

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 032389

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2019.05.31

(21) Номер заявки  
201400912

(22) Дата подачи заявки  
2013.02.14

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)  
A61K 39/008 (2006.01)  
A61K 39/39 (2006.01)

---

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПОКСВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, КОДИРУЮЩИЕ И  
ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЛИКОПРОТЕИН G ВИРУСА БЕШЕНСТВА И ПОЛИПЕПТИД  
OX<sub>40</sub>L, И ВАКЦИНЫ, СОЗДАННЫЕ НА ИХ ОСНОВЕ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В СПОСОБЕ  
ВАКЦИНАЦИИ ЖИВОТНЫХ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

---

(31) 61/598,610

(32) 2012.02.14

(33) US

(43) 2015.01.30

(86) PCT/US2013/026206

(87) WO 2013/123242 2013.08.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
МЕРИАЛ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Мабатсьон Тезом (US), Минке Жюль  
Мартен (FR), Дейвид Фредерик (US)

(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

(56) DATABASE WPI, Week 201104,  
Thomson Scientific, London, GB; AN 2010-Q31281,  
XP002696139, & CN 101884793 A (UNIV PLA  
THIRD MILITARY MEDICAL), 17 November 2010  
(2010-11-17), abstract  
US-B1-6309647

---

(57) Изобретение относится к рекомбинантным векторам, кодирующим полипептид G вируса бешенства и качестве генетического адъюванта полипептид OX<sub>40</sub>L, например относится к поксивирусным векторам. Заявленные векторы используются в составе вакцины против бешенства животных, в частности, являющихся представителями псовых. Изобретение относится к вакцинам против бешенства, созданным на основе заявленных векторов, и способу вакцинации животных, включающему введение заявленной вакцины.

---

B1

032389

032389

B1

### Родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/598610, поданной 14 февраля 2012 г., которая целиком включается в настоящий документ путем отсылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится в целом к вирусным вакцинам и способам их применения. Более конкретно, данное изобретение относится к вирусным векторам, которые могут содержать один или более вспомогательных генетических элементов, обеспечивающих усиленный иммунный ответ на антиген, экспрессия которого обеспечивается геном в составе вектора, предпочтительно вирусного вектора.

### Уровень техники

Бешенство вызывается вирусом бешенства; это заболевание поражает всех теплокровных животных. Инфекция вирусом бешенства с клиническими проявлениями почти всегда приводит к смерти зараженного индивида. Вирус бешенства, относящийся к семейству Rhabdoviridae, содержит несегментированную РНК отрицательной полярности. Вирион (вирусная частица) состоит из двух основных структурных компонентов: нуклеокапсид, или рибонуклеопротеина (РНП), и оболочки в форме двуслойной мембраны, которая окружает рибонуклеопротеиновый кор. У всех рабдовирусов инфекционным компонентом является рибонуклеопротеиновый кор, состоящий из генома (РНК), одетого в нуклеокапсид (N) вместе с двумя минорными белками, а именно РНК-зависимой РНК-полимеразой (L) и фосфопротеином (P). Мембрана, окружающая рибонуклеопротеиновый кор, состоит из двух белков: трансмембранного гликопротеина (G) и матричного (M) белка, располагающегося изнутри мембраны.

У вируса бешенства белок G, называемый также шипиковым белком, обеспечивает прикрепление к клетке и слияние мембран; кроме того, он является основной мишенью иммунной системы организма-хозяина. Установлено, что участок полипептидной цепи белка G с 330 по 340 аминокислотный остаток (называемый антигенным участком III), в особенности остаток аргинина в положении 333, ответствен за вирулентность вируса. У всех штаммов вируса бешенства имеется этот антигенный участок III, определяющий вирулентность.

Обычные вакцины против бешенства для животных, живущих с людьми, содержат инаktivированные вирусные частицы в сочетании с различными адъювантами, хорошо известными в данной области техники. Адъювант может состоять из нерастворимых в воде неорганических солей, липосом, мицелл или эмульсий, например адъювант Фрейнда. Другие адъюванты можно найти в работе Vogel, Powell, 1995 г. Действие адъювантов не сводится к какому-то единому механизму, но все они способны значительно усиливать иммунный ответ на вакцинный антиген по сравнению с тем же антигеном самим по себе (Nossal, 1999; Vogel, Powell, 1995). Некоторые адъюванты более эффективны в отношении гуморального иммунного ответа, другие - в отношении клеточного иммунного ответа (Vogel and Powell, 1995); третьи усиливают как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ на антигены в составе вакцины (Vogel, Powell, 1995). В целом можно считать, что адъюванты, по-видимому, осуществляют свое действие по меньшей мере одним из пяти путей: 1) ускоряют поглощение антигена, его транспортировку и представление в лимфатических узлах; 2) продлевают представление антигена; 3) стимулируют рецепторы, опознающие патогенный агент (паттерн-распознающие рецепторы, PRR), клеток, участвующих во врожденном иммунитете; 4) вызывают повреждение или стресс в клетках, участвующих в сигнальных путях при иммунном ответе; 5) влияют на соотношение Th1/Th2 иммунного ответа (Schijns V.E. et al. 2007). Иммуногенность антигенов может быть усилена также генетическими адъювантами, например лигандами для рецепторов, располагающихся на мембране клеток, участвующих в иммунном ответе. Генетические адъюванты для вакцин на основе ДНК обсуждаются, например, в работах Calarota & Weiner, Expert Rev Vaccines. 2004 Aug; 3(4 Suppl): S 135-49, Calarota & Weiner, Immunol Rev. 2004 Jun; 199:84-99 and Kutzler & Weiner, J Clin Invest. 2004 Nov; 114(9):1241-4). Однако применительно к вирусным вакцинам, особенно на основе поксвирусов, генетические адъюванты менее изучены.

Показано, что ряд членов надсемейства фактора некроза опухолей (TNFSF) и соответствующие рецепторы (TNFRSF) обеспечивают важные стимулирующие сигналы для иммунного ответа (Watts T.H. Annu Rev Immunol 2005; 23:23-68). Лиганд OX<sub>40</sub> (OX<sub>40</sub>L), обозначаемый также gp34, CD252, CD134L или TNFSF4, является членом надсемейства TN. Аминокислотная последовательность человеческого OX<sub>40</sub>L на 46% идентична таковой соответствующего мышинного белка. Как и другие члены надсемейства TNF, связанный с мембраной лиганд OX<sub>40</sub> существует в форме гомотримера. OX<sub>40</sub>L связывается с OX<sub>40</sub> (CD 134), также принадлежащим к надсемейству TNF. OX<sub>40</sub> экспрессируется на активированных Т-клетках, а его лиганд, OX<sub>40</sub>L, появляется на активированных клетках, представляющих антиген (APC), например В-клетках и дендритных клетках (DC) [Watts T.H. 2005 supra, Sugamura K., et al., Nat Rev Immunol 2004; 4(6):420-31]. Взаимодействие OX<sub>40</sub>-OX<sub>40</sub>L может способствовать пролиферации, дифференцировке и в особенности выживанию CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Rogers P.R., et al., Immunity 2001; 15(3):445-55; Song J, et al., Nat Immunol 2004; 5(2):150-8). Показано, что связывание OX40 ex vivo усиливает вторичный ответ человеческих CD8<sup>+</sup> Т-клеток против вирусов, включая вирус иммунодефицита (HIV-1), вирус Эпштейна-Барр (EBV) и вирус гриппа (Serghides L., et al., J Immunol. 2005; 175(10):6368-77). При иммунизации мышей вакциной на основе поксвируса канареек, экспрессирующей OX<sub>40</sub>L, вместе с вакциной на основе того же вируса против HIV-1, vCP1452, усиливался специфичный в отношении HIV-1 ответ CD8<sup>+</sup> Т-

клеток, а именно частота и экспрессия цитокинов (Liu J. et al., Vaccine 2009; 275077-5084). Однако OX<sub>40</sub>L не усиливал антительный ответ, возбуждаемый вакциной на основе поксвируса канареек против HIV-1, из чего можно предположить, что векторы на основе поксвируса канареек, экспрессирующие OX<sub>40</sub>L, могут усиливать иммуногенность вакцин на основе поксвируса канареек против HIV-1 в отношении клеточного, но не гуморального иммунного ответа. Liu J. et al., 2009, см. выше).

В настоящем документе описывается OX<sub>40</sub>L, экспрессирующийся вместе с белком G вируса бешенства в такой же рекомбинантной системе, что и в более ранних работах Serghides L., et al., 2005 (см. выше), в которых экспрессируемый аденовирусом OX<sub>40</sub>L использовался в сочетании с пептидами вируса гриппа *in vitro*, или в работе Liu J. et al., 2009, в которой вводили совместно поксвирус канареек, экспрессирующий OX<sub>40</sub>L, и поксвирус канареек, экспрессирующий HIV-1. Удивительно, но такая совместная экспрессия OX<sub>40</sub>L приводила к двух-трехкратному возрастанию максимального титра антирабических нейтрализующих антител, тогда как в работе Liu J. et al., 2009 (см. выше) сообщалось об отсутствии увеличения иммуногенности в отношении гуморального иммунного ответа.

Было бы очень желательно располагать вакцинами против бешенства с генетическими адъювантами для животных, проживающих с человеком, поскольку такие препараты позволили бы избежать или ослабить негативные последствия, связанные с обычными вакцинами, содержащими химические адъюванты (например, кожные реакции в месте инъекции, дискомфорт, боль, неспецифический иммунный ответ, повышение риска рака и проч.). Например, сообщалось о развитии саркомы, ассоциированной с введением содержащих адъюванты вакцин у кошек. Таким образом, существует потребность в эффективных и безопасных вакцинах на основе вирусов, в частности, в отношении экспрессии нужных антигенов-мишеней, эпитопов, иммуногенных агентов, пептидов или полипептидов в степени, достаточной для возбуждения защитного иммунного ответа.

### Раскрытие изобретения

Цель данного изобретения - предложить рекомбинантные векторы или вирусы, а также способы создания таких вирусов, композиции и/или вакцины и способы лечения и профилактики инфекции.

Данным изобретением предлагается рекомбинантный вектор, например рекомбинантный вирус, например рекомбинантный поксвирус, который содержит или экспрессирует по меньшей мере одну экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, причем по меньшей мере одна экзогенная молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую нужный иммуногенный агент или эпитоп вируса бешенства, например белок G вируса бешенства.

Данное изобретение также охватывает множество антигенов, успешно экспрессирующихся *in vivo* в организме животного-хозяина с возбуждением защитной иммунологической реакции при использовании поксвирусов или иных подходящих вирусных экспрессионных векторов, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), парамиксовирусы, вирус болезни Марека (MDV), вирус ньюкаслской болезни (NDV), вирус инфекционного бурсита (IBDV), вирус инфекционного бронхита (IBV) и др. Примеры таких вирусов включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) вирус чумы собак, вирус ящура (FMDV, патент США № 7527960 от компании Merial), вирус гриппа (патенты США №№ 7384642, 7910112, 6713068 и 7507416 от компании Merial), вирус катаральной лихорадки овец (BTV, патент США № 7862821 от компании Merial), цирковир свиней типа II (PCV2, патент США № 6497883 от компании Merial), вирус Нипах (патент США № 7803612 от компании Merial), вирус Хендра, вирус лихорадки Западного Нила (WNV, патент США № 7740863 от компании Merial), вирус лейкоза кошек (FeLV, патент США № 7582302 от компании Merial), вирус лейшманиоза собак (патент США № 7794736 от компании Merial), кальцивирус кошек (FCV, патент США № 6914134 от компании Merial), вирус инфекционного перитонита кошек (FIPV, патент США № 6096535 от компании Merial), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус африканской чумы лошадей (AHSV, патент США № 2010/0119546A1 от компании Merial) и вирус везикулярного стоматита (патент США № 8008268 от компании Merial); описание каждого из упомянутых здесь документов полностью включается в настоящий документ путем отсылки.

В частности, данным изобретением предлагается рекомбинантный вектор, например рекомбинантный вирус, например рекомбинантный поксвирус, который содержит и экспрессирует по меньшей мере одну экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, причем по меньшей мере одна экзогенная молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую какой-либо подходящий антиген, включая полипептиды G вируса бешенства и/или их варианты или фрагменты.

Данным изобретением предлагается рекомбинантный вектор, например рекомбинантный поксвирус, который содержит первый полинуклеотид, кодирующий полипептид G вируса бешенства и/или его варианты или фрагменты, и второй полинуклеотид, кодирующий полипептид, связывающий рецептор фактора некроза опухолей  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и/или его варианты или фрагменты.

Данным изобретением предлагаются композиции или вакцины, содержащие такой экспрессионный вектор или продукт (продукты) экспрессии такого экспрессионного вектора.

Данным изобретением также предлагаются способы индуцирования иммунологической (или иммуногенной) реакции или защитного иммунного ответа против бешенства, а также способы предотвращения или лечения бешенства или патологического состояния (состояний), обусловленных бешенством, включающие введение экспрессионного вектора или продукта экспрессии экспрессионного вектора, или

композиции, содержащей такой экспрессионный вектор, или композиции, содержащей продукт экспрессии такого экспрессионного вектора.

Данное изобретение также относится к продуктам экспрессии вируса, равно как и к антителам, образующимся в ответ на эти продукты экспрессии или к их экспрессии *in vivo* и к применению таких продуктов и антител, например, для диагностики.

Также предлагаются наборы, включающие по меньшей мере один полипептид вируса бешенства или его фрагмент или вариант и инструкции по применению.

Данное изобретение базируется отчасти на том неожиданном и удивительном факте, обнаруженном авторами изобретения, что поксвирусные векторы, обеспечивающие *in vivo* в организме животного хозяина совместную экспрессию антигенов патогенного агента (включая, но не ограничиваясь перечисленным здесь, вирус бешенства) и генетического адъюванта на основе лиганда рецептора TNF $\alpha$  (включая, но не ограничиваясь перечисленным здесь, OX<sub>40</sub>L) могут вызывать у животного длительный защитный иммунитет против бешенства. В частности, OX<sub>40</sub>L может быть гомологичен соответствующему лиганду вакцинируемого вида, например OX<sub>40</sub>L собаки (сOX<sub>40</sub>L) можно эффективно сочетать с белком G вируса бешенства в вакцине для собак против бешенства.

Ниже в разделе "Осуществление изобретения" описываются эти и другие воплощения данного изобретения или же они явствуют из него или охватываются им.

### Краткое описание фигур

Полное описание данного изобретения, позволяющее рядовому специалисту в данной области техники осуществить его на практике, включая наилучший образ действий, представлен более конкретно в остальном описании, в том числе ссылками на чертежи, где:

фиг. 1 представляет схему конструирования донорной плазмиды р397-синтетический ген полипептида G вируса бешенства. Показано расположение праймеров, использованных для секвенирования плечей C3, а также синтетического гена полипептида G вируса бешенства;

фиг. 2 представляет схему вектора vCP3006, несущего синтетический ген полипептида G вируса бешенства в сайте C3 и природный ген полипептида G вируса бешенства в сайте C5 site;

фиг. 3 представляет результаты разделения путем электрофореза в агарозном геле геномной ДНК, выделенной из ALVAC дикого типа и vCP30061, после расщепления рестриктазами HindIII, BamHI или XbaI;

фиг. 4 представляет результаты Саузерн-блоттинга гелей, показанных на фиг. 3 (геномная ДНК из ALVAC дикого типа и vCP3006), гибридизованных с зондом, специфичным к синтетическому гену полипептида G вируса бешенства;

фиг. 5 представляет результаты исследования экспрессии vCP3006 методом вестерн-блоттинга. Полоса, соответствующая полипептиду G вируса бешенства, обнаруживается только в осадке клеток, зараженных vCP3006 (слева). Для сравнения экспрессии белка G брали различные количества образцов клеток, зараженных vCP3006 или vCP65a в одинаковой дозе (MOI);

фиг. 6 представляет расположение праймеров на схеме области C3 vCP3006;

фиг. 7 - последовательность vCP3006, включающая плечи C3, промотор I3L и синтетический ген полипептида G вируса бешенства (полная последовательность представлена SEQ ID NO:2);

фиг. 8 представляет предсказанную аминокислотную последовательность, кодируемую синтетическим кодон-оптимизированным геном гликопротеина G вируса бешенства - SEQ ID NO:1;

фиг. 9 изображает схему клонирования донорной плазмиды р397-cOX<sub>40</sub>L;

фиг. 10 представляет схему вектора vCP3015, несущего природный ген полипептида G вируса бешенства в сайте C5 и нуклеотидную последовательность, кодирующую cOX<sub>40</sub>L, в сайте C6;

фиг. 11 представляет результаты разделения путем электрофореза в агарозном геле расщепленной ферментом NruI геномной ДНК (справа) и гибридизации по Саузерну с использованием зонда, специфичного к cOX<sub>40</sub>L;

фиг. 12 представляет результаты разделения путем электрофореза в агарозном геле расщепленной ферментом NruI геномной ДНК (слева) и гибридизации по Саузерну с использованием зонда, специфичного к природному гену полипептида G вируса бешенства (справа). Этот зонд охватывает как нуклеотидную последовательность, соответствующую природному гену белка G вируса бешенства, так и 389 пар нуклеотидов правого плеча C5; из-за связывания участка 389 п.н. есть слабый сигнал от гибридизации с исходным геномом ALVAC (дорожка 3), но размер, отвечающий этой полосе, отличается от такового vCP3015;

фиг. 13 представляет результаты анализа vCP3015 путем вестерн-блоттинга. Полоса, соответствующая белку G вируса бешенства, выявляется только в осадке клеток, зараженных vCP3015;

фиг. 14 изображает схему области C6 vCP3015; показано расположение праймеров;

фиг. 15 - последовательность vCP3015, включающая плечи C6, промотор 42K и синтетический ген cOX<sub>40</sub>L (вместе представленные SEQ ID NO:7);

фиг. 16 - предсказанная аминокислотная последовательность синтетического cOX<sub>40</sub>L (SEQ ID NO:12, 63, 64, 65, 66 или 67);

фиг. 17 изображает схему области C5 vCP3015; показано расположение праймеров;

фиг. 18 - последовательность vCP3015, включающая плечи C5, промотор H6 и природный ген полипептида G вируса бешенства (вместе представленные SEQ ID NO:13);

фиг. 19 - предсказанная аминокислотная последовательность природного гена полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO:1). Предсказанные аминокислотные последовательности природного и кодон-оптимизированного генов полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO:1) идентичны на 100%;

фиг. 20 представляет схему вектора vCP3012, несущего природный ген полипептида G вируса бешенства в сайте C, кодон-оптимизированный синтетический ген полипептида G вируса бешенства в сайте C3 и последовательность, кодирующую cOX<sub>40</sub>L, в сайте C6;

фиг. 21 представляет результаты разделения путем гель-электрофореза расщепленной ферментом PmeI геномной ДНК и гибридизации по Саузерну с использованием зонда, специфичного к природному гену полипептида G вируса бешенства;

фиг. 22 представляет результаты разделения путем гель-электрофореза расщепленной ферментом BamHI геномной ДНК и гибридизации по Саузерну с использованием зонда, специфичного к синтетическому гену полипептида G вируса бешенства;

фиг. 23 представляет результаты разделения путем гель-электрофореза расщепленной ферментом NruI геномной ДНК и гибридизации по Саузерну с использованием зонда, специфичного к природному гену полипептида G вируса бешенства;

фиг. 24 представляет результаты анализа vCP3012 методом вестерн-блоттинга. Полоса, соответствующая белку G вируса бешенства, выявляется только в осадке зараженных клеток;

фиг. 25 изображает схему области C6 vCP3012; показано расположение праймеров;

фиг. 26 - последовательность vCP3012, включающая плечи C6, промотор 42K и синтетический ген cOX<sub>40</sub>L (вместе представленные SEQ ID NO:17);

фиг. 27 изображает схему области C3 vCP3012; показано расположение праймеров;

фиг. 28 представляет последовательность vCP3012, включающую плечи C3, промотор I3L и синтетический ген полипептида G вируса бешенства (вместе представленные SEQ ID NO:20);

фиг. 29 изображает схему фрагмента vCP3012 от C5R до C5L (то есть последовательность, соответствующую полипептиду G вируса бешенства, и фланкирующие области);

фиг. 30 изображает последовательность vCP3012 от C5R до C5L, включающую ген белка G вируса бешенства (вместе представленную SEQ ID NO:23). Предсказанные аминокислотные последовательности природного гена полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO:1) и синтетического гена полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO:1) идентичны на 100% и такие же, как описано для vCP3006 или vCP3015;

фиг. 31 - график GMT и 95%-ный доверительный интервал (CI) в день 14;

фиг. 32 - график GMT и 95%-ный доверительный интервал (CI) в день 21;

фиг. 33 - график GMT и 95%-ный доверительный интервал (CI) в день 28;

фиг. 34 - график GMT и 95%-ный доверительный интервал (CI) в день 48;

фиг. 35 - графики титров антител против бешенства у животных разных групп;

фиг. 36 - описание последовательностей SEQ ID NO:1-24, 63-67;

фиг. 37 описание последовательностей SEQ ID NO:25-62;

фиг. 38 представляет выравнивание последовательностей SEQ ID NO:12, 63-67 (то есть выбранные пептиды OX<sub>40</sub>L). В таблице внизу указана степень идентичности

#### Осуществление изобретения

Предлагаются композиции, включающие экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид вируса бешенства и его фрагменты и варианты, вызывающие иммуногенную реакцию у животных. Экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид вируса бешенства или его фрагменты или варианты, может быть включен в состав вакцины или фармацевтической композиции и использован для возбуждения или стимуляции защитного иммунного ответа у животного. В одном из воплощений данного изобретения полипептид вируса бешенства является полипептидом G или его активным фрагментом или вариантом.

Предлагаются композиции, включающие экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид G вируса бешенства или его активные фрагменты или варианты, и полинуклеотид, кодирующий полипептид OX<sub>40</sub>L или его активные фрагменты или варианты. В частности, полипептид OX<sub>40</sub>L является собачьим OX<sub>40</sub>L (cOX<sub>40</sub>L).

Полипептиды по данному изобретению могут представлять собой целую полипептидную цепь или же ее активные фрагменты или варианты. Под активными фрагментами или вариантами понимаются фрагменты или варианты, сохраняющие антигенную природу данного полипептида. Таким образом, данное изобретение охватывает любые полипептиды, антигены, эпитопы или иммуногенные агенты вируса бешенства, вызывающие у животных иммуногенную реакцию. Полипептид, антиген, эпитоп или иммуногенный агент вируса бешенства по данному изобретению может быть любым полипептидом, антигеном, эпитопом или иммуногенным агентом вируса бешенства, например (не ограничиваясь перечисленным здесь) белком, пептидом или их фрагментом или вариантом, вызывающими, индуцирующими или стимулирующими у животных, например у птиц, иммунный ответ.

В частности, интерес представляет полипептид вируса бешенства, называемый гликопротеином, или белком G. Гликопротеин вируса бешенства относится к поверхностным белкам вирусной частицы. Он является антигенным и отвечает за связывание вируса с заражаемой клеткой. По данному изобретению можно использовать предшественники любого из этих антигенов.

Антигенные полипептиды по данному изобретению способны защищать от бешенства. Это значит, что они могут стимулировать у животного иммунный ответ. Под антигеном или иммуногенным агентом понимается вещество, вызывающее специфический иммунный ответ у животного-хозяина. Антиген может представлять собой целый организм - убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть этого организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; участок или фрагмент ДНК, способный вызывать иммунный ответ после представления в организме животного-хозяина; полипептид, эпитоп, гаптен или любое их сочетание. Или же иммуногенный агент/антиген может представлять собой токсин либо антитоксин.

В настоящем документе термины "белок", "пептид", "полипептид" и "фрагмент полипептида/полипептидный фрагмент" употребляются взаимозаменяемо и относятся к полимерной молекуле, состоящей из мономеров - аминокислот, любой длины. Такой полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот; в нем могут быть вставки иных нежели аминокислоты химических группировок. Эти термины также включают полимеры из аминокислот, модифицированные естественным образом или путем стороннего вмешательства: например, путем образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любых других манипуляций или модификаций, например конъюгирования с мечеными или биологически активными компонентами.

Термины "полипептид G вируса бешенства" или "полинуклеотид G вируса бешенства" относятся к любому природному или оптимизированному полипептиду G или полинуклеотиду G соответственно вируса бешенства, их производным и вариантам.

Термины "полипептид OX<sub>40</sub>L" или "полинуклеотид OX<sub>40</sub>L" относятся к любому природному или оптимизированному полипептиду OX<sub>40</sub>L или полинуклеотиду OX<sub>40</sub>L, соответственно их производным и вариантам.

В настоящем документе термин "иммуногенный/антигенный полипептид" включает полипептиды, иммунологически активные в том смысле, что, попав в организм животного-хозяина, они способны вызывать гуморальный и/или клеточный иммунный ответ, направленный против данного белка. Предпочтительно фрагмент белка берется такой, чтобы он обладал в основном такой же иммунологической активностью, что и целый белок. Таким образом, белковый фрагмент по данному изобретению содержит эпитоп или антигенную детерминанту, или состоит в основном из эпитопа или антигенной детерминанты, или состоит по меньшей мере из одного эпитопа или одной антигенной детерминанты. Термин "иммуногенный белок" или "иммуногенный полипептид" в настоящем документе включает полную аминокислотную последовательность данного белка, его аналогов или иммуногенных фрагментов. Под иммуногенным фрагментом понимается фрагмент белка, включающий один или более эпитопов, и таким образом вызывающий иммунологическую реакцию, описанную выше. Такие фрагменты можно идентифицировать, применяя любое число методов картирования эпитопов, хорошо известных в данной области техники; см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Например, в случае линейных эпитопов можно параллельно синтезировать множество пептидов на твердой подложке, соответствующих участкам белковой молекулы, и с находящимися на подложке пептидами проводить реакцию с антителами. Такие методы известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 4708871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. В случае конформационных эпитопов идентификация достигается путем определения пространственной конформации аминокислот, например с помощью рентгеновской кристаллографии и двумерной ЯМР-спектроскопии; см., например, *Epitope Mapping Protocols* (см. выше). Методы, особенно подходящие для белков T. parva, исчерпывающе описаны в заявке на патент США № 2004/022605, которая целиком включается в настоящий документ путем отсылки.

В настоящем описании данное изобретение включает активные фрагменты и варианты антигенных полипептидов. Таким образом, термин "иммуногенный/антигенный полипептид" также охватывает делеции, вставки и замены в последовательности, если с такими изменениями данный полипептид иммунологически функционирует, то есть вызывает иммунологическую реакцию, как она определена в настоящем документе. Термин "консервативная вариация" означает замену аминокислотного остатка другим, биологически сходным, или замену нуклеотида в нуклеотидной последовательности, не приводящую к замене аминокислотного остатка или приводящую к замене на биологически сходный аминокислотный остаток. В этой связи особенно предпочтительные замены консервативны, то есть на место заменяемой аминокислоты встает член того же семейства аминокислот. Аминокислоты обычно разделяют на четыре семейства: (1) кислые - аспарагиновая кислота (аспартат) и глутаминовая кислота (глутамат); (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда объединяют в группу ароматических аминокислот. Консерва-

тивные вариации включают замену одного гидрофобного аминокислотного остатка, например изолейцина, валина, лейцина или метионина, на другой гидрофобный остаток; или замену одного полярного аминокислотного остатка на другой полярный остаток, например замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты - на аспарагиновую кислоту или глутамин - на аспарагин и т.п.; Консервативной заменой будет и такая, когда аминокислота заменяется на структурно родственную, что не влияет существенно на биологическую активность. Таким образом, белки, имеющие такую же в основном аминокислотную последовательность, как и эталонная молекула, но только с незначительными заменами аминокислот, не влияющими существенно на иммуногенность белка, охватываются понятием "эталонный полипептид". В эту категорию включаются все полипептиды, порожденные указанными модификациями. Термин "консервативная вариация" также включает использование замещенных аминокислот вместо исходных незамещенных - при условии, что антитела, образовавшиеся в ответ на такой замещенный полипептид также реагируют с незамещенным полипептидом.

Термин "эпитоп" относится к участку антигена или гаптена, на который отвечают специфичные В-и/или Т-клетки. Этот термин используется как синоним (взаимозаменяемо) термину "антигенная детерминанта" или "участок антигенной детерминанты". Антитела, узнающие один и тот же эпитоп, можно идентифицировать простым иммунологическим методом, демонстрирующим способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью.

Иммунологическая реакция на композицию или вакцину - это развитие в организме-хозяине клеточного и/или гуморального (опосредованного антителами) иммунного ответа, направленного на данную композицию или вакцину. Обычно понятие "иммунологическая реакция" включает (но не ограничивается перечисленным здесь) один или более из следующих феноменов: образование антител, В-клеток, хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных специфично на антиген или антигены, содержащиеся в данной композиции или вакцине. Предпочтительно в организме-хозяине возникает терапевтическая или протективная иммунологическая реакция, так что усиливается сопротивляемость новой инфекции и/или снижается степень тяжести клинических проявлений заболевания. Такая защита демонстрируется ослаблением или отсутствием симптомов и/или клинических признаков заболевания, обычно имеющих место у зараженного организма-хозяина, более быстрым выздоровлением и/или пониженной концентрацией вируса в зараженном организме-хозяине.

Термин "животное" в настоящем документе подразумевает млекопитающих, птиц и проч. Термины "животное" или "хозяин" в настоящем документе включают млекопитающих, в том числе человека. Животное может быть выбрано из группы, состоящей из представителей семейства лошадиных (например, лошади), псовых (например, собаки, волка, лисицы, койота, шакала), кошачьих (например, льва, тигра и других "больших кошек", в том числе гепарда и рыси, домашней кошки, дикой кошки), полорогих (например, овцы и крупного рогатого скота), нежвачных парнокопытных (например, свиньи), птиц (например, курицы, утки, гуся, индейки, куропатки и перепела, фазана, попугаев, вьюрков, ястребиных, страусов, включая казуара и эму), приматов (например, полуобезьян, включая долгопятов, низших приматов, человекообразных обезьян, включая гиббонов) хорьков, тюленей и рыб. Термин "животное" включает также понятие особи (индивида) на всех стадиях развития, включая периоды новорожденности и внутриутробного развития.

Если особо не оговорено иного, все технические и научные термины в настоящем документе употребляются в тех значениях, которые общеприняты у рядовых специалистов в области техники, к которой относится данное описание. Слова используемые в единственном числе включают значение множественного числа, если только из контекста не следует иное. Союз "или" подразумевает также соединительное значение ("и"), если только из контекста не следует иное.

В настоящем описании и в особенности в формуле изобретения и/или пунктах выражения "содержать" и его производные ("содержащий" и проч.) имеют значение, придаваемое им согласно патентному законодательству США; например, значение "включать" ("включающий", "включенный" и проч.); выражение "состоять в основном из" и его производные ("состоящий в основном из") имеют значение, придаваемое им согласно патентному законодательству США; например, они означают, что подразумеваются не только буквально названные элементы, но исключают элементы, ранее фигурировавшие в данной области техники или влияющие на основные или новые отличительные признаки данного изобретения.

#### Композиции.

Данное изобретение относится к вакцинам против бешенства или к композициям, которые могут содержать рекомбинантный или экспрессионный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий полипептиды, антигены, эпитопы или иммуногенные агенты вируса бешенства, и фармацевтически и ветеринарно приемлемые носители, иные эксципиенты, или средства доставки. Полипептид, антиген, эпитоп или иммуногенный агент может быть любым полипептидом, антигеном, эпитопом или иммуногенным агентом вируса бешенства, например (не ограничиваясь перечисленным здесь) белком, пептидом или их фрагментом, который вызывает или стимулирует реакцию со стороны организма животного.

Данное изобретение относится к вакцинам или композициям против бешенства, содержащим рекомбинантный или экспрессионный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий полипептид G вируса бешенства и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, иной эксципиент или

средство доставки. В одном из воплощений данного изобретения предлагаемый экспрессионный вектор может также содержать полинуклеотид, кодирующий полипептид OX<sub>40</sub>L.

В другом воплощении данного изобретения или ветеринарно приемлемый носитель, иной эксципиент или средство доставки может представлять собой эмульсию типа "вода в масле". В еще одном воплощении данного изобретения эта эмульсия типа "вода в масле" может быть тройной эмульсией вода/масло/вода (W/O/W). В еще одном воплощении данного изобретения фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, иной эксципиент или средство доставки может представлять собой эмульсию типа "масло в воде".

В одном из воплощений данного изобретения полипептид или антиген, или его фрагмент, или его вариант вируса бешенства содержит полипептид G вируса бешенства или его фрагмент, или его вариант. В одном из вариантов этого воплощения данного изобретения полипептид G вируса бешенства или его фрагмент, или его вариант является рекомбинантным полипептидом - продуктом гена вируса бешенства. В другом варианте этого воплощения данного изобретения ген G вируса бешенства по меньшей мере на 70% идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO:5 или 16. В другом варианте этого воплощения данного изобретения полипептид G вируса бешенства или его фрагмент или его вариант по меньшей мере на 80% идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO:1.

В другом воплощении данного изобретения полипептид OX<sub>40</sub>L, антиген, или фрагмент, или вариант является рекомбинантным полипептидом - продуктом гена OX<sub>40</sub>L. В другом варианте этого воплощения данного изобретения ген OX<sub>40</sub>L по меньшей мере на 70% идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO:10. В другом варианте этого воплощения данного изобретения полипептид OX<sub>40</sub>L или его фрагмент, или его вариант по меньшей мере на 80% идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO:12, 63, 64, 65, 66 или 67.

В другом воплощении данного изобретения предлагается новая вакцина против бешенства с генетическим адъювантом для не отдельного применения у животных, живущих с человеком (например, у кошек, собак и хорьков), которая содержит рекомбинантный поксвирусный вектор, включающий и экспрессирующий нуклеотидные последовательности, кодирующие и экспрессирующие полипептид G и OX<sub>40</sub>L. В другом воплощении данного изобретения указанный вектор может содержать поксвирус канареек. В другом воплощении данного изобретения ген поверхностного гликопротеина вируса бешенства может кодировать гликопротеин G вируса бешенства, аминокислотная последовательность которого представлена SEQ ID NO:1, и полипептид OX<sub>40</sub>L, аминокислотная последовательность которого представлена SEQ ID NO:12, 63, 64, 65, 66 или 67.

Приведенное определение охватывает также синтетические антигены, например полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие производные антигенов, полученные рекомбинантным или синтетическим путем (см., например, Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998). Для целей данного изобретения иммуногенные фрагменты обычно включают по меньшей мере около 3 аминокислотных остатков, по меньшей мере около 5 аминокислотных остатков, по меньшей мере около 10-15 аминокислотных остатков или по меньшей мере около 15-25 или более аминокислотных остатков исходной молекулы. Что касается длины фрагмента, то верхнего предела здесь нет: он может содержать почти всю аминокислотную последовательность данного белка или даже гибридного (слитого) белка, содержащую по меньшей мере один эпитоп данного белка.

Соответственно минимальная структура полинуклеотида, проявляющаяся как эпитоп, содержит нуклеотиды, кодирующие эпитоп, или антигенную детерминанту, полипептида вируса бешенства (или состоит из этих нуклеотидов, или в основном состоит из этих нуклеотидов). Полинуклеотид, кодирующий фрагмент полипептида вируса бешенства, может содержать минимум 15 нуклеотидов, около 30-45 нуклеотидов, около 45-75 или по меньшей мере 57, 87 или 150 последовательно или непрерывно расположенных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, кодирующей данный полипептид (или состоять из них, или в основном состоять из них). При осуществлении на практике данного изобретения могут применяться такие подходы к определению эпитопов, как, например, создание библиотек перекрывающихся пептидов (Hemmer et al., 1998), пептидное сканирование (метод PEPSCAN) (Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1985; Van der Zee R. et al., 1989; Geysen, 1990; пептидный синтез на иглах Multipin.RTM, наборы производства компании Chiron) и использование алгоритмов (De Groot et al., 1999; PCT/US2004/022605).

