, по меньшей мере 4 нуклеотида, по меньшей мере 5 нуклеотидов, по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов, по меньшей мере 50, нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов, по меньшей мере 200 нуклеотидов, по меньшей мере 300 нуклеотидов, по меньшей мере 400 нуклеотидов, по меньшей мере 500 нуклеотидов, по меньшей мере 600 нуклеотидов, по меньшей мере 700 нуклеотидов, по меньшей мере 800 нуклеотидов, по меньшей мере 900, нуклеотидов, по меньшей мере 925 нуклеотидов, по меньшей мере 940 нуклеотидов от 5'-конца стартового кодона (ATG, нуклеотиды 1-3 из SEQ ID NO: 1) UL18 делетировано, заменено или инвертировано.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению по меньшей мере 1 нуклеотид, по меньшей мере 2 нуклеотида, по меньшей мере 3 нуклеотида, по меньшей мере 4 нуклеотида, по меньшей мере 5 нуклеотидов, по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов, по меньшей мере 50, нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов, по меньшей мере 200 нуклеотидов, по меньшей мере 300 нуклеотидов, по меньшей мере 400 нуклеотидов, по меньшей мере 500 нуклеотидов, по меньшей мере 600 нуклеотидов, по меньшей мере 700 нуклеотидов, по меньшей мере 800 нуклеотидов, по меньшей мере 900, нуклеотидов, по меньшей мере 925 нуклеотидов, по меньшей мере 940 нуклеотидов из А, Т, или G стартового кодона (ATG, нуклеотиды 1-3 из SEQ ID NO: 1) UL18 делетировано, заменено или инвертировано.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению по меньшей мере 1 нуклеотид, по меньшей мере 2 нуклеотида, по меньшей мере 3 нуклеотида, по меньшей мере 4 нуклеотида, по меньшей мере 5 нуклеотидов, по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов,

кассеты в UL8.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению инсерция экспрессионной кассеты в UL8 характеризуется делецией участка приблизительно 2256 по в пределах UL8 для RacH (SEQ ID NO: 2) или на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичной и/или идентичной к ней последовательности. Фланкирующие участки для UL18.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную последовательность к любой из этих последовательностей.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV включает (I) по меньшей мере один UL18 фланкирующий участок против хода транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9, и (II) по меньшей мере один UL18 фланкирующий участок по ходу транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 10.

Фланкирующие участки для UL8

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную последовательность к любой из этих последовательностей.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV включает (I) по меньшей мере один UL8 фланкирующий участок против хода транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 11 и (II) по меньшей мере один UL8 фланкирующий участок по ходу транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 12.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает плазмиду, включающую фланкирующие участки для гомологичной рекомбинации или RED-опосредованной рекомбинации (см. обе, как описано выше) в специфический целевой сайт в геноме вирусного вектора, предпочтительно в UL18 и/или UL8 сайт EHV вектора, специфически EHV-1, более специфически RacH вектора.

Рекомбинантный EHV

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению указанный EHV вектор представляет собой не встречающийся в природе и/или рекомбинантный EHV.

Функциональное определение для дефектного по репликации

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена по меньшей мере на 90%.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена по меньшей мере на 95%.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена по меньшей мере на 99%.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена по меньшей мере на 99,5%.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена по меньшей мере на 99,75%.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации отменена полностью.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению скорость репликации измеряют с помощью TCID₅₀ анализа. В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению дефектный по репликации EHV вектор все еще эффективный. Благоприятно, EHV вектор, как описано в настоящей заявке, имеет дефектный по репликации фенотип, но все еще инфекционный. Инфекционность является необходимой, поскольку вирусная вакцина должна инфицировать клетки-хозяева для обеспечения адекватного иммунного ответа. В особенности, инфекционность необходима вирусным векторным вакцинам, экспрессирующим чужеродные антигены.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV все еще эффективный, может реплицироваться в инфицированных эукариотических клеточных линиях, но только упакованный в виде компетентного по репликации вируса в комплементарных клеточных линиях. Благоприятно, вирусная ДНК и вирусный белок все еще продуцируются в хозяине и, следовательно, дефектный по репликации EHV согласно настоящему изобретению все еще индуцирует иммунный ответ и/или защитный иммунитет. Благоприятно, данные согласно настоящему изобретению показывают, что экспрессия белка (экспрессия маркерного белка) все еще происходит в дефектном по репликации EHV вирусе согласно настоящему изобретению.

Инсерция в UL56 или US4

В дальнейшем специфическом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению, указанный EHV вектор 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 UL18 и/или UL8, например, с помощью IRES /2a пептида(ов). В другом аспекте указанный вектор или экспрессионная кассета включают 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 другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в инсерционный сайт, предпочтительно UL56 и/или US4. В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL18 и/или UL8 и по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL56 и/или US4.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL18 и по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL56 (моновалентная вакцина).

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL18 и по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в US4 (моновалентная вакцина).

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL8 и по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL56 (моновалентная вакцина).

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL8 и по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в US4 (моновалентная вакцина).

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL18 и по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL56 и US4 (бивалентная вакцина).

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL8 и по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL56 и US4 (бивалентная вакцина).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает герпесвирус лошадей (EHV), специфически альфагерпесвирус лошадей, такой как EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9, более специфически альфагерпесвирус 1 типа лошадей (EHV-1) вектор, наиболее специфически штамм RasH, включающий первую нуклеотидную последовательность или ген, представляющий интерес, предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL18 и/или UL8 и по меньшей мере одну дополнительную нуклеотидную последовательность или ген, представляющий интерес, предпочтительно другую антигенкодирующую последовательность, инсертированную в по меньшей мере один другой сайт инсерции, предпочтительно UL56 (ORF1/3) и/или US4 (ORF70). В специфическом аспекте осуществления указанного EHV вектора согласно настоящему изобретению, по меньшей мере два представляющих интерес гена функционально связаны с регуляторными последовательностями, предпочтительно промоторными последовательностями.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает две или более представляющих интерес нуклеотидные последовательности, предпочтительно представляющих интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующие последовательности, инсертированные в два или более сайта инсерции.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL18 и/или UL8 путем инсертирования по меньшей мере одной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно инсертированной антигенкодирующей последовательности, и по меньшей мере одной дополнительной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности (или экспрессионной кассеты, содержащей вышеуказанный компонент) и по меньшей мере одной дополнительной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена,

ности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности, инсертированной в UL56.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL18 и UL8 путем инсертирования по меньшей мере одной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно инсертированной антигенкодирующей последовательности, и по меньшей мере одной дополнительной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности (или экспрессионной кассеты, содержащей вышеуказанный компонент) и по меньшей мере одной дополнительной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности, инсертированной в US4. В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает инактивацию UL18 и UL8 путем инсертирования по меньшей мере одной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно инсертированной антигенкодирующей последовательности, и по меньшей мере одной дополнительной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности (или экспрессионной кассеты, содержащей вышеуказанный компонент) и по меньшей мере одной дополнительной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующей последовательности, инсертированной в UL56 и US4.

US4 (ORF70)

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению инсерция в US4 характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или подобным в US4, где US5 остается функциональным.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению инсерция в US4 характеризуется делецией участка приблизительно 801 по в пределах US4 для RacH (SEQ ID NO: 24) или на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичной и/или идентичной к ней последовательности.

В специфическом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению, инсерция в US4 (ORF70) характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или подобным в US4 (ORF70), при этом US5 (ORF71) остается функциональным.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, и SEQ ID NO: 22 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную последовательность к любой из этих последовательностей.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор включает (I) по меньшей мере один левый US4 фланкирующий участок выбирают из группы, включающей: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, и SEQ ID NO: 21, и (II) по меньшей мере один правый US4 фланкирующий участок выбирают из группы, включающей: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, и SEQ ID NO: 22.

Нуклеотидные последовательности и патогены

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

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению указанная антигенкодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему животное, выращиваемое в продовольственных целях, такое как свиньи, крупный рогатый скот или птицы или домашние животные, такие как кошка, лошадь или собака.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению антигенкодирующая последовательность имеет происхождение из патогена, выбранного из перечня, но не ограничиваясь только ими: вирус Шмалленберга, вирус гриппа А, вирус респираторного и репродуктивного синдрома у свиней, цирковирус свиней, вирус классической чумы свиней, вирус африканской лихорадки свиней, вирус гепатита Е, вирус диареи крупного рогатого скота, вирус бешенства, кошачий морбилливирус, столбнячная палочка, микобактерия туберкулеза, актинобактериальная плевропневмония. В специфическом аспекте осуществления вектора или экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению, указанная антигенкодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему свиней. В дальнейшем специфическом аспекте указанный патоген представляет собой вирус свиного гриппа А (IAV). В дальнейшем специфическом аспекте указанный антиген представляет собой гемагглютининовый (HA) антиген, в частности 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 дальнейшем

специфическом аспекте указанный антиген включает или состоит из последовательности, кодируемой SEQ ID NO SEQ ID NO: 14. 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: 14.

Регуляторные последовательности и промоторы

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

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению промоторная(ые) последовательность(и), функционально связанную(ые) с представляющими интерес последовательностями или генами, выбирают из группы, но не ограничиваясь только ими, включающей: SV40 большой Т, HCMV и MCMV немедленно-ранний ген 1, промотор фактора элонгации альфа человека, бакуловирусный промотор полиэдрина, промотор полимеразы II, функциональный фрагмент.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интерес геном, представляет собой MCMV или его функциональный фрагмент или их комплементарные нуклеотидные последовательности.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интерес геном, представляет собой эндогенный промотор UL8 или UL18.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор выбирают из группы, включающей EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9.

В другом аспекте осуществления вектора согласно настоящему изобретению EHV вектор представляет собой EHV-1, предпочтительно RasH.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает EHV вектор в соответствии с настоящим изобретением, включающий:

а. первую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, такую как антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL18 и/или UL8,

б. указанную первую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, необязательно функционально связанную с регуляторной нуклеотидной последовательностью/промоторной последовательностью,

в. указанную первую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, необязательно функционально связанную с (дополнительной) регуляторной нуклеиновой кислотой, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно 71pA или BGHpA.

В специфическом аспекте EHV вектор дополнительно включает

а. вторую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно второй представляющий интерес ген, такую как антигенкодирующая последовательность, во втором сайте инсерции, предпочтительно UL56 и/или US4,

б. указанную вторую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, необязательно функционально связанную с регуляторной нуклеотидной последовательностью/промоторной последовательностью,

в. указанную вторую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, необязательно функционально связанную с регуляторной нуклеиновой кислотой, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно 71pA или BGHpA.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает EHV вектор в соответствии с настоящим изобретением, включающий:

а. инактивированный UL18 и/или UL8;

б. первую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, такую как антигенкодирующую последовательность, инсертированную в UL56 и/или US4,

в. указанную первую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, необязательно функционально связанную с регуляторной нуклеотидной последовательностью/промоторной последовательностью,

г. указанную первую представляющую интерес нуклеотидную последовательность, необязательно функционально связанную с (дополнительной) регуляторной нуклеиновой кислотой, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно 71pA или BGHpA.

Клетка-хозяин

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клетку-хозяина млекопитающего, отличающуюся

тем, что она включает дефектный по репликации EHV вектор, как описано в настоящей заявке.

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

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

- а. инфицирование клетки-хозяина млекопитающего в соответствии с настоящим изобретением с помощью вектора в соответствии с настоящим изобретением,
- б. культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,
- в. необязательно сбор указанной клетки-хозяина.

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

Комплементарная клеточная линия

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клеточную линию, экспрессирующую UL8 и/или UL18 из EHV или его функциональные части для культивирования дефектного по репликации EHV вектора, как описано в настоящей заявке.

Более того, настоящее изобретение обеспечивает клеточную линию, включающую плазмиду, включающую экспрессионную кассету, включающую UL8 и/или UL18 из EHV или его функциональные части, где клеточная линия экспрессирует UL8 и/или UL18 или его функциональные части.

В другом аспекте осуществления клеточной линии согласно настоящему изобретению, клеточную линию выбирают, но не ограничиваясь только ими, из группы, включающей: Vero клетки, RK-13 (почки кролика), ST (свиньи яички), MDCK (клетки Мадин-Дарби почек собак), MDBK (клетки Мадин-Дарби почек крупного рогатого скота) и Клетки кожи лошадей (NBL-6).

В другом аспекте осуществления клеточной линии согласно настоящему изобретению, клеточная линия представляет собой ST клеточную линию.

Способ получения

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающий инактивированный UL18 и/или UL8, как описано в настоящей заявке.

Более того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающие стадии:

- а) обеспечение EHV дикого типа или ослабленного EHV;
- б) инактивирование UL18 и/или UL8 из EHV со стадии а) и селекцию EHV клонов, которые не несут полную или функциональную часть UL18 и/или UL8;
- в) обеспечение комплементарной клеточной линии, экспрессирующей UL18 и/или UL8 или его функциональные части;
- г) обеспечение дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV) путем культивирования EHV со стадии б) с комплементарной клеточной линией со стадии в).

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

- а. Инсерцию первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно представляющего интерес гена, такой как антигенкодирующая последовательность, в UL18 и/или UL8,
- б. Необязательно функциональное связывание указанной первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной нуклеотидной последовательностью/промоторной последовательностью,
- в. Необязательно функциональное связывание указанной первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности с (дополнительной) регуляторной нуклеиновой кислотой, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно 71pA или BGHpA.

В специфическом аспекте способ дополнительно включает

- а. Инсерцию второй представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно второго представляющего интерес гена, такой как антигенкодирующая последовательность, во втором сайте инсерции, предпочтительно UL56 и/или US4,
- б. Необязательно функциональное связывание указанной второй представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной нуклеотидной последовательностью/промоторной последовательностью,
- в. Необязательно функциональное связывание указанной второй представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной нуклеиновой кислотой, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно 71pA или BGHpA.

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

- а. инактивирование UL18 и/или UL8 из EHV;
- б. Инсерцию первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности, предпочтительно

представляющего интерес гена, такой как антигенкодирующая последовательность, в UL56 и/или US4,

в. Необязательно функциональное связывание указанной первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности с регуляторной нуклеотидной последовательностью/промоторной последовательностью,

г. Необязательно функциональное связывание указанной первой представляющей интерес нуклеотидной последовательности с (дополнительной) регуляторной нуклеиновой кислотой, например, последовательностью полиаденилирования, предпочтительно 71pA или BGHpA.

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

а. Инфицирование комплементарной клеточной линии в соответствии с настоящим изобретением с помощью вектора в соответствии с настоящим изобретением,

б. культивирование инфицированных клеток в подходящих условиях,

в. сбор инфицированных клеточных культур,

г. необязательно очистку собранных инфицированных клеточных культур со стадии в)

д. необязательно смешивание указанных собранных инфицированных клеточных культур с фармацевтически приемлемым носителем.