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" относятся к РНК или ДНК-линейным или разветвленным, одно- или двухцепочечным, или их гибридам. Эти термины охватывают также гибридные молекулы ДНК/РНК. Ниже приведены примеры (не имеющие ограничительного характера) полинуклеотидов: ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, матричные РНК (мРНК), транспортные РНК (тРНК), рибосомные РНК (рРНК), рибозимы, комплементарные ДНК (кДНК), рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированная ДНК с любой нуклеотидной последовательностью, изолированная РНК с любой нуклеотидной последовательностью, ДНК- или РНК-пробы (зонды) и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, например метилированные нуклеотиды; или аналоги нуклеотидов; урацил; сахара и связывающие группировки, отличные от рибозы и дезоксирибозы, например фторрибозу и тиолаты; и нуклеотидные ответвления.



Нуклеотидная последовательность может модифицироваться после полимеризации, например, путем конъюгации с компонентом-меткой. Другие модификации такого рода включают экпирование, замену одного или более природных нуклеотидов на аналоги, включение средств для присоединения полинуклеотида к белкам, ионам металлов, компонентам-меткам, другим полинуклеотидам или твердой подложке. Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть получены путем химического синтеза или произведены микроорганизмами.

Термин "ген" употребляется в широком смысле для обозначения любого участка полинуклеотида, связанного с той или иной биологической функцией. Так, понятие гена включает интроны и экзоны как геномные последовательности или только кодирующие нуклеотидные последовательности, например кДНК, и/или регуляторные последовательности, необходимые для их экспрессии. Например, термин "ген" также относится к фрагментам нуклеиновых кислот, обеспечивающим образование мРНК или функциональной РНК, или кодирующим определенный белок, которые включают регуляторные последовательности.

Что касается вариаций OX<sub>40</sub>L, то словосочетание "функциональный фрагмент или вариант OX<sub>40</sub>L" в настоящем документе означает пептид, который стимулирует/усиливает иммунный ответ, вызываемый иммуногенным пептидом посредством того же механизма и в сравнимой степени (по сравнению с OX<sub>40</sub>L по данному изобретению). Например, если кошачий OX<sub>40</sub>L при его экспрессии вместе с полипептидом G вируса бешенства в организме собаки вызывает иммунный ответ против вируса бешенства, более интенсивный, чем вызванный одним только экспрессионным вектором, обеспечивающим экспрессию полипептида G, и этот кошачий OX<sub>40</sub>L действует посредством того же механизма (например, включающего связывание рецептора TNF), то этот кошачий OX<sub>40</sub>L можно считать функциональным фрагментом или вариантом собачьего OX<sub>40</sub>L, служащего примером в настоящем документе. Аналогично, полиморфные варианты собачьего OX<sub>40</sub>L, способные усиливать иммунный ответ, тоже являются функциональными фрагментами или вариантами собачьего OX<sub>40</sub>L. Наконец, если укороченный вариант OX<sub>40</sub>L стимулирует/усиливает иммунный ответ в сравнимой степени (по сравнению с соответствующим OX<sub>40</sub>L полной длины), то этот укороченный вариант считается функциональным фрагментом или вариантом OX<sub>40</sub>L.

Данное изобретение также охватывает нуклеотидные последовательности, комплементарные полинуклеотидам, кодирующим антиген, эпитоп или иммуногенный агент вируса бешенства, или полинуклеотидам, кодирующим антиген, эпитоп или иммуногенный агент OX<sub>40</sub>L. Комплементарная последовательность может быть полимером любой длины и может содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и их аналоги в любых сочетаниях.

Определение "изолированный" ("выделенный") применительно к биологическому компоненту (например, нуклеиновой кислоте, белку или клеточной органелле) означает, что данный компонент в основном отделен или очищен от других биологических компонентов клеток того организма, в котором данный компонент присутствует от природы, например от других хромосомных или нехромосомных ДНК или РНК, белков и органелл. Изолированные (выделенные) нуклеиновые кислоты и белки включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными методами очистки такого рода веществ. Определение "изолированный" ("выделенный") также охватывает нуклеиновые кислоты и белки, полученные с помощью методов рекомбинантной ДНК/РНК или путем химического синтеза.

Определение "очищенный" в настоящем документе не подразумевает абсолютной чистоты - это скорее относительная характеристика. Так, например, препарат частично очищенного полипептида - это такой препарат, в котором относительное содержание данного полипептида выше, чем в его естественном окружении. Иными словами, данный полипептид отделен от других клеточных компонентов. Выражение "в основном очищенный" ("практически очищенный") подразумевает, что по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или более клеточного материала или клеточных компонентов удалены. Сходным образом определяется понятие "частично очищенный полипептид". Это выражение подразумевает, что удалены менее 60% клеточного материала или клеточных компонентов. То же относится к полинуклеотидам. Описанные в настоящем документе полипептиды могут быть очищены любыми известными в данной области техники способами.

Также в объем данного изобретения входят гомологи полипептидов вируса бешенства и гомологи полипептидов OX<sub>40</sub>L. В настоящем документе термин "гомологи" включает ортологи, аналоги и паралоги. Термин "аналог" применительно к двум полипептидам или полинуклеотидам означает, что они выполняют одну и ту же функцию или сходные функции, но в ходе эволюции возникли независимо друг от друга у неродственных организмов. Термин "ортологи" употребляется в отношении полинуклеотидов или полипептидов из разных видов, подразумевая, что два полипептида (полинуклеотида) разделились в результате видообразования и происходят от общего предкового гена. Обычно ортологи кодируют полипептиды с одной и той же функцией или со сходными функциями. Термин "паралоги" употребляется в отношении полипептидов или полинуклеотидов, разделившихся в результате дубликации в геноме. У двух паралогичных полипептидов (полинуклеотидов) обычно разные функции, но эти функции могут быть связаны. Например, аналоги, ортологи и паралоги полипептида вируса бешенства дикого типа могут отличаться от полипептида вируса бешенства дикого типа в результате посттрансляционной модифи-

кации, различий в аминокислотной последовательности или того и другого вместе. В частности, гомологи по данному изобретению в основном по меньшей мере на 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95, 96, 97, 98, 99% идентичны по последовательности всему полипептиду или полинуклеотиду вируса бешенства дикого типа (или его части) и выполняют сходные функции.

В другом аспекте данного изобретения предлагается полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98% или 99% идентична последовательности полипептида, представленного SEQ ID NO:1. В еще одном аспекте данного изобретения предлагаются фрагменты и варианты полипептидов вируса бешенства или полипептидов OX<sub>40</sub>L, о которых говорилось выше (SEQ ID NO:1 или 12, 63-67); они могут быть достаточно легко получены специалистом в данной области техники с помощью хорошо известных молекулярно-биологических методов.

Варианты - это гомологичные полипептиды, у которых аминокислотная последовательность по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO:1 или 12, 63-67.

Варианты включают аллельные варианты. Термин "аллельный вариант" относится к существующим в природной популяции (например, виды или штаммы вируса) полинуклеотидам или полипептидам, в которых имеются полиморфизмы, приводящие к изменениям аминокислотной последовательности белка. В силу существования таких аллельных вариантов обычно имеет место 1-5%-ная изменчивость полинуклеотидов или полипептидов. Аллельные варианты можно идентифицировать путем секвенирования данной нуклеотидной последовательности у ряда различных видов живых организмов, что можно легко осуществить с помощью гибридизационных зондов, чтобы идентифицировать у этих видов один и тот же генный locus. В объем данного изобретения входят любые (и все) такие вариации нуклеотидных последовательностей и следующий из них полиморфизм аминокислотных последовательностей или вариации, являющиеся результатом природных аллельных вариантов, которые не влияют на функциональную активность данного гена.

В настоящем документе термины "производное" или "вариант" относятся к полипептиду (или к кодирующей его нуклеиновой кислоте), в котором имеются одна или более консервативных вариаций аминокислот или иные незначительные модификации -такие, что (1) функционирование соответствующего полипептида практически не изменяется по сравнению с полипептидом дикого типа или (2) антитела против данного полипептида иммунореактивны в отношении полипептида дикого типа. Эти варианты или производные включают полипептиды с незначительными модификациями по сравнению с исходными аминокислотными последовательностями полипептида вируса бешенства по данному изобретению или OX<sub>40</sub>L, в результате чего пептиды обладают практически такой же активностью, как соответствующие не модифицированные полипептиды. Такие модификации могут создаваться намеренно, например путем направленного (сайт-специфичного) мутагенеза, или же быть спонтанными. Термин "вариант" также включает делеции, вставки и замены в последовательности, не влияющие на функционирование полипептида, а именно на иммунологическую реакцию, как это описано в настоящем документе.

Термин "консервативная вариация" означает замену аминокислотного остатка на другой, биологически сходный аминокислотный остаток или замену нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты, не приводящую к замене аминокислотного остатка в соответствующем полипептиде или приводящую к замене на биологически сходный аминокислотный остаток. В этой связи особенно предпочтительные замены, как правило, консервативны, о чем говорилось выше.

Иммуногенный фрагмент полипептида вируса бешенства или полипептида OX<sub>40</sub>L включает по меньшей мере 8, 10, 13, 14, 15 или 20 расположенных подряд аминокислотных остатков, по меньшей мере 21 аминокислотный остаток, по меньшей мере 23 аминокислотных остатка, по меньшей мере 25 аминокислотных остатков или по меньшей мере 30 аминокислотных остатков полипептида вируса бешенства с последовательностью, представленной SEQ ID NO:1 или ее вариантами, или полипептида OX<sub>40</sub>L с последовательностью, представленной SEQ ID NO:12, 63, 64, 65, 66 или 67 или их вариантами.

В другом аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид, кодирующий полипептид вируса бешенства, например полинуклеотид, кодирующий полипептид с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:5 или 16. В еще одном аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид, кодирующий полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности полипептида, представленной SEQ ID NO:1 или ее консервативным вариантом, аллельным вариантом, гомологом или иммуногенным фрагментом, содержащим по меньшей мере восемь или по меньшей мере десять расположенных подряд аминокислотных остатков одного из этих полипептидов или их сочетаний.

В другом аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид, кодирующий полипептид OX<sub>40</sub>L, например полинуклеотид, кодирующий полипептид с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:12, 63, 64, 65, 66 или 67. В еще одном аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид, кодирующий полипептид, аминокислотная последовательность которого по

меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности полипептида, представленной SEQ ID NO:12, 63, 64, 65, 66 или 67 или их консервативными вариантами, аллельными вариантами, гомологами или иммуногенными фрагментами, содержащими по меньшей мере восемь или по меньшей мере десять расположенных подряд аминокислотных остатков одного из этих полипептидов или их сочетаний.

В другом аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO:5, 10 или 16 или их вариантами. В еще одном аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотид, последовательность которого по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности полинуклеотида, представленной SEQ ID NO:5, 10 или 16 или их вариантом.

В настоящем описании полинуклеотиды включают нуклеотидные последовательности, вырожденные в смысле генетического кода в результате, например, использования оптимизированных кодонов для определенного организма-хозяина. В настоящем документе определение "оптимизированный" относится к полинуклеотидам, которым методами генетической инженерии придана способность к усиленной экспрессии у данного вида живых организмов. Для получения кодон-оптимизированных полинуклеотидов, кодирующих полипептиды G вируса бешенства или полипептиды OX<sub>40</sub>L, последовательность ДНК гена G вируса бешенства или гена OX<sub>40</sub>L может быть модифицирована, чтобы 1) содержать кодоны, предпочтительные для генов с высоким уровнем экспрессии у данного вида живых организмов; 2) иметь содержание А+Т или G+C, близкое к обычно имеющему место у данного вида; 3) образовывать инициатор ну ю последовательность у указанного вида; или 4) исключить последовательности, обуславливающие дестабилизацию, неадекватное полиаденилирование, деградацию и терминацию РНК, или образовывать вторичную структуру типа "шпилька", или сайты сплайсинга РНК. Усиленная экспрессия белка G вируса бешенства или белка OX<sub>40</sub>L у указанного вида может достигаться с учетом распределения частоты использования кодонов у эукариот и прокариот или у данного вида. Термин "частота использования предпочтительных кодонов" относится к предпочтительному у определенных клеток-хозяев использованию кодонов для кодирования данной аминокислоты. Существует 20 природных аминокислот, большинство которых кодируется более чем одним кодоном. Таким образом, в настоящее описание включаются все вырожденные нуклеотидные последовательности, кодирующие функционально не различающиеся аминокислотные последовательности полипептида G вируса бешенства и полипептида OX<sub>40</sub>L.

Степень идентичности двух сравниваемых аминокислотных последовательностей может быть установлена с помощью программы BLAST с матрицей попарных сравнений BLOSUM62 NCBI (Национального центра биотехнологической информации, Бетесда, шт. Мэриленд, США) с использованием стандартных параметров (см., например, алгоритмы BLAST или BLASTX на сервере NCBI, а так же работу Altschul et al.). В настоящем документе алгоритм или BLAST, или BLASTX и матрица BLOSUM62 обозначаются словом *blasts*.

Термин "идентичность" применительно к последовательностям относится к числу положений с одинаковыми нуклеотидами или аминокислотами, деленному на число нуклеотидов или аминокислот в наиболее короткой из сравниваемых двух последовательностей. Выравнивание двух последовательностей определяют согласно алгоритму Уилбура-Липмана (Wilbur, Lipman), например, взяв размер окна 20 нуклеотидов, длину слова 4 нуклеотида и штраф за пробел 4. Компьютерный анализ и интерпретацию данных включая выравнивание можно осуществить, используя имеющиеся в продаже программы (например, *Intelligenetics™ Suite*, Intelligenetics Inc. штат Калифорния, США). Когда говорят, что последовательности РНК сходны или имеют ту или иную степень идентичности последовательностей, или гомологию с последовательностями ДНК, тимидин (Т) в последовательностях ДНК считается эквивалентным урацилу (У) в последовательностях РНК. Таким образом, последовательности РНК входят в объем данного изобретения; их можно вывести из последовательностей ДНК, полагая тимидин (Т) в последовательностях ДНК эквивалентным урацилу (У) в последовательностях РНК.

Идентичность или сходство двух аминокислотных последовательностей или идентичность двух нуклеотидных последовательностей можно определять, используя пакет программ Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Карлсбад, штат Калифорния, США).

В работах перечисленных ниже авторов предлагаются алгоритмы для сравнения и определения относительной идентичности или гомологии последовательностей; для определения процента гомологии или идентичности дополнительно к изложенному выше (или вместо него) можно использовать рекомендации, данные в работах этих авторов: Needleman S.B., Wunsch C.D.; Smith T.F., Waterman M.S.; Smith T.F., Waterman M.S., Sadler J.R.; Feng D.F., Dolittle R.F.; Higgins D.G., Sharp P.M.; Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.; Devereux J., Haeblerle P., Smithies O. Опытный специалист в данной области техники может обойтись без ненужного экспериментирования, используя при определении процента гомологии также многие другие программы или работы.

Реакции гибридизации можно проводить в условиях различной степени жесткости. Условия, увеличивающие жесткость гибридизации, хорошо известны (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory

Manual", второе издание (Sambrook et al., 1989).

Данное изобретение также охватывает полинуклеотиды вируса бешенства или полинуклеотиды ОХ<sub>40</sub>L, или то и другое вместе, содержащиеся в векторных молекулах или экспрессионных векторах и функционально связанные с промоторными элементами и при необходимости с энхансерами.

Термин "вектор" в настоящем документе относится к рекомбинантным плазмидам (РНК или ДНК) или вирусам, содержащим гетерологичный полинуклеотид, который должен быть доставлен в клетку-мишень *in vitro* либо *in vivo*. Этот гетерологичный полинуклеотид может включать нуклеотидную последовательность, нужную для профилактики или лечения, и при необходимости он может быть представлен экспрессионной кассетой. В контексте данного изобретения вектор не обязательно способен к репликации в конечной клетке-мишени или организме пациента. Термин "вектор" включает клонирующие и вирусные векторы.

Термин "рекомбинантный" означает, что данный полинуклеотид является полностью или частично синтетическим и не встречается в природе или связан с другим полинуклеотидом в конструкции, не встречающейся в природе.

Термин "гетерологичный" означает, что данный полинуклеотид происходит из объекта, генетически отличного от того объекта, с которым проводится сравнение. Например, с помощью методов генетической инженерии полинуклеотид может быть включен в плазмиду или вектор, происходящий из другого источника, и тогда он является гетерологичным. Промотор, отделенный от своей природной кодирующей последовательности и функционально связанный с кодирующей последовательностью, отличной от той, природной, является гетерологичным промотором.

Полинуклеотиды по данному изобретению могут содержать дополнительные последовательности, например дополнительные кодирующие последовательности в пределах той же транскрипционной единицы; регуляторные элементы, например промоторы; участки связывания с рибосомой; нетранслируемые области (5'-UTR, 3'-UTR); терминаторы транскрипции; сайты полиаденилирования; дополнительные транскрипционные единицы, регулируемые тем же или иным промотором; последовательности, обеспечивающие клонирование, экспрессию, гомологичную рекомбинацию и трансформацию клетки-хозяина; а также любые другие подобные элементы, если они желательны для воплощения данного изобретения.

В векторе по данному изобретению предпочтительно имеются элементы, нужные для экспрессии полипептида, антигена, эпитопа или иммуногенного агента вируса бешенства или полипептида ОХ<sub>40</sub>L. Как минимум вектор содержит кодон инициации трансляции (ATG), стоп-кодон и промотор, а при необходимости также последовательность polyA - в случае некоторых векторов, например плазмид и ряда вирусных векторов (например, отличных от поксвирусов). Когда полинуклеотид по данному изобретению кодирует фрагмент полипептида, например полипептида G вируса бешенства, в векторе предпочтительно инициаторный кодон ATG помещается на 5'-конце рамки считывания, а стоп-кодон - на ее 3'-конце. Могут присутствовать и другие элементы для регуляции экспрессии, например энхансеры, стабилизирующие последовательности, интроны и сигнальные последовательности, нужные для секреции белка-продукта.

Данное изобретение относится также к препаратам, содержащим векторы (например, экспрессионные векторы), например к терапевтическим композициям. Такие препараты могут включать один или более векторов, например экспрессионных векторов, например векторов для экспрессии *in vivo*, кодирующих и обеспечивающих экспрессию одного или более антигенов, эпитопов или иммуногенных агентов полипептида G вируса бешенства или полипептида ОХ<sub>40</sub>L. В одном из воплощений данного изобретения предлагаемый вектор содержит (и обеспечивает экспрессию) полинуклеотид, включающий полинуклеотид, кодирующий и/или обеспечивающий экспрессию антигена, эпитопа или иммуногенного агента полипептида G вируса бешенства, в фармацевтически (или ветеринарно приемлемом носителе, растворителе или ином эксципиенте. Таким образом, по одному из воплощений данного изобретения другой вектор (векторы) в указанном препарате содержит (содержат) полинуклеотид, кодирующий и при соответствующих обстоятельствах экспрессирующий один или более других белков помимо полипептида G вируса бешенства, его антигена, эпитопа или иммуногенного агента, например гемагглютинин, нейраминидазу, нуклеопротеин или их фрагменты.

В другом воплощении данного изобретения предлагаемый вектор (векторы) в препарате содержит полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий один или более белков или фрагментов полипептида G, его антигена, эпитопа или иммуногенного агента вируса бешенства или полипептида ОХ<sub>40</sub>L, его антигена, эпитопа или иммуногенного агента или их сочетания, или указанный вектор состоит из указанного полинуклеотида (полинуклеотидов). В другом воплощении данного изобретения предлагаемый препарат содержит один, два или более векторов, содержащих полинуклеотиды, кодирующие и экспрессирующие, предпочтительно *in vivo*, полипептида G вируса бешенства, его антигена или эпитопа, или включающего его гибридного (слитого) белка. Данное изобретение также направлено на смеси векторов, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие и экспрессирующие различные полипептиды G вируса бешенства, их антигены, эпитопы, иммуногенные агенты или включающие их гибридные (слитые) белки, например полипептиды G, антигены, эпитопы или иммуногенные агенты из различных видов живых организмов, включающих (но не ограничивающихся перечисленным здесь) людей, свиней, коров и другой крупный

рогатый скот, собак, кошек и птиц.

В еще одном воплощении данного изобретения экспрессионный вектор является плазмидным, в частности, для экспрессии *in vivo*. В одном из конкретных примеров (не имеющем ограничительного характера) в качестве вектора для внедрения полинуклеотидной последовательности могут использоваться плазмиды pVR1020 или 1012 plasmid (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, см., например, патенты США №№ 5846946 и 6451769). Плазида pVR1020 происходит из плазмиды pVR1012 и содержит человеческую сигнальную последовательность tPA. В одном из воплощений данного изобретения человеческая сигнальная последовательность tPA содержит аминокислоты с M(1) по S(23) последовательности, зарегистрированной в базе данных Genbank под номером HUMTPA14. В другом конкретном примере (не имеющем ограничительного характера) указанная плазида, используемая как вектор для внедрения полинуклеотидной последовательности, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид лошадиного инсулиноподобного фактора роста IGF1 с аминокислотного остатка M(24) до аминокислотного остатка A(48) последовательности, зарегистрированной в базе данных Genbank под номером U28070. Дополнительная информация о ДНК-плазидах, которую можно использовать для консультирования или практического использования, имеется, например, в патентах США №№ 6852705; 6818628; 6586412; 6576243; 6558674; 6464984; 6451770; 6376473 и 6221362.

Термин "плазида" в настоящем документе охватывает любые транскрипционные единицы ДНК, содержащие полинуклеотид по данному изобретению и элементы, необходимые для его экспрессии *in vivo* в клетке или клетках нужного организма-хозяина или мишени; в этой связи следует отметить, что сверхскрученные или не сверхскрученные кольцевые, а также в линейной форме плазмиды входят в объем данного изобретения.

Каждая плазида в дополнение к полинуклеотиду, кодирующему полипептид G вируса бешенства, его антиген, эпитоп или иммуногенный агент, при необходимости содержит (или состоит в основном из нее) слитую с ним последовательность, кодирующую гетерологичный пептид, вариант, аналог или фрагмент, функционально связанную с промотором или регулируемую промотором, или зависимую от промотора. Вообще, предпочтительно использовать сильные промоторы, функциональные в эукариотических клетках. Таким сильным промотором может быть (не ограничиваясь перечисленным здесь) промотор предранних генов цитомегаловируса (CMV-IE) человеческого или мышинного происхождения или при необходимости иного происхождения, например из морских свинок или крыс.

В более общих чертах промотор может быть вирусного либо клеточного происхождения. Сильным вирусным промотором, отличным от CMV-IE, который можно использовать для осуществления данного изобретения, является промотор ранних/поздних генов вируса SV40 или промотор LTR вируса саркомы Рауса. Сильным клеточным промотором, который можно использовать для осуществления данного изобретения, является промотор какого-либо гена цитоскелета, например промотор гена десмина (Kwissa et al., 2000) или промотор гена актина (Miyazaki et al., 1989).

Что касается сигнала полиаденилирования (poly A) для плазмид и вирусных векторов, отличных от поксвирусных, можно использовать сигнал полиаденилирования гена гормона роста крупного рогатого скота (bGH) (см. патент США № 5122458) или гена  $\beta$ -глобина кролика, или вируса SV40.

Под клеткой-хозяином понимается прокариотическая либо эукариотическая клетка, которая генетически изменена или способна к генетическому изменению путем введения экзогенного полинуклеотида, например рекомбинантной плазмиды или вектора. Применительно к генетически измененным клеткам данный термин относится как к клеткам, которые были изменены первыми, так и к их потомкам.

Способы применения и изделие.

Данное изобретение включает следующие воплощения предлагаемого способа. В одном из воплощений раскрывается способ вакцинации животных, включающий введение животному композиции, содержащей вектор, в составе которого имеется полинуклеотид, кодирующий полипептид G вируса бешенства или его фрагмент, или его вариант, и фармацевтически и ветеринарно приемлемый носитель, растворитель, средство доставки или иной эксципиент. В одном из вариантов этого воплощения способа по данному изобретению животным является птица, лошадь, представители семейства псовых, представители семейства кошачьих, хорек, тюлень или свинья.

В одном из воплощений данного изобретения применяется такой режим вакцинации, когда проводят несколько иммунизации разными вакцинными препаратами ("прайм-буст"); при этом делается по меньшей мере одно первичное введение и по меньшей мере одну повторную иммунизацию с использованием по меньшей мере одного общего полипептида, антигена, эпитопа или иммуногенного агента. Обычно иммунологическая композиция или вакцина, используемая для первичного введения отличается от тех, что используются для повторной иммунизации. Однако следует отметить, что и для первичного введения, и для повторной иммунизации можно использовать одну и ту же композицию. Такой режим введения вакцины называется "прайм-буст".

По данному изобретению используется рекомбинантный вирусный вектор для экспрессии кодирующей нуклеотидной последовательности вируса бешенства или ее фрагмента, которые кодируют полипептид вируса бешенства или его вариант, или его фрагмент. А именно, предлагаемый вирусный вектор может обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности вируса бешенства, конкретно -

ген G вируса бешенства или его фрагмент, кодирующий антигенный полипептид. Вирусные векторы, обсуждаемые в настоящем документе, включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) поксвирусы (например, вирус осповакцины или ослабленный вирус осповакцины; птичий поксвирус или ослабленный птичий поксвирус, например поксвирусы канареек, куриных, голубиных, перепелиных, вакцины ALVAC и TROVAC; см., например, патенты США №№ 5505941 и 54948070; поксвирус енотов, поксвирус свиней), аденовирусы (например, аденовирус человека, аденовирус собак), герпесвирусы (например, герпесвирус собак, герпесвирус кошек, герпесвирус крупного рогатого скота, герпесвирус свиней), бакулолвирусы, ретровирусы и др. В другом воплощении данного изобретения экспрессионный вектор на основе птичьего поксвируса может быть вектором на основе поксвируса канареек, например ALVAC. В еще одном воплощении данного изобретения экспрессионный вектор на основе птичьего поксвируса может быть вектором на основе поксвируса куриных, например TROVAC. Полипептид, антиген, эпитоп или иммуногенный агент вируса бешенства по данному изобретению может быть полипептидом G (или его антигеном, эпитопом или иммуногенным агентом) вируса бешенства. Например, поксвирусный вектор, обеспечивающий экспрессию полипептида G вируса бешенства может быть из числа векторов, описанных в патенте США № 5756102. По данному изобретению подлежащая экспрессии нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид G или его антиген, включается в вектор под контролем специфичного поксвирусного промотора, например промотора вируса осповакцины с молекулярной массой 7,5 кДа (Cochran et al., 1985), промотора вируса осповакцины I3L (Riviere et al., 1992), промотора вируса осповакцины G (Shida, 1986), промотора вируса коровьей оспы ATI (Funahashi et al., 1988), промотора вируса осповакцины H6 (Taylor et al., 1988b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989) и др.

Режим прайм-буст включает по меньшей мере одно первичное введение и по меньшей мере одну повторную иммунизацию с использованием по меньшей мере одного общего полипептида и/или его вариантов, или его фрагментов. Вакцина, используемая для первичного введения, может отличаться от тех препаратов, которые используются для последующего усиления иммунного ответа. Первичное введение может происходить в один или более приемов. Повторное введение также может происходить в один или более приемов.

Один из вариантов протокола вакцинации в режиме прайм-буст или в режиме по данному изобретению предполагает введение композиции, содержащей рекомбинантный вирусный вектор, который включает полинуклеотид, кодирующий полипептид G вируса бешенства, его антиген и/или варианты или фрагменты, и обеспечивает его экспрессию *in vivo*, и последующее введение рекомбинантного полипептида G вируса бешенства или его антигена по данному изобретению. Или же в протокол режима прайм-буст может входить сначала введение композиции, содержащей антиген G вируса бешенства по данному изобретению, а затем введение рекомбинантного вирусного вектора, который включает нуклеотидные последовательности, кодирующие и экспрессирующие полипептид G вируса бешенства или его антиген, или его варианты или фрагменты, и обеспечивает их экспрессию *in vivo*. Следует отметить, что как первичная, так и вторичная иммунизация может включать введение рекомбинантного вирусного вектора, обеспечивающего экспрессию полипептида G вируса бешенства по данному изобретению. Таким образом, при вакцинации против бешенства рекомбинантный вирусный вектор по данному изобретению можно вводить в любом порядке относительно рекомбинантного антигена вируса бешенства или же его можно использовать сам по себе в качестве композиции как для первичной, так и для вторичной иммунизации.

Другой вариант протокола вакцинации в режиме прайм-буст по данному изобретению предполагает введение композиции, содержащей рекомбинантный вирусный вектор, который включает полинуклеотид, кодирующий полипептид G вируса бешенства, его антиген и/или варианты или фрагменты, и обеспечивает его экспрессию *in vivo*, и последующее введение инактивированной композиции или вакцины, содержащей полипептид или антиген вируса бешенства. Или же в протокол режима прайм-буст может входить сначала введение инактивированной композиции или вакцины, а затем введение рекомбинантного вирусного вектора, который включает нуклеотидные последовательности, кодирующие и экспрессирующие полипептид G вируса бешенства или его антиген, или его варианты или фрагменты, и обеспечивает их экспрессию *in vivo*.

Еще один вариант протокола в режиме прайм-буст по данному изобретению предполагает по меньшей мере одно первичное введение композиции на основе рекомбинантного вирусного вектора по данному изобретению и по меньшей мере одно бустерное введение композиции на основе плазмиды по данному изобретению. Или же вакцинация в режиме прайм-буст предполагает по меньшей мере одно первичное введение композиции на основе плазмиды по данному изобретению и по меньшей мере одно бустерное введение композиции на основе рекомбинантного вирусного вектора по данному изобретению.

Объем дозы композиций по данному изобретению для видов-мишеней, например объем дозы для собаки, в случае композиции на основе вирусных векторов, например композиций на основе векторов из вирусов, отличных от поксвирусов, составляет, как правило, от около 0,1 до около 2,0 мл, от около 0,1 до около 1,0 мл и от около 0,5 до около 1,0 мл.

Эффективность вакцин можно оценивать после последней иммунизации, подвергая животных, на-

пример собак, контакту с вирулентным штаммом вируса бешенства. Как правило, животным под анестезией вводят 1,0 мл инфекционного материала путем внутримышечной инъекции (0,5 мл в каждую лобную и/или жевательную мышцу). Запланированная доза составляет  $3,8 \log_{10} LD_{50}$  / мл; для определения реально введенной дозы проводили обратное титрование антигена на мышах. За семь суток до иммунизации собакам давали привыкнуть к отдельным клеткам, в которых подопытных особей держали до конца исследования. Животные получали имеющийся в продаже корм и воду без ограничения. Для рандомизации можно использовать программу SAS ® V9.1 Enterprise Guide. Для заражения в день 0 (D0) препарат для введения готовят путем разбавления исходной инфекционной суспензии 1:100 раствором PBS + 2% фетальной телячьей сыворотки. Разбавленный препарат для заражения можно поместить в соответствующие помеченные стерильные емкости с запаиваемой крышкой и держать на льду до использования. В день заражения рекомендуется ввести животным обезболивающее/противовоспалительное средство; в случае собак это может быть фирококс в дозировке 5 мг/кг массы тела (расчетная доза при постепенном увеличении на полтаблетки). В течение 30 дней после заражения животных ежедневно обследуют, отмечая случаи смерти или развития неврологических проявлений, указывающих на инфекцию бешенства. Особей с симптомами бешенства умерщвляют щадящим способом согласно принятым на этот счет установлениям. Тотчас после умерщвления или спонтанной смерти животного у него берут образцы мозговой ткани. Образцы крови после заражения можно брать интракардиально под анестезией при умерщвлении. Из крови отделяют сыворотку, которую разделяют на две части по 2-3 мл каждая и до исследования хранят в замороженном виде при температуре около -20°C. У всех животных - умерших спонтанно, умерщвленных в период после заражения и у тех, кто дожил до конца эксперимента и был умерщвлен по его окончании - берут образцы ткани ядер продолговатого мозга. Эти образцы можно транспортировать в место исследования, держа их не замороженными на льду или замороженными на сухом льду. Определяют титры антител против вируса бешенства в сыворотке, используя метод RFFIT (быстрый тест на ингибирование флуоресценции) или FAVN (нейтрализация вируса флуоресцентными антителами). Ткань мозга подопытных животных можно подвергнуть прямому иммунофлуоресцентному окрашиванию, используя моноклональные антирабические антитела.

Специалистам в данной области техники следует учесть, что настоящее описание представляется в качестве примера и данное изобретение им не ограничивается. Базируясь на настоящем описании и на знаниях в данной области техники, опытный специалист может определить число введений, путь введения и дозы, нужные для каждого протокола иммунизации или заражения без излишнего экспериментирования.

Данное изобретение предполагает по меньшей мере одно введение животному эффективного количества терапевтической композиции, полученной по данному изобретению. Животное может быть самцом, самкой, беременной самкой и новорожденным. Введение терапевтической композиции возможно различными путями, включая (но не ограничиваясь перечисленным здесь) внутримышечные (IM), интрадермальные (ID) или подкожные (SC) инъекции или же интраназальное либо пероральное введение. Терапевтические композиции по данному изобретению можно также вводить с помощью безыгольного инъектора, например Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (производство Merial, шт. Гавайи, США), Vetjet или Vitajet (производство Bioject, шт. Орегон, США). Для введения плазмидных композиций можно также использовать другой подход - электропорацию (см., например, Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; заявка PCT № WO99/01158). В другом воплощении данного изобретения терапевтическая композиция вводится в организм животного путем "бомбардировки" частицами золота или с помощью генной пушки. В предпочтительном воплощении данного изобретения подопытным животным является собака, хорек или тюлень.

В одном из воплощений данного изобретения предлагается введение терапевтически эффективного количества композиции для доставки и экспрессии антигена или эпитопа вируса бешенства в клетках-мишенях. Для специалиста в данной области техники определение терапевтически эффективного количества препарата - обычное дело. В одном из воплощений данного изобретения указанная композиция включает экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, обеспечивающий экспрессию антигена или эпитопа вируса бешенства, и фармацевтически или ветеринарно приемлемого носителя, разбавителя или иного эксципиента. В другом воплощении данного изобретения фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или иной эксципиент способствует трансфекции или заражению и/или улучшает сохранность указанного вектора или белка в организме-хозяине.

Другое воплощение данного изобретения представляет собой набор для практического осуществления способа возбуждения или индуцирования иммунологической или защитной реакции у животных против бешенства; он включает рекомбинантную иммунологическую композицию или вакцину и инструкции для практического осуществления способа доставки указанного препарата в количестве, эффективном для возбуждения иммунного ответа у животного.

В другом воплощении данного изобретения его объект адресуется к набору для практического осуществления способа возбуждения или индуцирования иммунного ответа, включающему какую-либо из рекомбинантных композиций или вакцин против бешенства, инактивированных композиций или вакцин против бешенства, рекомбинантных вирусных композиций или вакцин против бешенства или основан-



ных на плаزمидах композиций или вакцин против бешенства композицию и инструкции по его применению на практике.

Другое воплощение данного изобретения представляет собой набор для практического осуществления способа возбуждения иммунологической или защитной реакции у животных против бешенства; он включает композицию или вакцину против бешенства, содержащую полипептид или антиген вируса бешенства по данному изобретению, рекомбинантную вирусную композицию или вакцину против бешенства и инструкции для практического осуществления способа доставки указанного препарата в количестве, эффективном для возбуждения иммунного ответа у животного.

Другое воплощение данного изобретения представляет собой набор для практического осуществления способа индуцирования иммунологической или защитной реакции у животных против бешенства, включающий композицию или вакцину, содержащую рекомбинантный вирусный вектор по данному изобретению и инактивированную иммунологическую композицию или вакцину против бешенства и инструкции для практического осуществления способа доставки указанного препарата в количестве, эффективном для возбуждения иммунного ответа у животного.

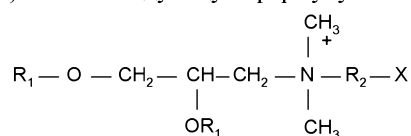
Другое воплощение данного изобретения представляет собой набор для практического осуществления способа индуцирования иммунологической или защитной реакции у животных против бешенства, включающий композицию или вакцину, содержащую рекомбинантный вирусный вектор по данному изобретению и основанную на плазмиде композицию или вакцину против бешенства и инструкции для практического осуществления способа доставки указанного препарата в количестве, эффективном для возбуждения иммунного ответа у животного.

В еще одном своем аспекте данное изобретение относится к набору для вакцинации в режиме прайм-буст, описанному выше в настоящем документе. Такой набор может содержать по меньшей мере две емкости: первая содержит вакцину или композицию для первичной вакцинации по данному изобретению, а вторая емкость содержит вакцину или композицию для повторной иммунизации с целью усиления иммунного ответа (бустер-иммунизации). Такой набор предпочтительно содержит дополнительную первую или вторую емкость для дополнительной первичной вакцинации или для дополнительной бустер-иммунизации.

В одном из воплощений данного изобретения предлагается введение терапевтически эффективного количества композиции для доставки и экспрессии полипептида G, антигена или эпитопа вируса бешенства в клетках-мишенях. Для специалиста в данной области техники определение терапевтически эффективного количества препарата - обычное дело. В одном из воплощений данного изобретения указанная композиция включает экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, обеспечивающий экспрессию полипептида G, антигена или эпитопа вируса бешенства, фармацевтически и ветеринарно приемлемого носителя, разбавителя или иного эксципиента. В другом воплощении данного изобретения фармацевтически (и ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или иной эксципиент способствует трансфекции или заражению и/или улучшает сохранность указанного вектора или белка в организме-хозяине.

Специалистам в данной области техники хорошо известны фармацевтически и ветеринарно приемлемые носители или разбавители, или иные вспомогательные вещества. Например, фармацевтически и ветеринарно приемлемым носителем или разбавителем, или иным эксципиентом может служить физиологический раствор (0,9%-ный раствор хлорида натрия) или фосфатный буферный раствор. Другие фармацевтически и ветеринарно приемлемые носители или разбавители, или иные вспомогательные вещества, которые можно использовать при осуществлении способов по данному изобретению, включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) поли-(L-глутамат) или поливинилпирролидон. Фармацевтически и ветеринарно приемлемым носителем или разбавителем, или иным эксципиентом может быть любое вещество или комбинация веществ, способствующие введению вектора (или белка, экспрессия которого обеспечивается вектором по данному изобретению *in vitro*) предпочтительно носитель или разбавитель, или иное вспомогательное вещество может способствовать трансфекции и/или улучшать сохранность вектора (или белка). Дозы и их объемы обсуждаются в настоящем документе в общем описании, из которого вместе с имеющимися знаниями и информацией специалист в данной области техники может их определить без излишнего экспериментирования.

Предпочтительные для плазмид катионные липиды, содержащие соли четвертичного аммония, (но подходят не только эти соединения) имеют следующую формулу:



где R<sub>1</sub> представляет насыщенный или ненасыщенный неразветвленный алифатический радикал, содержащий 12-18 атомов углерода; R<sub>2</sub> представляет другой алифатический радикал, содержащий 2-3 атома углерода; X представляет гидроксильную группу или аминогруппу, например N-(2-гидроксиэтил)-N,N-диметил-2,3-бис-(тетрадецилокси)-1-пропан аммоний (DMRIE). В другом воплощении данного изобретения



бретения указанный катионный липид может быть связан с нейтральным липидом, например диолеил-фосфатидил-этаноломином (DOPE).

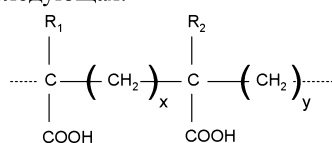
Из этих катионных липидов предпочтителен DMRIE (см. публикацию WO96/34109), предпочтительно связанный с нейтральным липидом, предпочтительно DOPE (см. Behr, 1994), с образованием DMRIE-DOPE.

При наличии DOPE молярное отношение DMRIE:DOPE предпочтительно составляет от (около 95:около 5) до (около 5:около 95), более предпочтительно (около 1:около 1), например 1:1.

Из числа адъювантных полимеров типа (1) предпочтительны полимеры поперечно сшитой акриловой или метакриловой кислоты, особенно поперечно сшитые полиалкениловыми эфирами Сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны под названием "карбомеры" (Европейская фармакопея, *Pharmeuropa*, vol. 8, no. 2, June 1996). Специалист в данной области техники может также обратиться к патенту США № 2909462, в котором предлагаются такие акриловые полимеры, поперечно сшитые полигидроксильным соединением по меньшей мере с тремя гидроксильными группами; предпочтительно, чтобы было не более восьми таких групп, причем атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных групп замещены ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по меньшей мере два атома углерода. Предпочтительны такие радикалы, которые содержат 2-4 атома углерода, например винилы, аллилы и другие ненасыщенные по этилену группы. Ненасыщенные радикалы могут также содержать другие заместители, например метил. Особенно подходят продукты, имеющиеся в продаже под названием "карбопол" (BF Goodrich, Огайо, США), в которых поперечные сшивки образованы аллилсахарозой или аллипентаэритритолом. В их числе упомянем карбополы 974Р, 934Р и 971Р.

Что касается сополимеров малеинового ангидрида и алкенильных производных, то предпочтителен ЕМА (Monsanto), который является неразветвленным или поперечно сшитым сополимером этилена и малеинового ангидрида, например с поперечными сшивками дивиниловым эфиром. Сошлемся также на работу J. Fields et al., 1960.

Со структурной точки зрения в полимерах акриловой или метакриловой кислот и ЕМА основной единицей является предпочтительно следующая:



где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, которые могут быть одинаковыми или же различными, представляют H или CH<sub>3</sub>;

x = 0 или 1, предпочтительно x = 1;

y = 1 или 2, причем x + y = 2.

В случае ЕМА x = 0 и y = 2, а в случае карбомеров x = y = 1.

Эти полимеры растворимы в воде или в физиологическом солевом растворе (20 г/л NaCl), и можно довести pH такого раствора до 7,3-7,4, например, с помощью едкого натра (NaOH); в результате получится адъювантный раствор, в который можно включить экспрессионный вектор (векторы). Концентрация полимера в конечной иммунологической или вакцинной композиции может варьировать от около 0,01 до около 1,5% (мас./об.), от около 0,05 до около 1% (мас./об.) и от около 0,1 до около 0,4% (мас./об.).

Цитокины, которые можно использовать по данному изобретению, включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF), колониестимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF), интерферон α (IFNα), интерферон β (IFNβ), интерферон γ (IFNγ), интерлейкин-1α (IL-1α), интерлейкин-1β (IL-1β), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-5 (IL-5), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-11 (IL-11), интерлейкин-12 (IL-12), фактор некроза опухолей α (TNFα), фактор некроза опухолей β (TNFβ) и трансформирующий фактор роста β (TGFβ). Ясно, что эти цитокины можно вводить пациенту вместе и/или последовательно с иммунологической или вакцинной композицией по данному изобретению. Так, например, вакцина по данному изобретению может также содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая экспрессируется *in vivo* с образованием подходящего цитокина, например цитокина, подходящего для данного организма-хозяина, который подлежит вакцинации или в котором должна быть вызвана иммунологическая реакция (например, собачий цитокин в случае препаратов, которые предназначены для введения собакам).

Далее данное изобретение описывается с помощью следующих примеров, не имеющих ограничительного характера.

### Примеры

Пример 1. Конструирование рекомбинантного вектора vCP3006, обеспечивающего экспрессию четырех копий гликопротеина вируса бешенства.

Был получен рекомбинантный вирус ALVAC, в котором синтетический ген полипептида G вируса бешенства G встроен в локусы C3 (2 копии) vCP65a, несущего природный ген полипептида G вируса бешенства в локусах C5 (2 копии).

Краткое изложение.

Синтетическую кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую гликопротеин G вируса бешенства (SEQ ID NO:1), внедрили в локусы C3 исходного поксвируса канареек (ALVAC CP65a), как полностью описано в патенте США № 5843456 (Virogenetics), с титром  $6,1 \times 10^7$  БОЕ/мл, ресуспендированного в 1 мл буферного раствора Tris с pH 9. Исходный ALVAC, который использовали для получения CP65a, был депонирован 14 ноября 1996 г. согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры с Американской коллекцией типовых культур (ATCC), под регистрационным номером VR-2547. Таким образом специалист в данной области техники сможет получить и использовать CP65a по патенту США № 5843456 или его подходящий/функциональный заменитель. Аминокислотная последовательность, кодируемая кодон-оптимизированным геном гликопротеина G вируса бешенства, была на 100% идентична последовательности GenBank ACR15154.1 (SEQ ID NO:1). Донорная плазмида содержала синтетический ген полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO:5) и промотор I3L (SEQ ID NO:4) в локусах C3 плазмиды (p397-синтетический ген полипептида G вируса бешенства, фиг. 1). Донорную плазмиду получали, взяв ПЦР-фрагмент длиной ~1,6 т.п.н., полученный с рестриктазами XhoI-XmaI, синтетического гена полипептида G вируса бешенства, с промотором I3L и клонировав его в pHM606.1 (pC3), что дало p397-синтетический ген полипептида G вируса бешенства (pC3 I3Lp синтетический ген полипептида G вируса бешенства G, фиг. 1). Рекомбинацию *in vitro* проводили с использованием первичных куриных фибробластов (1° CEF).

Получение рекомбинантного вектора vCP3006.

Чтобы инициировать рекомбинацию *in vitro* (IVR), вначале клетки 1° CEF трансфицировали 20 мкг расщепленной рестриктазой Not I плазмиды p397- синтетический ген полипептида G вируса бешенства, используя реагент FuGENE-6® (Roche). Трансфицированные клетки затем заражали ALVAC CP65a при MOI=10 (инфекционных частиц на клетку). Через 24 ч собирали трансфицированные зараженные клетки, обрабатывали ультразвуком и проверяли их на наличие рекомбинантного вируса по образованию бляшек с помощью гибридизации на фильтрах, используя зонд I3L (140 пар нуклеотидов), меченный с помощью набора с биотином North2South Biotin Random Prime Labeling Kit (Thermo Scientific#17075), для детекции использовали набор для хемилюминисцентного определения North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit (Thermo Scientific#17097). После пяти последовательных циклов очистки методом бляшек получали рекомбинантный vCP3066.4.1.3.1.1.3. На шестом цикле очистки отбирали отдельную бляшку и получали из нее пулы P1 (1 флакон T25), P2 (1 лунка в 6-луночном планшете), P3 (1 лунка в 6-луночном планшете), P4 (1 флакон T75) и P5. Собирали зараженные клетки из вращающихся флаконов P5 и концентрировали для получения vCP3006. Схема получения vCP3006 представлена на фиг. 2.

Анализ vCP3006.

Для проверки генетической чистоты брали P5 и для гибридизации использовали зонды на синтетический ген полипептида G вируса бешенства и сайт C3. Для гибридизации по Саузерну из vCP3006 P5 выделяли геномную ДНК, расщепляли ферментами XbaI, HindIII и BamHI и разделяли путем электрофореза в агарозе. Расщепленную геномную ДНК переносили на нейлоновую мембрану и проводили Саузерн-блоттинг с использованием зонда, специфичного к синтетическому гену полипептида G вируса бешенства. Для амплификации зонда, специфичного к синтетическому гену полипептида G вируса бешенства, использовали праймеры RabG. IF (SEQ ID NO:52) и RabG. IR (SEQ ID NO:53).

Вестерн-блоттинг.

Первичные клетки CEF заражали из пула P5 при MOI=4,5 и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Для сравнения уровней экспрессии гликопротеина G клетки также заражали исходным vCP65a при том же количестве инфекционных частиц на клетку. Затем собирали клетки и культуральный супернатант. Образцы белка разделяли путем электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (10% SDS-PAGE) и переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану. Эту мембрану инкубировали с моноклональными мышинными антителами против гликопротеина G вируса бешенства (Chemicon #MAB8727) в разведении 1:500, а затем - с антимышинными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой.

Анализ последовательности.

Более подробное исследование геномной ДНК из пула P5 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования плечей (левое - L, правое - R) локуса C3 и вставленного синтетического гена гликопротеина G вируса бешенства. Для амплификации целого фрагмента C3L- синтетический ген полипептида G вируса бешенства -C3R (SEQ ID NO:2) использовали праймеры C3R.3F (SEQ ID NO:44) и C3L.1R (SEQ

ID NO:47), расположенные в плечах локуса C3 в геноме ALVAC; затем для секвенирования этого фрагмента были использованы праймеры, представленные на фиг. 37.

Результаты.

Гомогенность пула P5 vCP3006 подтверждалась гибридизацией - на 100% положительной для синтетического гена гликопротеина G вируса бешенства и на 100% отрицательной для сайта C3. Титр vCP3006 из пула P5 составлял  $1,88 \times 10^9$  БОЕ/мл. Целостность рекомбинантного vCP3006 проверяли путем Саузерн-блоттинга после гель-электрофоретического разделения расщепленной рестриктазами геномной ДНК (фиг. 3). Анализ путем Саузерн-блоттинга с использованием зонда, специфичного к синтетическому гену гликопротеина G вируса бешенства, выявил полосы с ожидаемыми размерами: 14322 п.н. и 5248 п.н. (BamHI), 17367 п.н. (HindIII) и 6293 п.н. (XbaI); см. фиг. 4), что демонстрировало правильное встраивание синтетического гена гликопротеина G вируса бешенства в локусы C3. Две полосы на дорожке 5 (фиг. 4) тоже подтверждают встраивание синтетического гена гликопротеина G вируса бешенства в оба сайта C3 (14322 п.н. - левый сайт C3, 5248 п.н. - правый сайт C3).

Для исследования экспрессии гликопротеина G вируса бешенства первичные клетки CEF заражали из пула P5 vCP3006 или vCP65a при MOI=4,5. Зараженные клетки и супернатанты соответствующим образом обрабатывали и проводили вестерн-блоттинг. Как видно из фиг. 5, гликопротеин G вируса бешенства выявлялся в осадке зараженных клеток, но не в образцах супернатанта; это позволяет полагать, что ген G не включается в вирионы ALVAC на детектируемом уровне (фиг. 5, слева). Поскольку моноклональные антитела против вируса бешенства узнают гликопротеин G, кодируемый как природным, так и кодон-оптимизированным геном в vCP3006, была предпринята попытка сравнить количество гликопротеина G, экспрессируемого vCP65a, с таковым в случае vCP3006. Для этого клетки заражали при таком же MOI, и различные количества тотальных клеточных лизатов подвергали вестерн-блоттингу (фиг. 5, справа). При сравнении соответствующих дорожек, нагруженных 2 мкл клеточного лизата, видно, что в случае vCP3006 полоса G более выражена, чем в случае vCP65a. Из этого следует, что в случае vCP3006 уровень экспрессии гликопротеина G выше, чем в случае vCP65a. Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса C3 и вставленный синтетический ген гликопротеина G вируса бешенства, использовали праймеры, показанные на фиг. 6 (полное описание праймеров представлено на фиг. 37). Анализ последовательности показал, что последовательности синтетического гена гликопротеина G вируса бешенства и областей C3L и C3R соответствовали ожидаемому (фиг. 7) и весь фрагмент C3L - C3R имел последовательность, представленную SEQ ID NO:2. Предсказанная аминокислотная последовательность продукта синтетического гена гликопротеина G вируса бешенства представлена на фиг. 8 (SEQ ID NO:1); она идентична последовательности белка дикого типа.

Пример 2. Конструирование рекомбинантного вектора vCP3015, обеспечивающего совместную экспрессию гликопротеина вируса бешенства и OX<sub>40</sub>L.

Краткое изложение.

Был получен и охарактеризован рекомбинантный ALVAC, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая собачий лиганд OX<sub>40</sub> (сOX<sub>40</sub>L), встроена в локус C6 (одна копия) vCP65a, несущего природный ген полипептида G вируса бешенства в локусах C5 (2 копии). Синтетическую кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую собачий лиганд OX<sub>40</sub> (сOX<sub>40</sub>L, подобный белку 4 из надсемейства лигандов фактора некроза опухолей) внедрили в локус C6 исходного вируса ALVAC CP65a (титр  $6,1 \times 10^7$  БОЕ/мл, ресуспендированный в 1 мл буферного раствора Tris с pH 9). Донорная плазмида p397-cOX<sub>40</sub>L (pC6 42 Kp cOX<sub>40</sub>L) -синтетический полинуклеотид, кодирующий сOX<sub>40</sub>L, с промотором 42K в локусе C6 -была получена исходя из фрагмента синтетической нуклеотидной последовательности, кодирующей собачий OX<sub>40</sub>L, длиной ~0,6 т.п.н., полученного с рестриктазами EcoRI-XmaI с промотором 42K, путем клонирования в pC6L (фиг. 9). Рекомбинацию in vitro проводили с использованием первичных клеток 1° CEF, как описано в примере 1. Скрининг бляшек проводили в основном так же, как описано в примере 1, используя зонд длиной 551 п.н., специфичный к сOX<sub>40</sub>L. После четырех последовательных циклов очистки методом бляшек получали рекомбинантный продукт, обозначенный vCP3015.9.2.1.2. На четвертом цикле очистки отбирали отдельные бляшки и получали из них пулы P1 (флакон T25), P2 (флакон T75) и P3 (4 вращающихся флакона) vCP3015.9.2.1.2. Собирали P3, осаждали зараженные клетки CEF, супернатант отбрасывали. Зараженные клетки CEF ресуспендировали в буферном растворе Tris 1 мМ (pH 9,0), обрабатывали ультразвуком и концентрировали для получения vCP3015. Схема получения vCP3015 представлена на фиг. 10.

Анализ vCP3015.

Выделяли геномную ДНК из P3 vCP3015, расщепляли ферментом NruI и проводили в двух повторях электрофорез в 0,8%-ном агарозном геле. Расщепленную NruI геномную ДНК переносили на нейлоновую мембрану и проводили Саузерн-блоттинг, в основном, как описано в примере 1, с использованием зонда на OX<sub>40</sub>L либо зонда на природный ген гликопротеина G вируса бешенства. Для амплификации зонда на OX<sub>40</sub>L использовали праймеры OX<sub>40</sub>L.1F (SEQ ID NO:61) и OX<sub>40</sub>L.1R (SEQ ID NO:62). Для амплификации зонда на природный ген гликопротеина G вируса бешенства использовали праймеры CP65.2R (SEQ ID NO:39) и C5R.3F (SEQ ID NO:30).

Вестерн-блоттинг.

Первичные клетки CEF заражали из пула P3 vCP3015 при MOI=10 и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Затем собирали клетки и культуральный супернатант. Образцы белка разделяли путем электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (10% SDS-PAGE) и переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану, которую подвергали воздействию моноклональных антител против гликопротеина G вируса бешенства (Chemicon #MAB8727) в разведении 1:500, а затем - антимышиных антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой.

Анализ последовательности.

В случае природного гена полипептида G вируса бешенства в сайте C5 подробное исследование геномной ДНК P3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования локуса C5, содержащего вставленный природный ген гликопротеина G вируса бешенства. Для амплификации целого фрагмента C5R-природный ген полипептида G вируса бешенства-C5L использовали праймеры 7635CXL.R (SEQ ID NO:35) и 7635CXL.F (SEQ ID NO:36), расположенные на концах плечей локуса C5. Затем для секвенирования этого фрагмента были использованы праймеры, представленные на фиг. 37. В случае cOX<sub>40</sub>L в локусе C6 подробное исследование геномной ДНК P3 проводили путем амплификации (ПНР) и секвенирования локуса C6, содержащего вставленную нуклеотидную последовательность, кодирующую OX<sub>40</sub>L. Для амплификации целого фрагмента C6R-cOX<sub>40</sub>L-C6L были использованы праймеры C6R.1F (SEQ ID NO:57) и C6L.1R (SEQ ID NO:60), расположенные на концах плечей локуса C6. Для секвенирования этого фрагмента были использованы праймеры, представленные на фиг. 37.

Результаты.

Гомогенность пула P3 vCP3015 подтверждалась гибридизацией - на 100% положительной для вставки cOX<sub>40</sub>L и на 100% отрицательной для сайта C6 без вставки. Титр vCP3015 из P3 составлял  $8,5 \times 10^9$  БОЕ/мл. Целостность рекомбинантного vCP3015 проверяли также путем Саузерн-блоттинга. В случае cOX<sub>40</sub>L зонд выявлял фрагмент длиной 151858 п.н. (фиг. 11); в случае природного гена полипептида G вируса бешенства зонд выявлял фрагмент длиной 72175 п.н. для левого сайта C5, фрагмент длиной 23014 п.н. для правого сайта C5 и фрагмент длиной 806 п.н. для обоих сайтов C5 (фиг. 12).

Для исследования экспрессии природного гена гликопротеина G вируса бешенства первичные клетки CEF заражали vCP3015 из пула P3 при MOI=10. Зараженные клетки и супернатанты соответствующим образом обрабатывали и проводили вестерн-блоттинг. Как видно из фиг. 13, гликопротеин G вируса бешенства выявлялся в осадке зараженных клеток соответственно ожидаемым размерам, а в образцах супернатанта его не было. Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса C6 и вставку cOX<sub>40</sub>L, использовали праймеры, показанные на фиг. 14. Анализ последовательности показал, что последовательности, кодирующие cOX<sub>40</sub>L, и области C6L and C6R соответствовали ожидаемому (фиг. 15). Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса C5 и вставленный природный ген полипептида G вируса бешенства, использовали праймеры, показанные на фиг. 17. Установленная в результате последовательность показана на фиг. 18 (SEQ ID NO:13).

Пример 3. Конструирование рекомбинантного вектора vCP3015, обеспечивающего совместную экспрессию природного гена гликопротеина G вируса бешенства, кодон-оптимизированного гена гликопротеина G вируса бешенства и OX<sub>40</sub>L.

Краткое изложение.

Был получен и охарактеризован рекомбинантный ALVAC, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая собачий лиганд OX40 (cOX<sub>40</sub>L), вставлена в локус C6 (одна копия) vCP3006, несущего природный ген полипептида G вируса бешенства в локусах C5 (две копии) и кодон-оптимизированный ген полипептида G вируса бешенства в локусах C3 (две копии). Кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая собачий OX<sub>40</sub>L, (с промотором 42K перед ней) была вставлена в локус C6 исходного вируса ALVAC vCP3006 из пула P5 (титр  $1,88 \times 10^9$  БОЕ/мл). Донорная плазмида 397-cOX<sub>40</sub>L (pC6 42 Kp cOX<sub>40</sub>L) была такой же, какая использовалась в примере 2 (фиг. 9) при рекомбинации *in vitro*.

Скрининг бляшек проводили в основном так же, как описано в примере 1, используя зонд длиной 551 п.н., специфичный к cOX<sub>40</sub>L. После четырех последовательных циклов очистки методом бляшек получали рекомбинантный продукт, обозначенный vCP3012.9.2.1.3. На последнем цикле очистки отбирали отдельные бляшки и получали из них пулы P1 (6-луночный планшет), P2 (флакон Т75) и P3 (вращающийся флакон) для амплификации vCP3012.9.2.1.3. Собирали зараженные клетки и культуральный супернатант из вращающихся флаконов; получали осадок, супернатант отбрасывали. Осадок обрабатывали ультразвуком и концентрировали для получения VCP3012.

Анализ vCP3012.

Выделяли геномную ДНК из vCP3015 (P3), расщепляли ферментами PmeI, NruI и BamHI и разделяли путем электрофореза в агарозе. Расщепленную геномную ДНК переносили на нейлоновую мембрану и проводили Саузерн-блоттинг в основном, как описано в примере 1, с использованием зондов на cOX<sub>40</sub>L, на синтетический ген гликопротеина G вируса бешенства и на природный ген гликопротеина G вируса бешенства. Для амплификации зонда на cOX<sub>40</sub>L, использовали праймеры OX<sub>40</sub>L.1F (SEQ ID NO:61) и OX<sub>40</sub>L.1R (SEQ ID NO:62); для амплификации зонда на природный ген гликопротеина G вируса

бешенства использовали праймеры CP65.2R (SEQ ID NO:39) и C5R.3F (SEQ ID NO:30); для амплификации зонда на синтетический ген гликопротеина G вируса бешенства использовали праймеры RabG. 1R (SEQ ID NO:53) и RabG IF (SEQ ID NO:52)

#### Вестерн-блоттинг.

Первичные клетки CEF заражали vCP3012 из пула P3 при МОГ=10 и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Затем собирали клетки и культуральный супернатант. Образцы белка разделяли путем электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (10% SDS-PAGE) и переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану, которую инкубировали с моноклональными антителами против гликопротеина G вируса бешенства (Chemicon #MAB8727) в разведении 1:500, а затем - с антимышиными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой.

#### Анализ последовательности.

В случае cOX<sub>40</sub>L в локусе C6 исследование геномной ДНК из пула P3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования локуса C6, содержащего вставку cOX<sub>40</sub>L. Для амплификации целого фрагмента C6R-cOX<sub>40</sub>L-C6L использовали праймеры C6R.1F (SEQ ID NO:57) и C6L.1R (SEQ ID NO:60), расположенные на концах плечей локуса C6. Затем для секвенирования этого фрагмента были использованы праймеры, представленные на фиг. 37. В случае синтетического гена полипептида G вируса бешенства исследование геномной ДНК из пула P3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования плечей локуса C3 и вставленного синтетического гена полипептида G вируса бешенства. Для амплификации целого фрагмента C3R-вставленный синтетический ген полипептида G вируса бешенства-C3B были использованы праймеры C3R2F (SEQ ID NO:43) и C3L.1R (SEQ ID NO:47), расположенные в плечах локуса C6. В случае природного гена полипептида G вируса бешенства исследование геномной ДНК из пула P3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования локуса C5, содержащего вставленный природный ген полипептида G вируса бешенства. Для амплификации целого фрагмента CSR-природный ген полипептида G вируса бешенства -C5L были использованы праймеры 7635CXL.R (SEQ ID NO:35) и 7635CXL.F (SEQ ID NO:36), расположенные на концах плечей локуса C5. Для секвенирования этого фрагмента были использованы праймеры, представленные на фиг. 37.

#### Результаты.

Гомогенность пула P3 vCP3012 подтверждалась гибридизацией - на 100% положительной для вставки cOX<sub>40</sub>L и на 100% отрицательной для сайта C6 без вставки. Титр вируса vCP3012 из пула P3 составлял  $4 \times 10^9$  БОЕ/мл. Целостность рекомбинантного vCP3012 проверяли также путем Саузерн-блоттинга. В случае cOX<sub>40</sub>L выявлялся фрагмент длиной 200362 п.н. (фиг. 21); в случае синтетического гена полипептида G вируса бешенства выявлялся фрагмент длиной 14 322 п.н. для левого сайта C3 и фрагмент длиной 5248 п.н. для правого сайта C5 (фиг. 22); в случае природного гена полипептида G вируса бешенства выявлялся фрагмент длиной 806 п.н. для обоих сайтов, 72436 п.н. - для левого сайта C5 и 23275 п.н. - для правого сайта C5 (фиг. 23). Эти ожидаемые размеры свидетельствуют о правильном встраивании последовательности, кодирующей cOX<sub>40</sub>L, в локус C6, синтетического гена полипептида G вируса бешенства - в локус C3 и природного гена полипептида G вируса бешенства - в локус C5.

Для исследования экспрессии синтетического и природного генов гликопротеина G вируса бешенства первичные клетки CEF заражали vCP3012 из пула P3 при МОИ=10. Зараженные клетки и супернатанты соответствующим образом обрабатывали и проводили вестерн-блоттинг. Как видно из фиг. 24, гликопротеин G вируса бешенства выявлялся в осадке зараженных клеток соответственно ожидаемым размерам

Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса C6 и вставку cOX<sub>40</sub>L, использовали праймеры, показанные на фиг. 25. Анализ последовательности показал, что последовательности, кодирующие cOX<sub>40</sub>L, и области C6L и C6R соответствовали ожидаемому (фиг. 26). Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса C3 и вставленный синтетический ген полипептида G вируса бешенства, использовали праймеры, показанные на фиг. 27. Установленная в результате последовательность показана на фиг. 28 (SEQ ID NO:20). Секвенирование показало, что последовательности вставленного синтетического гена полипептида G вируса бешенства и последовательности C3 слева и справа от вставленного синтетического гена полипептида G вируса бешенства в vCP3012 соответствовали ожидаемому. Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса C5 и вставленный природный ген полипептида G вируса бешенства, использовали праймеры, показанные на фиг. 29. Установленная в результате последовательность показана на фиг. 30. (SEQ ID NO:23). Секвенирование показало, что последовательности вставленного природного гена полипептида G вируса бешенства и последовательности C5 слева и справа от вставленного природного гена полипептида G вируса бешенства в vCP3012 соответствовали ожидаемому.

Пример 4. Оценка эффективности трех новых рекомбинантных вакцин на основе поксвируса канареек по сравнению с vCP65A путем вакцинации и серологического исследования на собаках.

Для этого исследования подопытных животных случайным образом разделили на пять групп (по 6 особей в каждой) с учетом идентификационного номера помета. Собак разделили по признаку пола и особей из групп, получавших разные вакцины, случайным образом распределили по загонам, так что в одном загоне оказались животные из разных групп. До момента заражения особей контрольной группы

держали отдельно от вакцинируемых животных. Для получения рандомизационной таблицы использовали программное обеспечение SAS ® V9.1 Enterprise Guide. Собакам вводили вакцины в день 0 (табл. 1). В дни 0, 7, 14, 21, 28, 48, 70 и 90 у животных брали образцы крови и определяли титр антител против бешенства методом RFFIT.

Таблица 1

Группы подопытных животных					
Группа	Вакцина	Доза (TCID <sub>50</sub> /мл)	Путь однократного введения	Объем	Число особей в группе
A	Испытываемая вакцина #1 vCP3006	10 <sup>5,9</sup>	Подкожно	1 мл	6
B	Испытываемая вакцина #2 vCP3012	10 <sup>5,9</sup>	Подкожно	1 мл	6
C	Испытываемая вакцина #3 vCP3015	10 <sup>5,9</sup>	Подкожно	1 мл	6
D	Контрольная вакцина vCP65A	10 <sup>5,9</sup>	Подкожно	1 мл	6
E (отрицательный контроль)	-	-	-	-	6

Для каждой группы собак (A, B, C и D) и для каждого дня эксперимента рассчитывали среднее геометрическое титра антител, определенного методом RFFIT, и 95%-ный доверительный интервал. Максимальное количество антител должно было наблюдаться в день 21. Результаты представлены в табл. 2. В день 14 у собак, получивших вакцину vCP3012, отмечался заметно более высокий титр антител против бешенства, чем у животных других групп. В день 21 у животных тех двух групп, для которых вакцина включала вектор на основе поксвируса канареек, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую cOX<sub>40</sub>L, наблюдалась более выраженная реакция нейтрализации, чем у собак из других вакцинируемых групп. Таким образом, более раннее начало иммунной защиты и более высокий максимальный титр антител имели место у собак, получавших вакцину с вектором, обеспечивающим экспрессию cOX<sub>40</sub>L. После 21 дня и вплоть до конца эксперимента у особей, получивших вакцину vCP3012, были заметно более высокие значения титра антител против бешенства, чем у животных других групп. На 90 день у всех собак, получивших вакцину vCP3012, значения титра антител были выше 0,5 МЕ/мл - такой уровень в исследованиях вирулентности возбудителя бешенства обычно считается защитным. Таким образом, экспрессия cOX<sub>40</sub>L увеличивает продолжительность иммунной защиты, создаваемой вакциной против бешенства, содержащей вектор на основе поксвируса канареек.

#### Выводы.

По сравнению с исходной вакциной vCP65a (в табл. 2 - Ref vCP65A) добавление экспрессии cOX<sub>40</sub>L в случае как vCP65a, так и vCP3006 явно усиливает развитие иммунной защиты от бешенства, судя по результатам определения нейтрализующих антител против вируса бешенства; повышает максимальное значение титра нейтрализующих антител против вируса бешенства; увеличивает продолжительность иммунной защиты против бешенства по меньшей мере до 90 дня после вакцинации (в 90 день у подопытных собак брали кровь в последний раз).

Таблица 2  
Среднее геометрическое титра антител (GMT) и  
95%-ный доверительный интервал (95% CI)

День после вакцинации	Группа	GMT	Нижний 95% CI	Верхний 95% CI
7	#1 vCP3006	0,57	0,30	1,08
	#2 vCP3012	0,61	0,34	1,10
	#3 vCP3015	0,47	0,23	0,95
	Ref vCP65A	0,41	0,22	0,76
14	#1 vCP3006	0,78	0,29	2,08
	#2 vCP3012	3,36	1,71	6,63
	#3 vCP3015	0,98	0,39	2,43
	Ref vCP65A	0,54	0,27	1,08
21	#1 vCP3006	0,68	0,36	1,30
	#2 vCP3012	4,84	3,53	6,64
	#3 vCP3015	1,97	0,76	5,10
	Ref vCP65A	0,92	0,29	2,96
28	#1 vCP3006	0,66	0,34	1,29
	#2 vCP3012	3,06	1,61	5,82
	#3 vCP3015	1,63	0,85	3,10
	Ref vCP65A	1,15	0,36	3,65
48	#1 vCP3006	0,55	0,32	0,95
	#2 vCP3012	1,81	0,77	4,25
	#3 vCP3015	1,06	0,60	1,90
	Ref vCP65A	0,35	0,16	0,73
День после вакцинации	Группа	GMT	Нижний 95% CI	Верхний 95% CI
70	#1 vCP3006	0,39	0,19	0,78
	#2 vCP3012	1,16	0,66	2,03
	#3 vCP3015	0,58	0,37	0,89
	Ref vCP65A	0,26	0,13	0,49
90	#1 vCP3006	0,40	0,21	0,76
	#2 vCP3012	0,96	0,54	1,70
	#3 vCP3015	0,48	0,28	0,82
	Ref vCP65A	0,25	0,14	0,42

Пример 5. Определение иммуногенности трех новых рекомбинантных вакцин на основе поксвируса канареек путем заражения собак.

Тридцать собак породы "бигль", разводимых специально для медико-биологических исследований, в возрасте 2-3 месяцев случайным образом разделили на пять групп по 6 особей в каждой, используя идентификационный номер помета как первичный показатель для рандомизации. В день 0 все особи получали вакцину, как представлено в табл. 3.

Таблица 3

Схема вакцинации					
Группы	Вакцина*	Результаты обратного титрования (TCID <sub>50</sub> /мл)	Вводимое TCID <sub>50</sub>	Объем, мл	Число особей в группе
A	Испытуемая вакцина #1 vCP3006	10 <sup>6,16</sup>	10 <sup>6,16</sup>	1	6
B	Испытуемая вакцина #2 vCP3012	10 <sup>6,54</sup>	10 <sup>6,22</sup>	0,7	6
C	Испытуемая вакцина #3 vCP3015	10 <sup>6,08</sup>	10 <sup>5,87</sup>	1	6
D	Контрольная вакцина vCP65A	10 <sup>6,12</sup>	10 <sup>6,07</sup>	1	6
E (отрицательный контроль)	-	-	-	-	6

\* Вводимое количество вакцины (титр) 10<sup>5-9</sup> TCID<sub>50</sub>/мл.