Вакцина

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, включающую один или несколько EHV векторов, как описано в настоящей заявке.

В другом аспекте осуществления иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению, указанная иммуногенная композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте осуществления иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению, указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

Следовательно, изобретение дополнительно охватывает иммуногенную композицию, включающую

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

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

в. необязательно фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель является пригодным для перорального, внутривенного, внутримышечного или интраназального введения,

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

Изобретение дополнительно охватывает вакцину или фармацевтическую композицию, включающую

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

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

в. фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или наполнитель, предпочтительно указанный носитель является пригодным для перорального, внутривенного, внутримышечного или интраназального введения,

г. необязательно указанная вакцина дополнительно включает адъювант.

Способ лечения и применения

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ иммунизации субъекта, включающий введение такому субъекту иммуногенной композиции, как описано в настоящей заявке.

Более того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном, у субъекта, который в этом нуждается, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, как описано в настоящей заявке.

Настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, как описано в настоящей заявке, для применения в способе иммунизации субъекта, включающему введение такому субъекту указанной иммуногенной композиции.

Настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, как описано в настоящей заявке, для применения в способе лечения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном, у субъекта, который в этом нуждается, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

В другом аспекте осуществления способа или применения согласно настоящему изобретению, указанного субъекта выбирают из перечня, включающего свиней, крупный рогатый скот, птиц, кошек, лошадей и собак.

В другом аспекте осуществления способа или применения согласно настоящему изобретению, иммуногенную композицию вводят один раз. В другом аспекте осуществления способа или применения согласно настоящему изобретению, иммуногенную композицию вводят в виде двух или более доз.

Изобретение также обеспечивает набор для иммунизации животного, предпочтительно животного, выращиваемого в продовольственных целях, такого как свиньи или крупный рогатый скот или домашнее животное, такого как кошка, лошадь или собака, от заболевания, связанного с и/или уменьшения частоты или тяжести одного или нескольких клинических симптомов, связанных с или вызываемых патогеном у животного, включающий:

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

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

Определения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данной заявке, 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 данной заявке, главенствуют над любым словарем или внешним определением. Кроме того, если иное не предусмотрено контекстом, то особые условия должны включать множества, а множественные термины будут включать единственное число. При этом использование союза "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включающий", а также других форм, таких как "включает" и "включенный" не является ограничивающим. Все патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, являются введенными в данную заявку в качестве ссылки.

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

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

Молекулярно-биологические определения

Термин "вектор", как он известен в данной области техники, относится к полинуклеотидной конструкции, типично плазмиде или бактериальной искусственной хромосоме, используемой для передачи генетического материала в клетку-хозяин. Векторы могут представлять собой, например, бактерии, вирусы, фаги, бактериальные искусственные хромосомы, космиды или плазмиды. Вектор, как используется в настоящей заявке, может состоять из или содержать либо ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, вектор состоит из ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой патогенный вирус. Такой вирусный вектор содержит вирусный геном, который обрабатывают таким образом, что он несет чужеродный ген, который не принимает участие ни в репликации вирусного вектора, ни в клеточной культуре, ни в животном-хозяине. В соответствии со специфическими аспектами настоящего раскрытия, вектор можно использовать в различных аспектах, таких как только передача генетического материала, для трансфекции клеток-хозяев или организмов, для применения в качестве вакцины, например, ДНК вакцин или для экспрессии генов. Экспрессия гена представляет собой термин, описывающий биосинтез белка в клетке, которая управляется специфической полинуклеотидной последовательностью, называемую геном. В специфическом аспекте вектор может представлять собой "экспрессионный вектор", который представляет собой вектор, способный управлять экспрессией белка, кодируемого одним или несколькими генами, которые несет вектор, если он находится в подходящей окружающей среде. Векторы и способы получения и/или использования векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут представлять собой или являются аналогичными способам, описанным, в частности, в: патенты США №№ 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235,

5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, 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, октябрь 1996 г.; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, октябрь 1996 г.; Smith и др., патент США № 4,745,051 (рекомбинантный бакуловирус); Richardson, C. D. (ред.), *Methods in Molecular Biology* 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith и др., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", *Molecular and Cellular Biology*, December, 1983, том 3, № 12, сс. 2156-2165; Pennock и др., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus Vector", *Molecular and Cellular Biology* март 1984 г., том 4, № 3, с. 406; ЕРА0370 573; опубликованная заявка на патент США № 920,197, поданная 16 октября 1986 г.; опубликованная заявка на патент ЕР № 265785; патент США № 4,769,331 (рекомбинантный герпесвирус); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, октябрь 1996 г.; Andreansky и др., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, октябрь 1996 г.; Robertson и др., "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, октябрь 1996 г.; Kitson и др., *J. Virol.* 65, 3068-3075, 1991; патенты США №№ 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; принятые к рассмотрению заявки на патент США сер. №№ 08/675,556, и 08/675,566, обе поданные 3 июля 1996 г. (рекомбинантный аденовирус); Grunhaus и др., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," *Seminars in Virology* (том 3) сс. 237-52, 1993; Ballay и др. *EMBO Journal*, том 4, сс. 3861-65, Graham, *Tibtech* 8, 85-87, апрель 1990 г.; Prevec и др., *J. Gen Virol.* 70, 42434; РСТ WO 91/11525; Feigner и др. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561, *Science*, 259: 1745-49, 1993; и McClements и др., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, октябрь 1996; и патенты США №№ 5,591,639, 5,589,466, и 5,580,859, а также WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang и др., *Nature*, и Furth и др., *Analytical Biochemistry*, relating to DNA Expression Vectors. См. также WO 98/33510; Ju и др., *Diabetologia*, 41: 736-739, 1998 (лентивирусная экспрессионная система); Sanford и др., патент США № 4,945,050; Fischbachet и др. (Intracel); WO 90/01543; Robinson и др., *Seminars in Immunology* том 9, сс. 271-283 (1997), (ДНК векторные системы); Szoka и др., патент США № 4,394,448 (способ инсерции ДНК в живые клетки); McCormick и др., патент США № 5,677,178 (применение цитопатических вирусов); и патент США № 5,928,913 (векторы для доставки генов); а также другие документы, процитированные в настоящей заявке.

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

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

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

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

меньшей мере приблизительно 750 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 800 аминокислот, или больше.

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

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

Термин "конструкция", как используется в настоящей заявке, относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, такой как плазида, ВАС или рекомбинантный вирус, которые были созданы искусственно. Термин "плазида" относится к цитоплазматической ДНК, которая реплицируется независимо от бактериальной хромосомы в бактериальной клетке-хозяине. В специфическом аспекте настоящего изобретения термин "плазида" и/или "трансферная плазида" относится к элементу технологии рекомбинантной ДНК, используемой для конструирования, например, экспрессионной кассеты для инсерции в вирусный вектор. В другом специфическом аспекте термин "плазида" может использоваться для указания плазмиды, пригодной для ДНК вакцинации.

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

Термин "нуклеиновая кислота", "нуклеотидная последовательность", "нуклеотидная последовательность", "полинуклеотид", "полинуклеотидная последовательность", "РНК последовательность" или "ДНК последовательность", как используется в настоящей заявке, относится к олигонуклеотиду, нуклеотиду или полинуклеотиду и их фрагментам и частям и к ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными и представлять собой смысловую или бессмысловую цепь. Последовательность может представлять собой некодирующую последовательность, кодирующую последовательность или смесь обоих. Нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению могут быть получены, используя стандартные техники, хорошо известные квалифицированному специалисту в данной области техники. Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" также специфически охватывают нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличающихся от пяти биологически встречающихся оснований (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил).

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

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

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

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

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

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

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

Термины "ген", "представляющий интерес ген", как используется в настоящей заявке, имеют одинаковые значения и относятся к полинуклеотидной последовательности любой длины, которая кодирует представляющий интерес продукт. Ген может дополнительно содержать регуляторные последовательности, расположенные перед (5' некодирующие или нетранслируемые последовательности) и после (3' некодирующие или нетранслируемые последовательности) кодирующей последовательности. Выбранная последовательность может иметь полную длину или быть усеченной, слитой или меченой геном, и может представлять собой кДНК, геномную ДНК или ДНК фрагмент. В общих чертах подразумевается, что геномная ДНК, кодирующая полипептид, или РНК могут включать не-кодирующие участки (то есть интроны), которые сплайсированы от зрелой матричной РНК (мРНК) и, следовательно, не присутствуют в кДНК, кодирующей тот же самый полипептид или РНК. Она может представлять собой нативную после-

довательность, то есть встречающуюся(иеся) в природе форму(ы), или может быть мутирована, или включать последовательности, имеющие происхождение из различных источников, или модифицирована другим образом, если это является желательным. Эти модификации включают оптимизации кодонов для оптимизации частоты 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 секретируемый, цитоплазматический, ядерный, мембранно-связанный полипептид или полипептид клеточной поверхности.

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

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

Термин "UL (уникально длинный)" представляет собой сокращение для описания уникально длинного сегмента EHV генома, предпочтительно EHV-1 генома.

Термин "US (уникально короткий)" представляет собой сокращение для описания уникально короткого сегмента EHV-1 генома, предпочтительно EHV-1 генома.

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

Термин "экспрессионная кассета" или "транскрипционная единица" или "экспрессионная единица" определяется как участок в векторе, конструкции или полинуклеотидной последовательности, который содержит один или больше транскрибируемых генов, где нуклеотидные последовательности, кодируемые транскрибируемый(е) ген(ы), а также полинуклеотидные последовательности, включающие регуляторные элементы, содержащиеся в экспрессионной кассете, функционально связаны с друг с другом. Они транскрибируются из промотора и транскрипция терминируется на по меньшей мере одном сигнале полиаденилирования. В одном специфическом аспекте, они транскрибируются из одного единичного промотора. В результате этого, различные гены являются по меньшей мере транскрипционно связанными. Может быть транскрибировано более одного белка или продукта и экспрессировано из каждой транскрипционной единицы (мультицистронная транскрипционная единица). Каждая транскрипционная единица будет содержать регуляторные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции любой из выбранных последовательностей, которые содержатся в этой единице. И каждая транскрипционная единица может содержать одинаковые или различные регуляторные элементы. Например, каждая транскрипционная единица может такой же терминатор, IRES элемент или интроны могут использоваться для функционального связывания генов в транскрипционной единице. Вектор или полинуклеотидная последовательность могут содержать больше одной транскрипционной единицы.

Термин "повышенная экспрессия", "повышенный титр или продуктивность" или "улучшенная экспрессия или продуктивность" обозначает повышение экспрессии, синтеза или секреции гетерологичной и/или экзогенной последовательности, интродуцированной в клетку-хозяин, например, гена, кодирующего терапевтический белок, путем сравнения с подходящим контролем, например, белок, кодируемый кДНК относительно белка, кодируемого интрон-содержащим геном. Присутствует повышенный титр или продуктивность, если клетку согласно изобретению культивируют согласно способу по изобретению, описанном в настоящей заявке, и если клетка имеет по меньшей мере 1,2-кратное, 1,5-кратное, дву-

кратное, трехкратное, четырехкратное или пятикратное повышение специфической продуктивности или титра. Также присутствует повышенный титр или продуктивность если клетку согласно изобретению культивируют согласно способу по изобретению, описанном в настоящей заявке, и если клетка имеет по меньшей мере 1,2-кратное или по меньшей мере 1,5-кратное или по меньшей мере двукратное или по меньшей мере трехкратное повышение специфической продуктивности или титра. Также присутствует, в частности, повышенный титр или продуктивность если клетку согласно изобретению культивируют согласно способу по изобретению, описанном в настоящей заявке, и если клетка имеет по меньшей мере 1,2-кратное - пятикратное, предпочтительно 1,5-кратное - пятикратное, более предпочтительно - двукратное - пятикратное, особенно предпочтительно трехкратное - пятикратное повышение специфической продуктивности или титра. "Повышенная экспрессия" также может обозначать, что большее количество клеток действительно экспрессируют представляющий интерес ген/ последовательность. Например, повышенная экспрессия может обозначать, что новые промоторы согласно настоящему изобретению являются активными в течение более продолжительного периода времени в течение цикла репликации вируса по сравнению с другими промоторами.

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

Термин "полученный" может включать стадию выделения и/или очистки, известную квалифицированному специалисту в данной области техники, предпочтительно используя осаждение, колонки и др.

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

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

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

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

Термин "сайт инициации транскрипции" относится к нуклеиновой кислоте в конструкции, соответствующей первой нуклеиновой кислоте, инкорпорированной в первичный транскрипт, то есть предшественнику мРНК.

Сайт инициации транскрипции может перекрываться с промоторными последовательностями.

"Терминирующий кодон" или "терминатор" или "сигнал полиаденилирования" или "polyA" или сайт терминации транскрипции" или "элемент терминации транскрипции" представляет собой сигнальную последовательность, которая вызывает расщепление в специфическом сайте на 3' конце эукариотической мРНК и пост-транскрипционную инкорпорацию последовательности из приблизительно 100 - 200 адениновых нуклеотидов (polyA хвост) на отщепленном 3' конце, и, следовательно, вызывает терминацию транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой. Сигнал полиаденилирования включает последовательность 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 патент США № 5,122,458) или polyA гормона роста хомячка (WO2010010107).

"Регуляторные элементы трансляции" содержат сайт инициации трансляции (AUG), стоп-кодон и polyA сигнал для каждого индивидуального экспрессируемого полипептида. В некоторые конструкции

может быть включен внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Для оптимизации экспрессии может быть желательным удалять, добавлять или изменять 5'- и/или 3'-нетранслируемые участки экспрессируемой нуклеотидной последовательности для элиминации любых потенциальных дополнительных неподходящих альтернативных кодонов инициации трансляции, или другие последовательности, которые могут препятствовать или уменьшать экспрессию, либо на уровне транскрипции или трансляции. Консенсусные сайты связывания рибосом (последовательность Козак) могут быть встроены сразу против хода транскрипции старт-кодона для усиления трансляции и, следовательно, экспрессии. Повышенное содержание A/U вокруг этого сайта связывания рибосомы дополнительно влияет на более эффективное связывание рибосомы. Согласно определению, каждая полинуклеотидная последовательность или каждый ген, встроенный в клетку-хозяин и соответствующий белок или РНК, кодируемая таким образом, обозначается как "экзогенная", "экзогенная последовательность", "экзогенный ген", "экзогенная кодирующая последовательность", по отношению к клетке-хозяину, которая имеет происхождение из отличающихся (вирусных) видов. Таким образом, промотор на основе EHV-4 промотор является экзогенным по отношению к EHV-1 вирусному вектору. Как используется в настоящей заявке, по отношению к представляющей(ему) интерес последовательности или гену, такой(му) как антиген, термин "экзогенный" обозначает, что указанная(ый) представляющая(ий) интерес последовательность или ген, специфически указанный антиген, экспрессируется за пределами окружения его природных видов. Таким образом, HA антиген из свиного IAV является одним из примеров экзогенного антигена по отношению к EHV-1 вектору. Следовательно, любая последовательность, имеющая происхождение от другого патогена, отличающегося от EHV-1, представляет собой экзогенную последовательность или ген, представляющий интерес, или антиген в соответствии со специфическим аспектом настоящего изобретения.

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

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

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

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

Как используется в настоящей заявке, термин "функционально связанный" используется для описания связи между регуляторными элементами и геном или его кодирующим участком. Типично, генная экспрессия помещается под контроль одного или нескольких регуляторных элементов, например, не ограничиваясь только ими, конститутивные или индуцибельные промоторы, тканеспецифические регуляторные элементы и энхансеры. Когда указано, что ген или кодирующий участок является "функционально связанным с" или "оперативно связан с" или "функционально ассоциирован с" регуляторными эле-

ментами, то это обозначает, что или кодирующий участок управляется или находится под воздействием регуляторного элемента. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор оказывает влияние на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности.

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

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

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

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

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

тельно 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. Тем не менее, консервативные замены не включаются как совпадение при определении идентичности последовательностей.

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

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

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

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

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

Термин "лошадиный" или "конский" или "непарнокопытный" обозначают или относятся к семейству лошадиных (Equidae), которое включает коней, ослов и зебр, предпочтительно коней. Дополнительно, термин "лошадиный" или "конский" или "непарнокопытный" охватывает также гибридов представителей семейства Equidae (например, мулов, лошаков, и т.д.). "Вирус герпеса" или "вектор вируса герпеса" относится к видам в семействе Herpesviridae в порядке Herpesvirales.

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

Термин "EHV-1" обозначает альфагерпесвирус 1 типа лошадей 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 (Hübert 1996).

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

Термин "инсертрованный в UL18" или "инсертрованный в ORF43" обозначает, что ДНК фрагмент был инсертрован в геномную ДНК в локализацию, кодирующую открытую рамку считывания 43 (UL18) альфагерпесвируса 1 типа лошадей. В специфическом аспекте согласно настоящему изобретению указанная инсерция приводит к полной делеции (945 по) в ORF43 (UL18).

Термин "инсертрованный в UL8" или "инсертрованный в ORF54" обозначает, что ДНК фрагмент был инсертрован в геномную ДНК в локализацию, кодирующую открытую рамку считывания 54 (UL8) альфагерпесвируса 1 типа лошадей. В специфическом аспекте согласно настоящему изобретению указанная инсерция приводит к делеции (2256 по) в ORF 54 (UL8).

Термин "инсертрованный в ORF70" или "инсертрованный в US4" обозначает, что ДНК фрагмент был инсертрован в геномную ДНК в локализацию, кодирующую открытую рамку считывания 70 (US4) альфагерпесвируса 1 типа лошадей. В специфическом аспекте согласно настоящему изобретению указанная инсерция приводит к делеции 801 пар оснований на 5'-конце для ORF70 (US4), что приводит к тому, что оставшиеся 423 по на 3'-конце остаются интактными, но отменена экспрессия продукта гена *orf70* (US4) гликопротеина G. Было показано, что гликопротеин G нескольких альфагерпесвирусов, включая EHV-1, секретируется из инфицированных клеток и действует в качестве иммуномодулирующего белка путем связывания провоспалительными цитокинами. Отмена его экспрессии в вирусном векторе должна увеличивать иммуногенность вирусной инфекции по сравнению с EHV-1 дикого типа с экспрессией интактного гликопротеина G.

Термин "инсертрованный в ORF1/3" или "инсертрованный в UL56" обозначает, что ДНК фрагмент инсертрован в вирусный геном в положении, где, путем случайной делеции при пассивировании во время процедуры аттенуирования вакцинного штамма EHV-1 RacH фрагмент 1283 по, включающий 90% ORF1 и всю ORF2, был потерян. Этот сайт инсерции был выбран в связи с тем, что, как предполагают, очень низкая вероятность того, что экспрессия трансгена из этой локализации будет мешать репликации вируса.

Термин "инактивация" относится к мутации в пределах UL8 (ORF54) и/или UL18 (ORF43). Термин мутация включает модификаций в вирусной ДНК, кодирующей указанные белки, что приводит к изменению кодируемого белка. Термин мутация относится, но не ограничиваясь только ими, к заменам (замене одного или нескольких нуклеотидов/пар оснований), делециям (удалению одного, нескольких или всех нуклеотидов/пар оснований), и/или инсерциям (добавлению одного или нескольких нуклеотидов/пар оснований). Следовательно, термин мутация включает мутации, включая, но не ограничиваясь только ими, точечные мутации (мутации единственного нуклеотида) или более крупные мутации, где например, удалены части кодирующих (и/или некодирующих) нуклеотидов/пар оснований (частичная делеция) или удалены все кодирующие (и/или некодирующие) нуклеотиды/пары оснований (полная делеция), инсертрованы замененные и/или дополнительные кодирующие (и/или некодирующие) нуклеотиды/пары оснований. Следует принять во внимание, что термин мутация включает мутации в пределах кодирующих нуклеотидов/пар оснований, мутации в пределах некодирующих нуклеотидов/пар оснований, например, в пределах регуляторных нуклеотидов/пар оснований и мутации в пределах как кодирующих нуклеотидов/пар оснований, так и некодирующих нуклеотидов/пар оснований. Кроме того, термин мутация также включает инверсию нуклеотидов/пар оснований (кодирующих и/или некодирующих), такую как инверсия части или всех кодирующих нуклеотидов/пар оснований или инверсия части или всех некодирующих нуклеотидов/пар оснований или их комбинация. Более того, термин мутация также включает перестановку нуклеотидов/пар оснований (кодирующих и/или некодирующих), такую как перестановка части или всех кодирующих нуклеотидов/пар оснований или перестановка части или всех некодирующих нуклеотидов/пар оснований или их комбинация. Как используется в настоящей заявке, мутация может представлять единственную мутацию или несколько мутаций, следовательно, часто термин "мутация (и)" используется и относится как к единственной мутации, так и к нескольким мутациям. Указанные мутации могут приводить к модифицированному экспрессируемому белку вследствие изменения в кодирующей последовательности. Тем не менее, термин мутация хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области техники и квалифицированный специалист в данной области техники может создать мутации без дальнейших проблем.

Кроме того, термин "инактивация" охватывает уменьшенную (или элиминированную) экспрессию РНК и/или белка UL18 и/или UL8. Следует принять во внимание, что уменьшенная экспрессия охватывает как уменьшенную транскрипцию РНК, так и уменьшенную экспрессию белка. Предпочтительно, экспрессия РНК и/или белка UL18 и/или UL8 уменьшена на 5-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-99% или больше для РНК и/или белка по сравнению с экспрессией вируса EHV дикого типа или EHV вируса согласно настоящему изобретению, культивирован-

ной в комплементарной клеточной линии. Более предпочтительно, экспрессия РНК и/или белка UL18 и/или UL8 уменьшена на 50-100%, 60-100%, 70-100% 80-100% или 90-100% для РНК и/или белка по сравнению с экспрессией вируса EHV дикого типа или EHV вируса согласно настоящему изобретению, культивированной в комплементарной клеточной линии. Еще более предпочтительно, экспрессия РНК и/или белка UL18 и/или UL8 уменьшена в EHV согласно настоящему изобретению 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% для РНК и/или белка по сравнению с экспрессией вируса EHV дикого типа или EHV вируса согласно настоящему изобретению, культивированной в комплементарной клеточной линии.

Термин "полностью или частично удалено, заменено или инвертировано" охватывает полную или частичную делецию, полную или частичную замену и полную или частичную инверсию. Термин "полная" обозначает, что вся ORF (UL) повреждена от стартового кодона до стоп кодона ORF (UL). Предпочтительно, UL18 и/или UL8 полностью удалено, заменено или инвертировано. Тем не менее, термин "частичная" обозначает, что только часть целой (UL) повреждена. Предпочтительно, UL18 и/или UL8 частично удалено, заменено или инвертировано.

Термин "от 5'-конца стартового кодона" относится к делеции, замене или инверсии ORF (UL) на 5'-конце. Термин, как используется в настоящей заявке, обозначает, что указанная делеция, замена или инверсия поражает (охватывает) стартовый кодон ORF. Таким образом, части 3'-конца ORF остаются, в то время как части участка 5'-конца ORF делегированы. Тем не менее, указанная делеция, замена или инверсия от 5'-конца может приводить к делеции одной или больше аминокислот в пределах соответствующего белка или к сдвигу рамки в ORF, что приводит к кодирующему участку, который отличается от белка дикого типа. Тем не менее, указанная делеция, замена или инверсия на 5'-конце может приводить к полному отсутствию экспрессии белка, так как стартовый кодон усечен.

Термин "от А, Т или G стартового кодона", как используется в настоящей заявке, обозначает, что указанная делеция, замена или инверсия может начинаться с А или Т или G. В случае, если делеция начинается с А, то А удалено. Тем не менее, если делеция от А включает делецию двух или больше нуклеотидов, то также удалено Т. Кроме того, если от А включает делецию трех или больше нуклеотидов, то удалены А, Т и G. Тем не менее, следует принять во внимание, что если делеция начинается с Т, то Т удалено, в то время как А из ATG еще остаются. Кроме того, если делеция начинается с G, то G удалено, в то время как А и Т из ATG все еще остаются.

Термин "в пределах UL18" или "в пределах UL8", как используется в настоящей заявке, обозначает, что указанная делеция, замена или инверсия нуклеотидов может происходить в любом месте в пределах указанной ORF (UL). Таким образом, указанная делеция, замена или инверсия нуклеотидов может задействовать только 5'-конец из UL8 (ORF54) и/или UL18 (ORF43), только 3'-конец из UL8 (ORF54) и/или UL18 (ORF43) или остальные нуклеотиды из указанной ORF (UL) или любые их комбинации.

Термин "дефектный по репликации" также хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области техники. В целом, термин обозначает, что вирус имеет уменьшенную репликацию в хозяине (таком как клетка или клеточная линия млекопитающего). Предпочтительно, репликация уменьшена на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, предпочтительно 97,5%, еще более предпочтительно 99,5%, еще более предпочтительно 99,75% и наиболее предпочтительно на 100%. В случае, если репликация уменьшена на 100%, то репликация полностью отменена. Предпочтительно, репликацию сравнивают с недефектным по репликации вирусом аналогичных видов.

Предпочтительно, репликацию сравнивают с репликацией дефектного по репликации вируса, культивируемого в комплементарных клетках или клеточных линиях. Предпочтительно, дефектный по репликации EHV согласно настоящему изобретению все еще эффективный и реплицируется, но только может быть упакован в виде компетентного по репликации вируса в комплементарных клетках или клеточных линиях. Предпочтительно, вирусная ДНК и вирусный белок все еще продуцируются в хозяине и, следовательно, дефектный по репликации EHV согласно настоящему изобретению все еще индуцирует иммунный ответ и/или защитный иммунитет.

Термин "комплементарная клеточная линия" или "комплементарная клетка" также хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области техники. В контексте настоящего изобретения комплементарная клеточная линия представляет собой клеточную линию, в которой клетки экспрессируют UL8 и/или UL18 (или его функциональные части) из EHV (предпочтительно EHV-1). Так как дефектный по репликации EHV вектор включает инактивацию UL8 и/или UL18, то дефектный по репликации EHV не реплицируется в клетке-хозяине (такой как клетка или клеточная линия млекопитающего), но в соответствующей комплементарной клеточной линии, экспрессирующей UL8 и/или UL18.

Термин "TCID₅₀" также хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области техники. В целом, это исследование титрования в конечной точке определяет количество вируса, необходимое для уничтожения 50% инфицированных хозяев или для получения цитопатического эффекта у 50% инокулированных клеточных культур тканей. Исследования для измерения TCID₅₀ хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники, такие как метод Спирмана-Карбера или Рида и Менча (Reed и Muench, 1938). Термин "инфекционный" обозначает внедрение вируса в хозяина или в клетку-хозяина.

Определения вакцины

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

Термин "антиген", который используется в настоящей заявке, хорошо известен в данной области техники и включает вещества, которые являются иммуногенными, то есть иммуногены, а также вещества, которые индуцируют иммунологическую неотвечаемость или анергию, то есть отсутствие реакций посредством защитных реакций организма на чужеродные вещества. Как используется в настоящей заявке, термин "антиген" обозначает полноразмерные белки, а также их пептидные фрагменты, содержащие или включающие эпитоп. Термин "животное, используемое для производства пищевых продуктов" обозначает животных, которые используются для потребления людьми, такие как свиньи, крупный рогатый скот, птицы, рыбы и другие, предпочтительно животное, используемое для производства пищевых продуктов, обозначает свиней и крупный рогатый скот, наиболее предпочтительно свиньи. "Иммуногенная композиция", как используется в настоящей заявке, может относиться к полипептиду или белку, такому как, например, вирусный поверхностный белок, который вызывает иммунный ответ, как описано в настоящей заявке. Термин "иммуногенный фрагмент" или "иммуногенная часть" относится к фрагменту или усеченной и/или замещенной форме белка или полипептида, который включает один или несколько эпитопов и, следовательно, вызывает иммунный ответ, описанный в настоящей заявке. В целом, такие усеченные и/или замещенные формы или фрагменты будут содержать по меньшей мере шесть последовательных аминокислот из полноразмерного белка. Такие фрагменты могут быть идентифицированы при использовании любой из ряда методик, которые используются для картирования эпитопов, которые хорошо известны в данной области техники. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, том 66 (Glenn E. Morris, ред., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены с помощью одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, определения пептидов, соответствующих частям белковой молекулы и взаимодействия пептидов с антителами, в то время как пептиды все еще остаются присоединенными к подложкам. Такие методики известны и описаны в данной области техники, смотри, например, патент США № 4708871; Geysen и др. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; и Geysen и др. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. Аналогично, конформационные эпитопы легко идентифицируются с помощью определения пространственной конформации аминокислот, например, путем рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. Смотри, *Epitope Mapping Protocols*, как описано выше. Синтетические антигены также являются включенными в определение, например, полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие рекомбинантные или синтетически полученные антигены. Смотри, например, Bergmann и др. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777-2781; Bergmann и др. (1996), *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. и Cell Biol.* 75:402-408; и Gardner и др., (1998) 12-ая всемирная конференция по СПИДу, Женева, Швейцария, 28 июля 1998 года. (Раскрытие и содержание которых являются включенными в данную заявку 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 настоящей заявке, обозначает, что введение /лечение связано с бустированием или улучшением состояния здоровья или клинических симптомов или любого другого положительного медицинского влияния на состояние здоровья животных, которые получают иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "вакцина", как используется в настоящей заявке, относится к фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере один иммунологически активный компонент, который индуцирует иммунный ответ у животного и возможно, но не обязательно, один или несколько дополнительных компонентов, которые усиливают иммунологическую активность активного компонента. Вакцина может дополнительно содержать другие компоненты, которые являются типичными для фармацевтических композиций. В качестве отличия, иммунологически активный компонент вакцины может содержать полные вирусные частицы либо в их исходной форме или в качестве аттенуированных частиц в так называемой модифицированной живой вакцине (MLV) или частицы, инактивированные с помощью подходящих методов в так называемой убитой вакцине (KV). В другой форме, иммунологически активный компонент вакцины может содержать подходящие элементы организмов (субъединичные вакцины), где эти элементы создаются либо путем разрушения цельной частицы или выращивания культур, содержащих такие частицы, и необязательно последующих стадий очистки, приводящих к получению желательной(ых) структуры (структур), или с помощью синтетических процессов, включая подходящую манипуляцию путем применения приемлемой системы на основании, например, бактерий, вирусов, млекопитающих или других видов плюс необязательно процедуры последующего выделения и очистки, или путем индукции процессов синтеза в животном, нуждающемся в вакцине, путем прямой инкорпорации ге-

нетического материала, используя подходящие фармацевтические композиции (полинуклеотидная вакцинация). Вакцина может содержать один или одновременно более одного из элементов, описанных выше. Как используется в специфических аспектах согласно настоящему изобретению, "вакцина" относится к живой вакцине или живому вирусу, также называется рекомбинантной вакциной. В другом специфическом аспекте согласно настоящему изобретению "вакцина" относится к инактивированному или убитому вирусу, включая вирусоподобные частицы (VLP). Таким образом, вакцина может представлять собой субъединичную вакцину или убитую (KV) или инактивированную вакцину.