После вакцинации животных наблюдали непрерывно в течение 1 ч, чтобы отметить острые системные реакции. Затем на протяжении трех суток ежедневно осматривали место инъекции и измеряли температуру тела (ректально). Перед вакцинацией и затем через равные промежутки времени брали кровь и определяли титр антител против бешенства путем быстрого теста на ингибирование флуоресценции (RFFIT). Собак группы C (vCP3015), у которых серологические показатели были благоприятными, приблизительно через год после вакцинации (день 397) заражали бешенством. Инфекционный агент (штамм New York I 42.90 в разведении 1:100) вводили внутримышечно под анестезией в левую и правую лобные мышцы (по 0,5 мл). Проводили обратное титрование инфекционного материала в соответствии с QCD-CM-030. После заражения животных наблюдали в течение 30 суток, отмечая случаи смерти и развития неврологических симптомов. У всех особей тотчас после умерщвления брали сыворотку для исследования методом RFFIT. При аутопсии брали оба полушария мозга и в правом полушарии определяли вирус

бешенства путем прямой иммунофлуоресценции.

Для статистического анализа использовали программное обеспечение SAS, Cary, NC (SAS Version 9.1, Enterprise Guide). Все критерии были двусторонние; порог статистической значимости брали  $P=0,05$  или меньше. Первичной переменной служила величина титра антител против бешенства в сыворотке крови, определенная методом RFFIT. Сероконверсию полагали как изменение титра антител с отрицательного (ниже предела измерения, то есть  $< 0,2$  МЕ/мл) на положительный ( $> 0,2$  МЕ/мл). До вакцинации все подопытные животные были серонегативными, за исключением одной особи в группе А (vCP3006), у которой обнаружился низкий титр антител против бешенства (0,3 МЕ/мл), а при повторном определении он составил 0,5 МЕ/мл. В группе Е (отрицательный контроль) у трех особей в течение 30 дней от начала эксперимента отмечался низкий титр антител против бешенства. К 48-му дню все собаки группы Е стали серонегативными и оставались такими на протяжении всего дальнейшего исследования. По всей вероятности наблюдавшиеся у некоторых собак низкие титры антител объяснялись наличием остаточных материнских антител. В табл. 4 представлены средние (в данной группе) геометрические величины титра антител против бешенства после вакцинации собак групп А, В, С и D.

Таблица 4

Среднее геометрическое титра антител (GMT) против бешенства в сыворотке крови у собак различных групп после вакцинации

Группа	День после вакцинации – титр антител (GMT) по данным RFFIT, МЕ/мл						
	7	14	21	28	48	70	90
А vCP3006	0,57	0,78	0,68	0,66	0,55	0,39	0,40*
В vCP3012	0,61	3,36*	4,84*	3,06*	1,81*	1,16*	0,96*
С vCP3015	0,47	0,98	1,97*	1,63	1,06*	0,58*	0,48*
Д vCP65А	0,41	0,54	0,92	1,15	0,35	0,26	0,25
Е (отрицательный контроль)	0,2	0,25	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20

\*GMT статистически значимо ( $p < 0,05$ ) и отлично от такового для контрольной вакцины (группа D vCP65A).

Через семь суток после вакцинации у всех особей группы В (vCP3012) и у пяти из шести собак групп А (vCP3006), С (vCP3015) и D (vCP65A) наблюдалась сероконверсия. С 14 по 90 день у животных, получивших vCP3012, по сравнению с собаками групп А (vCP3006) и D (контрольная вакцина vCP65A) отмечались значительно более высокие титры антител против бешенства. На 21, 48, 70 и 90 дни в группе С (vCP3015) значения GMT были гораздо выше, чем в группе D (контрольная вакцина vCP65A). У собак, получивших vCP3006, не отмечалось значительного отличия по титру антител против бешенства по сравнению с группой D (контрольная вакцина vCP65A), за исключением 90 дня.

Приблизительно через один год после вакцинации собак группы С (vCP3015) заразили бешенством. Оставшимся особям групп В и Е сохраняли текущий номер исследования вплоть до его окончания позже. Рассчитанная 50%-ная летальная доза инфекционного агента для мышей (MLD<sub>50</sub>) составляла 2,2 log<sub>10</sub> (158,5 MLD<sub>50</sub>) в объеме 0,03 мл. Каждой собаке вводили 1 мл, соответственно доза составляла 3,96 log<sub>10</sub> MLD<sub>50</sub>. В приведенной ниже табл. 5 представлены результаты определения титра антител против бешенства до и после заражения по данным, полученным методом RFFIT, и после заражения - методом иммунофлуоресценции; показаны также данные по заболеваемости/смертности.

Таблица 5

## Результаты

Группа	Идентификационный номер	Серологические показатели по данным RFFIT (МЕ/мл)*		Результат иммунофлуоресценции	Заболеваемость/смертность **
		До заражения (392-й день после вакцинации)	После заражения (день умерщвления)		
С (vCP3015)	CCECAC	$\leq 0,2$	0,9	Отрицательный	30
	CCECAN	$\leq 0,2$	0,7	Отрицательный	30
	CCECAV	0,2	5,8	Отрицательный	30
	CCECCY	0,2	1,1	Отрицательный	30
	CCECEP	0,8	3,4	Отрицательный	30
	CCECFE	0,2	1,8	Отрицательный	30
Отрицательный контроль из исследования № 10-074	CBVCTX	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	Положительный	13
	CBDCCE	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	Положительный	17
	CBDCCY	$\leq 0,2$	0,4	Положительный	12

\*У всех собак, умерщвленных ранее 30 дня после заражения, были клинические признаки инфекции бешенства.

\*\*CBVCTX, CBDCCE и CBDCCY - 752 день до заражения.

В группе С ни одна особь не имела клинических проявлений бешенства вплоть до 30 дня после заражения. В группе отрицательного контроля в период с 12 по 17 день после заражения у всех собак на-



блюдались клинические признаки заболевания, сравнимые с характерными для инфекции бешенства псовых: изменения в поведении, сонливость, слюнотечение, подергивание лицевых мышц, затрудненность глотания и паралич конечностей. Все особи, умерщвленные до 17 дня после заражения, были серопозитивными в отношении антител против бешенства по данным иммунофлуоресцентного анализа, а оставшиеся собаки, умерщвленные в конце исследования, были серонегативными по данным иммунофлуоресцентного анализа ткани мозга. После вакцинации не отмечалось ни местных постинъекционных реакций (диффузного отека, плотного отека, болезненности при пальпации или нагноения в месте укола), ни клинически значимого повышения температуры тела (измеряемой ректально).

#### Обсуждение.

На основании данных по титру антител до вакцинации конечный объем каждого из испытывавшихся вакцинных препаратов брали таким, чтобы достичь титра приблизительно  $10^{5,9}$  TCID<sub>50</sub>/мл. При вакцинации препаратом vCP3012 (группа В), имевшим более высокий титр антител до вакцинации по сравнению с другими испытывавшимися вакцинами, вводили меньший объем. Для заражения бешенством через 1-2 года после вакцинации животных отбирали на основании серологических показателей, а именно среднего геометрического титра антител на протяжении трех месяцев в сравнении с группой, получавшей контрольную вакцину (группа D vCP65A). Группа А (vCP3006) не отвечала критериям, необходимым для заражения, поэтому этих собак исключили из исследования на 151 день. Группы В и С явно соответствовали критериям для заражения. Животные, получившие vCP3015 либо vCP3012, проходили оценку иммунной защиты в течение одного года и двух лет соответственно. Выбор того, какую из испытывавшихся вакцин оценивать первой, базировался на серологических данных и на числе копий гена полипептида G вируса бешенства, нужных для конструирования вакцины. Поскольку для vCP3015 нужны две копии, а для vCP3012 - четыре, vCP3015 оценивали первой. В случае vCP3012 оценку иммунной защиты у вакцинированных собак проводили в течение двух лет и сравнивали с группой, получавшей контрольную вакцину (vCP65A).

Полученные результаты показывают, что конструкции vCP безопасны при однократном подкожном введении у собак. Животные, которым подкожно вводили одну дозу вакцинного препарата, содержащего две копии гена полипептида G вируса бешенства и иммуномодулирующий агент OX<sub>40</sub>L, (vCP3015) в количестве  $10^{5,87}$  TCID<sub>50</sub>/мл, обретали защиту от инфекции бешенства через год после вакцинации. Препарат vCP3012, содержащий четыре копии гена полипептида G вируса бешенства и иммуномодулирующий агент OX<sub>40</sub>L, вызывал более ранний и мощный антителый ответ против бешенства по сравнению со всеми другими конструкциями vCP, и оценку его эффективности путем заражения бешенством проводили через два года после вакцинации.

#### Пример 6. Другие эффективные комбинации антигена и OX<sub>40</sub>L.

Авторы данного изобретения полагают, что возможно множество других сочетаний антигена и OX<sub>40</sub>L, позволяющие создать вакцины на основе поксвирусных векторов, обладающие повышенной эффективностью по сравнению с поксвирусным вектором, обеспечивающим экспрессию только данного антигена. В табл. 3 представлены не имеющие ограничительного характера комбинации антигенов и OX<sub>40</sub>L, в которых OX<sub>40</sub>L выбран за его вероятную способность действовать в организме подлежащего вакцинации животного как эффективный генетический адъювант. На фиг. 38 представлено выравнивание известных и предполагаемых OX<sub>40</sub>L из различных видов животных. Специалист в данной области техники должен обратить внимание на то, что белки OX<sub>40</sub>L могут также несколько варьировать в пределах одного рода или вида животных (например, у *Canis familiaris*). Следовательно, белки OX<sub>40</sub>L, имеющие достаточную степень гомологии с SEQ ID NO:12, тоже должны действовать как эффективные генетические адъюванты у псовых; эти белки входят в объем данного изобретения. Кроме того, авторы данного изобретения полагают, что сходные результаты вполне вероятно получить с другими векторами, включая вирусные векторы, для экспрессии *in vivo* - в организме животного-хозяина - генов, кодирующих тот или иной антиген и OX<sub>40</sub>L, служащий адъювантом. Например, вирусные векторы включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) ДНК-содержащие вирусы, РНК-содержащие вирусы, герпесвирусы, аденовирусы и подобные им вирусы, вирусы, вызывающие лейкозы, вирус ньюкаслской болезни (NDV), вирус инфекционного бронхита (IBV), вирус инфекционного бурсита (IBDV), вирус болезни Марека (MDV), вирус герпеса кур (SB1), вирус герпеса индеек (HVT) и др.

Таблица 3

**Комбинации антигенов и OX<sub>40</sub>L, которые  
предположительно должны действовать как эффективные  
вакцинные композиции с генетическим адъювантом**

Антиген	Животные	OX <sub>40</sub> L
Грипп, чума (CDV), CPV, лихорадка Западного Нила, коронавирусы	Псовые	SEQ ID NO:12 или ее варианты со сравнимым адъювантным действием у псовых
Грипп, FCV, FeLV, FIPV, FIV, WNV и др.	Кошачьи	SEQ ID NO:63 или ее варианты со сравнимым адъювантным действием у кошачьих
Грипп, WNV, E/W вирусный энцефалит, EHV, герпес, везикулярный стоматит, инфекционная анемия, артериит, AHSV, вирус Хендра и др.	Лошадиные	SEQ ID NO:64 или ее варианты со сравнимым адъювантным действием у лошадиных
BRSV, BVD, герпес, плевропневмония, аденовирусы, парвовирусы, энтеровирусы, FMDV, BTV, PCV2, PRRSV, FMDV, BVD, инфекционный менингоэнцефалит, вирус Нипах и др.	Крупный рогатый скот	SEQ ID NO:65 или ее варианты со сравнимым адъювантным действием у крупного рогатого скота
MDV, SB1, HVT, NDV, IBDV, IBV	Свиньи	SEQ ID NO:66 или ее варианты со сравнимым адъювантным действием у свиней
BTV и др.	Птицы	SEQ ID NO:70 или ее варианты со сравнимым адъювантным действием у птиц
	Овцы	SEQ ID NO: 71

Ниже приводится пронумерованный перечень воплощений данного изобретения, не имеющих ограничительного характера.

1. Вакцина против бешенства животных, содержащая:

а) экспрессионный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий и экспрессирующий *in vivo* в животном-хозяине:

i) полипептид G вируса бешенства; и

ii) полипептид OX<sub>40</sub>L либо его вариант или фрагмент, которые способны усиливать иммунный ответ, вызванный гликопротеином G вируса бешенства, и которые происходят из того же вида, к которому принадлежит вакцинируемое животное; и

б) фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

2. Вакцина по п.1, в которой указанный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид OX<sub>40</sub>L псовых, кошачьих, лошадиных, крупного рогатого скота, нежвачных парнокопытных, птиц, овец или приматов.

3. Вакцина по п.2, в которой полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12 (для псовых), SEQ ID NO:63 (для кошачьих), SEQ ID NO:64 (для лошадиных), SEQ ID NO:65 (для крупного рогатого скота) или SEQ ID NO:66 (для нежвачных парнокопытных), SEQ ID NO:70 (для птиц), SEQ ID NO:71 (для овец) или SEQ ID NO:67 (для приматов).

4. Вакцина по п.1 или 3, в которой животное является представителем псовых или кошачьих.

5. Вакцина по п.3, в которой полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность SEQ ID NO:12 (для псовых), SEQ ID NO:63 (для кошачьих), SEQ ID NO:64 (для лошадиных), SEQ ID NO:65 (для крупного рогатого скота) или SEQ ID NO:66 (для нежвачных парнокопытных), SEQ ID NO:70 (для птиц), SEQ ID NO:71 (для овец) или SEQ ID NO:67 (для приматов).

6. Вакцина по п.1 или 3, в которой полипептид G вируса бешенства кодируется последовательностью SEQ ID NO:5.

7. Вакцина по п.1 или 3, в которой полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.

8. Вакцина по п.7, в которой полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность SEQ ID NO:12.

9. Вакцина по п.1 или 3, в которой экспрессионный вектор является рекомбинантным поксвирусным вектором.

10. Вакцина по п.9, в которой вектор является поксвирусом канареек.

11. Вакцина по п.10, в которой вектор содержит последовательность SEQ ID NO:23.

12. Вектор для использования в составе вакцины против бешенства животных, содержащий полинуклеотид, кодирующий и экспрессирующий *in vivo* в животном-хозяине:

(а) полипептид G вируса бешенства и

(б) полипептид OX<sub>40</sub>L либо его вариант или фрагмент, которые способны усиливать иммунный ответ, вызванный гликопротеином G вируса бешенства, и которые происходят из того же вида, к которому принадлежит вакцинируемое животное.

13. Вектор по п.12, в котором полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность, идентичную по мень-

шей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12 (для псовых), SEQ ID NO:63 (для кошачьих), SEQ ID NO:64 (для лошадиных), SEQ ID NO:65 (для крупного рогатого скота), SEQ ID NO:66 (для нежвачных парнокопытных) или SEQ ID NO:71 (для овец).

14. Вектор по п.13, в котором полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность SEQ ID NO:12 (для псовых), SEQ ID NO:63 (для кошачьих), SEQ ID NO:64 (для лошадиных), SEQ ID NO:65 (для крупного рогатого скота), SEQ ID NO:66 (для нежвачных парнокопытных) или SEQ ID NO:71 (для овец).

15. Вектор по п.14, где животное является представителем псовых или кошачьих.

16. Вектор по п.15, где животное является представителем псовых.

17. Вектор по п.13 или 14, в котором полипептид G вируса бешенства кодируется последовательностью SEQ ID NO:5.

18. Вектор по п.13 или 14, в котором полинуклеотид кодирует полипептид G вируса бешенства, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, и полипептид OX<sub>40</sub>L, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.

19. Вектор по п.13 или 14, являющийся поксвирусным.

20. Способ вакцинации животных против бешенства, включающий введение животному по меньшей мере одной дозы вакцины по любому из пп.1-11.

Подробно описав предпочтительные воплощения данного изобретения, отметим, что это изобретение, определенное изложенным выше, не ограничивается конкретными деталями, приведенными в представленном выше описании, поскольку возможно множество очевидных их вариантов без отклонения от сущности и объема данного изобретения.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МЕРИАЛ ЛИМИТЕД  
ТЕЗОМ, МЕБАТСЬОН  
ДЕЙВИД, ФРЕДЕРИК

<120> РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПОКСВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, КОДИРУЮЩИЕ И ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ  
ГЛИКОПРОТЕИН G  
ВИРУСА БЕШЕНСТВА И ПОЛИПЕПТИД OX<sub>40</sub>L, И ВАКЦИНЫ, СОЗДАННЫЕ НА ИХ ОСНОВЕ,  
ИСПОЛЗУЕМЫЕ В СПОСОБЕ ВАКЦИНАЦИИ ЖИВОТНЫХ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

<130> MER 12-190P

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 524  
<212> белок  
<213> Вирус бешенства

<400> 1

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu  
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro Asp Lys Leu Gly Pro  
20 25 30

Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys Pro Asn Asn Leu Val  
35 40 45

Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly Phe Ser Tyr Met Glu  
50 55 60

Leu Lys Val Gly Tyr Ile Leu Ala Ile Lys Met Asn Gly Phe Thr Cys

032389

65					70						75				80
Thr	Gly	Val	Val	Thr	Glu	Ala	Glu	Thr	Tyr	Thr	Asn	Phe	Val	Gly	Tyr
				85					90					95	
Val	Thr	Thr	Thr	Phe	Lys	Arg	Lys	His	Phe	Arg	Pro	Thr	Pro	Asp	Ala
			100					105					110		
Cys	Arg	Ala	Ala	Tyr	Asn	Trp	Lys	Met	Ala	Gly	Asp	Pro	Arg	Tyr	Glu
		115					120					125			
Glu	Ser	Leu	His	Asn	Pro	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Arg	Trp	Leu	Arg	Thr	Val
	130					135					140				
Lys	Thr	Thr	Lys	Glu	Ser	Leu	Val	Ile	Ile	Ser	Pro	Ser	Val	Ala	Asp
145					150					155					160
Leu	Asp	Pro	Tyr	Asp	Arg	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Val	Phe	Pro	Ser	Gly
				165					170					175	
Lys	Cys	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Tyr	Cys	Ser	Thr	Asn	His
			180					185						190	
Asp	Tyr	Thr	Ile	Trp	Met	Pro	Glu	Asn	Pro	Arg	Leu	Gly	Met	Ser	Cys
		195					200					205			
Asp	Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Ser	Glu
	210					215					220				
Thr	Cys	Gly	Phe	Val	Asp	Glu	Arg	Gly	Leu	Tyr	Lys	Ser	Leu	Lys	Gly
225					230					235					240
Ala	Cys	Lys	Leu	Lys	Leu	Cys	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Met	Asp
				245					250					255	
Gly	Thr	Trp	Val	Ala	Met	Gln	Thr	Ser	Asn	Glu	Thr	Lys	Trp	Cys	Pro
			260					265					270		
Pro	Asp	Gln	Leu	Val	Asn	Leu	His	Asp	Phe	Arg	Ser	Asp	Glu	Ile	Glu
		275					280					285			
His	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Arg	Glu	Glu	Cys	Leu	Asp
	290					295					300				
Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Met	Thr	Thr	Lys	Ser	Val	Ser	Phe	Arg	Arg	Leu
305					310					315					320

**032389**

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

Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His Tyr Lys Ser Val Arg  
340 345 350

Thr Trp Asn Glu Ile Leu Pro Ser Lys Gly Cys Leu Arg Val Gly Gly  
355 360 365

Arg Cys His Pro His Val Asn Gly Val Phe Phe Asn Gly Ile Ile Leu  
370 375 380

Gly Pro Asp Gly Asn Val Leu Ile Pro Glu Met Gln Ser Ser Leu Leu  
385 390 395 400

Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val Ile Pro Leu Val His  
405 410 415

Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Lys Asp Gly Asp Glu Ala Glu  
420 425 430

Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His Asn Gln Val Ser Gly  
435 440 445

Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr Val Leu Leu Ser Ala  
450 455 460

Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys  
465 470 475 480

Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr  
485 490 495

Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser  
500 505 510

Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu  
515 520

<210> 2

<211> 3609

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Подпоследовательность рекомбинантного vCP3006, охватывающая фланкирующие плечи С3, промотор I3L, а также синтетический G вируса бешенства

<400> 2

gctttatgaa gaggaggatt tttacatfff aaaatatcgg caccgtgttc tagtaataat	60
tttaccatfff ctatatcaga aatactttacg gctaaataca aagacgttga tagtatatfff	120
acgttattgt atttgcatfff ttttaagtata taccttacta aattttatatc tctatacctt	180
atagctttat gcagtttcatt tataagtctt ccattactca tttctggtaa tgaagtatta	240
tatatcatta tgatattatc tctatfffat tctaataaaa accgttatca tgttattfat	300
tatttgttat aattatacta ttttaataaat tataccaaat acttagatac ttattaatac	360
catcctagaa cttgtatfff ttgcccccta aacttggaca tgcactccat taggcgtfff	420
ttgttttcga catcgtctct cttaacatat cctactgtta tgtgaggatt ccacggatta	480
tctactgtga tatcaccaaa cactgctctt gaacagggtta ccgcattcag cagaacatfff	540
cttagggctc taagttcatc agatacctcc agtttcataa ctacagcgca tcttttgcct	600
cccaactggt tagaggcggt actctgagga aaacacatct cttctttaca gactatagaa	660
atagtctgta aatcttgatc agttatfff ttgttgaaat tttcaaactc atcacattga	720
tccatatttg ctattccaag agttatatga ggaaaaatat cacatcctgt catgtatfff	780
attgtaacat tattataatc tgtaacatca gtatctaacc taacgtcgta aaagttaaca	840
gatgcccagt tactataatc ccaaggaacc ttaacatcta atcccattaa aatagtatcc	900
tttctactat ttttttcatt ggcaagtatg tggttaggtt tacacaaaat tcttgccatt	960
ttgtaacgat agcgaagcaa tagcttgtat gctttttatt tgattaacta gtcataaaaa	1020
tcgggatccc tcgagatgag ataaagtga aatatatatc attatattac aaagtacaat	1080
tatttaggtt taatcatggt gccccaggcc ctgctgttctg tgccccctgct ggtgttcccc	1140
ctgtgcttctg gcaagttccc catctacacc atccccgaca agctggggccc ctggagcccc	1200
atcgacatcc accacctgag ctgccccaac aatctgggtg tgaggatga gggctgcacc	1260
aatctgagcg gcttcagcta catggagctg aaagtgggct acatcctggc catcaagatg	1320
aacggcttca cctgcaccgg cgtggtgacc gaggcgaga cctacaccaa ctttgtgggc	1380
tacgtgacca ccaccttcaa gcggaagcac ttcagacctc cccccgacgc ctgcagagcc	1440
gcctacaact ggaagatggc cggcgacct agatacagagg agagcctgca caaccctac	1500
cccgactaca gatggctgcg gaccgtgaaa accaccaagg agtccctggt gatcatcagc	1560
cctagcgtgg ccgatctgga cccctacgac agaagcctgc acagcagagt gttccctagc	1620
ggcaagtgca gcggcgtggc cgtgtccagc acctactgca gcaccaacca cgactacacc	1680
atctggatgc ccgagaaccc tagactgggc atgagctgcg acatcttcac caacagccgg	1740
ggcaagagag ccagcaaggg cagcgagacc tgcggttctg tggacgagag aggcctgtac	1800
aagagcctga agggcgctg caagctgaag ctgtgcggcg tgcctgggct gagactgatg	1860
gacggcacct ggggtggccat gcagaccagc aacgagacca agtggtgccc tctgaccag	1920

ctggtgaacc tgcacgactt cccgagcgat gagatcgagc acctggtggt ggaagagctg 1980  
 gtgcggaaga gagaggagtg cctggacgcc ctggagagca tcatgaccac caagagcgtg 2040  
 tccttcgga gactgagcca cctgagaaaag ctggtgcccc gctttggcaa ggcctacaca 2100  
 atcttcaaca agaccctgat ggaggccgat gccactaca agtctgtgcg gacctggaac 2160  
 gagatcctgc ctagcaaggg ctgcctgaga gtgggcgga gatgccaccc ccacgtgaac 2220  
 ggcgtgttct tcaacggcat catcctgggc cctgacggca acgtgctgat ccctgagatg 2280  
 cagagcagcc tgctgcagca gcacatggaa ctgctggaga gcagcgtgat ccccttggtg 2340  
 cccccctgg ccgacccag caccgtgttc aaggatggcg acgaggccga ggacttcgtg 2400  
 gaggtgcacc tgcccgatgt gcacaaccag gtgtccggcg tggacctggg cctgccccaac 2460  
 tggggcaagt acgtgctgct gagegcggga gccctgaccg ccctgatgct gatcatcttc 2520  
 ctgatgacct gctgccggag ggtgaacaga agcgagccca cccagcaca cctgagagggc 2580  
 accggcagag aggtgtccgt gacccccag agcggcaaga tcatcagcag ctgggagagc 2640  
 cacaagagcg gcggagagac cagactatga ttttatgcc cgggttttta tagctaatta 2700  
 gtcaaatgtg agttaatatt agtatactac attactaatt tattacatat tcatttatat 2760  
 caatctagta gcatttagct tttataaaac aatataactg aatagtacat actttactaa 2820  
 taagttataa ataagagata catatttata gtattttact ttctacactg aatataataa 2880  
 tataattata caaatataat ttttaatact atatagtata taactgaaat aaaataaccag 2940  
 tgtaatatag ttattataca tttataccac atcaaagatg agttataaca tcagtgtcac 3000  
 tgtagcaac agtagttata cgatgagtag ttactctcgt atggcgtag tatgtatgta 3060  
 tcttctagtt ttcttagtag gcattatagg aaacgtcaag cttataaggt tattaatggt 3120  
 atctagaaat atatctatta taccgtttct caacttgga atagccgatt tgctgtttgt 3180  
 gatattcata cctttataca ttatatacat actaagtaat ttccattggc attttggtaa 3240  
 agcactttgt aaaattagtt ctttcttttt tacttctaac atgtttgcaa gtatattttt 3300  
 aataactgta ataagcgtat atagatatgt aaaaattacc cttcctggat ttacctataa 3360  
 atatgttaac attagaaata tgtacattac tatatttttc atatggatta tttctattat 3420  
 actagggatt cctgctcttt actttagaaa tactatcgta acaaaaaata acgacacgct 3480  
 gtgtattaat cattatcatg ataatagaga aattgctgaa ttgatttaca aagttattat 3540  
 ctgtatcaga tttatttttag gatacctact aactacgata attatactcg tatgctatac 3600  
 gttactgat 3609

<210> 3  
 <211> 991  
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> vCP3006 C3 правое плечо

<400> 3

```

gctttatgaa gaggaggatt ttacattttt aaaatatcgg caccgtgttc tagtaataat      60
tttaccattt ctatatacaga aatacttacg gctaaataca aagacgttga tagtatattt      120
acgttattgt atttgcattt ttttaagtata taccttacta aatttatatc tctataacct      180
atagctttat gcagttcatt tataagtctt ccattactca tttctggtaa tgaagtatta      240
tatatacatta tgatattatc tctatatttt tctaataaaa accgttatca tgttattttat      300
tatttgttat aattatacta ttttaataaat tataccaaat acttagatac ttattaatac      360
catcctagaa cttgtatttc ttgcccccta aacttggaca tgcactccat taggcgtttc      420
ttgttttcga catcgctctc cttaacatat cctactgtta tgtgaggatt ccacggatta      480
tctactgtga tatcaccaaa cactgctctc gaacagggta ccgcattcag cagaacattt      540
cttagggctc taagttcctc agatacctcc agtttcataa ctacagcgca tcctttcgct      600
cccaactggt tagaggcggt actctgagga aaacacatct cttctttaca gactatagaa      660
atagtctgta aatcttgatc agttatttgc tttttgaaat tttcaaactc atcacattga      720
tccatatttg ctattccaag agttatatga ggaaaaatat cacatcctgt catgtatttt      780
attgtaacat tattataatc tgtaacatca gtatctaacc taacgtcgta aaagttaaca      840
gatgcccgat tactataatc ccaaggaacc ttaacatcta atcccattaa aatagtatcc      900
tttctactat ttttttcatt ggcaagtatg tggttaggtt tacacaaaat tcctgccatt      960
ttgtaacgat agcgaagcaa tagcttggtat g                                  991

```

<210> 4

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> промотор I3L

<400> 4

```

atgagataaa gtgaaaatat atatacattat attacaaagt acaattattt aggtttaatc      60

```

<210> 5

<211> 2667

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический кодон-оптимизированный ген G вируса бешенства

<400> 5

```

gctttatgaa gaggaggatt ttacattttt aaaatatcgg caccgtgttc tagtaataat      60

```



tttaccat	ttt ctatatcaga	aatacttacg	gctaaataca	aagacgttga	tagtatat	120
acgttatt	gtg atttgcatt	tttaagtata	taccttacta	aatttatatc	tctatacctt	180
atagcttt	tat gcagttcatt	tataagtctt	ccattactca	tttctggtaa	tgaagtatta	240
tatatcatt	a tgatattatc	tctat	ttttat	tctaaataaaa	accgttatca	300
tatttg	ttat aattatacta	tttaataaat	tataccaaat	acttagatac	ttattaatac	360
catcctaga	aa cttgtatttc	ttgcccccta	aacttggaca	tgcactccat	taggcgtttc	420
ttgttttc	ga catcgtctct	cctaacatat	cctactgtta	tgtgaggatt	ccacggatta	480
tctactgt	ga tatcaccaaa	cacgtccttc	gaacagggta	ccgcattcag	cagaacat	540
cttagggct	c taagttcatc	agatacctcc	agtttcataa	ctacagcgca	tcctttcgct	600
cccaactgt	t tagaggcggt	actctgagga	aaacacatct	cttctttaca	gactatagaa	660
atagtctgt	a aatcttgatc	agttatttgc	tttttgaaat	tttcaa	atctat	720
tccatatt	tg ctattccaag	agttatatga	ggaaaaatat	cacatcctgt	catgtatt	780
attgtaac	at tattataatc	tgtaacatca	gtatctaacc	taacgtcgta	aaagttaaca	840
gatgcccag	t tactataatc	ccaaggaacc	ttaacatcta	atcccattaa	aatagtatcc	900
tttctact	at ttttttcatt	ggcaagtatg	tggttaggtt	tacacaaaat	tcctgccatt	960
ttgtaacga	t agcgaagcaa	tagcttgtat	gctttttatt	tgattaacta	gtcataaaaa	1020
tcgggatccc	t cgagatgag	ataaagtga	aatatatatc	attatattac	aaagtacaat	1080
tatttaggt	t taatcatggt	gccccaggcc	ctgtgttctg	tgccccctgct	ggtgttcccc	1140
ctgtgcttc	g gcaagttccc	catctacacc	atccccgaca	agctgggccc	ctggagcccc	1200
atcgacatcc	a accacctgag	ctgccccaac	aatctgggtg	tggaggatga	gggctgcacc	1260
aatctgagcg	g gcttcagcta	catggagctg	aaagtgggct	acatcctggc	catcaagatg	1320
aacggcttca	c cctgcaccgg	cgtggtgacc	gaggccgaga	cctacaccaa	ctttgtgggc	1380
tacgtgacca	c ccaccttcaa	gcggaagcac	ttcagacctc	cccccgacgc	ctgcagagcc	1440
gcctacaact	g ggaagatggc	cggcgaccct	agatacgagg	agagcctgca	caacccctac	1500
cccgactaca	g gatggctgcg	gaccgtgaaa	accaccaagg	agtccctggg	gatcatcagc	1560
cctagcgtgg	c cgatctgga	cccctacgac	agaagcctgc	acagcagagt	gttccttagc	1620
ggcaagtgca	g gcggcgtggc	cgtgtccagc	acctactgca	gcaccaacca	cgactacacc	1680
atctggatgc	c cgagaaccc	tagactgggc	atgagctgcg	acatcttcac	caacagccgg	1740
ggcaagagag	c ccagcaaggg	cagcgagacc	tgcggcttcg	tggacgagag	aggcctgtac	1800
aagagcctga	a agggcgcttg	caagctgaag	ctgtgcggcg	tgctgggcct	gagactgatg	1860
gacggcacct	g ggtggccat	gcagaccagc	aacgagacca	agtgggtgcc	tcctgaccag	1920

ctggtgaacc tgcacgactt cccgagcgat gagatcgagc acctggtggt ggaagagctg 1980  
gtgcggaaga gagaggagtg cctggacgcc ctggagagca tcatgaccac caagagcgtg 2040  
tccttccgga gactgagcca cctgagaaag ctggtgcccc gctttggcaa ggcctacaca 2100  
atcttcaaca agacctgat ggaggccgat gccactaca agtctgtgcg gacctggaac 2160  
gagatcctgc ctagcaaggg ctgcctgaga gtgggcggca gatgccaccc ccacgtgaac 2220  
ggcgtgttct tcaacggcat catcctgggc cctgacggca acgtgctgat ccctgagatg 2280  
cagagcagcc tgctgcagca gcacatggaa ctgctggaga gcagcgtgat ccccttggtg 2340  
caccctctgg ccgacccag caccgtgttc aaggatggcg acgaggccga ggacttcgtg 2400  
gaggtgcacc tgcccgatgt gcacaaccag gtgtccggcg tggacctggg cctgcccaac 2460  
tggggcaagt acgtgctgct gagcgccgga gccctgaccg ccctgatgct gatcatcttc 2520  
ctgatgacct gctgccggag ggtgaacaga agcgagccca cccagcacia cctgagaggc 2580  
accggcagag aggtgtccgt gacccccag agcggaaga tcatcagcag ctgggagagc 2640  
cacaagagcg gcggagagac cagacta 2667

<210> 6  
<211> 939  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> правое плечо vCP3006 C3

<400> 6  
tttttatgcc cgggttttta tagctaatta gtcaaattgtg agttaatatt agtatactac 60  
attactaatt tattacatat tcatttatat caatctagta gcatttagct tttataaaac 120  
aatataactg aatagtacat actttactaa taagttataa ataagagata catatttata 180  
gtattttact ttctacactg aatataataa tataattata caaatataat ttttaatact 240  
atatagtata taactgaaat aaaataccag tgtaatatag ttattataca tttataccac 300  
atcaaagatg agttataaca tcagtgtcac tgtttagcaac agtagttata cgatgagtag 360  
ttactctcgt atggcgtag tatgtatgta tcttctagtt ttcttagtag gcattatagg 420  
aaacgtcaag cttataaggt tattaatggt atctagaaat atatctatta taccgtttct 480  
caacttgga atagccgatt tgctgtttgt gatattcata cctttataca ttatatacat 540  
actaagtaat ttccattggc attttggtaa agcactttgt aaaattagtt ctttcttttt 600  
tacttctaac atgtttgcaa gtatatTTTT aataactgta ataagcgat atagatatgt 660  
aaaaattacc cttcctggat ttacctataa atatgttaac attagaaata tgtacattac 720  
tatatttttc atatggatta tttctattat actagggatt cctgctcttt actttagaaa 780  
tactatcgta acaaaaaata acgacacgct gtgtattaat cattatcatg ataatagaga 840

aattgctgaa ttgatttaca aagttattat ctgtatcaga tttatttttag gataacctact 900  
acctacgata attataactcg tatgctatac gttactgat 939

<210> 7  
<211> 2141  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Фрагмент vCP3015 с C6R до C6L