Термин "Множественность заражения (M.O.I.)" описывает, сколько инфекционных единиц, например, TCID₅₀, вирусного препарата используется на клетку для инфицирования клеточных культур. Например, M.O.I. 0,01 обозначает, что на каждые 100 клеток в сосуде для культивирования инокулируют одну инфекционную единицу.

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

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

Для инаktivации 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 инаktivации вируса или бактерии. Является очень важным скорректировать количество формалина для обеспечения инаktivации материала, но не настолько много, чтобы проявлялись побочные эффекты от высокой дозы. Более предпочтительно, термин "инактивированный" по отношению к вирусу обозначает, что вирус неспособный к репликации в условиях *in vivo* или *in vitro* и, соответственно, термин "инактивированная" по отношению к бактерии обозначает, что бактерия неспособна к репродукции в условиях *in vivo* или *in vitro*. Например, термин "инактивированный" может относиться к вирусу, который был размножен *in vitro*, и затем был инаktivирован с использованием химических или физических средств таким способом, что он больше не способен к репликации. В другом примере, термин "инактивированная" может относиться к бактерии, которая была размножена, и затем инаktivирована с использованием химических или физических средств, что привело к получению суспензии бактерий, фрагментов или компонентов бактерии, например, к получению бактериина, который может использоваться в качестве компонента вакцины. Как используется в настоящей заявке, термины "инактивированный", "убитый" или "KV" используются взаимозаменяемо.

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

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

В некоторых воплощениях иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит адъювант. "Адъюванты", как используется в данной заявке, могут включать гидроксид алюми-

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

Еще одним примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильных производных. Предпочтительные адъювантные соединения представляют собой полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые являются перекрестно связанными, в частности, с полиалкениловыми эстерами Сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения являются известными под термином карбомер (Фармакопеей том 8, № 2, июнь 1996 г.). Специалисты в данной области техники могут также сослаться на патент США № 2909462, который описывает такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксильным соединением, имеющим по крайней мере, 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, при этом атомы водорода, по крайней мере, трех гидроксильных групп заменяются ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими, по крайней мере, 2 атома углерода. Предпочтительные радикалы представляют собой такие, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие этилен-ненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы сами по себе могут содержать другие заместители такие, как метил. Продукты, которые продаются под названием CARBOPOL®; (BF Goodrich, штат Огайо, США) являются особенно приемлемыми. Они являются перекрестно сшитыми с аллилсахарозой или пентаэритритолом. Среди них могут быть упомянуты Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является использование CARBOPOL® 971P. Среди сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила следует упомянуть сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к получению кислотного раствора, который будет нейтрализован, предпочтительно до физиологического значения рН, для того, чтобы ввести раствор адъюванта, в который будет включена иммуногенная или иммунологическая вакцина.

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

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

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

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

или полипептид, отделенный от сосуществующих с ним материалов в его естественном состоянии, является "изолированным" в том значении, как этот термин используется в данном документе.

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

Термин "лечение и/или профилактика" относится к ослаблению частоты инфицирования в стаде или уменьшения тяжести клинических симптомов, вызываемых или связанных с конкретной инфекцией. Следовательно, термин "лечение и/или профилактика" также относится к уменьшению количества животных в стаде, которые становятся инфицированными патогеном, или к уменьшению тяжести клинических симптомов, в норме связанных с или вызываемых инфекцией в группе животных, где животные получают эффективное количество иммуногенной композиции, как обеспечивается в настоящей заявке, по сравнению с группой животных, где животные не получают такой иммуногенной композиции. "Лечение и/или профилактика" в целом включает введение эффективного количества иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению, 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(ы) инфицировано(ы) таким патогеном и где такие животные уже проявляют некоторые клинические симптомы, вызываемые или связанные с инфицированием таким патогеном. Термин "профилактика" относится к введению животному перед каким-либо инфицированием такого животного патогеном или по меньшей мере где такое животное или ни одно из животных в группе животных не проявляют каких-либо клинических симптомов, вызываемых или связанных с инфицированием таким патогеном. Термины "профилактика" и "предотвращение" используются взаимозаменяемо в настоящей заявке.

Термин "клинические симптомы", как используется в настоящей заявке, относится к симптомам инфицирования животного патогеном. 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. Тем не менее, клинические симптомы также включают, но не ограничиваясь только ими, клинические симптомы, которые непосредственно наблюдаются от живого животного. Примеры клинических симптомов, которые непосредственно наблюдаются от живого животного, включают выделения из носа и глаз, летаргию, кашель, хрипение, пульсирование, повышенную температуру, потерю веса, обезвоживание, прихрамывание, истощение, бледность кожных покровов, хилость и другие.

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

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

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

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

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

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

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

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

Термин "уменьшение вирусемии", индуцируемой вирусом, обозначает, но не ограничиваясь только ими, уменьшение вируса, проникающего в систему кровообращения животного, где уровень вирусемии, то есть количество копий вирусной ДНК или РНК на мл сыворотки крови или количество бляшкообразующих колоний на децилитр сыворотки крови, уменьшается в сыворотке крови животных, получающих композицию согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 50% по сравнению с животными, которые не получали композицию и могут инфицироваться. Более предпочтительно, уровень вирусемии уменьшается у животных, получающих композицию согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 99,9%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,99%, и даже более предпочтительно по меньшей мере на 99,999%. Термин "патоген" также хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области техники. Тем не менее, термин "патоген" включает бактерии и вирусы. Термин "патоген" включает патогены, такие как вирус Шмалленберга, вирус гриппа А, вирус респираторного и репродуктивного синдрома у свиней, цирковирус свиней, вирус классической чумы свиней, вирус африканской лихорадки свиней, вирус гепатита Е, вирус диареи крупного рогатого скота, вирус бешенства, кошачий морбилливирус, столбнячная палочка, микобактерия туберкулеза, актинобациллярная плеввропневмония. Термин "животное, выращиваемое в продовольственных целях", обозначает животных, которые используются человеком для потребления, такие как свиньи, крупные рогатые скот, птицы, рыбы и другие, предпочтительно свиньи.

Термин "домашнее животное" включает таких животных, как кошка, лошадь или собака.

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

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

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

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

Препараты

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

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

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

Способы лечения

Предпочтительные пути введения включают, но не ограничиваясь только ими, интраназальное, пероральное, внутрикожное и внутримышечное. Желательным является введение в питьевой воде, наиболее предпочтительно в единичной дозе. Квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятным, что композиции согласно изобретению также можно вводить в одной, двух или более дозах, а также при использовании других путей введения.

Например, такие другие пути включают подкожное, внутрикожное, внутривнутрибрюшинное, внутрикожное, 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 более стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, содержать металлическую или пластиковую упаковку, такую как блистерная упаковка. Упаковка или устройство дозатора может сопровождаться инструкциями в отношении введения, предпочтительно для введения млекопитающему, в частности, свинье. Такой(ие) контейнер(ы) могут сопровождаться сведениями в форме, установленной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, где сведения отображают разрешение ведомства на производство, применение или продажу для введения людям. Определения антигена

Термин "вирус свиного гриппа" известен квалифицированному специалисту в данной области техники. Термин вирус свиного гриппа относится к вирусу гриппа типа А или типа С из семейства ортомиксовирусов, которые вызывают свиной грипп. 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 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 группы, который был выделен из свиней.

Термины "НА" или "Н", "NA" или "N" и "NP" известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Тем не менее, в целом, 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. Более того, NP (нуклеопротеин) образует нуклеокапсид.

Обзор последовательностей:

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

- SEQ ID NO: 1 EHV-1 ORF43 (UL18) последовательность гена
- SEQ ID NO: 2 EHV-1 ORF54 (UL8) последовательность гена
- SEQ ID NO: 3 Кодон-оптимизированная ORF43 (UL18) последовательность гена
- SEQ ID NO: 4 Кодон-оптимизированная ORF54 (UL8) последовательность гена
- SEQ ID NO: 5 171 оснований против хода транскрипции для ORF43 (UL18) гена
- SEQ ID NO: 6 265 оснований по ходу транскрипции для ORF43 (UL18) гена
- SEQ ID NO: 7 mCMV промотор контролируемый RFP ген с BGH поли А, фланкированный с помощью SEQ ID NO: 5 и 6
- SEQ ID NO: 8 Канамициновый ген, фланкированный с помощью SEQ ID NO: 5 и 6
- SEQ ID NO: 9 161 основание против хода транскрипции для ORF43 (UL18) гена
- SEQ ID NO: 10 120 оснований по ходу транскрипции для ORF43 (UL18) гена
- SEQ ID NO: 11 200 нуклеотидов против хода транскрипции для ORF54 (UL8) гена
- SEQ ID NO: 12 200 нуклеотидов по ходу транскрипции для ORF54 (UL8) гена
- SEQ ID NO: 13 mCMV промотор контролируемый RFP ген с BGH поли А, фланкированный с помощью SEQ ID NO: 5 и 6
- SEQ ID NO: 14 HA последовательность, клонированная в ORF1/3 (UL56) сайте
- SEQ ID NO: 15 Нуклеотидная последовательность трансферного вектора pU70-p455-71K71
- SEQ ID NO: 16 Нуклеотидная последовательность трансферной плазмиды pU70-p455-H3-71K71
- SEQ ID NO: 17 левый (Up70) фланкирующий участок (417 по)
- SEQ ID NO: 18 левый (Up71) фланкирующий участок (431 по)
- SEQ ID NO: 19 фланкирующий участок левый (вплоть доorf70) в EHV-1 штамме ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), расположенный на нуклеотидах 127264 - 127680
- SEQ ID NO: 20 фланкирующий участок правый (вплоть доorf71) в EHV-1 штамме ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1), расположенный на нуклеотидах 128484 - 128913
- SEQ ID NO: 21 усеченный фланкирующий участок в RED системе: левый (Up70) фланкирующий участок (283 по)=идентичный к 3' 283 по "классического" фланкирующего участка из 417 по
- SEQ ID NO: 22 усеченный фланкирующий участок в RED системе: правый (Up71) фланкирующий участок (144 по)=идентичный к 5' 144 по "классического" фланкирующего участка из 431 по
- SEQ ID NO: 23 делетированная часть в ab4 дикого типа (номер доступа Genbank AY665713.1) геномная последовательность, нт 127681 – 128482
- SEQ ID NO: 24 делетированная часть в RasH геномной последовательности (нет доступных номеров нт, поскольку полная геномная последовательность неизвестна)
- SEQ ID NO: 25 HA последовательность, клонированная в ORF1/3 (UL56) сайте

Пункты

Следующие пункты формулы изобретения описаны в настоящей заявке:

Изобретение обеспечивает следующие пункты:

1. Дефектный по репликации вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV), содержащий инактивацию UL18 и/или UL8.
2. Дефектный по репликации EHV вектор по п.1, где UL18 является инактивированным.
3. Дефектный по репликации EHV вектор по п.1 или 2, где UL8 является инактивированным.
4. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-3, где UL18 и UL8 являются инактивированными.
5. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-4, где инактивация UL18 представляет собой полную или частичную делецию, полное или частичное усечение, полную или частичную замену, полную или частичную инверсию, инсерцию.
6. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-5, где инактивация UL8 представляет собой полную или частичную делецию, полное или частичное усечение, полную или частичную замену, полную или частичную инверсию, инсерцию.
7. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-6, где стартовый кодон UL18 (ATG, нуклеотиды 1-3 из SEQ ID NO: 1) является инактивированным.
8. Дефектный по репликации EHV вектор по п.7, где указанная инактивация стартового кодона (ATG) UL18 представляет собой делецию, замену, инверсию или инсерцию.
9. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-8, где стартовый кодон UL8 (ATG, нуклеотиды 1-3 из SEQ ID NO: 2) является инактивированным.

меньшей мере 5 нуклеотидов, по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов, по меньшей мере 50, нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов, по меньшей мере 200 нуклеотидов, по меньшей мере 300 нуклеотидов, по меньшей мере 400 нуклеотидов, по меньшей мере 500 нуклеотидов, по меньшей мере 600 нуклеотидов, по меньшей мере 700 нуклеотидов, по меньшей мере 800 нуклеотидов, по меньшей мере 900, нуклеотидов, по меньшей мере 1000 нуклеотидов, по меньшей мере 1250 нуклеотидов, по меньшей мере 1500, нуклеотидов, по меньшей мере 1750 нуклеотидов, по меньшей мере 2000 нуклеотидов, по меньшей мере 2225 нуклеотидов удалено, заменено или инвертировано в пределах UL8.

19. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-18, где ДНК последовательность, имеющая 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 ДНК последовательности, как указано в SEQ ID NO: 2 удалена, заменена или инвертирована в пределах UL8.

20. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-19, где по меньшей мере 1 нуклеотид, по меньшей мере 2 нуклеотида, по меньшей мере 3 нуклеотида, по меньшей мере 4 нуклеотида, по меньшей мере 5 нуклеотидов, по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов, по меньшей мере 50, нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов, по меньшей мере 300 нуклеотидов, по меньшей мере 500 нуклеотидов, по меньшей мере 800 нуклеотидов, по меньшей мере 1000 нуклеотидов инсертировано в пределах UL8.

21. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-20, где EHV включает экспрессионную кассету, содержащую:

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

(II) по меньшей мере один UL18 фланкирующий участок против хода транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 5 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность, SEQ ID NO: 9 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность, и

(III) по меньшей мере один UL18 фланкирующий участок по ходу транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 6 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность, SEQ ID NO: 10 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность.

22. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-21, где EHV включает экспрессионную кассету, содержащую:

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

(II) по меньшей мере один UL8 фланкирующий участок против хода транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 11 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность, и

(III) по меньшей мере один UL8 фланкирующий участок по ходу транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 12 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность.

23. Дефектный по репликации EHV вектор по п. 21 или 22, где инсерция экспрессионной кассеты инактивирует UL18 и/или UL8.

24. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-23, где инсерция экспрессионной кассеты в UL18 характеризуется делецией участка приблизительно 945 по в пределах UL18 для RasH (SEQ ID NO: 1) или на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичной и/или идентичной к ней последовательности.

25. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-24, где инсерция экспрессионной кассеты в UL8 характеризуется делецией участка приблизительно 2256 по в пределах UL8 для RasH (SEQ ID NO: 2) или на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичной и/или идентичной к ней последовательности.

26. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-25, где EHV вектор включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 5, SEQ ID

NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную последовательность к любой из этих последовательностей.

27. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-26, где EHV вектор включает (I) по меньшей мере один UL18 фланкирующий участок против хода транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9, и (II) по меньшей мере один UL18 фланкирующий участок по ходу транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 10.

28. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-27, где EHV вектор включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную последовательность к любой из этих последовательностей.

29. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-28, где EHV вектор включает (I) по меньшей мере один UL8 фланкирующий участок против хода транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 11 и (II) по меньшей мере один UL8 фланкирующий участок по ходу транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 12.

30. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1 - 29, где указанный EHV вектор представляет собой не встречающийся в природе и/или рекомбинантный EHV.

31. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-30, где дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена по меньшей мере на 90%.

32. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-31, где дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена по меньшей мере на 95%.

33. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-32, где дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена по меньшей мере на 99%.

34. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-33, где дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации отменена полностью.

35. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-34, где скорость репликации измеряют с помощью TCID₅₀ анализа.

36. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-35, где дефектный по репликации EHV вектор все еще эффективный.

37. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-36, где EHV вектор все еще эффективный, может реплицироваться в инфицированных эукариотических клеточных линиях, но только упакованный в виде компетентного по репликации вируса в комплементных клеточных линиях.

38. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-37, где EHV вектор включает по меньшей мере одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в инсерционный сайт, предпочтительно UL56 и/или US4.

39. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-38, где EHV вектор включает две или более представляющих интерес нуклеотидные последовательности, предпочтительно представляющих интерес гена, более предпочтительно антигенкодирующие последовательности, инсертированные в два или более сайта инсерции.

40. EHV вектор по п.38 или 39, где инсерция в US4 характеризуется частичной делецией, усечением, заменой, модификацией или подобным в US4, где US5 остается функциональным.

41. EHV вектор по одному из пп.38-40, где инсерция в US4 характеризуется делецией участка приблизительно 801 по в пределах US4 для RacH (SEQ ID NO: 24) или на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичной и/или идентичной к ней последовательности.

42. EHV вектор по одному из пп.38-41, где EHV вектор включает по меньшей мере один фланкирующий участок, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, и SEQ ID NO: 22 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную последовательность к любой из этих последовательностей.

43. EHV вектор по одному из пп.38-42, где EHV вектор включает (I) по меньшей мере один левый US4 фланкирующий участок выбирают из группы, включающей: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, и SEQ ID NO: 21, и (II) по меньшей мере один правый US4 фланкирующий участок выбирают из группы, включающей: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, и SEQ ID NO: 22.

44. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-43, где указанная представляющая интерес нуклеотидная последовательность является рекомбинантной и/или гетерологичной и/или экзогенной.

45. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-44, где указанная антигенкодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему животное, выращиваемое в продовольственных целях, такое как свиньи, крупный рогатый скот или птицы или домашние животные, такие как кошка, лошадь или собака.

46. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-45, где антигенкодирующая последовательность имеет происхождение из патогена, выбранного из перечня, но не ограничиваясь только

ими: вирус Шмалленберга, вирус гриппа А, вирус респираторного и репродуктивного синдрома у свиней, цирковироз свиней, вирус классической чумы свиней, вирус африканской лихорадки свиней, вирус гепатита Е, вирус диареи крупного рогатого скота, вирус бешенства, кошачий морбилливирус, столбнячная палочка, микобактерия туберкулёза, актинобациллярная плевропневмония.

47. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-46, который дополнительно включает дополнительные регуляторные последовательности, такие как стоп-кодон или последовательность полиаденилирования.

48. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-47, где представляющий интерес ген функционально связан с регуляторной последовательностью, предпочтительно промоторной последовательностью.

49. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-48, где промоторная(ые) последовательность(и), функционально связанную(ые) с представляющими интерес последовательностями или генами, выбирают из группы, но не ограничиваясь только ими, включающей: SV40 большой Т, HCMV и MCMV немедленно-ранний ген 1, промотор фактора элонгации альфа человека, бакуловирусный промотор полиэдрина, промотор полимеразы II, функциональный фрагмент.

50. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-49, где промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интерес геном, представляет собой MCMV или его функциональный фрагмент или их комплементарные нуклеотидные последовательности.

51. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.21-50, где промоторная последовательность, функционально связанная с по меньшей мере одним представляющим интерес геном, представляет собой эндогенный промотор UL8 или UL18.

52. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-51, где EHV вектор выбирают из группы, включающей EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9.

53. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-52, где EHV вектор представляет собой EHV-1, предпочтительно RasH.

54. Клетка-хозяин млекопитающего, отличающаяся тем, что она включает дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-53.

55. Клеточная линия, экспрессирующая UL8 и/или UL18 из EHV или его функциональные части для культивирования дефектного по репликации EHV вектора по одному из пп.1-53.

56. Клеточная линия, включающая плазмиду, включающую экспрессионную кассету, включающую UL8 и/или UL18 из EHV или его функциональные части, где клеточная линия экспрессирует UL8 и/или UL18 или его функциональные части.

57. Клеточная линия по п.55 или 56, где клетку выбирают, но не ограничиваясь только ими, из группы: Vero клетки, RK-13 (почки кролика), ST (свиньи яйца), MDCK (клетки Мадин-Дарби почек собак), MDBK (клетки Мадин-Дарби почек крупного рогатого скота) и клетки кожи лошадей (NBL-6).

58. Клеточная линия по одному из пп.55-57, где клеточная линия представляет собой ST клеточную линию.

59. Способ получения дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающий инактивированный UL18 и/или UL8 по одному из пп.1-53.

60. Способ получения дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV), включающие стадии:

- а) обеспечение EHV дикого типа или ослабленного EHV;
- б) инактивирование UL18 и/или UL8 из EHV со стадии а) и селекцию EHV клонов, которые не несут полную или функциональную часть UL18 и/или UL 8;
- в) обеспечение комплементарной клеточной линии, экспрессирующей UL18 и/или UL8 или его функциональные части;
- г) обеспечение дефектного по репликации альфагерпесвируса лошадей (EHV) путем культивирования EHV со стадии б) с комплементарной клеточной линией со стадии в).

61. Иммуногенная композиция, включающая один или несколько EHV векторов по одному из пп.1-53.

62. Иммуногенная композиция по п.61, где указанная иммуногенная композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

63. Иммуногенная композиция по одному из пп.61 или 62, где указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

64. Способ иммунизации субъекта, включающий введение такому субъекту иммуногенной композиции по одному из пп.61-63.

65. Способ лечения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном, у субъекта, который в этом нуждается, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по одному из пп.61-63.

66. Иммуногенная композиция по одному из пп.61-63 для применения в способе иммунизации субъекта, включающему введение такому субъекту указанной иммуногенной композиции.

67. Иммуногенная композиция по одному из пп.61-63 для применения в способе лечения или предотвращения клинических симптомов, вызываемых патогеном, у субъекта, который в этом нуждается, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

68. Способ или применение по одному из пп.64-67, где указанного субъекта выбирают из перечня, включающего свиней, крупный рогатый скот, птиц, кошек, лошадей и собак.

69. Способ или применение по одному из пп.64-68, где иммуногенную композицию вводят один раз.

70. Способ по одному из пп.64-69, где иммуногенную композицию вводят в виде двух или более доз.

Примеры

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

Пример 1:

Создание стабильной клеточной линии, экспрессирующей EHV-1 ORF 43 (UL18) или ORF 54 (UL8) гены

Синтетический, кодон-оптимизированный ORF 43 (ORF 43(co)) ген, SEQ ID NO: 3, (на основании нуклеотидной последовательности EHV-1 RasH штамма ORF 43 гена, SEQ ID NO: 1) расщепляли с помощью XhoI/BamHI и лигировали в pCEP вектор (Invitrogen, № по каталогу V044-50), расщепленный с помощью таких же рестрикционных эндонуклеаз. Полученную плазмиду, pCEP-ORF43 (co) (фиг. 1), линеаризировали и трансфектировали в клетки яичек свиней (ST). После двухнедельной селекции с гигромицином, стабильные клетки, экспрессирующие ORF43 (co) гены (ST-43-CO клетки), использовали для выведения дефектного по репликации EHV-1 вируса.

Синтетический, кодон-оптимизированный ORF 54 (ORF 54(co)) ген, SEQ ID NO: 4 (на основании нуклеотидной последовательности EHV-1 RasH штамма ORF 54 гена, SEQ ID NO: 2) расщепляли с помощью XhoI/BamHI и лигировали в pCEP вектор (Invitrogen, № по каталогу V044-50), расщепленный с помощью таких же рестрикционных эндонуклеаз. Полученную плазмиду, pCEP-ORF54 (co) (фиг. 2), линеаризировали и трансфектировали в клетки яичек свиней (ST). После двухнедельной селекции с гигромицином, стабильные клетки, экспрессирующие ORF54 (co) гены (ST-54-CO клетки), использовали для выведения дефектного по репликации EHV-1 вируса.

Пример 2: Выведение векторной конструкции и дефектного по репликации EHV вируса EHV-1ΔORF43 вирус, с mCMV промотор-контролируемый RFP, заменяющий ORF43

Создавали синтетическую ДНК с сайтом множественного клонирования (MCS), фланкированную с применением 171 нуклеотидов против хода транскрипции (SEQ ID NO: 5) и 265 нуклеотидов по ходу транскрипции (SEQ ID NO: 6) из ORF 43 ген. mCMV (мышинный CMV промотор) контролируемый Red флуоресцентный белок (RFP/mCherry) (Shaner и др., 2004) использовали в качестве репортерного гена. В качестве сигнала терминации транскрипции и стабилизации функции мРНК, использовали последовательность полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (BGH_{ра}, Goodwin & Rottman, 1992) непосредственно по ходу транскрипции на 3'-конце репортерного (RFP) гена. RFP ген, расщепленный с помощью MluI/SalI рестрикционных эндонуклеаз, клонировали в MCS для создания плазмиды pUC43-mCMV-RFP. Из этой плазмиды, ДНК фрагмент с mCMV-RFP-BGH poly-A, фланкированный с помощью ORF 43 фланкирующих последовательностей (SEQ ID NO 7), расщепляли и клонировали в EHV-1 RasH ВАС ДНК, используя систему RED рекомбинации, для создания EHV-1-43-mCMV RFP. Red рекомбинация выключает ORF43 и заменяет ее на mCMV-RFP-BGH poly-A (фиг. 3). После селекции с применением канамицина, EHV-1-43-mCMV RFP ВАС ДНК позже трансфектировали в ST-43-CO клетки для выведения рекомбинантный вирус- gEHV-1-43-mCMV-RFP.

Пример 3: EHV-1ΔORF43 вирус, с эндогенным EHV-1 промотор-контролируемым RFP, заменяющий ORF 43

В другой версии замены дефектного по репликации EHV-1 вируса, ORF 43 заменяли на RFP ген в рамке считывания, используя протокол модифицированной RED рекомбинации (фиг. 5). Сначала создавали синтетическую ДНК Scel/Канамицин ДНК, фланкированную с помощью 171 нуклеотидов против хода транскрипции (SEQ ID NO: 5) и 265 нуклеотидов по ходу транскрипции (SEQ ID NO: 6) из ORF 43 гена. Этот ДНК фрагмент (SEQ ID NO: 8) трансформировали в E.coli K12 GS1783, несущую EHV-1 ВАС ДНК. Селекция с применением канамицина приводила к получению промежуточных EHV-1 клонов, где ORF 43 заменяли на фрагмент Scel/Канамицин. Затем, RFP ген, фланкированный с помощью 161 нуклео-

тидов против хода транскрипции (SEQ ID NO 9) и 120 нуклеотидов по ходу транскрипции (SEQ ID NO: 10) из ORF 43 гена, трансформировали в вышеуказанные клоны для селекции EHV-1 ВАС ДНК клонов, где ORF43 ген была заменен на RFP в рамке считывания (EHV-1-43-RFP) (фиг. 4). EHV-1-43 RFP ВАС ДНК трансфектировали в ST-43-СО клетки для выведения рекомбинантный вирус- гEHV-1-43-RFP. Поскольку мы не включали конститутивный промотор, то RFP экспрессия в этом сценарии зависит от собственной экспрессии EHV-1 гена с помощью эндогенного ORF 43 промотора.

Пример 4: EHV-1ΔORF 54 вирус, с mCMV промотор-контролируемым RFP, заменяющий ORF 54

Создавали синтетическую ДНК с MCS, фланкированную с применением 200 нуклеотидов против хода транскрипции (SEQ ID NO: 11) и 200 нуклеотидов по ходу транскрипции (SEQ ID NO: 12) из ORF 54 гена. mCMV контролируемый RFP ген, расщепленный с помощью MluI/SalI рестрикционных эндонуклеаз, клонировали в MCS для создания плазмиды pUC54-mCMV-RFP. Из этой плазмиды, ДНК фрагмент с mCMV-RFP-BGH poly-A, фланкированный с помощью ORF 54 фланкирующих последовательностей (SEQ ID NO: 13), расщепляли с помощью I-CeuI и клонировали в EHV-1 RacH ВАС ДНК, используя систему RED рекомбинации для создания EHV-1-54-mCMV RFP. Red рекомбинация выключает ORF54 и встраивает mCMV-RFP-BGH poly-A в тот же самый участок (фиг. 6). После селекции с применением канамицина EHV-1-54-mCMV RFP ВАС ДНК позже трансфектировали в ST-54-СО клетки для выведения рекомбинантный вирус- гEHV-1-54-mCMV-RFP.

Пример 5: Дефектный по репликации EHV-1 вирус с трансгенами в ORF43 или ORF54

Обычные ST клетки, ST-43-СО клетки и ST-54-СО клетки инфицировали с различными множественностями заражения (MOI) вирусами EHV-1/RacH, гEHV-1-43-mCMV-RFP, гEHV-1-43-RFP и гEHV-1-54-mCMV-RFP. Инфицированные клетки наблюдали каждые 24 ч для определения экспрессии гена и образования бляшек с помощью флуоресцентной микроскопии. Цитопатический эффект (CPE) наблюдали с помощью световой микроскопии; вирус собирали при 70% CPE и титровали с помощью TCID₅₀. Как показано на фиг. 7, EHV-1/RacH вирус вызывает существенное CPE во всех трех клеточных линиях. Характерные бляшки наблюдали во всех клетках, инфицированных с помощью EHV-1/RacH вируса, подтверждая, что стабильные клетки, созданные в примере 1 и примере 2, поддерживают EHV-1 репликацию, также как и обычные ST клетки.