<400> 7  
gttctaaagt tctttctctc gaaggtatag aacaaagtat ttcttctaca tccttactat 60  
ttattgcagc ttttaacagc ctatcacgta tcctatTTTT agtattggta gaacgtttta 120  
gttctaaagt taaaatatta gacataattg gcatattgct tattccttgc atagttgagt 180  
ctgtagatcg tttcagtata tcaactgatta atgtactact gttatgatga aatatagaat 240  
cgatattggc atttaactgt tttgtttatac taagtctaga ttttaaactct tctagtaata 300  
tgctatttaa tataaaagct tccacgtttt tgtatacatt tctttccata ttagtagcta 360  
ctactaaatg attatcttct ttcatatctt gtagataaga tagactatct ttatctttat 420  
tagtagaaaa tacttctggc catacatcgt taaatTTTT tgttggtggt agatataata 480  
ttaaatatct agaggatcct attatttgtg gtaaaatggt tatagagtaa aatgatctgg 540  
ctattaaaca taggccagtt accatagaat gctgcttccc gttacagtgt tttaccataa 600  
ccatagatct gcctgtattg ttgatacata taacagctgt aaatcctaaa aaattcctat 660  
cataattatt aatattaggt aattcatttc catgtgaaag atagactaat tttatatcct 720  
ttacctcaa ataattatTT acatctctta aacaatctat tttaatatca ttaactggta 780  
ttttataata tccagaaagg tttgaagggg ttgatggaat aagtctatta acatcgtaa 840  
gtaaattatt aatatcatga atctttatta tattataccc ataagttaaa tttatattta 900  
ctttctcatc atctgactta gttagtttgt aataagggtgt gtctgaaaaa attaaaagg 960  
aattcgttga atgaagctgt atttgctgta tcatttttat ctaattttgg agatttagca 1020  
gtacttactt cattagaaga agaactctgc agttcctgtc tattactgat atttcgtttc 1080  
attattatat gatttatatt ttactttttc aattatatat actcatttga ctagttaatc 1140  
aataaaaaga attctcaaaa ttgaaaatat ataattacaa tataaaatgg aaggagtaca 1200  
accattagat caaaatgttg gaaatacacc aggaagaaga tttcaaaaaa ataaagtatt 1260  
attagtagca gcaataatc aaggtttagg attattatta tgttttacat atatatgttt 1320  
acacttttat gcatctcaag taccacctca atatccacct atacaaagta taagagttca 1380  
gtttacaaga tgtgaaaatg aaaaagggtg tattattaca tctccaagta aagatgaaac 1440

tatgaaagta caagataatt caataatcat aaattgtgat ggtttttact taattagttt 1500  
aaaaggatat ttttcagaag aattatcatt atctttatat tatagaaaag gtagaggacc 1560  
tttattttct ttatcaaaag taacatcagt tgattctatt ggagttgcat atttggtttt 1620  
taaagataaa gtatatttta atgttacaac tcattctact agttataaag atatacaagt 1680  
aatgggtggg gaattaatat taatacatca aaatcctggg ggattttgtg cttattaatt 1740  
tttatcccg gtttttatag ctaattagtc atttttcgta agtaagtatt tttatttaatt 1800  
actttttatt gtacttatgt taaatataac tgatgataac aaaatccatt atgtattatt 1860  
tataactgta atttctttag cgtagttaga tgtccaatct ctctcaaata catcggtat 1920  
cttttttagtg agattttgat ctatgcagtt gaaacttatg aacgcgtgat gattaaaatg 1980  
tgaaccgtcc aaatttgcag tcattatatg agcgtatcta ttatctacta tcatcatctt 2040  
tgagttatta atatcatcta ctttagaatt gataggaaat atgaatacct ttgtagtaat 2100  
atctatacta tctacaccta actcattaag acttttgata g 2141

<210> 8

<211> 1148

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> vCP3015 C6R

<400> 8

gttctaaagt tctttctctc gaaggtatag aacaaagtat ttcttctaca tccttactat 60  
ttattgcagc ttttaacagc ctatcacgta tcctattttt agtattggta gaacgtttta 120  
gttctaaagt taaaatatta gacataattg gcatattgct tattccttgc atagttgagt 180  
ctgtagatcg tttcagtata tcaactgatta atgtactact gttatgatga aatatagaat 240  
cgatattggc atttaactgt tttgttatac taagtctaga ttttaaactct tctagtaata 300  
tgctatttaa tataaaagct tccacgtttt tgtatacatt tctttccata ttagtagcta 360  
ctactaaatg attatcttct ttcatatctt gtagataaga tagactatct ttatctttat 420  
tagtagaaaa tacttctggc catacatcgt taaatttttt tgttggtgtt agatataata 480  
ttaaatatct agaggatcct attatttgtg gtaaaatggt tatagagtaa aatgatctgg 540  
ctattaaaca taggccagtt accatagaat gctgcttccc gttacagtgt tttaccataa 600  
ccatagatct gcctgtattg ttgatacata taacagctgt aaatcctaaa aaatcctat 660  
cataattatt aatattaggt aattcatttc catgtgaaag atagactaat tttatatact 720  
ttacctcaa ataattattt acatctctta aacaatctat tttaatatca ttaactggta 780  
ttttataata tccagaaagg tttgaagggg ttgatggaat aagtctatta acatcggtta 840  
gtaaattatt aatatcatga atctttatta tattataccc ataagttaa tttatattta 900

ctttctcatc atctgactta gttagtttgt aataaggtgt gtctgaaaaa attaaaaggt 960  
aattcggtga atgaagctgt atttgctgta tcatttttat ctaattttgg agatttagca 1020  
gtacttactt cattagaaga agaatctgcc agttcctgtc tattactgat atttcgtttc 1080  
attattatat gatttatatt ttactttttc aattatatat actcatttga ctagttaatc 1140  
aataaaaa 1148

<210> 9  
<211> 36  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> промотор 42K

<400> 9  
atttctcaaaa ttgaaaatat ataattacaa tataaa 36

<210> 10  
<211> 549  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> cOX40L

<400> 10  
atggaaggag tacaaccatt agatcaaaat gttggaaata caccaggaag aagatttcaa 60  
aaaaataaag tattattagt agcagcaata attcaagggt taggattatt attatgtttt 120  
acatatatat gtttacactt ttatgcatct caagtaccac ctcaatatcc acctatacaa 180  
agtataagag ttcagtttac aagatgtgaa aatgaaaaag gttgtattat tacatctcca 240  
agtaaagatg aaactatgaa agtacaagat aattcaataa tcataaattg tgatgggtttt 300  
tacttaatta gtttaaaagg atatttttca gaagaattat cattatcttt atattataga 360  
aaaggtagag gacctttatt ttctttatca aaagtaacat cagttgattc tattggagtt 420  
gcatatttgg cttttaaaga taaagtatat tttaatgtta caactcatto tactagttat 480  
aaagatatac aagtaaatgg tgggtgaatta atattaatac atcaaaatcc tgggtggattt 540  
tgtgcttat 549

<210> 11  
<211> 364  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> плечо vCP3015 C6L

<400> 11

gtaagtaagt atttttatatt aatacttttt attgtactta tgttaaatat aactgatgat 60  
aacaaaatcc attatgtatt atttataact gtaattttctt tagcgtagtt agatgtccaa 120  
tctctctcaa atacatcggc tatcttttta gtgagatttt gatctatgca gttgaaactt 180  
atgaacgcgt gatgattaaa atgtgaaccg tccaaatttg cagtcattat atgagcgtat 240  
ctattatcta ctatcatcat ctttgagtta ttaatatcat ctactttaga attgatagga 300  
aatatgaata cctttgtagt aatatctata ctatctacac ctaactcatt aagacttttg 360  
atag 364

<210> 12

<211> 183

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Предсказанная аминокислотная последовательность синтетического COX40L

<400> 12

Met Glu Gly Val Gln Pro Leu Asp Gln Asn Val Gly Asn Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Arg Arg Phe Gln Lys Asn Lys Val Leu Leu Val Ala Ala Ile Ile Gln  
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Tyr  
35 40 45

Ala Ser Gln Val Pro Pro Gln Tyr Pro Pro Ile Gln Ser Ile Arg Val  
50 55 60

Gln Phe Thr Arg Cys Glu Asn Glu Lys Gly Cys Ile Ile Thr Ser Pro  
65 70 75 80

Ser Lys Asp Glu Thr Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Ile Ile Ile Asn  
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Glu Glu  
100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Gly Arg Gly Pro Leu Phe Ser  
115 120 125

Leu Ser Lys Val Thr Ser Val Asp Ser Ile Gly Val Ala Tyr Leu Ala  
130 135 140

Phe Lys Asp Lys Val Tyr Phe Asn Val Thr Thr His Ser Thr Ser Tyr

145

150

155

160

Lys Asp Ile Gln Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn  
 165 170 175

Pro Gly Gly Phe Cys Ala Tyr  
 180

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 3279

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Фрагмент правого плеча vCP3015 C5 G классического вируса бешенства

&lt;400&gt; 13

```

gctataaata tgcattggaa aaataatcca tttaaagaaa ggattcaaact actacaaaac      60
ctaagcgata atatgttaac taagcttatt cttaacgacg ctttaaatat acacaaataa      120
acataatddd tgtataacct aacaaataac taaaacataa aaataataaa aggaaatgta      180
atatcgtaat tattttactc aggaatgggg ttaaataattd atatcacgtg tatatctata      240
ctgttatcgt atactcttta caattactat tacgaatatg caagagataa taagattacg      300
tatttaagag aatcttgtca tgataattgg gtacgacata gtgataaatg ctatttcgca      360
tcgttacata aagtcagttg gaaagatgga ttgacagat gtaacttaat aggtgcaaaa      420
atgttaaata acagcattct atcggaagat aggataccag ttatattata caaaaatcac      480
tggttgata aaacagattc tgcaatatc gtaaaagatg aagattactg cgaatttgta      540
aactatgaca ataaaaagcc atttatctca acgacatcgt gtaattcttc catgttttat      600
gtatgtgttt cagatattat gagattacta taaacttttt gtatacttat attccgtaaa      660
ctatattaat catgaagaaa atgaaaaagt atagaagctg ttcacgagcg gttgttgaaa      720
acaacaaaat tatacattca agatggctta catatacgtc tgtgaggcta tcatggataa      780
tgacaatgca tctctaaata ggttttttgg caatggattc gaccctaaca cggaatatgg      840
tactctacaa tctctctttg aaatggctgt aatgttcaag aataccgagg ctataaaaaat      900
cttgatgagg tatggagcta aacctgtagt tactgaatgc acaacttctt gtctgcatga      960
tgcggtgttg agagacgact acaaaatagt gaaagatctg ttgaagaata actatgtaaa      1020
caatgttctt tacagcggag gctttactcc tttgtgtttg gcagcttacc ttaacaaagt      1080
taatttggtt aaacttctat tggtcattc ggcgatgta gatatttcaa acacggatcg      1140
gttaactcct ctacatatag ccgtatcaaa taaaatttta acaatgggta aacttctatt      1200
gaacaaaggt gctgatactg acttgctgga taacatggga cgtactcctt taatgatcgc      1260
tgtacaatct ggaaatattg aaatatgtag cacactactt aaaaaaata aaatgtccag      1320

```

aactgggaaa aattgatctt gccagctgta attcatggta gaaaagaagt gctcaggcta	1380
cttttcaaca aaggagcaga tgtaaactac atctttgaaa gaaatggaaa atcatatact	1440
gttttggaat tgattaaaga aagttactct gagacacaaa agaggtagct gaagtggtag	1500
tctcaaaagc ttcccgggtt aattaattag ttattagaca aggtgaaaac gaaactatct	1560
gtagcttaat taattagagc ttctttattc tataacttaa aagtgaaaat aaatacaaag	1620
gttcttgagg gttgtgttaa attgaaagcg agaaataatc ataaattatt tcattatcgc	1680
gatatccgtt aagtttgtat cgtaatgggt cctcaagctc tcctgtttgt accccttctg	1740
gtttttccgt tgtgttttgg aaaattccct atttacacaa tcccagacaa gcttggtccc	1800
tggagcccga ttgacatata tcacctcagc tgcccaaaca atttggtagt ggaggacgaa	1860
ggatgcacca acctgtcagg gttctcctac atggaactta aagttggata catcttagcc	1920
ataaaaatga acgggttcac ttgcacaggc gttgtgacgg aggctgaaac ctacactaac	1980
ttcgttggtt atgtcacac cactgtcaaa agaaagcatt tccgccaac accagatgca	2040
tgtagagccg cgtacaactg gaagatggcc ggtgacccca gatatgaaga gtctctacac	2100
aatccgtacc ctgactaccg ctggcttcga actgtaaaaa ccaccaagga gtctctcggt	2160
atcatatctc caagtgtagc agatttggac ccatatgaca gatcccttca ctcgagggtc	2220
ttccctagcg ggaagtgtc aggagtagcg gtgtcttcta cctactgtc cactaaccac	2280
gattacacca tttggatgcc cgagaatccg agactagggg tgtcttgtga catttttacc	2340
aatagtagag ggaagagagc atccaaaggg agtgagactt gcggctttgt agatgaaaga	2400
ggcctatata agtctttaaa aggagcatgc aaactcaagt tatgtggagt tctaggactt	2460
agacttatgg atggaacatg ggtcgcgatg caaacatcaa atgaaaccaa atgggtgccct	2520
cccgatcagt tgggtgaacct gcacgacttt cgtcagacg aaattgagca ccttgttgta	2580
gaggagttag tcaggaagag agaggagtgt ctggatgcac tagagtccat catgacaacc	2640
aagtcagtga gtttcagacg tctcagtcac ttaagaaaac ttgtccctgg gtttgaaaaa	2700
gcatatacca tattcaacaa gaccttgatg gaagccgatg ctactacaa gtcagtcaga	2760
acttggaatg agatcctccc ttcaaaaggg tgtttaagag ttgggggggag gtgtcatcct	2820
catgtgaacg ggggtgtttt caatggtata atattaggac ctgacggcaa tgtcttaatc	2880
ccagagatgc aatcatccct cctccagcaa catatggagt tgttggaatc ctcggttata	2940
ccccttgtgc accccctggc agaccgtct accgttttca aggacgggtga cgaggctgag	3000
gattttgttg aagttcacct tcccgatgtg cacaatcagg tctcaggagt tgacttgggt	3060
ctcccgaact gggggaagta tgtattactg agtgcagggg cctgactgc cttgatgttg	3120
ataattttcc tgatgacatg ttgtagaaga gtcaatcgat cagaacctac gcaacacaat	3180



ctcagagggga cagggagggga ggtgtcagtc actccccaaa gcgggaagat catatcttca 3240  
 tggaatcac acaagagtgg gggtagagacc agactgtga 3279

<210> 14  
 <211> 1508  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> vCP3015 C5R

<400> 14  
 gctataaata tgcattggaa aaataatcca tttaaagaaa ggattcaaact actacaaaac 60  
 ctaagcgata atatgttaac taagcttatt cttaacgacg ctttaaatat acacaaataa 120  
 acataatttt tgtataacct aacaaataac taaaacataa aaataataaa aggaaatgta 180  
 atatcgtaat ttttttactc aggaatgggg ttaaataattt atatcacgtg tatatctata 240  
 ctgttatcgt atactcttta caattactat tacgaatatg caagagataa taagattacg 300  
 tatttaagag aatcttgtca tgataattgg gtacgacata gtgataaatg ctatttcgca 360  
 tcgttacata aagtcagttg gaaagatgga ttgacagat gtaacttaat aggtgcaaaa 420  
 atgttaaata acagcattct atcggaagat aggataccag ttatattata caaaaatcac 480  
 tggttggata aaacagattc tgcaatatcc gtaaaagatg aagattactg cgaatttgta 540  
 aactatgaca ataaaaagcc atttatctca acgacatcgt gtaattcttc catgttttat 600  
 gtatgtgttt cagatattat gagattacta taaacttttt gtatacttat attccgtaaa 660  
 ctatattaat catgaagaaa atgaaaaagt atagaagctg ttcacgagcg gttgttgaaa 720  
 acaacaaaat tatacattca agatggctta catatacgtc tgtgaggcta tcatggataa 780  
 tgacaatgca tctctaaata ggttttttgg caatggattc gaccctaaca cggaatatgg 840  
 tactctacaa tctctcttgg aaatggctgt aatgttcaag aataccgagg ctataaaaat 900  
 cttgatgagg tatggagcta aacctgtagt tactgaatgc acaacttctt gtctgcatga 960  
 tgcggtgttg agagacgact acaaaatagt gaaagatctg ttgaagaata actatgtaaa 1020  
 caatgttctt tacagcggag gctttactcc tttgtgtttg gcagcttacc ttaacaaaagt 1080  
 taatttggtt aaacttctat tggctcattc ggcggtatgta gatatttcaa acacggatcg 1140  
 gtttaactct ctacatatag ccgtatcaaa taaaatttta acaatgggta aacttctatt 1200  
 gaacaaaggt gctgatactg acttgctgga taacatggga cgtactcctt taatgatcgc 1260  
 tgtacaatct ggaaatattg aaatatgtag cacactactt aaaaaaata aaatgtccag 1320  
 aactgggaaa aattgatctt gccagctgta attcatggta gaaaagaagt gctcaggcta 1380  
 cttttcaaca aaggagcaga tgtaaaactac atctttgaaa gaaatggaaa atcatatact 1440  
 gttttggaat tgattaaaga aagtactct gagacacaaa agaggtagct gaagtggtag 1500

tctcaaaa 1508

<210> 15  
 <211> 124  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> промотор vCP3015 H6

<400> 15  
 ttctttattc tataacttaaa aagtgaaaat aaatacaaag gttcttgagg gttgtgttaa 60  
 attgaaagcg agaaataatc ataaattatt tcattatcgc gatatccggt aagtttgtat 120  
 cgta 124

<210> 16  
 <211> 1572  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Ген G классического вируса бешенства (дикий тип)

<400> 16  
 atgggttcctc aagctctcct gtttgtaccc cttctggttt ttccggttggtg ttttgaaaaa 60  
 ttccctatatt acacaatccc agacaagcgtt ggtccctgga gcccgattga catacatcac 120  
 ctcagctgcc caaacaattt ggtagtggag gacgaaggat gcaccaacct gtcagggttc 180  
 tcctacatgg aacttaaagt tggatacatc ttagccataa aatgaacgg gttcacttgc 240  
 acaggcggtt tgacggagggc tgaaacctac actaacttcg ttggttatgt cacaaccacg 300  
 ttcaaaagaa agcatttccg cccaacacca gatgcatgta gagccgcgta caactggaag 360  
 atggccggtg accccagata tgaagagtct ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg 420  
 cttcgaactg taaaaaccac caaggagtct ctggttatca tatctccaag tgtagcagat 480  
 ttggacccat atgacagatc ccttcaactc aggggtcttc ctagcgggaa gtgctcagga 540  
 gtagcgggtgt cttctaccta ctgctccact aaccacgatt acaccatttg gatgcccag 600  
 aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt tttaaccaata gtagagggaa gagagcatcc 660  
 aaaggagtg agacttgccg cttttagat gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga 720  
 gcatgcaaac tcaagttatg tggagttcta ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc 780  
 gcgatgcaaa catcaaatga aaccaaattg tgcoctcccg atcagttggg gaacctgcac 840  
 gactttcgct cagacgaaat tgagcacctt gttgtagagg agttgggtcag gaagagagag 900  
 gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg acaaccaagt cagtgagttt cagacgtctc 960  
 agtcatttaa gaaaacttgt ccctgggttt ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc 1020

ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca gtcagaactt ggaatgagat cctcccttca	1080
aaaggggtgtt taagagttgg ggggaggtgt catcctcatg tgaacgggggt gtttttcaat	1140
ggtataatat taggacctga cggcaatgtc ttaatcccag agatgcaatc atccctcctc	1200
cagcaacata tggagttgtt ggaatcctcg gttatcccc ttgtgcaccc cctggcagac	1260
ccgtctaccg ttttcaagga cggtgacgag gctgaggatt ttgttgaagt tcaccttccc	1320
gatgtgcaca atcaggtctc aggagttgac ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta	1380
ttactgagtg cagggggccct gactgccttg atgttgataa ttttctgat gacatgttgt	1440
agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa cacaatctca gagggacagg gagggaggtg	1500
tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata ttttcatggg aatcacacaa gagtgggggt	1560
gagaccagac tg	1572

<210> 17  
 <211> 2141  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> vCP3012 с правого плеча С6 до левого плеча С6

<400> 17	
gtttctaaagt tctttctctcc gaaggatatag aacaaagtat ttctttctaca tccttactat	60
ttattgcagc ttttaacagc ctatcacgta tctatTTTT agtattggta gaacgtttta	120
gtttctaaagt taaaatatta gacataattg gcatattgct tattccttgc atagttgagt	180
ctgtagatcg tttcagtata tcaactgatta atgtactact gttatgatga aatatagaat	240
cgatattggc atttaactgt tttgttatac taagtctaga ttttaaactc tctagtaata	300
tgctatttaa tataaaagct tccacgtttt tgtatacatt tctttccata ttagtagcta	360
ctactaaatg attatcttct ttcatatctt gtagataaga tagactatct ttatctttat	420
tagtagaaaa tacttctggc catacatcgt taaatTTTT tgttggtgtt agatataata	480
ttaaatatct agaggatcct attatTTgtg gtaaaatgtt tatagagtaa aatgatctgg	540
ctattaaaca taggccagtt accatagaat gctgcttccc gttacagtgt tttaccataa	600
ccatagatct gctgtattg ttgatacata taacagctgt aaatcctaaa aaattcctat	660
cataattatt aatattaggt aattcatttc catgtgaaag atagactaat tttatctcct	720
ttacctcaa ataattatTT acatctctta aacaatctat tttaatatca ttaactggta	780
ttttataata tccagaaagg tttgaagggg ttgatggaat aagtctatta acatcgtaa	840
gtaaattatt aatatcatga atctttatta tattataccc ataagttaaa tttatatTTa	900
ctttctcatc atctgactta gttagtttgt aataaggtgt gtctgaaaa attaaaaggt	960
aattcgttga atgaagctgt atttgcgtga tcatttttat ctaatttttg agatttagca	1020

gtacttactt cattagaaga agaatctgcc agttcctgtc tattactgat atttcggttc 1080  
 attattatat gatttatatt ttactttttc aattatatat actcatttga ctagttaatc 1140  
 aataaaaaga attctcaaaa ttgaaaatat ataattacaa tataaaatgg aaggagtaca 1200  
 accattagat caaaatgttg gaaatacacc aggaagaaga ttccaacaaa ataaagtatt 1260  
 attagtagca gcaataattc aagggttagg attattatta tgtttttacat atatatgttt 1320  
 acacttttat gcatctcaag taccacctca atatccacct atacaaagta taagagttca 1380  
 gtttacaaga tgtgaaaatg aaaaagggttg tattattaca tctccaagta aagatgaaac 1440  
 tatgaaagta caagataatt caataatcat aaattgtgat ggtttttact taattagttt 1500  
 aaaaggatat ttttcagaag aattatcatt atcttttatat tatagaaaag gtagaggacc 1560  
 tttattttct ttatcaaaag taacatcagt tgattctatt ggagttgcat atttggtttt 1620  
 taaagataaa gtatatttta atgttacaac tcattctact agttataaag atatacaagt 1680  
 aaatgggtgg gaattaatat taatacatca aaatcctggg ggattttgtg cttattaatt 1740  
 tttatcccg gtttttatag ctaattagtc atttttcgtg agtaagtatt tttatttaat 1800  
 actttttatt gtacttatgt taaatataac tgatgataac aaaatccatt atgtattatt 1860  
 tataactgta atttcttttag cgtagttaga tgtccaatct ctctcaaata catcggtat 1920  
 ctttttagtg agattttgat ctatgcagtt gaaacttatg aacgcgtgat gattaaaatg 1980  
 tgaaccgtcc aaatttgcag tcattatatg agcgtatcta ttatctacta tcatcatctt 2040  
 tgagttatta atatcatcta ctttagaatt gataggaaat atgaatacct ttgtagtaat 2100  
 atctatacta tctacaccta actcattaag acttttgata g 2141

<210> 18  
 <211> 1148  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Плечо C6R vCP3012

<400> 18  
 gttctaaagt tctttctctc gaaggtatag aacaaagtat ttcttctaca tccttactat 60  
 ttattgcagc ttttaacagc ctatcacgta tcctattttt agtattggta gaacgtttta 120  
 gttctaaagt taaaatatta gacataattg gcatattgct tattccttgc atagttgagt 180  
 ctgtagatcg tttcagtata tcaactgatta atgtactact gttatgatga aatatagaat 240  
 cgatattggc atttaactgt tttgttatac taagtctaga ttttaaatct tctagtaata 300  
 tgctatttaa tataaaagct tccacgtttt tgtatacatt tctttccata ttagtagcta 360  
 ctactaaatg attatcttct ttcatatctt gtagataaga tagactatct ttatctttat 420

tagtagaaaa tacttctggc catacatcgt taaatTTTTT tgttgttggt agatataata	480
ttaaatatct agaggatcct attatTTgtg gtaaatggt tatagagtaa aatgatctgg	540
ctattaaaca taggccagtt accatagaat gctgcttccc gttacagtgt tttaccataa	600
ccatagatct gctgtattg ttgatacata taacagctgt aaatcctaaa aaattcctat	660
cataattatt aatattaggt aattcatttc catgtgaaag atagactaat tttatatacct	720
ttacctcaa ataattatTT acatctctta aacaatctat tttaatatca ttaactggta	780
ttttataata tccagaaagg tttgaagggg ttgatggaat aagtctatta acatcggttaa	840
gtaaattatt aatatcatga atctttatta tattataccc ataagttaaa tttatatTTa	900
ctttctcatc atctgactta gttagtttgt aataaggtgt gtctgaaaaa attaaaaggt	960
aattcgttga atgaagctgt atttgcgtga tcatttttat ctaattttgg agatttagca	1020
gtacttactt cattagaaga agaatctgcc agttcctgtc tattactgat atttcgTTtc	1080
attattatat gatttatatt ttactTTTTc aattatatat actcatttga ctagttaatc	1140
aataaaaa	1148

<210> 19  
 <211> 365  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Плечо C6L vCP3012

<400> 19	
cgtaagtaag tatTTTTatt taatactTTT tattgtactt atgttaaata taactgatga	60
taacaaaatc cattatgtat tatTTataac tgtaatttct ttagcgtagt tagatgtcca	120
atctctctca aatacatcgg ctatctTTTT agtgagattt tgatctatgc agttgaaact	180
tatgaacgcg tgatgattaa aatgtgaacc gtccaaattt gcagtcatta tatgagcgta	240
tctattatct actatcatca tctttgagtt attaatatca tctacttttag aattgatagg	300
aaatatgaat acctttgtag taatatctat actatctaca cctaactcat taagactTTT	360
gatag	365

<210> 20  
 <211> 4089  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> vCP3012 с плеча C3R до плеча C3L

<400> 20	
tgtaatgggg ttttacctaa atcatcttgt tcgTTtatag gcactccgtg atttataagt	60
aacgctatta tatcgtaact acaattatTT ttaagtgcct ttatgagata ctgttttatgc	120

aaaaataaac ttttatctat ttttaacta ttatctaaca atatcctaata taaatctata	180
ttcttataact ttatagcgta atgtaacgga gtttcaaaat ttctagtttg tatattaaga	240
tcaatattaa aatctataaa ttttttatac atatcatcag atatcttatac atacagtaca	300
tcgtaataat ttagaaagaa tctattacaa ttaacacctt tttttaataa atatctagtt	360
aatgacttat tgtttctata tacagaaata tataacggac tatttccaga atgtatctgt	420
tctatgtcag cgccagaatc tattagtagt ttagcaattt ctgtattatc taaactagca	480
gctttatgaa gaggaggatt ttacattttt aaaatatcgg caccgtgttc tagtaataat	540
tttaccattt ctatatcaga aatacttacg gctaaataca aagacgttga tagtatattt	600
acgttattgt atttgcattt ttttaagtata taccttacta aatttatatc tctatacctt	660
atagctttat gcagttcatt tataagtctt ccattactca tttctggtaa tgaagtatta	720
tatatcatta tgatattatc tctattttat tctaataaaa accgttatca tgttatttat	780
tatttgttat aattatacta ttttaataaat tataccaaat acttagatac ttattaatac	840
catcctagaa cttgtatttc ttgcccccta aacttggaca tgcactccat taggcgtttc	900
ttgttttcga catcgctctc cttaacatat cctactgtta tgtgaggatt ccacggatta	960
tctactgtga tatcaccaaa cacgtccttc gaacagggtta ccgcattcag cagaacattt	1020
cttagggctc taagttcctc agatacctcc agtttccataa ctacagcgca tcttttctgt	1080
cccaactgtt tagaggcggt actctgagga aaacacatct cttctttaca gactatagaa	1140
atagtctgta aatcttgatc agttatttgc tttttgaaat tttcaaactc atcacattga	1200
tccatatttg ctattccaag agttatatga ggaaaaatat cacatcctgt catgtatttt	1260
attgtaacat tattataatc tgtaacatca gtatctaacc taacgtcgta aaagttaaca	1320
gatgcccagt tactataatc ccaaggaacc ttaacatcta atcccattaa aatagtatcc	1380
tttctactat ttttttcatt ggcaagtatg tggttaggtt tacacaaaat tcttgccatt	1440
ttgtaacgat agcgaagcaa tagcttgatg gctttttatt tgattaacta gtcataaaaa	1500
tcgggatccc tcgagatgag ataaagtga aatatatatac attatattac aaagtacaat	1560
tatttaggtt taatcatggt gcccaggcc ctgtgttctg tgccccctgt ggtgttcccc	1620
ctgtgcttct gcaagttccc catctacacc atccccgaca agctgggccc ctggagcccc	1680
atcgacatcc accacctgag ctgccccaac aatctgggtg tggaggatga gggctgcacc	1740
aatctgagcg gcttcagcta catggagctg aaagtgggct acatcctggc catcaagatg	1800
aacggcttca cctgcaccgg cgtggtgacc gaggcgaga cctacaccaa ctttgtgggc	1860
tacgtgacca ccaccttcaa gcggaagcac ttcagacctc cccccgacgc ctgcagagcc	1920
gcctacaact ggaagatggc cggcgacct agatacgagg agagcctgca caaccctac	1980

cccgactaca gatggctgcg gaccgtgaaa accaccaagg agtccctggt gatcatcagc	2040
cctagcgtgg ccgatctgga cccctacgac agaagcctgc acagcagagt gttccctagc	2100
ggcaagtgca gcgggcgtggc cgtgtccagc acctactgca gcaccaacca cgactacacc	2160
atctggatgc ccgagaaccc tagactgggc atgagctgcg acatcttcac caacagccgg	2220
ggcaagagag ccagcaaggg cagcgagacc tgcggcttcg tggacgagag aggccgtgac	2280
aagagcctga agggcgccctg caagctgaag ctgtgcggcg tgctgggcct gagactgatg	2340
gacggcacct ggggtggccat gcagaccagc aacgagacca agtgggtgccc tcctgaccag	2400
ctggtgaacc tgcacgactt cgggagcgat gagatcgagc acctgggtggg ggaagagctg	2460
gtgcggaaga gagaggagtg cctggacgcc ctggagagca tcatgaccac caagagcgtg	2520
tccttccgga gactgagcca cctgagaaag ctggtgcccg gctttggcaa ggcctacaca	2580
atcttcaaca agaccctgat ggaggccgat gccactaca agtctgtgcg gacctggaac	2640
gagatcctgc ctagcaaggg ctgcctgaga gtggggcgga gatgccaccc ccacgtgaac	2700
ggcgtgttct tcaacggcat catcctgggc cctgacggca acgtgctgat ccctgagatg	2760
cagagcagcc tgctgcagca gcacatggaa ctgctggaga gcagcgtgat cccctggtg	2820
cacccctgg ccgacccag caccgtgttc aaggatggcg acgaggccga ggacttcgtg	2880
gaggtgcacc tgcccgatgt gcacaaccag gtgtccggcg tggacctggg cctgcccac	2940
tggggcaagt acgtgctgct gagegcggga gccctgaccg ccctgatgct gatcatcttc	3000
ctgatgacct gctgccggag ggtgaacaga agcgagccca ccagcacaa cctgagaggc	3060
accggcagag aggtgtccgt gacccccag agcggcaaga tcatcagcag ctgggagagc	3120
cacaagagcg gcggagagac cagactatga ttttatgcc cgggttttta tagctaatta	3180
gtcaaatgtg agttaatatt agtatactac attactaatt tattacatat tcatttatat	3240
caatctagta gcatttagct tttataaaac aatataactg aatagtacat actttactaa	3300
taagttataa ataagagata catatttata gtattttact ttctacactg aatataataa	3360
tataattata caaatataat ttttaatact atatagtata taactgaaat aaaataccag	3420
tgtaatatag ttattataca tttataccac atcaaagatg agttataaca tcagtgtcac	3480
tgttagcaac agtagttata cgatgagtag ttactctcgt atggcgtag tatgtatgta	3540
tcttctagtt ttcttagtag gcattatagg aaacgtcaag cttataaggt tattaatgg	3600
atctagaaat atatctatta taccgtttct caacttggga atagccgatt tgctgtttgt	3660
gatattcata cttttataca ttatatacat actaagtaat ttccattggc attttggtaa	3720
agcactttgt aaaattagtt ctttcttttt tacttctaac atgtttgcaa gtatatTTTT	3780
aataactgta ataagcgtat atagatatgt aaaaattacc cttcctggat ttacctataa	3840
atatgttaac attagaaata tgtacattac tatatttttc atatggatta tttctattat	3900

actagggatt cctgctcttt actttagaaa tactatcgta acaaaaaata acgacacgct 3960  
 gtgtattaat cattatcatg ataatagaga aattgctgaa ttgatttaca aagttattat 4020  
 ctgtatcaga tttattttag gatacctact acctacgata attatactcg tatgctatac 4080  
 gttactgat 4089

<210> 21  
 <211> 1471  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Плечо C3R vCP3012

<400> 21  
 tgtaatgggg ttttacctaa atcatcttgt tcgtttatag gcactccgtg atttataagt 60  
 aacgctatta tatcgtaact acaattatit ttaagtgcct ttatgagata ctgtttatgc 120  
 aaaaataaac ttttatctat ttttaatacta ttatctaaca atatcctaata taaatctata 180  
 ttctttatact ttatagcgta atgtaacgga gtttcaaaat ttctagtttg tatattaaga 240  
 tcaatattaa aatctataaa tattttatac atatcatcag atatcttatac atacagtaca 300  
 tcgtaataat ttagaaagaa tctattacaa ttaaacacctt tttttaataa atatctagtt 360  
 aatgacttat tgtttctata tacagaaata tataacggac tatttcagaa atgtatctgt 420  
 tctatgtcag cgccagaatc tattagtagt ttagcaattt ctgtattatc taaactagca 480  
 gctttatgaa gaggaggatt tttacatttt aaaatatcgg caccgtgttc tagtaataat 540  
 tttaccattt ctatatcaga aatacttacg gctaaatata aagacgttga tagtatattt 600  
 acgttattgt atttgcattt ttttaagtata taccttacta aatttatatc tctataacct 660  
 atagctttat gcagttcatt tataagtctt ccattactca tttctggtaa tgaagtatta 720  
 tatatcatta tgatattatc tctattttat tctaataaaa accgttatca tgttatttat 780  
 tatttgttat aattatacta ttttaataat tataccaaat acttagatac ttattaatac 840  
 catcctagaa cttgtatttc ttgcccccta aacttggaca tgcactccat taggcgtttc 900  
 ttgttttcga catcgctctc cttaacatat cctactgtta tgtgaggatt ccacggatta 960  
 tctactgtga tatcaccaaa cacgtccttc gaacagggtg ccgcattcag cagaacattt 1020  
 cttagggctc taagttcatc agatacctcc agtttcataa ctacagcgca tcctttcgct 1080  
 cccaactggt tagaggcggt actctgagga aaacacatct cttctttaca gactatagaa 1140  
 atagtctgta aatcttgatc agttatttgc tttttgaaat tttcaaactc atcacattga 1200  
 tccatatttg ctattccaag agttatatga ggaaaaatat cacatcctgt catgtatttt 1260  
 attgtaacat tattataatc tgtaacatca gtatctaacc taacgtcgta aaagttaaca 1320



gatgccagtg tactataatc ccaaggaacc ttaacatcta atcccattaa aatagtatcc 1380  
 tttctactat ttttttcatt ggcaagtatg tggttagtt tacacaaaat tcttgccatt 1440  
 ttgtaacgat agcgaagcaa tagcttgat g 1471