Обычные ST клетки и ST-43-СО клетки инфицировали с применением гEHV-1-43 -RFP вируса (фиг. 8). Несмотря на то, что оба типа клеток инфицировали с применением гEHV-1-43 -RFP вируса (как видно на основании GFP экспрессии), CPE и продукция вируса наблюдались только в ST-43-СО клетках. Экспрессия трансгена (RFP) наблюдалась во всех инфицированных клетках, но видимые CPE или бляшки только наблюдались исключительно в ST-43-СО клетках.

Затем, обычные ST клетки и ST-43-СО клетки инфицировали с применением гEHV-1-43-mCMV-RFP вируса (фиг. 9). Несмотря на то, что оба типа клеток инфицировали с применением гEHV-1-43-mCMV-RFP вируса (как видно на основании GFP экспрессии), CPE и продукция вируса наблюдались только в ST-43-СО клетках. Экспрессия трансгена (RFP) наблюдалась во всех инфицированных клетках, но видимые CPE или бляшки только наблюдались исключительно в ST-43-СО клетках.

Данные, представленные выше, подтверждают, что EHV-1 вирусы, в которых отсутствует ORF43 ген, могут реплицироваться только в клетках, экспрессирующих ORF 43 белок (как в ST-43-СО клетках), но не в обычных клетках. Эти данные также свидетельствуют о том, что ORF43 может быть заменена на другой трансген, который может экспрессироваться в инфицированных клетках с помощью внешнего промотора (такого как mCMV) или в качестве части EHV-1 генов (без внешнего промотора; с эндогенным промотором).

В завершение, обычные ST клетки и ST-54-СО клетки инфицировали с применением гEHV-1-54-mCMV-RFP вируса (фиг. 10). Несмотря на то, что оба типа клеток инфицировали с применением гEHV-1-54-mCMV-RFP вируса (как видно на основании GFP экспрессии), CPE и продукция вируса наблюдались только в ST-54-СО клетках. Экспрессия трансгена (RFP) наблюдалась во всех инфицированных клетках, но видимые CPE или бляшки только наблюдались исключительно в ST-54-СО клетках. Эти данные, представленные выше, подтверждают, что EHV-1 вирусы, в которых отсутствует ORF54 ген, могут реплицироваться только в клетках, экспрессирующих ORF 54 белок (как в ST-54-СО клетках), но не обычных клетках. Эти данные также свидетельствуют о том, что ORF54 может быть заменена на другой трансген, который может экспрессироваться в инфицированных клетках с помощью внешнего промотора (такого как mCMV).

Мы сравнивали титры различных рекомбинантных вирусов, продуцируемых различными клеточными линиями (в трех повторах). Эти данные наглядно демонстрируют, что вирусы, в которых отсутствуют ORF 43 или ORF 54, не могут реплицироваться в обычных клетках (таблица).

№ образца	Вирус	Продуцируемый в клетках	Титр (TCID ₅₀ /мл)
1	гEHV-1-43 -RFP	ST	0
2	гEHV-1-43 -RFP	ST-43-CO	6,49E+06
3	гEHV-1-43-mCMV-RFP	ST	0
4	гEHV-1-43-mCMV-RFP	ST-43-CO	5,99E+06
5	гEHV-1-54-mCMV-RFP	ST	0
6	гEHV-1-54-mCMV-RFP	ST-54-CO	1.24E+06

Примеры 6: Дефектный по репликации EHV-1 вирус с трансгенами в других сайтах инсерции

Создавали синтетическую ДНК с фланкирующими последовательностями к инактивированной ORF 43 полностью за два этапа *red* рекомбинации и трансформировали в GS1783 клетки, несущие EHV-1/HA ВАС ДНК (HA последовательность, SEQ ID NO: 14). После двух этапов *red* рекомбинации, ORF 43 была инактивирована (подтверждено путем секвенирования по Сенгеру, данные не представлены) для создания EHV-1-ΔORF43-HA. EHV-1-ΔORF43-HA ВАС ДНК (с mCMV контролируемым HA геном в ORF 1/3 сайте и отсутствием ORF 43) трансфектировали в ST-43-CO клетки для выведения рекомбинантный вирус: гEHV-1-ΔORF43-HA. Создавали синтетическую ДНК с фланкирующими последовательностями к инактивированной ORF 54 полностью за два этапа *red* рекомбинации и трансформировали в GS1783 клетки, несущие EHV-1/HA ВАС ДНК (HA последовательность, SEQ ID NO: 14). После двух этапов *red* рекомбинации, ORF 54 была инактивирована (подтверждено путем секвенирования по Сенгеру, данные не представлены) для создания EHV-1-ΔORF54-HA. EHV-1-ΔORF54-HA ВАС ДНК (с mCMV контролируемым HA геном в ORF 1/3 сайте и отсутствием ORF 54) трансфектировали в ST-43-CO клетки для выведения рекомбинантный вирус: гEHV-1-ΔORF54-HA.

Если обычные ST и ST-43-CO клетки инфицировали с помощью гEHV-1-ΔORF43-HA при различных MOI, то CPE/продукция вируса наблюдались только в инфицированных ST-43-CO клетках. HA экспрессия в инфицированных клетках может быть подтверждена с помощью ИФА (Иммунофлуоресцентный анализ), используя антитело к HA.

Если обычные ST и ST-54-CO клетки инфицировали с помощью гEHV-1-ΔORF54-HA при различных MOI, то CPE/продукция вируса наблюдались только в инфицированных ST-54-CO клетках. HA экспрессия в инфицированных клетках может быть подтверждена с помощью ИФА (Иммунофлуоресцентный анализ), используя антитело к HA.

Пример 7: Тестирование дефектной по репликации EHV-1 векторной вакцины, экспрессирующей HA в других сайтах инсерции *in vivo* у свиней

Создавали синтетическую ДНК с фланкирующими последовательностями к инактивированной ORF 43 полностью за два этапа *red* рекомбинации и трансформировали в GS1783 клетки, несущие EHV-1/HA ВАС ДНК (HA последовательность, SEQ ID NO: 25). После двух этапов *red* рекомбинации, ORF 43 была инактивирована (подтверждено путем секвенирования по Сенгеру, данные не представлены) для создания EHV-1-ΔORF43-HA. EHV-1-ΔORF43-HA ВАС ДНК (с mCMV контролируемым HA геном в ORF 1/3 сайте и отсутствием ORF 43) трансфектировали в ST-43-CO клетки для выведения рекомбинантный вирус: гEHV-1-ΔORF43-HA. Если некомплементарные ST клетки и ST-43-CO клетки инфицировали с помощью гEHV-1-ΔORF43-HA, то CPE/продукция вируса наблюдались только в инфицированных ST-43-CO клетках. HA (SEQ ID NO: 25) экспрессия в инфицированных клетках может быть подтверждена с помощью ИФА (Иммунофлуоресцентный анализ), используя антитело к HA (фиг. 19). Для тестирования возможностей дефектных по репликации EHV-1 вирусов в качестве вакцин, 5 свиней в возрасте одиннадцать недель вакцинировали два раза (День-0 и День-14) с помощью гEHV-1-ΔORF43-HA вируса. Контрольную группу животных вакцинировали с помощью плацебо. Исследование ингибирования гемагглютинации (HI) осуществляли для всех образцов сыворотки для тестирования, будут ли вакцинированные свиньи нести антитела к антигену, присутствующему в дефектном по репликации EHV-1 вирусе.

Все 5 вакцинированных животных имели существенные HI титры после одной вакцинации. HI титры дополнительно повышались у всех вакцинированных свиней после второй вакцинации. Ни одно из контрольных животных не имело существенных HI титров в сходные тестируемые дни (фиг. 20).

Пример 8: Применение ORF70 (US4) сайта инсерции с p455 промотором в рекомбинантных EHV-1 векторных вакцинах и конструирование рекомбинантного вируса

Гемагглютинин гриппа подтип H3 (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), № доступа GenBank: ABS50302.2) клонировали в pU70-p455-71K71 (фиг. 11, SEQ ID NO: 15) для создания трансферной плазмиды pU70-p455-H3-71K71, помещая H3 под контроль p455 промотора и новый 71pA сигнал полиаденилирования и фланкируя кассету с рекомбинантными участками для инсерции в ORF70 (фиг. 12, SEQ ID NO: 16). Использовали систему RED рекомбинации (Tischer и др. 2006 Biotechnol. Tech. 40, 191-197) для клонирования экспрессионной кассеты p455-H3-71 в ORF70 из pRacH-SE для создания pRacH-SE70-p455-H3 (фиг. 13). PK/WRL клетки трансфектировали с помощью pRacH-SE70-p455-H3, для выведения рекомбинантного гEHV-1 RacH-SE70-p455-H3 вируса. Инсерцию экспрессионной кассеты подтверждали путем секвенирования высокоточного ПЛР продукта участка инсерции. Экспрессию трансгена в инфицированных клетках анализировали с помощью и непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА,

фиг. 14).

Пример 9: Тестирование *in vivo* моновалентной вакцины вируса гриппа на основании вектора EHV-1 (H3 вакцина) для свиней

Для тестирования эффективности гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 в качестве потенциальной вакцины, поросят без материнского иммунитета к IAV свиней (без материнских антител) вакцинировали два раза с применением гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 в дозе 1×10^7 TCID₅₀/мл внутримышечно в возрасте двух и пяти недель соответственно, или только в возрасте пяти недель (однократная вакцинация). Невакцинированная группа поросят служила в качестве отрицательного контроля, а группа животных, которых вакцинировали в возрасте двух и пяти недель с помощью коммерчески доступной инактивированной вакцины IAV свиней в соответствии с инструкциями производителя (но в моменты времени вакцинации), служила в качестве положительного контроля (убитая). В возрасте 8 недель, всех животных, за исключением отрицательной контрольной группы, заражали интратрахеально применяемой дозой 1×10^7 TCID₅₀/мл H3N2 штамма IAV свиней для заражения (изолят Европейского полевого вируса R452-14, чей H3 является гетерологичным к H3 антигену вакцины, используемому в RacH-SE-70-p455-H3). Невакцинированные и незараженные животные служили в качестве отрицательного контроля, в то время как невакцинированные, но зараженные животные служили в качестве контроля заражения. Измеряли температуру тела и отбирали образцы крови в определенные моменты времени. Через один день после заражения, половину животных в каждой группе убивали и легкие оценивали для определения наличия поражений, типичных для инфекции IAV свиней, три образца легких левого и правого легкого отбирали у каждого животного, соответственно, для определения инфекционных титров IAV свиней в гомогенатах легких, а также отбирали образцы бронхоальвеолярных смывов (BALF). Аналогичную процедуру проводили с оставшейся половиной животных на группу через три дня после заражения.

При исследовании повышения температуры тела после применения вируса IAV свиней для заражения, в отличие от поросят, вакцинированных два раза с применением гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, невакцинированные животные продемонстрировали повышение температуры тела приблизительно на 1°C через один день после заражения (фиг. 15).

Оценивали показатели легких у животных, убитых через 1 или 3 дня после заражения. Типичные поражения в легких, связанные с инфицированием IAV свиней, отсутствовали у поросят в отрицательной контрольной группе. Но, наблюдались поражения в легких (в среднем в диапазоне 6-7%) у зараженной контрольной группы. В завершение, средние значения поражения легких были существенно ниже (менее чем 4%) у поросят, вакцинированных два раза с применением гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 вакцины (фиг. 16). Оценивали средние значения титров IAV свиней в легких у животных, убитых через 1 или 3 дня после заражения. В то время как IAV свиней отсутствовал в образцах легких от поросят отрицательной контрольной группы, зараженная контрольная группа продемонстрировала титры вирусов на г легочной ткани в диапазоне от больше 5 (день 3) до больше 7 log (день 1). При кардинальном отличии, средние значения для группы были сильно снижены до приблизительно двух log или меньше для группы, вакцинированной один раз с применением гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 вакцины, и уменьшены до необнаруживаемых уровней для группы, вакцинированной два раза с применением гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 вакцины (фиг. 17). При тестировании индукции нейтрализующих антител к IAV свиней после вакцинации, сыворотки от животных, вакцинированных один раз с применением гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 вакцины, продемонстрировали титры реципрокной нейтрализации в диапазоне приблизительно 160, через три недели после первой вакцинации, а сыворотки от животных, вакцинированных два раза с применением гEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 вакцины, продемонстрировали нетрализирующие титры приблизительно 2560 через три недели после 2ой вакцинации, в то время как сыворотка от невакцинированных групп не имела обнаруживаемых уровней нейтрализующие антител к IAV свиней (фиг. 18). Взятые в совокупности, данные из этих примеров продемонстрировали, что трансгены, инсертированные в ORF70 в EHV-1 векторном каркасе, могут экспрессироваться, используя наружный промотор, и полученные рекомбинантные EHV-1 векторы могут использоваться *in vivo* в качестве потенциальной кандидатной вакцины.

Ссылки

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

1. Bustin, S. **2000**. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**(2): 169-193.
2. Goodwin, E.C. & Rottman, F.M. **1992**. The 3' flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J.Biol.Chem.* 267: 16330-16334
3. Hübert, P. H., Birkenmaier, S., Rziha, H.-J. and Osterrieder, N. **1996**, Alterations in the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain RacH During Attenuation. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 43: 1–14. doi:10.1111/j.1439-0450.1996.tb00282.x
4. Luke, GA and Ryan, MD. **2013**. The protein coexpression problem in biotechnology and biomedicine: virus 2A and 2A-like sequences provide a solution. *Future Virology*, Vol. 8, No. 10, Pages 983-996.
5. 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.
6. Nolan, T. Rebecca E Hands, R.E., and Bustin S.A. **2006**. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR *Nature Protocols* 1: 1559-1582
7. Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Kaaden, O.R., and O'Callaghan, D.J. **1996**. The equine herpesvirus 1 IR6 protein influences virus growth at elevated temperature and is a major determinant of virulence. *Virology* 226:243-251.
8. Ptashne, M. **2014**. *The Chemistry of Regulation of Genes and Other Things* *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 289, (9) 5417–5435. Reed, L.J., and Muench, H. **1938**. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* (27) 3; 493-497.
9. **Reed** LJ and Muench H (1938). A simple method estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27(3) 493-497

10. Rosas, C.T., Konig, 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.
11. Rosas, C.T., B.K. Tischer, G.A. Perkins, B. Wagner, L.B. Goodman, N. Osterrieder. **2007b** . Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV) *Virus Research*, 125 , pp. 69–78.
12. 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.
13. 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
14. **Sambrook J and Russell DW (2001)**. *Molecular Cloning*, 3rd ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; ISBN 978-087969-577-4
15. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. **2004**. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* Dec;22(12):1567-72. Epub 2004 Nov 21.
16. Tischer, B.K., Kaufer, B.B., Sommer, M., Wussow, F., Arvin, A., and Osterrieder, N. A Self-Excisable Infectious Bacterial Artificial Chromosome Clone of Varicella-Zoster Virus Allows Analysis of the Essential Tegument Protein Encoded by *ORF9*. *J. Virol.* 81 (23), **2007**, 13200–13208.
17. Tischer, B.K, Smith, G.A.,and Osterrieder, N. in: Jeff Braman (ed.), *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition*, Methods in Molecular Biology, vol. 634,DOI 10.1007/978-1-60761-652-8_30, © Springer Science+Business Media, LLC **2010**, Chapter 30: *En Passant* Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System.
18. 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.

19. 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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Дефектный по репликации вектор альфагерпесвируса лошадей (EHV), содержащий инактивацию UL18, где инактивация UL18 представляет собой полную или частичную делецию, полное или частичное усечение, полную или частичную замену, полную или частичную инверсию, инсерцию.

2. Дефектный по репликации EHV вектор по п.1, где, по меньшей мере, 1 нуклеотид, по меньшей мере, 2 нуклеотида, по меньшей мере, 3 нуклеотида, по меньшей мере, 4 нуклеотида, по меньшей мере, 5 нуклеотидов, по меньшей мере, 10 нуклеотидов, по меньшей мере, 25 нуклеотидов, по меньшей мере, 50, нуклеотидов, по меньшей мере, 100 нуклеотидов, по меньшей мере, 200 нуклеотидов, по меньшей мере, 300 нуклеотидов, по меньшей мере, 400 нуклеотидов, по меньшей мере, 500 нуклеотидов, по меньшей мере, 600 нуклеотидов, по меньшей мере, 700 нуклеотидов, по меньшей мере, 800 нуклеотидов, по меньшей мере, 900, нуклеотидов, по меньшей мере, 925 нуклеотидов, по меньшей мере, 940 нуклеотидов удалено, заменено или инвертировано в пределах UL18.

3. Дефектный по репликации EHV вектор по п.1 или 2, где ДНК последовательность, имеющая, 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 ДНК последовательности, как указано в SEQ ID NO: 1, удалена, заменена или инвертирована в пределах UL18.

4. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-3, где EHV вектор содержит экспрессионную кассету, содержащую:

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

(II) по меньшей мере, один UL18 фланкирующий участок против хода транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 5 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность, SEQ ID NO: 9 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность,

(III) по меньшей мере, один UL18 фланкирующий участок по ходу транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 6 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность, SEQ ID NO: 10 и на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичную и/или идентичную к ней последовательность.

5. Дефектный по репликации EHV вектор по п.4, где инсерция экспрессионной кассеты в UL18 характеризуется делецией участка приблизительно 945 п.о. в пределах UL18 для RasH (SEQ ID NO: 1) или на 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологичной и/или идентичной к ней последовательности.

6. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-5, где EHV вектор включает (I) по меньшей мере, один UL18 фланкирующий участок против хода транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9, и (II) по меньшей мере, один UL18 фланкирующий участок по ходу транскрипции, выбранный из группы, включающей: SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 10.

7. Дефектный по репликации EHV вектор по пп.1-6, где дефектный по репликации обозначает, что скорость репликации уменьшена, по меньшей мере, на 90%.

8. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-7, где дефектный по репликации EHV вектор все еще инфекционный.

9. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-8, где EHV вектор включает, по меньшей мере, одну представляющую интерес нуклеотидную последовательность, предпочтительно представляющий интерес ген, более предпочтительно антигенкодирующую последовательность, инсертированную в инсерционный сайт, предпочтительно UL56 и/или US4.

10. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.4-9, где указанная антигенкодирующая последовательность относится к патогену, инфицирующему животное, выращиваемое в продовольственных целях, такое как свиньи, крупный рогатый скот или птицы или домашние животные, такие как кошка, лошадь или собака, предпочтительно, антигенкодирующая последовательность имеет происхождение

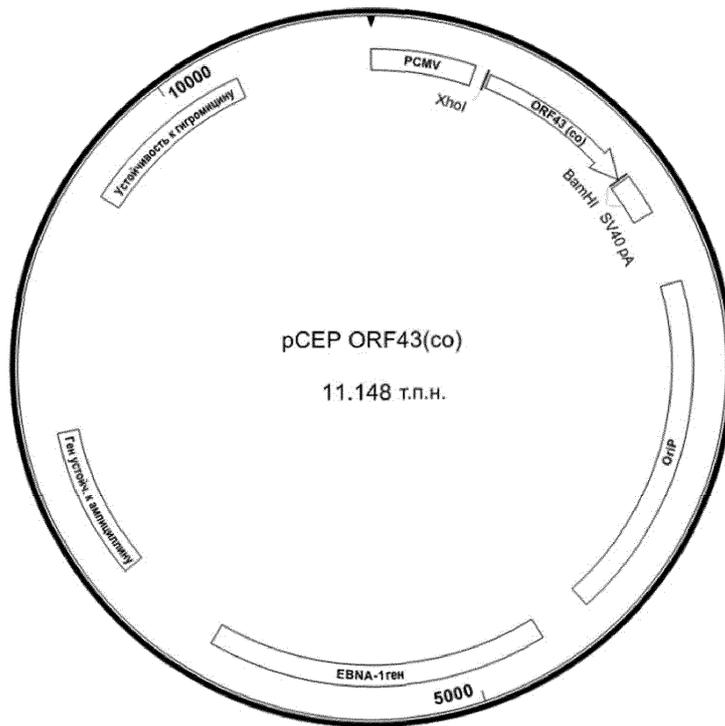
из патогена, выбранного из перечня, но не ограничиваясь только ими: вирус Шмалленберга, вирус гриппа А, вирус респираторного и репродуктивного синдрома у свиней, цирковирус свиней, вирус классической чумы свиней, вирус африканской лихорадки свиней, вирус гепатита Е, вирус диареи крупного рогатого скота, вирус бешенства, кошачий морбилливирус, столбнячная палочка, микобактерия туберкулёза, актинобациллярная плевропневмония.

11. Дефектный по репликации EHV вектор по одному из пп.1-10, где EHV вектор выбирают из группы, включающей EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 и EHV-9.

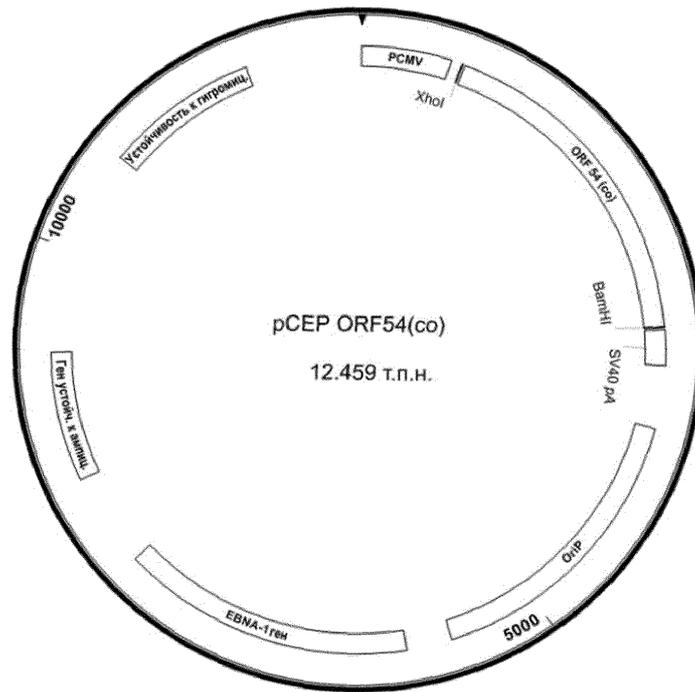
12. Клеточная линия, экспрессирующая UL18 из EHV для культивирования дефектного по репликации EHV вектора по одному из пп.1-11.

13. Иммуногенная композиция, включающая один или несколько EHV векторов по одному из пп.1-11.

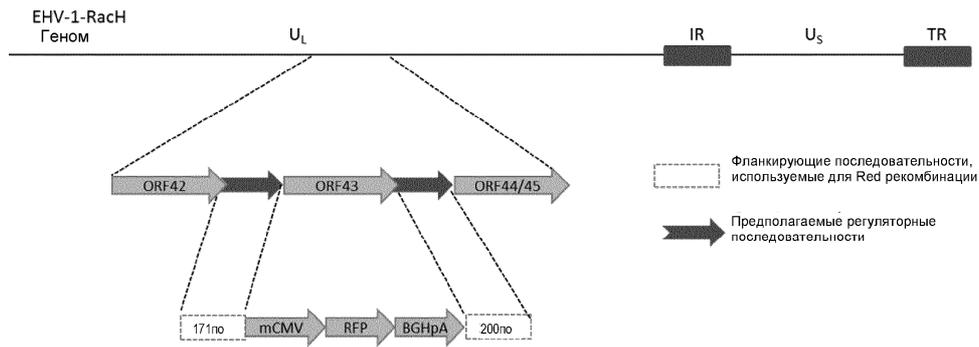
14. Способ иммунизации субъекта, включающий введение такому субъекту иммуногенной композиции по п.13.