<210> 22  
 <211> 907  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Плечо C3R vCP3012

<400> 22  
 caaatgtgag ttaatattag tatactacat tactaattta ttacatattc atttatatca 60  
 atctagtagc atttagcttt tataaaacaa tataactgaa tagtacatac ttactaata 120  
 agttataaat aagagataca tatttatagt attttacttt ctacactgaa tataataata 180  
 taattataca aatataatth ttaatactat atagtatata actgaaataa aataccagtg 240  
 taatatagtt attatacatt tataccacat caaagatgag ttataacatc agtgtcactg 300  
 ttagcaacag tagttatacg atgagtagtt actctcgtat ggcgtagta tgtatgtatc 360  
 ttctagtttt cttagtaggc attataggaa acgtcaagct tataagggtta ttaatgggtat 420  
 ctagaaatat atctattata ccgttttctca acttggaat agccgatttg ctgtttgtga 480  
 tattcatacc ttatacatt atatacatac taagtaatth ccattggcat ttgggtaag 540  
 cactttgtaa aattagttct ttctttttta cttctaacat gtttgcaagt atatttttaa 600  
 taactgtaat aagcgtatat agatatgtaa aaattaccct tcttggtatt acctataaat 660  
 atgttaacat tagaaatatg tacattacta tatttttcat atggattatt tctattatac 720  
 tagggattcc tgctctttac tttagaaata ctatcgtaac aaaaaataac gacacgtgt 780  
 gtattaatca ttatcatgat aatagagaaa ttgctgaatt gatttacaaa gttattatct 840  
 gtatcagatt tatttttagga tacctactac ctacgataat tatactcgta tgctatacgt 900  
 tactgat 907

<210> 23  
 <211> 3279  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Фрагмент vCP3012 - Вирус бешенства G и фланкирующие области

<400> 23  
 gctataaata tgcattggaa aaataatcca tttaaagaaa ggattcaaact actacaaaac 60  
 ctaagcgata atatgttaac taagcttatt cttaacgacg ctttaaatat acacaaataa 120  
 acataattht tgtataacct aacaataac taaacataa aaataataaa aggaaatgta 180

atatcgtaat tattttactc aggaatgggg ttaaataattt atatcacgtg tataatctata	240
ctgttatcgt atactcttta caattactat tacgaatatg caagagataa taagattacg	300
tatttaagag aatcttgtca tgataattgg gtacgacata gtgataaatg ctatttcgca	360
tcgttacata aagtcagttg gaaagatgga ttgacagat gtaacttaat aggtgcaaaa	420
atgttaaata acagcattct atcggaagat aggataccag ttatattata caaaaatcac	480
tggttgata aaacagattc tgcaatatc gtaaaagatg aagattactg cgaatttgta	540
aactatgaca ataaaaagcc atttatctca acgacatcgt gtaattcttc catgttttat	600
gtatgtgttt cagatattat gagattacta taaacttttt gtatacttat attccgtaaa	660
ctatattaat catgaagaaa atgaaaaagt atagaagctg ttcacgagcg gttgttgaaa	720
acaacaaaat tatacattca agatggctta catatacgtc tgtgaggcta tcatggataa	780
tgacaatgca tctctaaata ggtttttgga caatggattc gaccctaaca cggaatatgg	840
tactctacaa tctcctcttg aaatggctgt aatgttcaag aataccgagg ctataaaaaat	900
cttgatgagg tatggagcta aacctgtagt tactgaatgc acaacttctt gtctgcatga	960
tgcggtgttg agagacgact acaaaatagt gaaagatctg ttgaagaata actatgtaaa	1020
caatgttctt tacagcggag gctttactcc tttgtgtttg gcagcttacc ttaacaaagt	1080
taatttggtt aaacttctat tggtcattc ggaggatgta gatatttcaa acacggatcg	1140
gttaactcct ctacatatag ccgtatcaaa taaaaattta acaatggtta aacttctatt	1200
gaacaaaggt gctgatactg acttgctgga taacatggga cgtactcctt taatgatcgc	1260
tgtacaatct ggaaatattg aaatatgtag cacactactt aaaaaaata aaatgtccag	1320
aactgggaaa aattgatctt gccagctgta attcatggta gaaaagaagt gctcaggcta	1380
cttttcaaca aaggagcaga tgtaaaactac atctttgaaa gaaatggaaa atcatatact	1440
gttttggaat tgattaaaga aagtactct gagacacaaa agaggtagct gaagtggtag	1500
tctcaaaagc ttcccggtt aattaattag ttattagaca aggtgaaaac gaaactattt	1560
gtagcttaat taattagagc ttctttattc tatacttaaa aagtgaaaat aaatacaaaag	1620
gttcttgagg gttgtgttaa attgaaagcg agaaataatc ataaattatt tcattatcgc	1680
gatatccgtt aagtttgtat cgtaatgggt cctcaagctc tctgtttgt accccttctg	1740
gtttttccgt tgtgttttg aaaattccct atttacacaa tcccagacaa gcttgggtccc	1800
tggagccccg ttgacataca tcacctcagc tgoccaaaca atttggtagt ggaggacgaa	1860
ggatgcacca acctgtcagg gttctctac atggaaacta aagttggata catcttagcc	1920
ataaaaaatga acgggttcac ttgcacaggc gttgtgacgg aggctgaaac ctacactaac	1980
ttcgttggtt atgtcacaa cacgttcaaa agaaagcatt tccgccaac accagatgca	2040

tgtagagccg cgtacaactg gaagatggcc ggtgacccca gatatgaaga gtctctacac 2100  
 aatccgtacc ctgactaccg ctggcttcga actgtaaaaa ccaccaagga gtctctcggtt 2160  
 atcatatctc caagtgtage agatttggac ccatatgaca gatcccttca ctcgaggggtc 2220  
 ttccctagcg ggaagtgtc aggagtagcg gtgtcttcta cctactgtc cactaaccac 2280  
 gattacacca tttggatgcc cgagaatccg agactaggga tgtcttgtga catttttacc 2340  
 aatagtagag ggaagagagc atccaaaggg agtgagactt gcggctttgt agatgaaaga 2400  
 ggcctatata agtcttttaa aggagcatgc aaactcaagt tatgtggagt tctaggactt 2460  
 agacttatgg atggaacatg ggtcgcgatg caaacatcaa atgaaaccaa atgggtgccct 2520  
 cccgatcagt tggatgaacct gcacgacttt cgtcagacg aaattgagca ccttggttga 2580  
 gaggagttagg tcaggaagag agaggagtgt ctggatgcac tagagtccat catgacaacc 2640  
 aagtcagtga gtttcagacg tctcagtcac ttaagaaaac ttgtccctgg gtttggaaaa 2700  
 gcatatacca tattcaaca gacctgatg gaagccgatg ctactacaa gtcagtcaga 2760  
 acttggaaatg agatcctccc ttcaaaaggg tgtttaagag ttgggggggag gtgtcatcct 2820  
 catgtgaacg ggggtgtttt caatggtata atattaggac ctgacggcaa tgtcttaatc 2880  
 ccagagatgc aatcatccct cctccagcaa catatggagt tgttggaaac ctcggttacc 2940  
 ccccttgtgc accccctggc agaccgtct accgttttca aggacgggtga cgaggctgag 3000  
 gattttgttg aagtccacct tcccgatgtg cacaatcagg tctcaggagt tgacttgggt 3060  
 ctcccgaact gggggaagta tgtattactg agtgcagggg cctgactgc cttgatgttg 3120  
 ataattttcc tgatgacatg ttgtagaaga gtcaatcgat cagaacctac gcaacacaat 3180  
 ctgagaggga caggaggga ggtgtcagtc actccccaaa gcgggaagat catatcttca 3240  
 tgggaatcac acaagagtgg gggtagagacc agactgtga 3279

<210> 24

<211> 3279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плечо C5R vCP3012

<400> 24

gctataaata tgcattggaa aaataatcca tttaaagaaa ggattcaaact actacaaaac 60  
 ctaagcgata atatgttaac taagcttatt cttacgacg ctttaaatat acacaaataa 120  
 acataatttt tgtataacct aacaaataac taaaacataa aaataataaa aggaaatgta 180  
 atatcgtaat tattttactc aggaatgggg ttaaataattt atatcacgtg tatatctata 240  
 ctgttatcgt atactcttta caattactat tacgaatatg caagagataa taagattacg 300  
 tatttaagag aatcttgtca tgataattgg gtacgacata gtgataaatg ctatttgcga 360

tcgttacata aagtcagttg gaaagatgga tttgacagat gtaacttaat aggtgcaaaa	420
atgttaaata acagcattct atcggaagat aggataccag ttatattata caaaaatcac	480
tggttgata aaacagattc tgcaatatcc gtaaaagatg aagattactg cgaatttgta	540
aactatgaca ataaaaagcc atttatctca acgacatcgt gtaattcttc catgttttat	600
gtatgtgttt cagatattat gagattacta taaacttttt gtatacttat attccgtaaa	660
ctatattaat catgaagaaa atgaaaaagt atagaagctg ttcacgagcg gttgttgaaa	720
acaacaaaat tatacattca agatggctta catatacgtc tgtgaggcta tcatggataa	780
tgacaatgca tctctaaata ggttttttga caatggatcc gaccctaaca cggaatatgg	840
tactctacaa tctcctcttg aaatggctgt aatgttcaag aataccgagg ctataaaaat	900
cttgatgagg tatggagcta aacctgtagt tactgaatgc acaacttctt gtctgcatga	960
tgcggtgttg agagacgact acaaaatagt gaaagatctg ttgaagaata actatgtaaa	1020
caatgttctt tacagcggag gctttactcc tttgtgtttg gcagcttacc ttaacaaagt	1080
taatttggtt aaacttctat tggctcattc ggcgatgta gatatttcaa acacggatcg	1140
gttaactcct ctacatatag ccgtatcaaa taaaatttta acaatgggta aacttctatt	1200
gaacaaaggt gctgatactg acttgctgga taacatggga cgtactcctt taatgatcgc	1260
tgtacaatct ggaaatatgg aaatatgtag cacactactt aaaaaaata aaatgtccag	1320
aactgggaaa aattgatctt gccagctgta attcatggta gaaaagaagt gctcaggcta	1380
cttttcaaca aaggagcaga tgtaaaactac atctttgaaa gaaatggaaa atcatatact	1440
gttttggaat tgattaaaga aagttactct gagacacaaa agaggtagct gaagtggtag	1500
tctcaaaagc ttcccgggtt aattaattag ttattagaca aggtgaaaac gaaactattt	1560
gtagcttaat taattagagc ttctttattc tatacttaaa aagtgaaaat aaatacaaag	1620
gttcttgagg gttgtgttaa attgaaagcg agaaataatc ataaattatt tcattatcgc	1680
gatatccgtt aagtttgtat cgtaatgggt cctcaagctc tcctgtttgt accccttctg	1740
gtttttccgt tgtgttttgg aaaattccct atttacacaa tcccagacaa gcttgggtccc	1800
tggagcccga ttgacatata tcacctcagc tgcccaaaca atttggtagt ggaggacgaa	1860
ggatgcacca acctgtcagg gttctcttac atggaactta aagttggata catcttagcc	1920
ataaaaaatga acgggttcac ttgcacaggc gttgtgacgg aggctgaaac ctacactaac	1980
ttcgttgggt atgtcacaaac cacgttcaaa agaaagcatt tccgccaac accagatgca	2040
tgtagagccg cgtacaactg gaagatggcc ggtgacccca gatatgaaga gtctctacac	2100
aatccgtacc ctgactaccg ctggcttcga actgtaaaaa ccaccaagga gtctctcggt	2160
atcatatctc caagtgtagc agatttggac ccatatgaca gatcccttca ctcgagggtc	2220

ttccctagcg ggaagtgctc aggagtagcg gtgtcttcta cctactgctc cactaaccac 2280  
 gattacacca tttggatgcc cgagaatccg agactaggga tgtcttgtga catttttacc 2340  
 aatagtagag ggaagagagc atccaaaggg agtgagactt gcggccttgt agatgaaaga 2400  
 ggcctatata agtcttttaa aggagcatgc aaactcaagt tatgtggagt tctaggactt 2460  
 agacttatgg atggaacatg ggtcgcgatg caaacatcaa atgaaaccaa atgggtgcct 2520  
 cccgatcagt tggatgaacct gcacgacttt cgcacagacg aaattgagca ccttggtgta 2580  
 gaggagtgg tcaggaagag agaggagtgt ctggatgcac tagagtccat catgacaacc 2640  
 aagtcagtga gtttcagacg tctcagtcac ttaagaaaac ttgtccctgg gtttgaaaaa 2700  
 gcatatacca tattcaacaa gaccttgatg gaagccgatg ctactacaa gtcagtcaga 2760  
 acttggaatg agatcctccc ttcaaaaggg tgtttaagag ttgggggggag gtgtcatcct 2820  
 catgtgaacg ggggtgtttt caatgggtata atattaggac ctgacggcaa tgtcttaatc 2880  
 ccagagatgc aatcatcctt cctccagcaa catatggagt tgttggaaac ctcggttatc 2940  
 ccccttgtgc acccctggc agaccgtct accgttttca aggacggtga cgaggctgag 3000  
 gattttgttg aagttcacct tcccgatgtg cacaatcagg tctcaggagt tgacttgggt 3060  
 ctcccgaact gggggaagta tgtattactg agtgcagggg ccctgactgc cttgatgttg 3120  
 ataattttcc tgatgacatg ttgtagaaga gtcaatcgat cagaacctac gcaacacaat 3180  
 ctcagagggg cagggaggga ggtgtcagtc actccccaaa gcgggaagat catatcttca 3240  
 tgggaatcac acaagagtgg gggtagagacc agactgtga 3279

<210> 25  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер C5R.1R

<400> 25  
 ctcttgcata ttcgtaatag taattg 26

<210> 26  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер C5R.1F

<400> 26  
 attctatcgg aagataggat accag 25

<210> 27  
 <211> 25

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C5R.2R  
  
 <400> 27  
 tcaacaaccg ctctgaaca gcttc 25

<210> 28  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C5R.2F  
  
 <400> 28  
 atgcacaact tcttgtctgc atgatg 26

<210> 29  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C5R.3R  
  
 <400> 29  
 tacggctata tgtagaggag ttaacc 26

<210> 30  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C5R.3F  
  
 <400> 30  
 ctctgagaca caaaagaggt agctg 25

<210> 31  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C5L.1F  
  
 <400> 31  
 catcatgagc aacgcgtag tatat 25

<210> 32  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер C5L.1R  
  
 <400> 32  
 ttagaaatta tgcattttag a 21  
  
 <210> 33  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C5L.2R  
  
 <400> 33  
 ggagatacct ttagatatgg atctg 25  
  
 <210> 34  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C5L.3R  
  
 <400> 34  
 ttgtaaccat agtatatctt agcgc 25  
  
 <210> 35  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер 7634CXL-F  
  
 <400> 35  
 gttctcgtag gagagaacta ttgac 25  
  
 <210> 36  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер 7635CXL-R  
  
 <400> 36  
 cgtcttcagc tgtaaacaaa tataatg 27  
  
 <210> 37  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер CP65.1F

<400> 37  
 atggttcctc aggcctcctc gtttg 25

<210> 38  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер CP65.1R

<400> 38  
 tcacagtctg gtctcasscc cactc 25

<210> 39  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер CP65.2R

<400> 39  
 gaccatgtt ccatccataa 20

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

<220>  
 <223> праймер CP65.3F

<400> 40  
 gtctcasscc cactcttggtg tg 22

<210> 41  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер CP65.4F

<400> 41  
 gaaaacggta gacgggtctg 20

<210> 42  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер C3R.1F

<400> 42  
 catagcttta tgtaaaggag tat 23



<210> 43  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C3R.2F  
  
 <400> 43  
 tgtaatgggg ttttacctaa 20

<210> 44  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C3R.3F  
  
 <400> 44  
 gctttatgaa gaggaggatt tt 22

<210> 45  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C3R.4F  
  
 <400> 45  
 gcattcagca gaacatttct 20

<210> 46  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C3L.1F  
  
 <400> 46  
 tagttactct cgtatggcgt 20

<210> 47  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C3L.1R  
  
 <400> 47  
 atcagtaacg tatagcatatc g 21

<210> 48  
 <211> 25

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C3L.2R  
  
 <400> 48  
 tacatatttc taatgttaac atatt 25  
  
  
 <210> 49  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер I3L.1F  
  
 <400> 49  
 ggatccctcg agatgagata 20  
  
  
 <210> 50  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер RabG.PF  
  
 <400> 50  
 atagcttgta tgctttttat ttgat 25  
  
  
 <210> 51  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер RabG.PR  
  
 <400> 51  
 gaacagcagg gcctggggca ccatg 25  
  
  
 <210> 52  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер RabG.1F  
  
 <400> 52  
 gtgaaaacca csaaggagtc 20  
  
  
 <210> 53  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер RabG.1R  
  
 <400> 53  
 ttctgttcac cctccggcag 20  
  
 <210> 54  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер RabG.2R  
  
 <400> 54  
 tgggtgaagat gtcgcagctc atgcc 25  
  
 <210> 55  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер RabG.2F  
  
 <400> 55  
 accассаага gcgtgtcctt 20  
  
 <210> 56  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер RabG.3F  
  
 <400> 56  
 ttctctgatga cctgctgccg ga 22  
  
 <210> 57  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C6R.1F  
  
 <400> 57  
 gttctaaagt tctttcctcc 20  
  
 <210> 58  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер C6R.2F

<400> 58  
tctttcatat cttgtagata aga 23

<210> 59  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер C6R.3F

<400> 59  
tgaagggggtt gatggaataa 20

<210> 60  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер C6L.1R

<400> 60  
ctatcaaaaag tcttaatgag ttagg 25

<210> 61  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер OX40L.1F

<400> 61  
atggaaggag tacaaccatt agatc 25

<210> 62  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер C5R.1R

<400> 62  
ttaataagca caaaatccac cagga 25

<210> 63  
<211> 183  
<212> белок  
<213> Felis catus

<400> 63

Met Glu Gly Val Gln Pro Leu Asp Glu Asn Val Gly Asn Ala Pro Gly  
1 5 10 15

032389

Arg Arg Phe Gln Ser Asn Lys Leu Leu Leu Val Thr Ala Val Ile Gln  
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Tyr  
35 40 45

Ala Ser Gln Val Pro Pro Gln Tyr Pro Pro Ile Gln Ser Ile Lys Val  
50 55 60

Gln Phe Thr Lys Cys Gly Asn Gly Thr Gly Cys Ile Ile Thr Ser Pro  
65 70 75 80

Asn Lys Asp Glu Thr Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Ile Ile Ile Asn  
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Glu Glu  
100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Gly Arg Lys Pro Leu Phe Ser  
115 120 125

Leu Ser Lys Val Lys Ser Val Asp Ser Ile Gly Val Ala His Leu Ala  
130 135 140

Phe Lys Asp Lys Val Tyr Phe Asn Val Thr Thr His Asn Thr Ser Tyr  
145 150 155 160

Lys Asp Ile Gln Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Val Ile Leu Gln Asn  
165 170 175

Pro Gly Gly Phe Cys Val Leu  
180

<210> 64

<211> 183

<212> белок

<213> Equus caballus

<400> 64

Met Glu Gly Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Arg Arg Phe Gln Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Thr Ser Ile Ile Gln  
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Thr Tyr Val Cys Leu His Phe Tyr  
35 40 45

032389

Thr Ser Gln Val Pro Ser Gln Tyr Pro Pro Ile Gln Ser Ile Arg Val  
50 55 60

Gln Phe Thr Ser Cys Glu Asn Glu Lys Gly Phe Ile Ile Thr Ser Pro  
65 70 75 80

Asn Gln Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Ile Ile Ile Asn  
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu  
100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu His Tyr Arg Lys Gly Arg Glu Pro Leu Ser Ser  
115 120 125

Leu Ser Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Ile Met Val Ala Tyr Leu Ala  
130 135 140

Phe Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr His Asn Thr Ser Cys  
145 150 155 160

Asp Asp Ile Gln Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn  
165 170 175

Pro Gly Gly Phe Cys Ala Tyr  
180

<210> 65  
<211> 182  
<212> белок  
<213> Bos taurus

<400> 65

Met Glu Gly Val Gln Pro Leu Asp Glu Asn Val Gly Asn Val Pro Gly  
1 5 10 15

Arg Arg Phe Leu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Ile Ile Gln  
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Tyr  
35 40 45

Ala Gln Val Pro Ser Gln Tyr Pro Pro Ile Gln Ser Ile Arg Val Gln  
50 55 60

Phe Thr Lys Cys Glu Asn Glu Asn Gly Phe Ile Ile Thr Ser Pro Asp  
65 70 75 80

032389

Ala Asp Gly Thr Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Ile Ile Ile Thr Cys  
85 90 95

Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Leu  
100 105 110

Ser Leu Arg Leu Leu Tyr Arg Lys Gly Arg Glu Pro Leu Phe Ser Leu  
115 120 125

Asn Met Val Lys Ile Val Asp Ser Val Thr Val Ala Tyr Leu Arg Phe  
130 135 140

Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Met Thr Thr Gln Asn Ala Ser Cys Glu  
145 150 155 160

Asp Ile Gln Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro  
165 170 175

Gly Gly Phe Cys Val Tyr  
180

<210> 66

<211> 182

<212> белок

<213> sus scrofa

<400> 66

Met Glu Gly Val Gln Pro Leu Asp Glu Asn Val Gly Asn Ala Pro Gly  
1 5 10 15

Arg Arg Leu Leu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln  
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Thr Tyr Ile Cys Leu His Leu Tyr  
35 40 45

Ala Gln Val Pro Ser Gln Tyr Pro Pro Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln  
50 55 60

Phe Thr Lys Cys Glu Asn Asp Asn Gly Phe Ile Ile Thr Pro Ser Ser  
65 70 75 80

Lys Asp Gly Thr Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Ile Ile Ile Asn Cys  
85 90 95

Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Leu  
100 105 110

032389

Ser Leu Met Leu Gln Tyr Arg Lys Gly Arg Lys Pro Leu Phe Ser Leu  
115 120 125

Asn Lys Val Lys Ser Val Asp Ser Val Thr Val Ala Asp Leu Ala Phe  
130 135 140

Lys Asp Lys Val Phe Leu Asn Val Thr Thr His Ser Ala Ser Cys Glu  
145 150 155 160

Asp Ile Gln Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro  
165 170 175

Gly Gly Phe Cys Val Tyr  
180

<210> 67  
<211> 183  
<212> белок  
<213> pan troglodytes

<400> 67

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg  
1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln  
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser  
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val  
50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln  
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Val Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn  
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu  
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln  
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr  
130 135 140



032389

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu  
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn  
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu  
180

<210> 68

<211> 5049

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плазмида p397-cOX40L (pC6 42Kp cOX40L)

<400> 68

```

ggaaattgta aacgttaata ttttggttaa attcgcgtta aatttttggt aaatcagctc      60
attttttaac caataggccg aaatcggtcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga      120
gatagggttg agtgttggtc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc      180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc      240
ctaatacagt tttttggggt cgaggtgccc taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag      300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc gggaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa      360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac      420
cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cgccattcgc cattcaggct      480
gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgc ggccctcttc ctattacgcc agctggcgaa      540
agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca ggggtttccc agtcacgacg      600
ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtacctt      660
cataaatata agtttgatta aacttaagtt gttctaaagt tctttcctcc gaaggtatag      720
aacaagtat ttcttctaca tccttactat ttattgcagc ttttaacagc ctatcacgta      780
tcctattttt agtattggta gaacgtttta gttctaaagt taaaatatta gacataattg      840
gcatattgct tattccttgc atagttgagt ctgtagatcg tttcagtata tcaactgatta      900
atgtactact gttatgatga aatatagaat cgatattggc atttaactgt tttgttatac      960
taagtctaga ttttaaatct tctagtaata tgctatttta tataaaagct tccacgtttt     1020
tgtatacatt tctttccata ttagtagcta ctactaaatg attatcttct ttcatatctt     1080
gtagataaga tagactatct ttatctttat tagtagaaaa tacttctggc catacatcgt     1140
taaatttttt tggtgttggt agatataata ttaaatatct agaggatcct attatttgtg     1200
gtaaaatggt tatagagtaa aatgatctgg ctattaaaca taggccagtt accatagaat     1260

```

gctgcttccc gttacagtgt tttaccataa ccatagatct gcctgtattg ttgatacata	1320
taacagctgt aaatcctaaa aaattcctat cataattatt aatattaggt aattcatttc	1380
catgtgaaag atagactaat tttatatect ttacctccaa ataattattht acatctctta	1440
aacaatctat tttaatatca ttaactggta ttttataata tccagaaagg tttgaagggg	1500
ttgatggaat aagtctatta acatcggtta gtaaattatt aatatcatga atctttatta	1560
tattataccc ataagttaaa tttatattta ctttctcatc atctgactta gttagtttgt	1620
aataagggtgt gtctgaaaaa attaaaagggt aattcggttg atgaagctgt atttgctgta	1680
tcattttttat ctaatttttg agatttagca gtacttactt cattagaaga agaatctgcc	1740
agttcctgtc tattactgat atttcgtttc attattatat gatttatatt ttactttttc	1800
aattatatat actcatttga ctagttaatc aataaaaaga attctcaaaa ttgaaaatat	1860
ataattacaa tataaaatgg aaggagtaca accattagat caaatgttg gaaatacacc	1920
aggaagaaga tttcaaaaaa ataaagtatt attagtagca gcaataattc aaggtttagg	1980
attattatta tgttttacat atatatgttt acacttttat gcactcaag taccacctca	2040
atatccacct atacaaagta taagagttca gtttacaaga tgtgaaaatg aaaaagggtg	2100
tattattaca tctccaagta aagatgaaac tatgaaagta caagataatt caataatcat	2160
aaattgtgat ggtttttact taattagttt aaaaggatat ttttcagaag aattatcatt	2220
atctttatat tatagaaaag gtagaggacc tttattttct ttatcaaaag taacatcagt	2280
tgattctatt ggagttgcat atttggtttt taaagataaa gtatatthta atgttacaac	2340
tcattctact agttataaag atatacaagt aaatgggtgg gaattaatat taatacatca	2400
aaatcctggg ggattttgtg cttattaatt tttatcccg gtttttatag ctaattagtc	2460
atthttcgta agtaagtatt tttatttaat actthttatt gtacttatgt taaatataac	2520
tgatgataac aaaatccatt atgtattatt tataactgta atthctthtag cgtagttaga	2580
tgtccaatct ctctcaaata catcggtat cthtttagtg agattttgat ctatgcagtt	2640
gaaacttatg aacgcgtgat gattaaaatg tgaacgtcc aaatttgcag tcattatatg	2700
agcgatatcta ttatctacta tcatcatctt tgagttatta atatcatcta cthttagaatt	2760
gataggaaat atgaatacct ttgtagtaat atctatacta tctacacct actcattaag	2820
actthtgata ggcgcccgcg agctccagct tttgttccct ttagtgaggg ttaattccga	2880
gcttgccgta atcatggcca tagctgtthc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc	2940
cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgaagt	3000
aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgctthcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc	3060
agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt	3120
ccgcttctc gctcactgac tgcgtgcgt ccgtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag	3180

ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca	3240
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg ctggcggtttt	3300
tccataggct ccgccccct gacgagcacc aaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc	3360
gaaacccgac aggactataa agataaccagg cgtttccccc tggaaagctcc ctcggtgcgct	3420
ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg	3480
tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca	3540
agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact	3600
atcgctttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta	3660
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta	3720
actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct	3780
tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggg agcgggtggtt	3840
tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga	3900
tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttgggtca	3960
tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ttaaaaatga agttttaaat	4020
caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg	4080
cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactc cccgctggt	4140
agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag	4200
accacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc	4260
gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag	4320
ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tggtgccatt gctacaggca	4380
tcgtggtgtc acgctcgctg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa	4440
ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga	4500
tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat gggttatggca gcaactgcata	4560
attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca	4620
agtcattctg agaatagtgt atgccccgac cgagttgctc ttgccccgag tcaatacggg	4680
ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg	4740
ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg	4800
cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag	4860
gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac	4920
tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca	4980
tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag	5040

tgccacctg

5049

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 7865

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Плазмида p397-Syn Rabies G (pC3 I3Lp Syn Rabies G)

&lt;400&gt; 69

agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt	60
ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc	120
taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc	180
cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct	240
tccgcttcct cgcctcactga ctgcgtgcgc tcggctgttc ggctgcggcg agcggtatca	300
gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac	360
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt	420
ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg	480
cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc	540
tctcctgttc cgacctgce gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcggaagc	600
gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc	660
aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	720
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	780
aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct	840
aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc	900
ttcgaaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt	960
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg	1020
atcttttcta cggggtctga cgctcagtggt aacgaaaact cacgttaagg gatttttggtc	1080
atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa	1140
tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag	1200
gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg	1260
tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga	1320
gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag	1380
cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa	1440
gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc	1500
atcgtggtgt cagcctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca	1560

aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg 1620  
 atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 1680  
 aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcctttctg tgactgggtga gtactcaacc 1740  
 aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg 1800  
 gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg 1860  
 gggcgaaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 1920  
 gcacccaact gatcttcage atcttttaact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaaca 1980  
 ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aataactcata 2040  
 ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac 2100  
 atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa 2160  
 gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 2220  
 atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg 2280  
 cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt 2340  
 cagggcgcggt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcacagag 2400  
 cagattgtac tgagagtga ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga 2460  
 aaataccgca tcaggcgcca ttcgccatc aggtgcgca actgttggga agggcgatcg 2520  
 gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta 2580  
 agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtc cgcggttgta aaacgacggc cagtgaatta 2640  
 attcgagctc ttatactac tgggttacia cagctgggtga taacagaatg taaatcatta 2700  
 ttacttaata gttccattat tatatgtttg atatctatag gtaacctacc tattattcct 2760  
 agattcttac tctcttttac agctttaact attagctgat gtctatgaaa agctaagat 2820  
 ttatttttcc gtattaattc cctatatata cgtatacatg caggtatctt attactcta 2880  
 ggattagtta cgaactttac cataagatct atgttattgt caagaaagat attaaaagaa 2940  
 tatatagaat ttaactttat atgtgttata acatctagtt ctttttcgca tgattctttt 3000  
 atagatagta gtcttttatt actgtttata tgttccatgt ttactataaa accttctgaa 3060  
 ttagctatct caggatcttt agatattctt aacatcattt tagatattat cataatagct 3120  
 atcttgtcat ctaaaaagct aacacaagtt agaggcgtat taccgtgatt atttagagaa 3180  
 ttatagtcgg cgttataaga taaaagtaat tttatattat taaaactatt agataacata 3240  
 gctttatgta aaggagtatt tccagataac ttagcttttag catttacgta agcaccggtg 3300  
 tcaagtaaga gtttaacaaa ttctgttttc atagaactaa ctgccatgta tagaggagtg 3360  
 aaacctttat gattatagac gtttacatag caaccatata ataagatcgc attcagtata 3420

ttaatatctt	tcatttctat	agctatgtga	ataacatggt	tatctaatacc	taccaacttt	3480
gtatcagtac	cgtacttcag	taataagttt	actatagttt	tgtttttaga	tgcaacagct	3540
atatttagaa	cggtatctat	atgattatta	accacattaa	cattagatcc	tctttctaaa	3600
agtgtctttg	ttgtttcgat	atcgttacgt	gaaacagegt	aatgtaaggg	actgcccata	3660
cagtcaccta	ttacgtttat	atcagctcct	agatttaaca	gaagtgctgt	tacatctttt	3720
cttctattaa	ttaccgaatg	atgtaatggg	gttttaccta	aatcatcttg	ttcgtttata	3780
ggcactccgt	gatttataag	taacgctatt	atatcgtaac	tacaattatt	tttaagtgcc	3840
tttatgagat	actgtttatg	caaaaataaa	cttttatcta	ttttaatact	attatctaac	3900
aatatcctaa	ttaaatctat	attcttatac	tttatagcgt	aatgtaacgg	agtttcaaaa	3960
tttctagttt	gtatattaag	atcaatatta	aaatctataa	atattttata	catatcatca	4020
gatatcttat	catacagtac	atcgtaataa	tttagaaaga	atctattaca	attaacacct	4080
ttttttaata	aatatctagt	taatgaacta	ttgtttctat	atacagaaat	atataacgga	4140
ctatttccag	aatgtatctg	ttctatgtca	gogccagaat	ctattagtag	tttagcaatt	4200
tctgtattat	ctaaactagc	agctttatga	agaggaggat	ttttacattt	taaaatatcg	4260
gcaccgtggt	ctagtaataa	ttttaccatt	tctatatcag	aaatacttac	ggctaaatac	4320
aaagacgttg	atagtatatt	tacgttattg	tatttgcatt	ttttaagtat	ataccttact	4380
aaatttatat	ctctatacct	tatagcttta	tgcagttcat	ttataagtct	tccattactc	4440
atctctggta	atgaagtatt	atatatcatt	atgatattat	ctctatttta	ttctaataaa	4500
aaccgttatc	atgttattta	ttatttggtta	taattatact	atttaataaa	ttataccaaa	4560
tacttagata	cttattaata	ccatcctaga	acttgatatt	cttgccccct	aaacttggac	4620
atgcactcca	ttaggcggtt	cttgttttcg	acatcgctct	ccttaacata	tcctactggt	4680
atgtgaggat	tccacggatt	atctactgtg	atatcaccaa	acacgtcctt	cgaacagggt	4740
accgcattca	gcagaacatt	tcttaggggt	ctaagttcat	cagatacctc	cagtttcata	4800
actacagcgc	atcctttcgc	tcccaactgt	ttagaggcgt	tactctgagg	aaaacacatc	4860
tcttctttac	agactataga	aatagtctgt	aaatcttgat	cagttatttg	ctttttgaaa	4920
ttttcaaate	tatcacattg	atccatattt	gtatttccaa	gagttatatg	aggaaaaata	4980
tcacatcctg	tcattgtattt	tattgtaaca	ttattataat	ctgtaacatc	agtatctaac	5040
ctaacgtcgt	aaaagttaac	agatgccag	ttactataat	cccaaggaac	cctaacatct	5100
aatcccatta	aaatagtatc	ctttctacta	tttttttcat	tggcaagtat	gtggcttagt	5160
ttacacaaaa	ttcctgccat	tttgtaacga	tagcgaagca	atagcttgta	tgttttttat	5220
ttgattaact	agtcataaaa	atcgggatcc	ctcgagatga	gataaagtga	aaatatatat	5280
cattatatta	caaagtacaa	ttatttaggt	ttaatcatgg	tgccccaggc	cctgctgttc	5340

gtgccccctgc tgggtgttccc cctgtgcttc ggcaagttcc ccatctacac catccccgac	5400
aagctggggcc cctggagccc catcgacatc caccacctga gctgccccaa caatctggtg	5460
gtggaggatg agggctgcac caatctgagc ggcttcagct acatggagct gaaagtgggc	5520
tacatcctgg ccatcaagat gaacggcttc acctgcaccg gcgtggtgac cgaggccgag	5580
acctacacca actttgtggg ctacgtgacc accaccttca agcgggaagca cttcagacct	5640
acccccgacg cctgcagagc cgcctacaac tggaagatgg ccggcgaccc tagatacgag	5700
gagagcctgc acaacccta ccccgactac agatggctgc ggaccgtgaa aaccaccaag	5760
gagtccttgg tgatcatcag ccctagcgtg gccgatctgg acccctacga cagaagcctg	5820
cacagcagag tgttccctag cggcaagtgc agcggcgtgg ccgtgtccag cacctactgc	5880
agcaccaacc acgactacac catctggatg cccgagaacc ctagactggg catgagctgc	5940
gacatcttca ccaacagccg gggcaagaga gccagcaagg gcagcgagac ctgcggcttc	6000
gtggacgaga gaggcctgta caagagcctg aagggcgccct gcaagctgaa gctgtgcggc	6060
gtgctggggcc tgagactgat ggacggcacc tgggtggcca tgcagaccag caacgagacc	6120
aagtgggtgcc ctctgacca gctggtgaac ctgcacgact tccggagcga tgagatcgag	6180
cacctgggtg tggaagagct ggtgcggaag agagaggagt gcctggacgc cctggagagc	6240
atcatgacca ccaagagcgt gtccttccgg agactgagcc acctgagaaa gctggtgccc	6300
ggctttggca aggcctacac aatcttcaac aagacctga tggaggccga tgcccactac	6360
aagtctgtgc ggacctggaa cgagatcctg cctagcaagg gctgcctgag agtgggcggc	6420
agatgccacc cccacgtgaa cggcgtgttc ttcaacggca tcatcctggg ccctgacggc	6480
aacgtgctga tcctgagat gcagagcagc ctgctgcagc agcacatgga actgctggag	6540
agcagcgtga tccccctggt gcacccccctg gccgacccca gcaccgtgtt caaggatggc	6600
gacgaggccg aggacttcgt ggaggtgcac ctgcccgatg tgcacaacca ggtgtccggc	6660
gtggacctgg gcctgccccaa ctggggcaag tacgtgctgc tgagcgccgg agccctgacc	6720
gccctgatgc tgatcatctt cctgatgacc tgctgccgga ggggtgaacag aagcgagccc	6780
accagcaca acctgagagg caccggcaga gaggtgtccg tgacccccca gagcggcaag	6840
atcatcagca gctgggagag ccacaagagc ggcggagaga ccagactatg atttttatgc	6900
ccgggttttt atagctaatt agtcaaagt gagttaatat tagtatacta cattactaat	6960
ttattacata ttcatttata tcaatctagt agcatttagc ttttataaaa caatataact	7020
gaatagtaca tactttacta ataagttata aataagagat acatatttat agtattttac	7080
tttctacact gaatataata atataattat acaaatataa tttttaatac tatatagtat	7140
ataactgaaa taaaatacca gtgtaatata gttattatac atttatacca catcaaagat	7200

gagttataac atcagtggtca ctggttagcaa cagtagttat acgatgagta gttactctcg 7260  
 tatggcggtta gtatgtatgt atcttctagt tttcttagta ggcattatag gaaacgtcaa 7320  
 gcttataagg ttattaatgg tatctagaaa tatatctatt ataccgtttc tcaacttggg 7380  
 aatagccgat ttgctgtttg tgatattcat acctttatac attatataca tactaagtaa 7440  
 tttccattgg cattttggta aagcactttg taaaattagt tctttctttt ttacttctaa 7500  
 catgtttgca agtatatttt taataactgt aataagcgta tatagatatg taaaaattac 7560  
 ccttcctgga tttacctata aatatgttaa cattagaaat atgtacatta ctatatTTTT 7620  
 catatggatt atttctatta tactagggat tctgtctctt tacttttagaa atactatcgt 7680  
 aacaaaaaat aacgacacgc tgtgtattaa tcattatcat gataatagag aaattgctga 7740  
 attgatttac aaagttatta tctgtatcag atttatttta ggatacctac tacctacgat 7800  
 aattatactc gtatgctata cgttactgat ctacagaact aacaatgcat gtcgacgcgg 7860  
 ccgca 7865