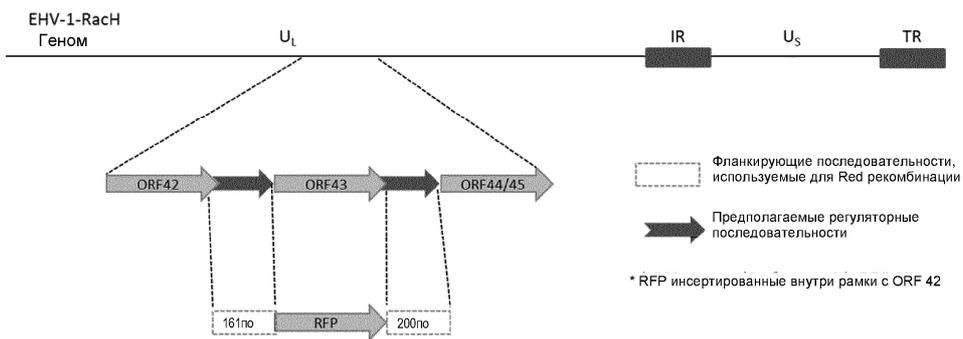
Фиг. 1



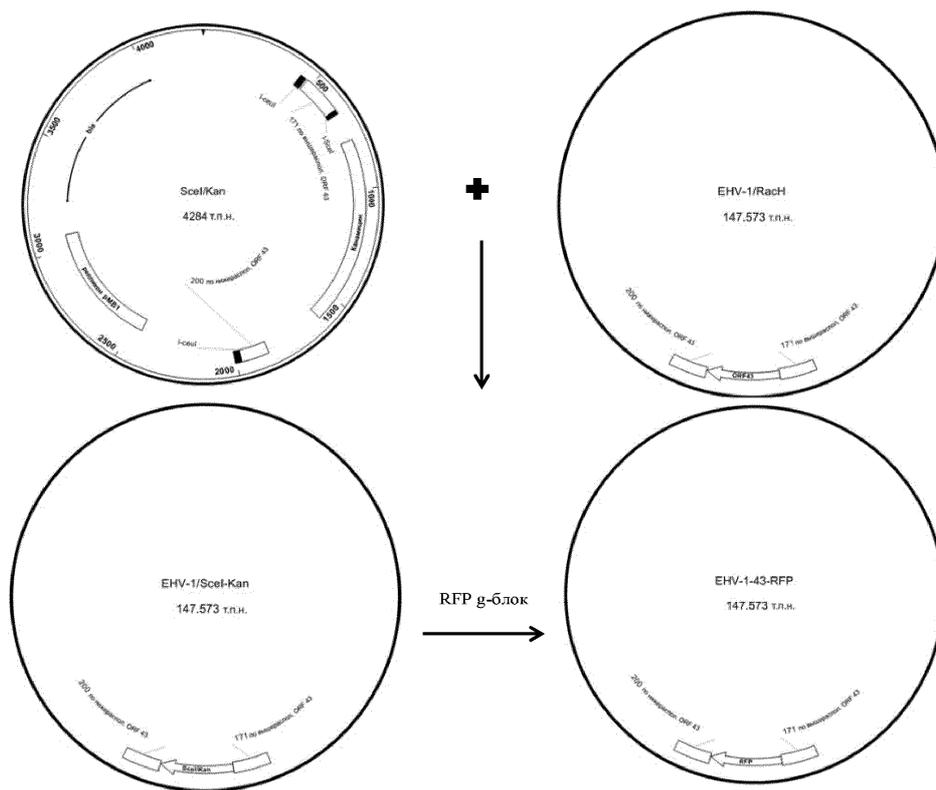
Фиг. 2



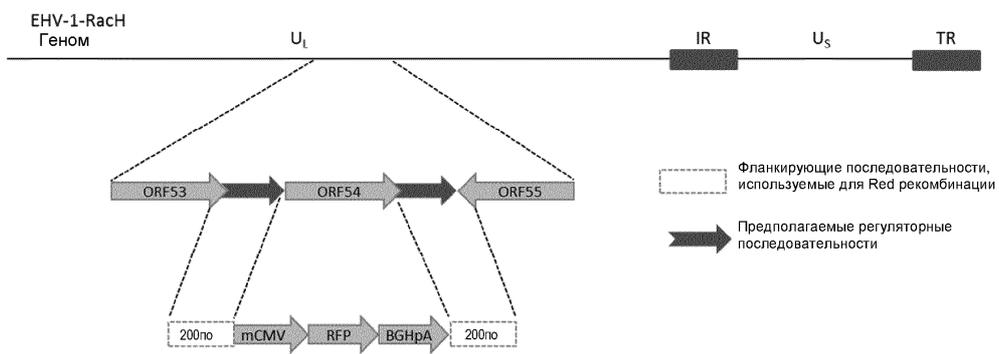
Фиг. 3



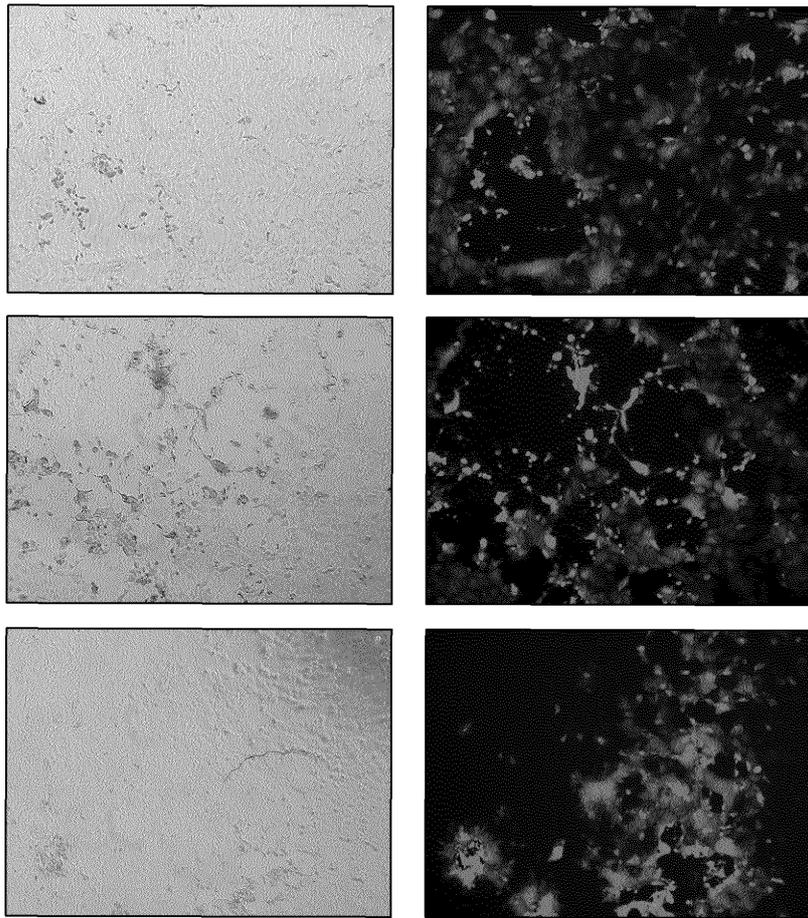
Фиг. 4



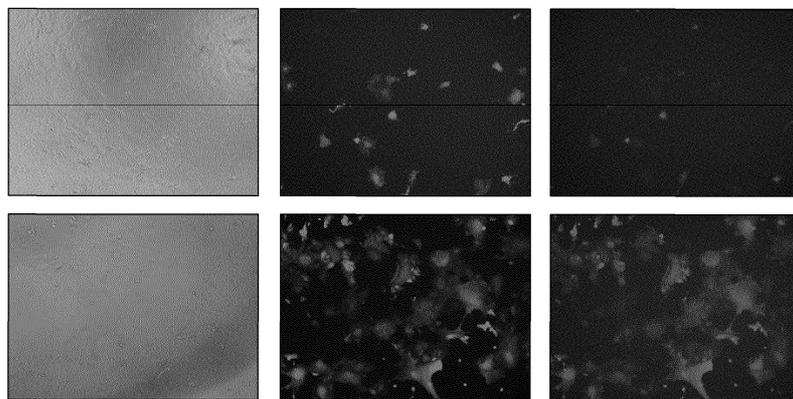
Фиг. 5



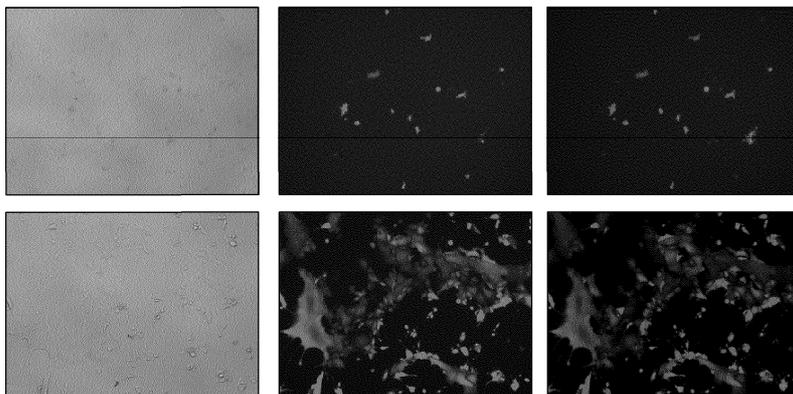
Фиг. 6



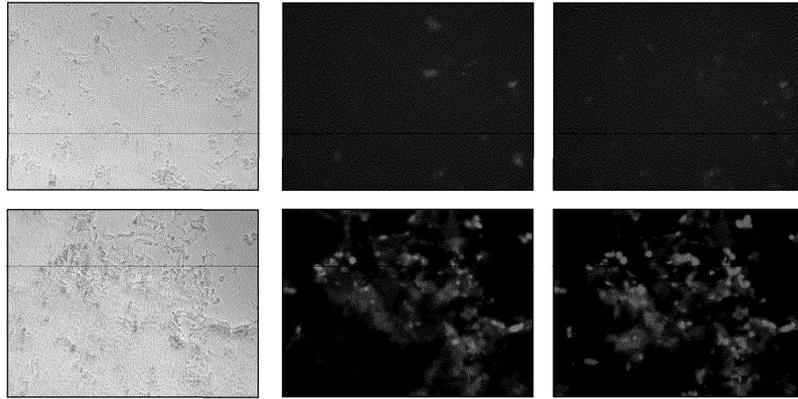
Фиг. 7



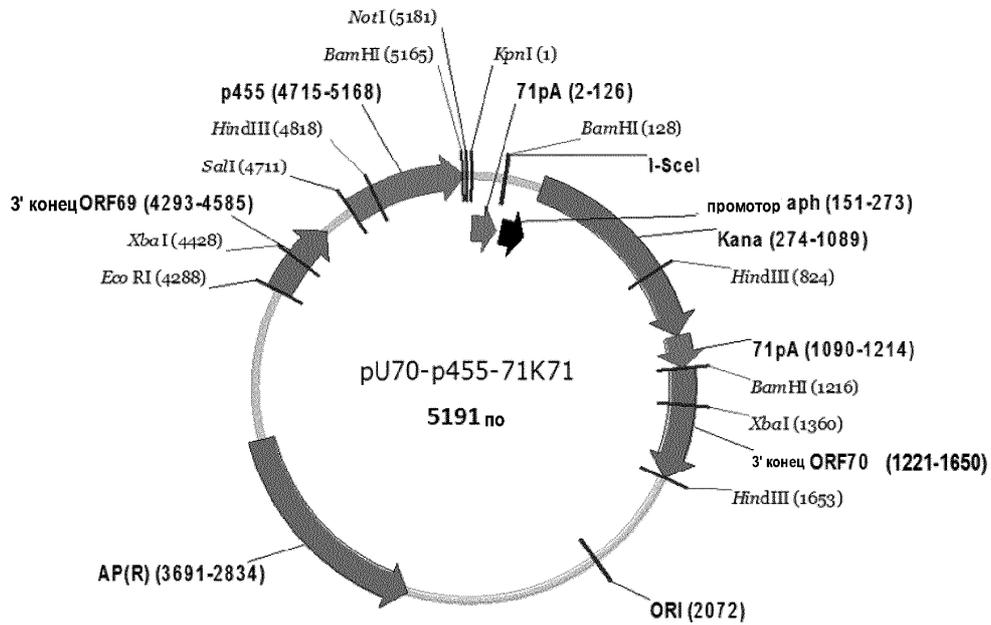
Фиг. 8



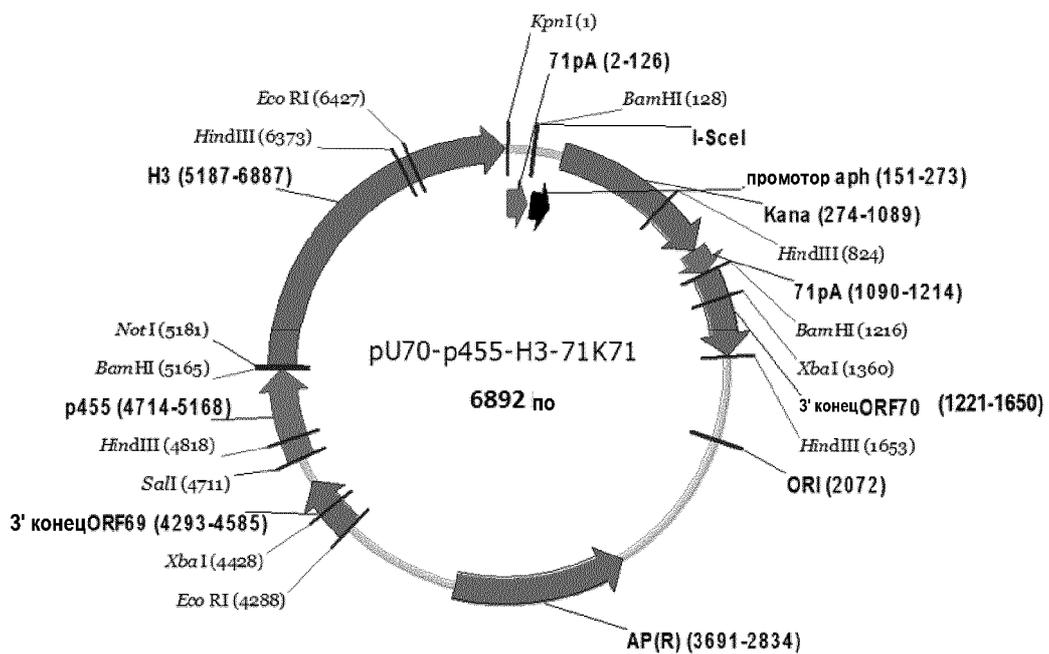
Фиг. 9



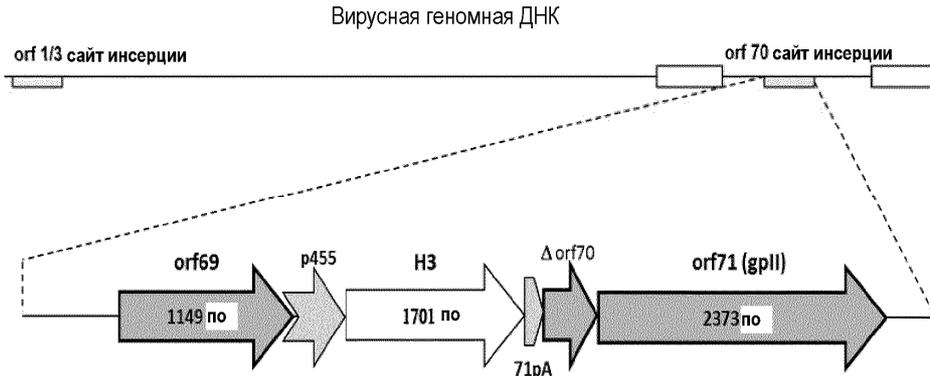
Фиг. 10



Фиг. 11

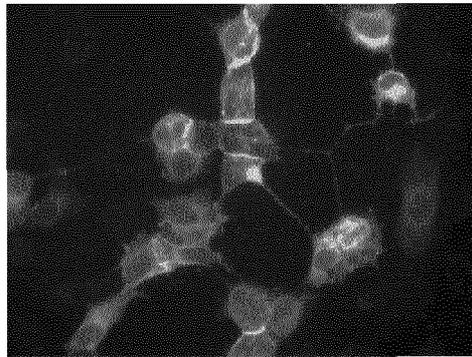


Фиг. 12



Фиг. 13

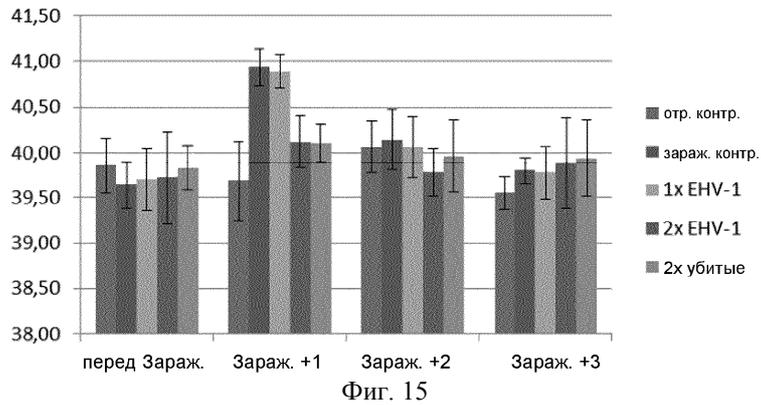
rEHV-1 RasH-SE70-455-H3



Моноклональное антитело к H3

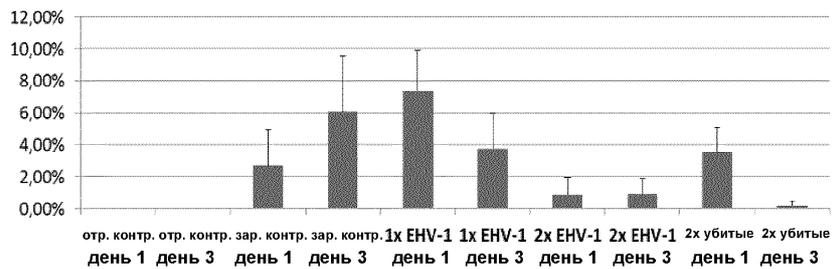
Фиг. 14

Среднегрупповые температуры тела

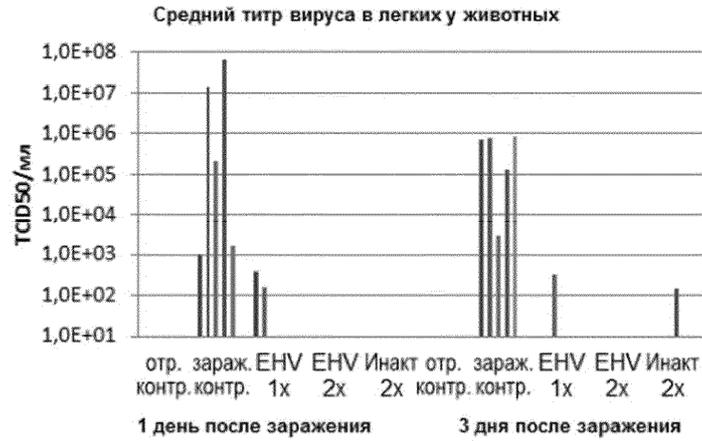


Фиг. 15

Легочные показатели для групп



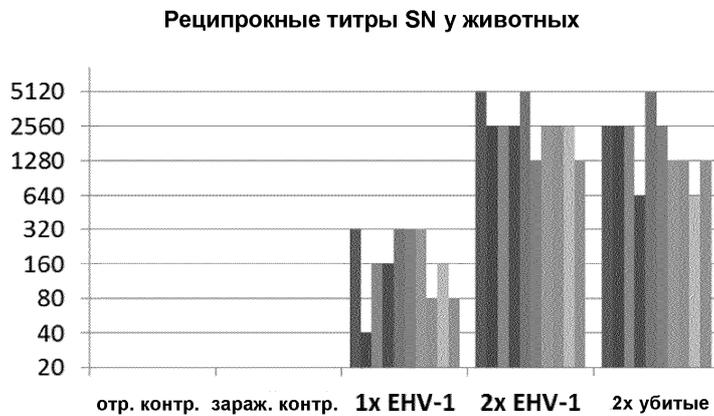
Фиг. 16



Фиг. 17А



Фиг. 17В



Фиг. 18