<210> 70

<211> 235

<212> белок

<213> Gallus gallus

<400> 70

Met Met Val Cys Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gln Ala Arg Pro Ala Gly  
1 5 10 15

Asp Cys Gly Pro Pro Val Leu Leu Val Pro Ala Leu Leu Val Glu Met  
20 25 30

Glu Gly Gln Pro Asp Thr Glu Leu Lys Lys His Thr Asp Gln Lys Asp  
35 40 45

Cys Glu Lys Glu Pro Ala Gly Met Arg Ser Asp Asp Glu Trp Arg Gly  
50 55 60

Trp Gln Lys Gly Gln Ala Lys Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Val Ser Ala  
65 70 75 80

Ala Thr Gln Trp Ile Leu Leu Leu Ala Cys Leu Ile Tyr Leu Gly Thr  
85 90 95

Asp Ser Leu Gln Leu Trp Thr Pro His Ser Asp Lys Val Lys Trp Thr  
100 105 110

Tyr Ile Arg Tyr Thr Gly Gln Ser Ile Ala Gly Val Ala Met Asn Leu  
115 120 125



032389

Ser Ala Glu Phe Thr Ser Ile Pro Val Ile Asn Gly Ser Ile Met Ile  
130 135 140

Pro Cys Asp Gly Leu Tyr Val Val Ser Leu Lys Gly Val Leu Ser Pro  
145 150 155 160

Asp Leu Glu Lys Ser Ser Leu Lys Leu Met Met Lys Asn Thr Glu Ser  
165 170 175

Lys Asn Ala Ala Pro Leu Trp Glu Arg Asp Val Gln Asn Ser Ser Asn  
180 185 190

Ala Val Asp Leu Ile Thr Met Leu Tyr Leu Phe Ala Gln Asn Asn Ile  
195 200 205

Ile Leu Ser Thr Ser Ser Asn Ala Thr Ile Gln Cys Leu Thr Phe Ser  
210 215 220

Leu Val Leu Leu Asn Pro Val Phe Cys Asn Pro  
225 230 235

<210> 71  
<211> 181  
<212> белок  
<213> Ovis aries

<400> 71

Met Glu Gly Val Gln Pro Leu Asp Glu Asn Val Gly Asn Ala Pro Gly  
1 5 10 15

Arg Arg Phe Leu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Ile Ile Gln  
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Tyr  
35 40 45

Ala Gln Val Pro Ser Gln Tyr Pro Pro Ile Gln Ser Ile Arg Val Arg  
50 55 60

Phe Thr Cys Glu Asn Glu Asn Gly Phe Ile Ile Thr Ser Pro Asp Ala  
65 70 75 80

Asp Gly Thr Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Ile Ile Ile Thr Cys Asp  
85 90 95

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Lys Leu Ser  
100 105 110

Leu Arg Leu Leu Tyr Arg Lys Gly Arg Glu Pro Leu Phe Ser Leu Asn  
115 120 125

Met Val Lys Ile Val Asp Ser Val Thr Val Ala Tyr Leu Arg Phe Lys  
130 135 140

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Gln Asn Ala Ser Cys Glu Asp  
145 150 155 160

Ile Gln Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly  
165 170 175

Gly Phe Cys Val Tyr  
180

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина против бешенства животных, содержащая:
  - а) экспрессионный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий и экспрессирующий *in vivo* в животном-хозяине:
    - i) полипептид G вируса бешенства и
    - ii) полипептид OX<sub>40</sub>L либо его вариант или фрагмент, которые способны усиливать иммунный ответ, вызванный гликопротеином G вируса бешенства, и которые происходят из того же вида, к которому принадлежит вакцинируемое животное; и
  - б) фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.
2. Вакцина по п.1, в которой указанный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид OX<sub>40</sub>L псовых, кошачьих, лошадиных, крупного рогатого скота, нежвачных парнокопытных, птиц, овец или приматов.
3. Вакцина по п.2, в которой полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12 (для псовых), SEQ ID NO:63 (для кошачьих), SEQ ID NO:64 (для лошадиных), SEQ ID NO:65 (для крупного рогатого скота) или SEQ ID NO:66 (для нежвачных парнокопытных), SEQ ID NO:70 (для птиц), SEQ ID NO:71 (для овец) или SEQ ID NO:67 (для приматов).
4. Вакцина по п.1 или 3, в которой животное является представителем псовых или кошачьих.
5. Вакцина по п.3, в которой полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность SEQ ID NO:12 (для псовых), SEQ ID NO:63 (для кошачьих), SEQ ID NO:64 (для лошадиных), SEQ ID NO:65 (для крупного рогатого скота) или SEQ ID NO:66 (для нежвачных парнокопытных), SEQ ID NO:70 (для птиц), SEQ ID NO:71 (для овец) или SEQ ID NO:67 (для приматов).
6. Вакцина по п.1 или 3, в которой полипептид G вируса бешенства кодируется последовательностью SEQ ID NO:5.
7. Вакцина по п.1 или 3, в которой полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.
8. Вакцина по п.7, в которой полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность SEQ ID NO:12.
9. Вакцина по п.1 или 3, в которой экспрессионный вектор является рекомбинантным поксвирусным вектором.
10. Вакцина по п.9, в которой вектор является поксвирусом канареек.
11. Вакцина по п.10, в которой вектор содержит последовательность SEQ ID NO:23.
12. Вектор для использования в составе вакцины против бешенства животных, содержащий полинуклеотид, кодирующий и экспрессирующий *in vivo* в животном-хозяине:
  - (а) полипептид G вируса бешенства и
  - (б) полипептид OX<sub>40</sub>L либо его вариант или фрагмент, которые способны усиливать иммунный ответ, вызванный гликопротеином G вируса бешенства, и которые происходят из того же вида, к которому принадлежит вакцинируемое животное.
13. Вектор по п.12, в котором полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12 (для псовых), SEQ ID NO:63 (для кошачьих), SEQ ID NO:64 (для лошадиных), SEQ ID NO:65 (для крупного рогатого скота), SEQ ID NO:66 (для нежвачных парнокопытных) или SEQ ID NO:71 (для овец).

14. Вектор по п.13, в котором полипептид OX<sub>40</sub>L имеет последовательность SEQ ID NO:12 (для псовых), SEQ ID NO:63 (для кошачьих), SEQ ID NO:64 (для лошадиных), SEQ ID NO:65 (для крупного рогатого скота), SEQ ID NO:66 (для нежвачных парнокопытных) или SEQ ID NO:71 (для овец).

15. Вектор по п.14, где животное является представителем псовых или кошачьих.

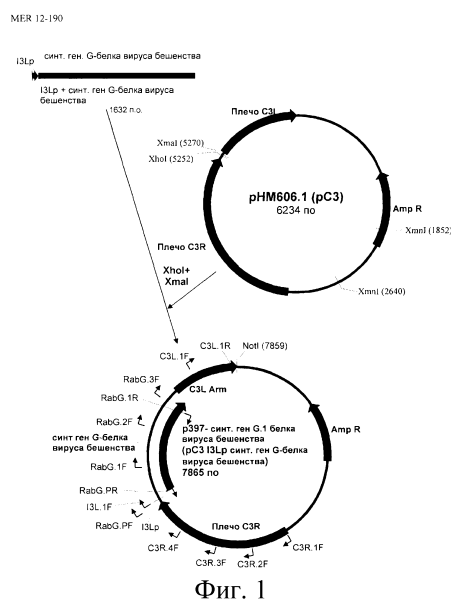
16. Вектор по п.15, где животное является представителем псовых.

17. Вектор по п.13 или 14, в котором полипептид G вируса бешенства кодируется последовательно-  
стью SEQ ID NO:5.

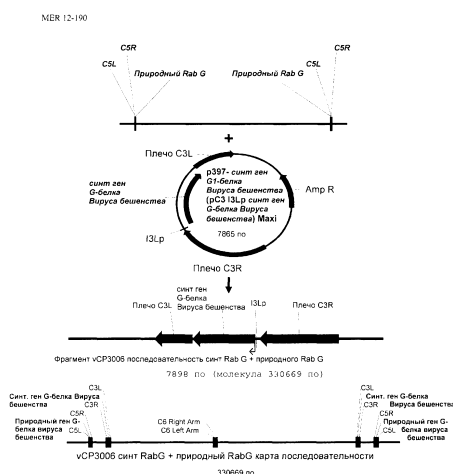
18. Вектор по п.13 или 14, в котором полинуклеотид кодирует полипептид G вируса бешенства, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, и полипептид OX<sub>40</sub>L, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.

19. Вектор по п.13 или 14, являющийся поксвирусным.

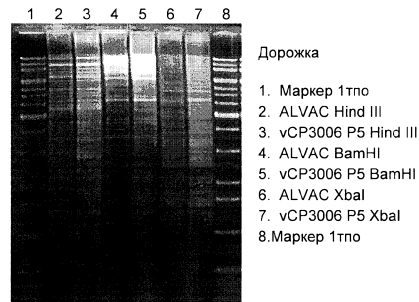
20. Способ вакцинации животных против бешенства, включающий введение животному по меньшей мере одной дозы вакцины по любому из пп.1-11.



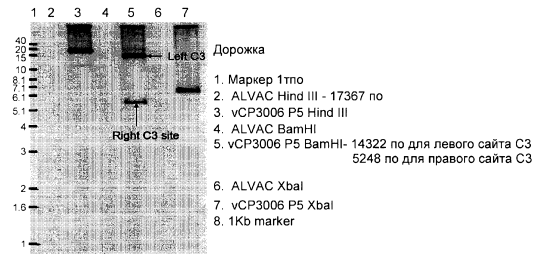
Фиг. 1



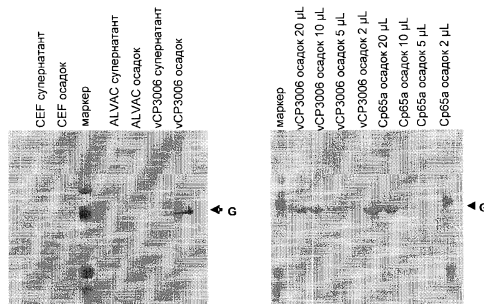
Фиг. 2



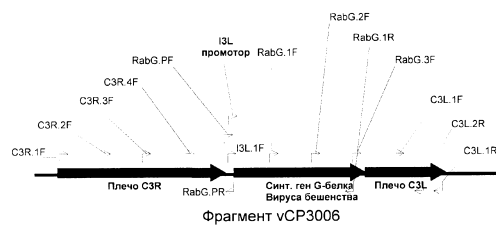
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

Ключ к последовательности фрагмента «СР1006» (полная последовательность представлена SEQ ID NO: 2):

1-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: правое плечо С3 (SEQ ID NO: 3)

1-й текст строчными: промотор I3L (SEQ ID NO: 4)

2-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: синтетический ген полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO: 5)

2-й текст строчными: правое плечо С3 (SEQ ID NO: 6)

Получена последовательность клонируемого вектора

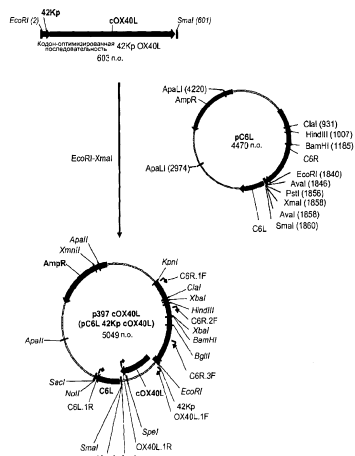
GCCTTATGAAGAGGAGGATTTTACATTTTAAATATCGGCACCGTGTCTAGTAATAATTTTAC  
CCATTTCTATATCAGAAATACCTACGGCTAAATACAAAGACGTTGATAGTATATTTACGTTATT  
GTATTTGCATTTTAAAGTATATACCTTACTAAATTTATATCTCTATACCTTATAGCTTTATGC  
AGTTCATTTATAAGTCTTCCATTACTCATTTCTGGTAAIAGAATATTATATATCATTTATGATA  
TATCTCTATTTATTCTAATAAAAAACCGTTATCATGTTATTTATTTGTTATAAATATATACTA  
TTAAATAAATTATACCAATACCTAGTATACCTTATTAATACCATCTAGAACTGTATTTCTTGC  
CCCCATAACTTGGACATGCACCTCCATTAGGCGTTCTTTGTTTCGACATCGTCCCTTAACAT  
ATCCCTACTGTATGTGAGGATTCCACGGATTACTACTGTGATATCAACAAACACGTCCTTCGA  
ACAGGGTACCGCATTCAGCAGAACTTTCTTAGGGCTCAAGTTCATCAGATACCTCCAGTTTC  
ATAACTACAGCGCATCTTTGCTCCCACTGTTAGAGGCGTTACTCTGAGGAAACACATCT  
CTCTTTTACAGACTACAGAAATAGCTGTAAATCTTGATCAGTTATTGCTTTTGTAAATTTTC  
AAATCTATCAGATTGATCCATATTGCTATTCAGAGTTTATATGAGGAAATATCAGATCT  
GTCAITGATTTTATTGTACATTTATTAATCTGTAACATCAGTATCTAACCTAACCTCGTAA  
AGTTAACAGATGCCAGTTACTATAATCCAGGAACCTTAACATCTAATCCCATTTAAATAGT  
ATCCCTTCTACTATTTTCTTCAITGGCAAGTAAGTGGCTTAGTTTACACAAATTCCTGCCATT  
TTGTAACGATAGCGAAGCAATAGCTTGTATGCTTTTATTTGATTAACTAGTCATAAAATCGG  
CATCCCTCCAGCctgagatacagtganaatatatacatatataatacaagtagcaattatttagg  
t:taatacatggtgccccagggccctgctgtcgtgccccctgctggtgtccccctgctgtcgtcggc  
AAGTTCCTCATCTACACCATCCCGACAGCTGGGCCCCGGAGCCCCCATCGACATCCACACC  
TGAGCTGCCCAACAACTGCTGGTGGGAGGATGAGGGCTGCACCAATCTGAGCGGCTTCAGCTA  
CATGGAGCTGAAGTGGGCTACATCTGGCCATCAAGATGAACGGCTTCACCTGCACCGGCTG  
GTGACCGAGGCGGACCTACACCAACTTTGTGGGCTACGTGACCAACCTTCAAGCGGAGC  
ACTTCAGACCTACCCCGACCGCTGCAGAGCGCGCTACACATCGGAAGATGCGCGCGACCTAG  
ATACGAGGAGACCTGCACAACTTACCCGACTACAGATGGCTGCGGACCGTGAACACACC  
AAGGAGTCCCTGCTGATCATCAGCCCTAGCGTGGCGAICTGACCCCTACAGACGAAGCTGC  
ACAGCAGAGTGTTCCTAGCGGCAAGTGCAGCGCGTGGCGGTGCCAGCCTACTGCAGCAC  
CAACACAGCTACACCATCTGGAATGCCGAGAACCTTAGATGCGGCAAGAGCTGCAGCATCTTC  
ACCAACAGCCGCGCAAGAGAGCCAGCAAGGGCAGCGAGACCTGCGGCTTCGTGGACGAGAG  
GCCTGTACAAGAGCTGAAGGGCGCTGCAAGCTGAAGCTGTGCGGCTGCTGCGCTGAGACT  
GATGGACGCGACCTGGGTGGCCATGCAGACCAACGAGACCAAGTGGTCCCTCCTGACCGAG  
CTGGTGAACCTGCACGACTTCCGAGCGATGAGATCGAGCACCCTGGTGGTGAAGAGCTGGTGC  
GGAAAGAGAGGAGTGCCTGGACGCCCTGGAGAGCATCATGACCAACAGAGCTGTCTCTCCG  
GAGACTGAGCCACCTGAGAAAGCTGTGCTCCCGCTTTGCAAGGCTTACACAACTTCAACAG  
ACCTTGATGGAGGCGCATGCGCACTACAGTCTGTGCGGACCTGGACGAGATCTGCTGAGCA  
AGGCTGCTGAGAGTGGGCGGAGATGCCACCCCACTGAACGCGGTGTTCTTCAACGSCAT  
CATCTGGGCGCTGACCGCAACCTGCTGATCCCTGAGATGCAGAGCAGCTGCTGCGAGCAGC  
ATGGAACCTGCTGGAGAGCAGCTGATCCCTGCTGACCCCTGGCGGACCCAGCAGCCTGT  
TCAAGGATGGCGACGAGCGCGAGGACTTCTGTGAGGTGCACCTGCCCGATGTGCACACCAAGT  
GTCCGCGGTGGACCTGGGCTGCCCACTGGGCGCAAGTACGTGCTGTGAGCGCGGAGCCCTG  
ACCGCCCTGATGCTGATCATCTTCTGATGAGCTGTGCGGAGGTTGAACAGAGCGAGCCCA  
CCAGCACAACTGAGAGGCAACCGCGAGAGGTTCTCCGTGACCCCGAGAGCGGCAAGATCAT  
CAGCAGCTGGGAGGCCACAGAGCGCGGAGAGCAGACTATGAtttttatgccccgggtttt  
tatagctaattagtcacaaatgtgagtttaattagttatactatactactaattttattacataatc  
atttatataatctagtagcatttagcttttataaaacaataataactgaatagttacatacttta  
cataaagttataaataagagatacataatttatagattttactttctacactgaataataaa  
tataattatacaaatataatttttaatactataagttataactgaataaaataccagtgta  
ataagttattatacatttatacacatcaagatgagttataacatcagtgtaactgttagca  
acagtagttatacagtagtagttactctcgtagtgcggttagttatgtatgtatcttctagtttt  
cttagtaggcattataggaaacgtcaagcttataagggtattaatggtatctagaaatatact  
attataccgttttctcaacttgggaatagccgatttgcgtttgtgatattcatacctttataca  
ttatatacactaataagtaatttccattggcattttggaaagaccttggtaaattagttcttt  
ctttttactttcatacatgtttgcaagtataatttaataactgtataagcggtatataagatat  
g:aaaaattacccttccgtgatttacctataaataagttaacattagaataatgtacattacta  
tattttcatatqqaattatttctattatactaggaattctctctcttacttttaqaaatactat  
cgttaacaaaaataacgacacgctgtgtattaatcatattcatgataatagagaattgtgaa  
ttgatttacaaagttattatctgtatcagatttat:taggatacctactacctacgataatta  
taactgtatgctatacgtttactgat

Фиг. 7

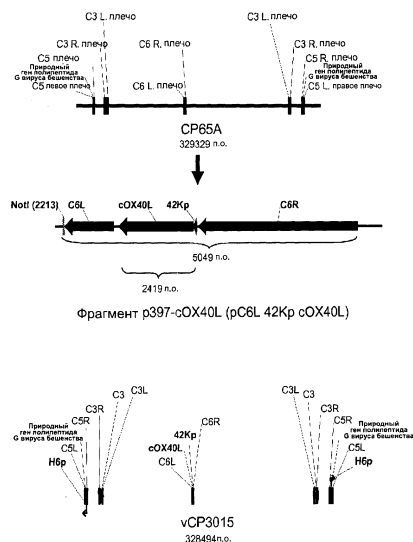
Аминокислотная последовательность, кодируемая кодон-оптимизированным синтетическим геном полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO: 1)

1	MVPQALLFV	LLVFPLCFGK	FPIYTIPTDKL	GPWSPIDIHH	LSCPNNLVVE
51	DEGCTNLSGF	SYMELKVGVI	LAIKMGFTCG	TGVVTEAETY	INFGVYVTT
101	FKRKHFRPT	DACRAAYNWK	MAGDPRIYES	LHNPPYDIYW	LRTVKTTKES
151	IVICSPSVAD	LDPYDRSLHS	RVPFSGKCSG	VAVSSTYCYST	NHDYTIWMPE
201	NPRIGMSCDI	FTNSRGKKAS	KGSETCGFVD	ERGLYKSLKG	ACKLKLCGVL
251	GLRLMDGTWV	AMQTSKETKW	CPPDQVLVNLH	DFRSDEIEHL	VVE3LVKRKE
301	ECLDALESIM	TTKSVSFRRRL	SHLRKLVPGF	GKAYTIFNKT	LMEADAHYKS
351	VRTWNEILPS	KGCLRVGGRC	HPFVNGVFNN	GILGLPGDNV	LIPMQSSLL
401	QQMELLESS	VIPLVHPLAD	PSTVFKGDOE	AEDFVEVHLP	DVHNQVSGVD
451	IGLPNMLKQV	LSAGALATAL	MLIIFINDTCC	RVRNRSPTQT	HNLRGTGREV
501	SVTPQSGKII	SSWESHKSGG	ETRI*		

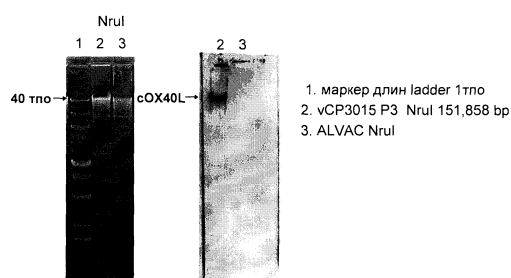
Фиг. 8



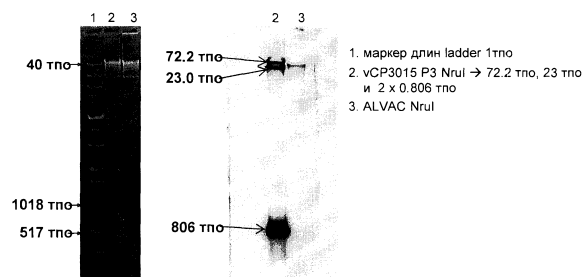
Фиг. 9



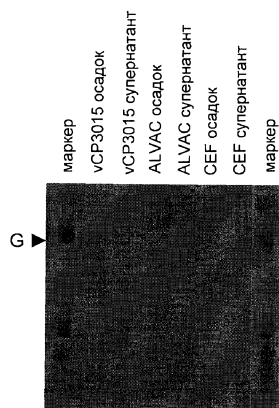
Фиг. 10



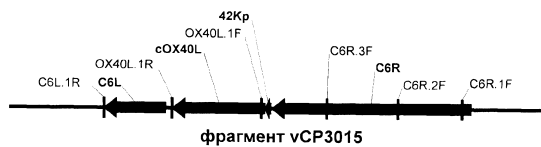
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

Ключ к последовательности фрагмента vCP3015 C6R-C6L (SEQ ID NO: 7).

Примечание C6 (1-1148): SEQ ID NO:8

Промотор 42K: (1155-1186): SEQ ID NO:9

cOX40L (1187-1735): SEQ ID NO:10

Делеция C6L (1777-2141): SEQ ID NO:11

```

1  GTTCTAAAGT TCTTTCCTCC GAAGGTATAG AACAAAGTAT TTCTTCTACA
51  TCCTTACTAT TTATTGCAGC TTTCACAGC CTATCACGTA TCCTATTTT
101 AGTATTGGTA GAACGTTTTA GTTCTAAAGT TAAAAATATTA GACATAATTG
151 GCATATTGCT TATTCTTTCG ATAGTTGAGI CTGTAGATCG TTTCAGTATA
201 TCACTGATTA ATGTACTACT GTTATGATGA AATATAGAAT CGATATTGGC
251 ACTTAACTGT TTGTCTATAC TAAGTCTAGA TTGTAATCT TCTAGTAATA
301 TGCTATTTAA TATAAAGCT TCCACGTTT TGATACATT TCTTCCATA
351 TTAGTAGCTA CTACTAAATG ATTATCTCTT TCCATATCTT GTAGATAAGA
401 TAGACTATCT TTATCTTAT TAGTAGAAAA TACTTCTGGC CATACATCGT
451 TAAATTTTCT TGTGTTGTT AGACATAATA TAAATATCT AGAGGATCCT
501 ATTATTTGCG GTAAATGTT TATAGACTAA AATGATCTGG CTATTAAACA
551 TAGGCCAGTT ACCATAGAAT GCTGCTTCCC GTTACAGTGT TTTACCATAA
601 CCATAGATCT GCCGTATATG TTGATACATA TAACAGCTGT AAATCCTAAA
651 AAATCCTAT CATATATATT AATATAGGI AATTCATTC CATGTGAAAG
701 ATAGACTAAT TTTATATCCT TTAACCTCAA ATAATTATTT ACATCTCTTA
751 AACAACTCAT TTTAATATCA TTAACCTGGA TTTTATAATA TCCAGAAAGG
801 TTTGAAGGGG TTGATGGAAT AAGCTTATTA ACATCGTTAA GTAAATTATT
851 AATATCATGA ATCTTTATTA TATCATACCC ATAAGTTAAA TTTATATTTA
901 CTTTCTCACC ATCTGACCTA GTTAGTTTGI AATAAGGTGT GTCTGAAAAA
951 ATTAAAGGT AATTCGTTGA ATGAAGCTGI ATTGCTGTA TCATTTTAT
1001 CTAATTTTGG AGATTTAGCA CTACTTACTT CATTAGAGA AGAATCTGCC
1051 AGTTCCTGTC TATTACTGAT ATTTCGTTTC ATTATTATAT GATTTATATT

```

```

1101 TTACTTTTTC AATTATATAT ACTCATTGGA CTAGTTAATC AATAAAAAGA
1151 ATTCTCAAAA TTGAAAATAT ATAATTACAA TATAAAATGG AAGGAGTACA
1201 ACCATTAGAT CAAAATGTTG GAAATACACC AGGAAGAAGA TTTCAAAAAA
1251 ATAAAGTACT ATTAGTAGCA GCAATAATTC AAGGTTTAGG ATTATTATTA
1301 TGTTTTACAT ATATATGTTT ACACTTTATG GCATCTCAAG TACCACCTCA
1351 ATATCCACCT ATACAAAGTA TAAGAGTTCA GTTTACAAGA TGTGAAAATG
1401 AAAAAGGTGG TATTATTACA TCTCCAAGTA AAGATGAAC TATGAAAGTA
1451 CAAGATAACT CATAATCAT AAATGTGAT GGTTTTACT TAATTAGTTT
1501 AAAAGGATAT TTTTCAGAAG AATCATCAT ATCTTTATAT TATAGAAAAG
1551 GTAGAGGACC TTTATTTTCT TTACCAAAAG TACATCAGT TGATTCTATT
1601 GGAGTTGCAT ATTTGGCTTT TAAAGATAAA GTATATTTTA ATGTTACAAC
1651 TCATTCTACT AGTTATAAAG ATACACAAGT AAATGGTGGT GAATTAATAT
1701 TAATACATCA AAATCCTGGT GGAATTTGTG CTTATTAATT TTTATCCCGS
1751 GTTTTATAG CTAATTAGTC ATTCTTCGTA AGTAAGTATT TTTATTTAAT
1801 ACTTTTATTT GTACTTATGT TAAATAAAG TCATGATAAC AAAATCCATT
1851 ATGTAATTA TATAACGTGA ATTCTTTAG CGTAGTTAGA TGCCAATCT
1901 CTCTCAAAAT CATCGGCTAT CTTTCTAGTG AGATTTTGA TATGCAGTT
1951 GAAACTTAAG AACGGGTGAT GATTAAGTG TGAACCTCC AAATTTGCAG
2001 TCATTATACG AGCGTATCTA TTAATCTACT TCATCATCTT TGAGTTATTA
2051 ATATCATCTA CTTTAGAATT GATAGGAAT ATGAATACCT TTGTAGTAAT
2101 ATCTATACCA TCTACACCTA ACTCATTAAG ACTTTTGATA G

```

Фиг. 15

MER 12-190

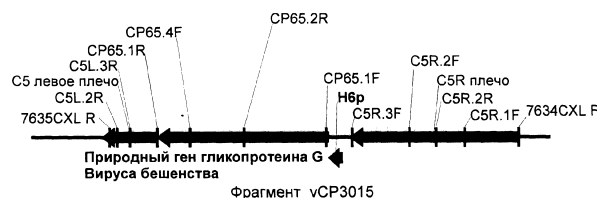
Предсказанная аминокислотная последовательность синтетического cOX40L (SEQ ID NO:12)

```

1  MEGVQPLDQN VGNTPGRRFQ KNKVLLVAAT IQGLGLLLCF TYICLHFIYAS
51  QVPPQYPIQ SIRVQFTRCE NEKGCIIISP SKDETMKVQD NSIINCDFG
101 YLISLKGYS EELSLSLYR KGRGPLFSL KVTSDSIGV AYLAFKDKVY
151 FNVTHSTSY KDIQVNGGEL ILIHNPGGF CAY

```

Фиг. 16



Фиг. 17

**Правое плечо C5 - природный ген полипептида G вируса бешенства: SEQ ID NO: 13**

1-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: правое плечо C5 (SEQ ID NO: 14)

текст строчными: промотор H6 (SEQ ID NO: 15)

2-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ : природный ген полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO: 16)

Полчёркнута последовательность вектора

```

GCTATAAATATGCATTGGAAAAAATCCAITTAAGAAAGGATTCAAATACTACAAAACCTAAGCGATA
ATATGTTAACTAAGCTTATTCTTAACGACGCTTTAAATATACACAATAAACATAAATTTTGTATAACCT
AACAAATAACTAAACATAAAAATATAAAGGAAATGTAATATCGTAATTATTTACTCAGGAATGGGG
TTAAATATTATATCAGTGATATCTATATCTGTTATCGTATACCTTTACAATTACTATTACGAATATG
CAGAGATAAATAGATTACGATTTAAGAGAACTTGTGCATGATAATTGGGTACGACATAGTGATAAATG
CTATTTCGCATCGTTACATAAAGTCAGTGGAAAGATGGATTGACAGATGTACTTAATAGGTGCAAAA
ATGTTAAATAACAGCATTCTATCGGAAGATAGGATACCACTTATATTACAAAAATCACTGGTTGGATA
AANCAGATTCGCAATATTCGTAAGATGAAGATTACTGCGAATTTGTAACATGACAATAAAAAAGCC
ATTATCTCAACGACATCGTGTAATTCCTCCATGTTTATGTAATGTTTCAGATATTATGAGATTACTA
TAACTTTTTGTATACTTATATCCGTAACATATATTAATCATGAAGAAATGAAAAAGTATAGAAGCTG
TTCACGAGCGGTTGTGAAACACACAAATATACATTCAAGATGGCTTACATATACGTTCTGTGAGGCTA
TCATGGATAATGACAAATGCACTCTAAATAGCTTTTGGACAAATGGATTGACCCCTAACACGGAATATGG
TACTCTACAATCTCCTCTTGAAATGGCTGTAATGTTCAAGAATACCGAGGCTATAAAAAATCTTGATGAGG
TATGGAGCTAAACCTGTAGTACTGAAATGCAACAACTCTTGTCTGCATGATGCGGTGTTGAGAGACGACT
ACAAAAATAGTGAAAGATCTGTTGAAGAATAACTATGTAACAAATGTTCTTTACAGCGGAGGCTTTACTCC
TTTGTGTTTGGCAGCTTACCTTAACAAAGTAAATTTGGTTAACTTCTATTTGSCICATTTGGCGGATGTA
GATATTTCAACACGGATCGGTAACCTCTTACATATAGCCGATCAAAATAAAAAATTAACAAATGGTTA
AACTTCTATTGAACAAAGGTGCTGATACTGACTTGTGGAATAACATGGGACGTACTCCTTTAATGATCGC
TGTAACATCTGGAATATTGAAATATGTAACACACTACTTAAAAAAATAAAATGTCCAGACTGGGAAA
AATTGATCTTGCCAGCTGTAATTCATGCTAGAAAAGAGTGCTCAGGCTACTTTTCAACAAAGGAGCAGA
TGTAACATACATCTTTGAACAAATGGAATAATCATATCTGTTTGGAAATTGATTAAAGAAAGTTACTCT
GAGACACAAAGAGGTAGCTGAAGTGGTACICTCAAAAGCTTCCCGGTTAATTAATTAGTTATAGACA
AGGTGAAACACGAACTATTCTAGCTTAATTAATTAGAGCTctcttattctatacttaaaagtgaagt
aaatacaaggtctcttgagggtgtgttaastgaaagcgagaataatcataaattatttcattatcg
gataacggttaagttgtatcgtaATGGTTCTCAAGCTCTCCGTTTGTACCCCTTCGTTTTCCTG

```



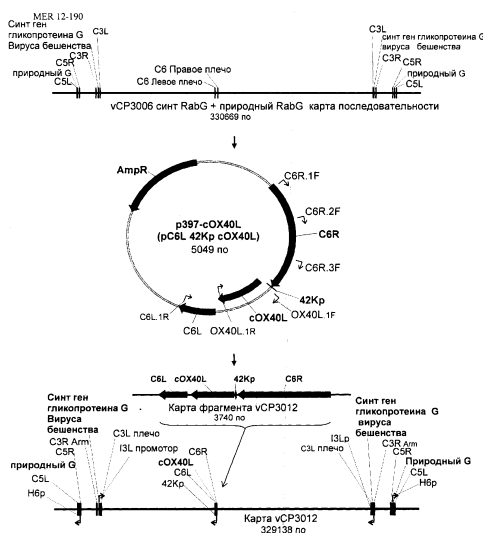
TGTGTTTGGAAAATTCCCTATTACACAAICCCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGATTGACATACA  
 TCACCTCAGCTGCCAAACAATTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCCTAC  
 ATCGAACTTAACTTCGATACATCTTAGCCATAAAATGAACGCTTCACTTCACACGCCCTTCTCACCG  
 AGGCTGAAACCTACACTAACITCGTTGGTTATGTCAACACGTTCAAAGAAAGCATTCCGCCCAAC  
 ACCAGATGCATGTAGAGCCGCTACAACCTGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCTTACAC  
 AATCCGTACCTGACTACCGCTGGCTTCGAACGTGTAACCAACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTC  
 CAAGTGTAGCAGATTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGCTC  
 AGSAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACACAGATACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCG  
 AGACTAGGGATGCTTGTGACATTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTT  
 GCGGCTTTGTAGATGAAGAGGCCATATATAAGTCTTAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATGTGGAGT  
 TCTAGGACTTAGACTTATGATGGAACATGCGTCGCGATGCAACATCAATGAAACCAATGGTGCCCT  
 CCCGATCAGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCGCTCAGACGAAATGAGCACCTTGTGTAGAGGAGTTGG  
 TCAGGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACIAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAAGTGAGTTTCAGAGC  
 TCTCAGTCATTTAAGAAAACITGTCCTGGTTTGGAAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGTATG  
 GAAGCCGATGCTCACTACAGTCACTCAGAACTTGAATGAGATCCTCCCTCAAAGGGGTGTTAAGAG  
 TTGGGGGAGGTGTCACTCATGTGAACGCGGTGTTTTCAATGGTATAATATTAGACCTGACGGCAA  
 TGTCTTAATCCAGAGATGCAATCATCCTCTCCAGCAACATATGGAGTTGTGGAATCCTCGGTATC  
 CCCCTTGTGACCCCTGGCAGACCCGCTACCGTTTCAAGGACGGTGACGAGGCTGAGGATTTGTGTG  
 AAGTTCACTTCCCGATGTGCACAATCAGGICTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCGAACTGGGGGAAGTA  
 TGTATTACTGAGTGCAGGGGCCCTGACTGCTTGTATGTAATTTCTGATGACATGTTGTAGAAGA  
 GTCAATCGATCAGAACCTACCCAAACATCTCAGAGGGACAGGGAGGAGGTGTCAGTCACTCCCAAA  
 GCGGGAAGATCATATCTTCATGGGAATCACACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACTGTGA

Фиг. 18

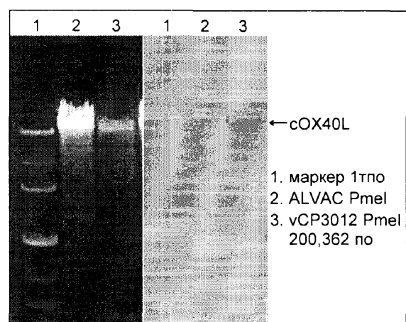
Предсказанная аминокислотная последовательность природного гена полипептида G  
 вируса бешенства (SEQ ID NO: 1)

1 MVPQALLFV? LLVFPLCFGK FPIYIPDKL GFWSPIDIHH LSCFNNLVVE  
 31 DEECTNLSGF SYMELKVGII LAIKMNGFTC TGVTTERETY INFVGYVT?T  
 101 FKRKHFRPT? DACRAAYNWK MAGDPRIEES LHNPPYDYNW LRTVKTTKES  
 151 IVIISPSVAD LDPYDRSLHS RVFPSGKCSG VAVSSTYCST NHDYTIWMPE  
 201 NPRLGMSCDI FTNSRGKRAS KGSETCGFVD ERGLYKSLKG ACKLKLCOVL  
 251 GLRLMDGTWV AMQTSNETKW CPPDQIVNLH DFRSDEIEHL VVEELVRKRE  
 301 ECLDALESIM TKSVSFRRL SHLRKIVPGF GKAYTIFNKT LMEADAHYKS  
 351 VRTWNEILPS KGCLRVGGRC HPEVNGVFFN GILGPDGNV LIPMQSSLL  
 401 QQIMELLESS VILPVIPLAD PSTVFKDGE AEDFVEVILP DVINQVSGVD  
 451 IGLPNWGKYV LLSAGALTAL MLIIFLMTCC RRVNRSEPTQ HNLRGTGREV  
 501 SVTPQSGKII SSWESHKSGG ETEL\*

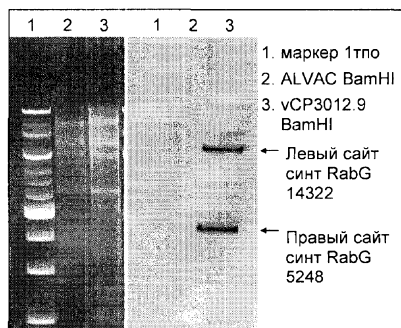
Фиг. 19



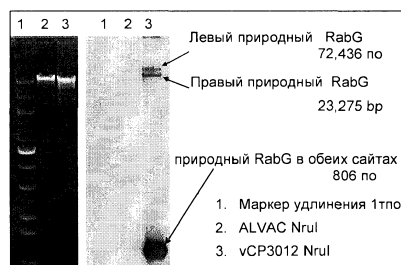
Фиг. 20



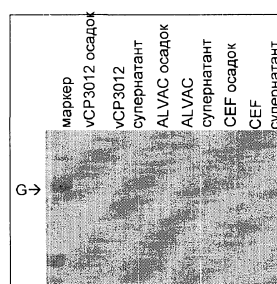
Фиг. 21



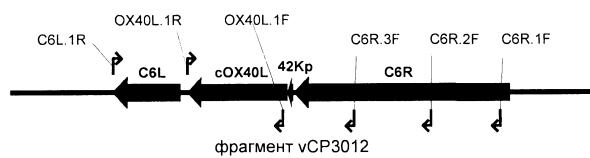
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24

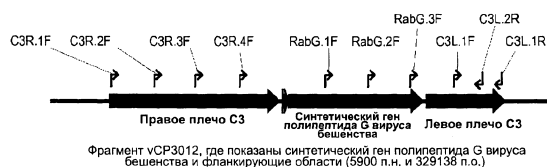


Фиг. 25

. vCP3012 правое плечо C6 – левое плечо C6: SEQ ID NO: 17  
 1-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: правое плечо C6 (SEQ ID NO: 18)  
 2-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: cOX40L (SEQ ID NO: 10)  
 1-й текст строчными: промотор 42K (SEQ ID NO: 9)  
 2-й текст строчными: левое плечо C6 (SEQ ID NO: 19)  
 Подчеркнута последовательность вектора

GTTCSTAAGTCTTTCCSTCCGAGGTACAGAACAAAGTATTCTCTACATCCTTACTATTATTCGACG  
 TTTTAACAGCCTATCACTATCCTATTCTTAGTATTGGTAGAACGTTTAGTCTAAAGTTAAATATTA  
 GACATAATTGGCATATTGCTATCTCTGCATAGTGGAGCTGTAGATCGTTTCAGTATATCACTGAATTA  
 ATGTACTACTGTTATGATGAATATAGAATCGATATTGGCATTAACTGTTTGTATATAAGTCTAGA  
 TTTTAAATCTCTAGTAATAGCTATTAAATATAAAGCTTCCACGTTTGTATACATTTCTTTCCATA  
 TTAGTAGCTACTACTAAATGATTATCTCTCTCATATCTTGTAGATAAGATAGACTATCTTTATCITTTAT  
 TAGTAGAAATACTCTTGCCCATACATCGTAAATTTTTTGTGTGTGTAGATATAATATTAATATCT  
 ACAGCATCCTATATTCTCTCTAAATCTTTATACACTAAATCATCTCGCTATTAAACATACCCCACTT  
 ACCATAGAATGCTGCTCTCCCTTACAGTGTITACCATACCATAGATCTGCTGTATTGTTGATACATA  
 TAACAGCTGTAAATCCTAAATAATCTCTATCATATATTATTAATATTAGGTAATTCTATTCATGTGAAG  
 ATAGACTAATTTATATCTTTACCTCCAAATATATTATACATCTCTTAAACATCTATTTTAATATCA  
 TAACTGGTATTTTATTAATATCCAGAAAGGTTTGAAGCGGTTGATGGAATAAGTCTATTAACTCGTAA  
 GTAAATTTAATATCATGAATCTTTACTATATTATACCCATAAGTTAAATTTATATTACTTTCTCATC  
 ATCTGACTTAGTTAGTTTGAATAAGGCTCTCTGAAATAATTAAGGTAACTGTTGAATGAAGCTGT  
 ATTTGCTGTATCATTTTATCTAAATTTGGAGATTAGCAGTACTTACTTCATTAGAAGAAGAACTGCC  
 AGTCTCTGTCTATTACTGATATTCTGTTTCATTATTATGATTATATTTTTACTTTTCAATTATATAT  
 ACTCATTTGACTAGTTAATCAATAAAAGAAATTCcaaaattgaaaatatataattacaatatasaATGG  
 AAGGAGTACAACCATTAGATCAAAATGTTGCAATACACCCAGGAGAGAAGTTTCAAAAAATAAAGATT  
 ATTAGTAGCAGCAATAATTCAAGSTTAGGATTTATTTATGTTTACATATATATTTCACATTTTAT  
 CCATCTCAAGTACCACCTCAATACCCACCTATACAAAGTATAAGAGTTCAGTTTACAAAGATGTGAATAAG  
 AAAAGGTTGTATTATTACATCTCCAAAGTAAAGTGAACCTATGAAAGTACAAGATAATTCAATAATCAT  
 AATTTGTGATGGTTTTTACTTAAATAGTTTAAAGGATATTTTCAGAGAATATCATTTATTTATAT  
 TATAGAAAAGGTAGAGGACCTTATTCTTTATCAAAAGTAACTCAGTTGATCTTATTGGAGTTGCAT  
 ATTTGGCTTTTAAAGATAAAGTATATTTAATGTTACACTCAATCTACTAGTTATAAAGATATACAAGT  
 AAATGCTGTGAATTAATTAACACATCAAAATCTCGGTGATTTTGTCTATTAAATTTTATCCCGG  
GTTTTATAGCTAATTAGTCAATTTToctaaqtaatttttttaataactttttatgtacttatgt  
 taaataaactgatgatacaaaatccattatgtattattataactgtaattcttttagcgtagttaga  
 tgtccaatctctctcaaatacatcggtatctcttttagtgagattttgatctatgcagtgtaacttatg  
 aacgctgatgattaaaatgtgaacggtccaaatttgagtcatttatatgagcgatctattatctactata  
 tcatcatcttttagttattataatcatctacttagaattgataggaatatgaatacctttgtagtaat  
 atctatactatctacactaaactcattaagacctttgtagatg

Фиг. 26



Фиг. 27

**Фрагмент vCP3012 от правого плеча C3 до левого плеча C3 (SEQ ID NO: 20)**

1-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: правое плечо C3 (SEQ ID NO: 21)

1-й текст строчными: промотор 13L (SEQ ID NO: 4)

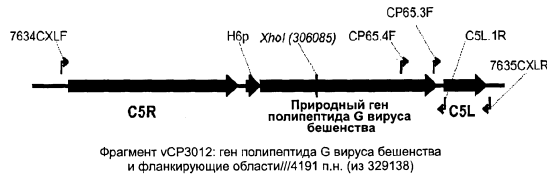
2-й выделенный текст : синтетический ген полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO: 5)

2-й текст строчными: правое плечо C6 (SEQ ID NO: 22)

TGTAATGGGZTTTTACSTAAATCATCTGTTCGTTTATAGGCACTCCGTGATTTATAAGTAACGCTATTA  
 TATCGTAACTACAATTAATTTTAAAGTGCCTTTATGAGATAGTGTATTATGCAAAATAAATCTTTATCTAT  
 TTTAAATACTATTATCTAAATAATCCTAATTAATCTATATCTTATACSTTTATAGCGTAATGTAAACGGA  
 GTTTCAAATTTCTAGTTTGTATATTAAGAICAATATTAATAATCTATAAATATTTATACATATCATCAG  
 ATATCTTATACATACAGTACATCTGTAATAATTAGAAAGAACTTATTAACAATTAACACCTTTTTTAATAA  
 ATATCTAGTTTAATGACTATTGTCTCTATATACAGAAATATATAACGGACTATTTCCAGAAATGTATCTGT  
 TCTATGTGAGCGCCAGAACTCTATTAGTAGTTTAGCAATTTCTGTATTATCTAAACTAGCAGCTTTATGAA  
 GAGGAGGATTTTACATTTTAAATAATCGGCACCGTGTCTAGTAATAATTTTACCATTCTATATCAGA  
 AATACCTTACGGCTAAATACAAAGACGTGATAGTATATTACGTTATTGTATTGCAITTTTTAAGTATA  
 TACCTTATCAAAATTTATATCTCTATACCTTTATAGCTTTATGCASTTCAATTTATAAGTCTTCCATTACTCA  
 TTCTCGGTAAAGATATATATATCACTAIGATATTATCTCTATTTTATCTAATAAAACCGTTATCA  
 TGTATTATTATTGTTATTAATCTATACTAATTAATAATTTATACCAATACTTAGATACTTATTAATAC  
 CATCTAGAACTGTATTCTTGCCCTTAACTTGGACATGCACTCCATTAGGCGCTTTCTGTTTTCGA  
 CATGCTCCCTTTAACATATCTACTGTATTGTGAGGATCCACGGATTATCTACTGTGATATCACCAAA  
 CACGTCCTTCGAACAGGTCACGCAATTCAGCAGAACATTTCTTAGGGCTCAAGTTCATCAGATACCTCC  
 AGTTTTCATAACTACAGCGCATCTTCTGCTCCCACTGTTTAGAGCGCTTACTCTGAGGAAACACATCT  
 CTCTTTTACAGACTATAGAAATAGCTGTAATCTTGATCAGTTATTGCTTTTGAATTTTCAAACTC  
 ATCAGATTGATCATAATTGCTATTCGAAAGATTATATGAGGAAATATACATCTCTGTCATGTATTTT  
 ATTTGAACATTTATTAATCTGTAACACATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCT  
 TACTATATCCCAAGAACCTTAACTATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCTAATCT  
 GGCAGATATGTGGCTTAGTTTACACAAATCTCGCCATTTTGAACGATAGCGAAGCAATAGCTTGTAT  
 GCITTTTATTGATTAACTACTATAAAATCGGGATCCCTCGAGatgagataaagtgaataatatatc  
 attatattacaagtaacaattatttagtttaaatCATGGTCCCGAGGCCCTGCTGTTGCTGCCCTGCT  
 GGTGTTCCCGCTGTGCTTCCGCAAGTTCCCATCTACACCACTCCGCAAGCTGGGCCCTGGAGCCCG  
 ATCGACATCCACACCTGAGCTGCCCAACATCTGGTGGGAGGATGAGGCTGCACCAATCTGACGG  
 GCTTCAGTACATGGAGCTGAAAGTGGGCTACATCTTGCCCATTAAGATGAACGCTTCACTTGCACCGG  
 CGTGTGACCGAGCCGAGACTACACCAATTTGTGGGCTACGTGACCAACCTTCAAGCGGAAGCAC

TCTGACAGCTTACCCCGACGSCCTGAGAGGCCCTCTACACTCGGAAGTAGGCCGCGACCTTGATACAGAGG  
 AGAGCCTTGCAACAACCCCTACCCGCACTACATATGGCTGCGGACGCTGAAACCCACCAAGGAGTCCCTGGT  
 GATCATCAGGCTCTGCTGGTGGCGGATCTGACACCCCTACGACAGAGGCTCTGCACAGCAGAGTGTCTTACCTG  
 GSCAAAGTCGACGGCGCTGGCGCTGTCTCGACCACTACTGCAGCACAACCAAGCATACCACTCTGATGCG  
 CGGAGAACCCTAGACTGGGCATGAGCTGGGCATCTTCAACCAAGCCGGGCGCAAGAGAGCCAGCAAGGG  
 CACGGAACACCTTGGCGCTTGTGTGACGAGAGAGGCTCTACMAAGACCTGGGAGGCGGCTGCAAGCTGAG  
 TCTGGCGGCTCTGGCGCTTGACATGATGACAGGCACCTGGGTGGGCTGACAGGACAGAGCAGACGA  
 TGTGGTGCCTCTCTGACAGACTGGTGATGCTACGACACTTCGAGAGCGATGAGATCGACGACCTGGTGGT  
 GGAAGACCTGTGTGCGGAAGACAGAGGATGCTCTGGAGCCCTGSGAGAGCATATGACCAACCAAGAGCTG  
 TACCTTCGGGAGATGACGCCACTGAGAAAGCTGGTGCCGGCTGTGGCAAGGCTACACAATCTTCAACA  
 CGGCTCTGAGAGCTGAGGCGCATGCCACTCAAGCTGTGCGGGACTGTGAACAGAGATCTCGCTCAAGCAAGG  
 CTGCTCTGAGATGGGCGGCAGATGCCACCCCAAGCTGAACGGCTGTGTTCTTAACGGCATCATCTCTGGCG  
 CTGACGGCAACCTGGTGTGATCTCCGASGTGACAGAGCGCTGTCGACGAGAGCATGGAACTGCTGCGAGA  
 CGAGCGCTGACCTCCGCTGGTGCACCTCCCTGGCGACAGCCGAGCTGTCTCAAGATGGGCGACCGGCGA  
 GGAATCTCTGAGAGGCTGCACTGCCGCAAGTGCACAAACAGAGTGTCCGGCTGGACCTGGGCTGCCCAAC  
 TGGGCGAAGTACGTGCTGCTGAGCGCGGAGCCCTGACCGCCCTGATGCTGATCATCTTCTGATGACCT  
 CTGCGCGGAGGGTGAACAGAAAGCAGGCCCAACAGACACAACCTAGAGAGCAGCGGCGAGAGAGGTGCTCGT  
 GACCCGCCAGAGCGGCGAAGCATCAACAGCAGCTGGGAGAGCCCAAGAGCGCGGAGACAGCAGCATATGA  
 TTTTATATCGCTGGTTTATATAGCTAAATTACTCTcaagtggagtataatagtataactactataacttaact  
 tatatacatattcatttatatacatctagtagcttaagctttatataatacaataaactgaatagtacat  
 actttactataaagttataaataagtagatacaattatagtatttacttctctacactgaataataaa  
 tataattataatacaaaataattttataatactatagattataataactgaataaataaactcaggttaataatag  
 ttattatacatattatacaacataaagtagagtataaactctgttcttcttagtaacaagtagtataatag  
 cgtagtagtagttactctgtttgtgatttatacctctatacatctctacactcaagtagtttccacttgga  
 aaacgtcaagcttataaagttattaatggtatctagaataatatactattataccggtttctcaacttgga  
 atagccggttgcgtttgtgatttatacctctatacatctctacactcaagtagtttccacttgga  
 attttggttaagcggtgtataaattagtctctctcttttactctacactgaattgtgcaagtattgtt  
 aataactgtaataaagctgataatagattagttaaaattaccctctcgtggttacctataaataatgttaac  
 attagaataatgtacattactattattttcatatggaattattcttatatactagggtactcgtctctt  
 aacttgaataatctatcgttaacaaaataatgcagcagctgtgattataatctatcaatgataatgaga  
 caattgcgaattgtttacaaagttattatctacagattatttttaggatactcaactcaactgata  
 atataactctatgctatcagcttactgagt

Фиг. 28



Фиг. 29

Фрагмент vCP3012: ген полипептида G вируса бешенства и фланкирующие области (SEQ ID NO: 23)

1-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: правое плечо C5 (SEQ ID NO: 24)

текст строчными: промотор H6 (SEQ ID NO: 15)

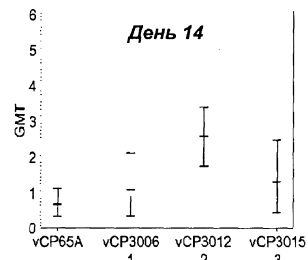
2-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: природный ген полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO: 16)

Подчеркнута последовательность вектора

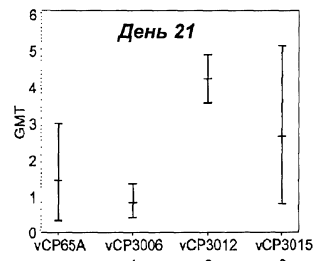
[illegible]

TACACTAAGTTCGTTGGTTATGTGCACCAACGTTCAAAAGAAAGCATTTCCGCCCAACACAGATSCA'TGTAGAGC  
 CGCGTACAAGTGAAGATGGCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCTTGACTACCGCTGGC  
 TTGGAAGTGTAAAAACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTAGCAGATTGGACCCATATGACAGA  
 TCCCTTCACTCGAGGCTCTTCCCTAGCGGGAAGTCTCAGGAGTAGCGGTGCTCTCTACCTACTGCTCCACTAACCA  
 CGATTACACCAITTTGGAATGCCGGAATCCGAGACTAGGGATGCTTTGTGACA'TTTTACCAATAGTAGAGGGAAGA  
 GAGCATCCAAAGGAGTGAAGCTTCCGCTT'TGTAGATGAAGAGGCCATATATAGTCTTTAAAGSAGCATGCAAA  
 CTCANGTTATGTGGAGTCTAGGAGCTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAACATCAATGAAACCAA  
 ATGGTGGCCCTCCCGATCAGTTGGTGAACCTGCAAGACTTTCCGCTCAGACGAAATGAGCACTTGTGTAGAGGAGT  
 TGGTCAGGAGAGAGAGAGGTCTCTGATGCACTAGAGTCCATCATGACCAACAGTCAGTGTTCAGAGCTCTC  
 AGTGATTTAAGAAAAGTGTCCCTGGTTTGGAAAAGCATATACCATATCAACAGAGCTTGTGGAAGCGATGC  
 TCACATCAAGTCAGTCAGAACTTGGATGAGATCCTCCCTTCAAAAGGGTGT'TAAGAGTTGGGGGAGGTGTATC  
 CTCATGTGAACCGGTGTTTTCATGGTATCAATTAGGAGCTGACGGCAATGTCTTAATCCAGAGATGCAATCA  
 TCCCTCTCCAGCAACATATGGAGTGTGTGGAATCCTCGGTATCCCGCTTGTGACCCCTGGCAGACCGGTCTAC  
 CGTTTTCAGGAGCGGTGACAGGCTGAGGATTTTGTGAGTTCACTTCCCGATGTGCAATCAGGTCTCAGGAG  
 TTGACTTGGGTCTCCGAACTGGGGAGATATGATTACTAGTGCAGGGCCCTGACTGCCCTGATGTGTGATATT  
 TTCTGATGACATGTTGTAGAAGAGTCAATCGATCAGAACTACGCAACAACTCTCAGAGGGACAGGGAGGAGGT  
 GTCAGTCACTCCCAAGCGGGAGATCATATCTTCATGGGAATCACAAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACTGTGA

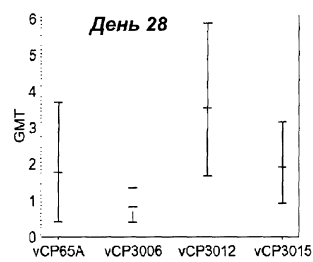
Фиг. 30



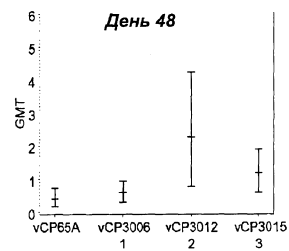
Фиг. 31



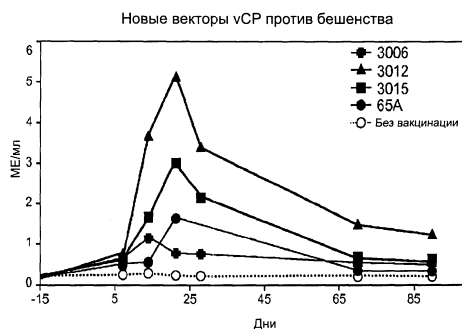
Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35

Последовательности без праймеров, описанные в настоящей заявке

SEQ ID NO	ДНК/ белок	Описание
1	БЕЛОК	Предсказанная аминокислотная последовательность полипептида G вируса бешенства (дикого типа и кодируемая синтетическим кодон-оптимизированным геном)
2	ДНК	Последовательность рекомбинантного vCP3006 включающая плечи C3, промотор I3L и синтетический ген полипептида G вируса бешенства
3	ДНК	vCP3006 плечо C3L
4	ДНК	vCP3006 промотор I3L
5	ДНК	vCP3006 синтетический ген полипептида G вируса бешенства
6	ДНК	vCP3006 плечо C3R
7	ДНК	Фрагмент vCP3015 от правого плеча C6 до левого плеча C6
8	ДНК	vCP3015 плечо C6R
9	ДНК	vCP3015 промотор 42K
10	ДНК	vCP3015 cOX40L
11	ДНК	vCP3015 плечо C6L
12	БЕЛОК	cOX40L предсказанная аминокислотная последовательность
13	ДНК	Фрагмент vCP3015, включающий правое плечо C5 до природного гена полипептида G вируса бешенства
14	ДНК	vCP3015 плечо C5R
15	ДНК	vCP3015 промотор H6
16	ДНК	Природный ген полипептида G вируса бешенства (дикий тип)
17	ДНК	vCP3012 от правого плеча C6 до левого плеча C6
18	ДНК	vCP3012 плечо C6R
19	ДНК	vCP3012 плечо C6L
20	ДНК	vCP3012 от правого плеча C3 до левого плеча C3
21	ДНК	vCP3012 плечо C3R
22	ДНК	vCP3012 плечо C3L
23	ДНК	Фрагмент vCP3012: ген полипептида G вируса бешенства и фланкирующие области
24	ДНК	vCP3012 плечо C5R
63	БЕЛОК	OX40L <i>Felis catus</i>
64	БЕЛОК	OX40L <i>Equus caballus</i>
65	БЕЛОК	OX40L <i>Bos taurus</i>
66	БЕЛОК	OX40L <i>Sus scrofa</i>
67	БЕЛОК	OX40L <i>Pan troglodytes</i>
68	ДНК	Плазмида p397-cOX40L (pC6 42Kp cOX40L)
69	ДНК	Плазмида p397- синтетический ген полипептида G вируса бешенства (pC3 I3Lp синтетический ген полипептида G вируса бешенства)
70	БЕЛОК	OX40L <i>Gallus gallus</i>
71	БЕЛОК	OX40L <i>Ovis aries</i>

Фиг. 36

Название	Последовательность ( 5'→3')	Ген	SEQ ID
C5R.1R праймер	CTCTTGCATATTCGTAATAGTAATTG	Природный G/C5	25
C5R.1F праймер	ATTCTATCGGAAGATAGGATACCAG		26
C5R.2R праймер	TCAACAACCGCTCGTGAACAGCTTC		27
C5R.2F праймер	ATGCACAACCTCTTGTCTGCATGATG		28
C5R.3R праймер	TACGGCTATATGTAGAGGAGTTAACC		29
C5R.3F праймер	CTCTGAGACACAAAAGAGGTAGCTG		30
C5L.1F праймер	CATCATGAGCAACGCGTTAGTATAT		31
C5L.1R праймер	TTAGAAATTATGCATTTTAGA		32
C5L.2R праймер	GGAGATACCTTTAGATATGGATCTG		33
C5L.3R праймер	TTGTAACCATAGTATATCTTAGCGC		34
7634CXL-F	GTTCTCGTAGGAGAGAACTATTGAC		35
7635CXL-R	CGTCTTCAGCTGTAAACAAATATAATG		36
CP65.1F праймер	ATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTG		37
CP65.1R праймер	TCACAGTCTGGTCTCACCCCACTC		38
CP65.2R праймер	GACCCATGTTCCATCCATAA		39
CP65.3F праймер	GTCTCACCCCACTCTTGTGTG		40
CP65.4F праймер	GAAAACGGTAGACGGGTCTG		41
C3R.1F праймер	CATAGCTTTATGTAAAGGAGTAT	СинтетическийG/C3	42
C3R.2F праймер	TGTAATGGGGTTTTACCTAA		43
C3R.3F праймер	GCTTTATGAAGAGGAGGATTTT		44
C3R.4F праймер	GCATTACAGCAGAACATTTCT		45
C3L.1F праймер	TAGTTACTCTCGTATGGCGT		46
C3L.1R праймер	ATCAGTAACGTATAGCATACG		47
C3L.2R праймер	TACATATTTCTAATGTTAACATATT		48
I3L.1F праймер	GGATCCCTCGAGATGAGATA		49
RabG.PF праймер	ATAGCTTGTATGCTTTTTATTGAT		50
RabG.PR праймер	GAACAGCAGGGCCTGGGGCACCATG		51
RabG.1F праймер	GTGAAAACCAACCAAGGAGTC		52
RabG.1R праймер	TTCTGTTACCCCTCCGGCAG		53
RabG.2R праймер	TGGTGAAGATGTCGCAGCTCATGCC		54
RabG.2F праймер	ACCACCAAGAGCGTGTCCCTT		55
RabG.3F праймер	TTCTGATGACCTGCTGCCGGA		56
C6R.1F праймер	GTTCTAAAGTTCTTTCCTCC	cOX40L/C6	57
C6R.2F праймер	TCTTTCATATCTTGTAGATAAGA		58
C6R.3F праймер	TGAAGGGGTTGATGGAATAA		59
C6L.1R праймер	CTATCAAAAAGTCTTAATGAGTTAGG		60
OX40L.1F праймер	ATGGAAGGAGTACAACCATTAGATC		61
OX40L.1R праймер	TTAATAAGCACAAAATCCACCAGGA		62

Фиг. 37

SEQ NO:12(собака); SEQ NO:63(кошка); SEQ NO:64(лошадь); SEQ ID NO:65(корова)  
 SEQ NO:66(свинья); SEQ NO:67(шимпанзе); SEQ NO:71(овца)  
 SEQ NO:70(курица); первые 50 аминокислот не показаны в этом выравнивании

```

51
100
SEQ ID: 12 (1) -MEGVQPLDQNVGNTPGRRFQNKVLVAATIGLGLILCFTYICLHFYA
SEQ ID: 63 (1) -MEGVQPLDENVGNAPEGRRFQSNKLLVAVIIGLGLILCFTYICLHFYA
SEQ ID: 67 (1) -MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLVASVIGLGLILCFTYICLHFSA
SEQ ID: 64 (1) -MEGVQPLEENVGNTPGRRFQNKLLVAVTSIIGLGLILCFTYICLHFYT
SEQ ID: 65 (1) -MEGVQPLDENVGNVPGRRFLNKLLVASITIGLGLILCFTYICLHFYA
SEQ ID: 71 (1) -MEGVQPLDENVGNAPEGRRFLNKLLVASITIGLGLILCFTYICLHFYA
SEQ ID: 66 (1) -MEGVQPLDENVGNAPEGRRLLRNKLLVASVIGLGLILCFTYICLHLYA
SEQ ID: 70 (51) KEPAGMRSDDEWRGWQKGQAKRNTLYVSAATGWILLVAGLILGLGTDLSLQ
101
150
SEQ ID: 12 (50) SQVPPQYPPPIQSIRVQFTKCEENKGCIIITSPSKDETMKYQDNIIINDDG
SEQ ID: 63 (50) SQVPPQYPPPIQSIKQFTKCGNGTGCIIITSPNKDETMKYQDNIIINDDG
SEQ ID: 67 (50) LQVSHRYPRIQSIRVQFTKCKEKGKFIITSPKDETMKYQDNIIINDDG
SEQ ID: 64 (50) SQVPSQYPPPIQSIRVQFTKCEENKGCIIITSPNDEIMKYQDNIIINDDG
SEQ ID: 65 (50) -QVPSQYPPPIQSIRVQFTKCEENKGCIIITSPADGTMKYQDNIIINDDG
SEQ ID: 71 (50) -QVPSQYPPPIQSIRVQFTKCEENKGCIIITSPADGTMKYQDNIIINDDG
SEQ ID: 66 (50) -QVPSQYPPPIQSIRVQFTKCEENKGCIIITSPADGTMKYQDNIIINDDG
SEQ ID: 70 (101) -LWTFHSDKVKWTYIRYSGQ-SIAGVAMNLSAEFTSIPYINGSIMPDG
151
200
SEQ ID: 12 (100) FYLSLKGYFSEELSLSLYYR-----KGRKPFSLSKVTSVDSIGVAY
SEQ ID: 63 (100) FYLSLKGYFSEELSLSLYYR-----KGRKPFSLSKVTSVDSIGVAH
SEQ ID: 67 (100) FYLSLKGYFSEVNLISLHYQ-----KDEEPEQLKKVRSVNSIMVAS
SEQ ID: 64 (100) FYLSLKGYFSEELSLSLHYR-----KGREPFSLSKVRSVNSIMVAY
SEQ ID: 65 (99) FYLSLKGYFSEELSLRLLYR-----KGREPFSLNMVKIVDSVTVAY
SEQ ID: 71 (98) FYLSLKGYFSEELSLRLLYR-----KGREPFSLNMVKIVDSVTVAY
SEQ ID: 66 (99) FYLSLKGYFSEELSLMLQYR-----KGRKPFSLNKVKSVDSTVAD
SEQ ID: 70 (149) LYVSLKGVLPDLEKSSKLMMKNTESKNAATWERDVGNSNAVDLIT
201
241
SEQ ID: 12 (143) LAFKDKVYFVTTHTSYKDIQVNGGSEILIHQNPGGKAY
SEQ ID: 63 (143) LAFKDKVYFVTTHTSYKDIQVNGGSEILIHQNPGGKVL
SEQ ID: 67 (143) LTYKDKVYFVTTDNTSLDDFHVNGGSEILIHQNPGEKVL
SEQ ID: 64 (143) LAFKDKVYFVTTHTSCDDIQVNGGSEILIHQNPGGKAY
SEQ ID: 65 (142) LRFKDKVYFVTTQNASCEDIQVNGGSEILIHQNPGGKAY
SEQ ID: 71 (141) LRFKDKVYFVTTQNASCEDIQVNGGSEILIHQNPGGKAY
SEQ ID: 66 (142) LAFKDKVYFVTTHTSCCEDIQVNGGSEILIHQNPGGKAY
SEQ ID: 70 (199) MLYLF-AQNIIILSTSSNATIQCLTFSEVLLNP---VSGNP

```

	SEQ 12	SEQ 63	SEQ 67	SEQ 64	SEQ 65	SEQ 71	SEQ 66	SEQ 70
SEQ 12		89	68	86	81	81	81	22
SEQ 63			69	82	79	79	82	22
SEQ 67				73	69	70	69	22
SEQ 64					84	83	81	23
SEQ 65						98	88	24
SEQ 71							88	24
SEQ 66								24
SEQ 70								

Фиг. 38



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2