

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 032389

(13) В1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.05.31

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

(21) Номер заявки
201400912

(22) Дата подачи заявки
2013.02.14

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПОКСВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, КОДИРУЮЩИЕ И ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЛИКОПРОТЕИН G ВИРУСА БЕШЕНСТВА И ПОЛИПЕПТИД OX₄₀L, И ВАКЦИНЫ, СОЗДАННЫЕ НА ИХ ОСНОВЕ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В СПОСОБЕ ВАКЦИНАЦИИ ЖИВОТНЫХ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

(31) 61/598,610

(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

(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:

**Мебатсьон Тезом (US), Минке Жюль
Мартен (FR), Дэвид Фредерик (US)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

032389
B1

(57) Изобретение относится к рекомбинантным векторам, кодирующими полипептид G вируса бешенства и качестве генетического адьюванта полипептид OX₄₀L, 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

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: нуклеокапсида, или рибонуклеопротеина (РНП), и оболочки в форме двуслойной мембранны, 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: трансмембранный гликопротеина (G) и матриксного (M) белка, располагающегося изнутри мембранны.

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 инактивированные вирусные частицы в сочетании с различными адьювантами, хорошо известными в данной области техники. Адьювант может состоять из нерастворимых в воде неорганических солей, липосом, мицелл или эмульсий, например адьювант Фрейнда. Другие адьюванты можно найти в работе Vogel, Powell, 1995 г. Действие адьювантов не сводится к какому-то единому механизму, но все они способны значительно усиливать иммунный ответ на вакциненный антиген по сравнению с тем же антигеном самим по себе (Nossal, 1999; Vogel, Powell, 1995). Некоторые адьюванты более эффективны в отношении гуморального иммунного ответа, другие - в отношении клеточного иммунного ответа (Vogel and Powell, 1995); третии усиливают как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ на антигены в составе вакцины (Vogel, Powell, 1995). В целом можно считать, что адьюванты, 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 усиlena также генетическими адьювантами, например лигандами для рецепторов, располагающихся на мемbrane клеток, участвующих в иммунном ответе. Генетические адьюванты 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 адьюванты 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 OX₄₀ (OX₄₀L), обозначаемый также gp34, CD252, CD134L или TNFSF4, является членом надсемейства TN. Аминокислотная последовательность человеческого OX₄₀L на 46% идентична таковой соответствующего мышного белка. Как и другие члены надсемейства TNF, связанный с мембраной лиганд OX₄₀ существует в форме гомотримера. OX₄₀L связывается с OX₄₀ (CD 134), также принадлежащим к надсемейству TNF. OX₄₀ экспрессируется на активированных Т-клетках, а его лиганд, OX₄₀L, 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 OX₄₀-OX₄₀L может способствовать пролиферации, дифференцировке и в особенности выживанию CD4+ 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+ 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 OX₄₀L, вместе с вакциной на основе того же вируса против HIV-1, vCP1452, усиливался специфичный в отношении HIV-1 ответ CD8+ Т-

клеток, а именно частота и экспрессия цитокинов (Liu J. et al., Vaccine 2009; 27:5077-5084). Однако OX₄₀L не усиливал антителный ответ, возбуждаемый вакциной на основе поксвируса канареек против HIV-1, из чего можно предположить, что векторы на основе поксвируса канареек, экспрессирующие OX₄₀L, 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 OX₄₀L, 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 аденоовирусом OX₄₀L использовался в сочетании с пептидами вируса гриппа *in vitro*, или в работе Liu J. et al., 2009, в которой вводили совместно поксвирус канареек, экспрессирующий OX₄₀L, и поксвирус канареек, экспрессирующий HIV-1. Удивительно, но такая совместная экспрессия OX₄₀L 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 адьювантами для животных, проживающих с человеком, поскольку такие препараты позволили бы избежать или ослабить негативные последствия, связанные с обычными вакцинами, содержащими химические адьюванты (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 адьюванты 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 аденоавирусы, 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 катаралярной лихорадки овец (BTV, патент США № 7862821 от компании Merial), цирковирус 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 receptor фактора некроза опухолей α (TNF α) 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, обнаруженному авторами изобретения, что поксивирные векторы, обеспечивающие *in vivo* в организме животного хозяина совместную экспрессию антигенов патогенного агента (включая, но не ограничиваясь перечисленным здесь, вирус бешенства) и генетического адьюванта на основе лиганда рецептора TNF α (включая, но не ограничиваясь перечисленным здесь, OX₄₀L) могут вызывать у животного длительный защитный иммунитет против бешенства. В частности, OX₄₀L может быть гомологичен соответствующему лиганду вакцинируемого вида, например OX₄₀L собаки (cOX₄₀L) 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 плазмида p397-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 плазмида p397-cOX₄₀L;

фиг. 10 представляет схему вектора vCP3015, несущего природный ген полипептида G вируса бешенства в сайте C5 и нуклеотидную последовательность, кодирующую cOX₄₀L, 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 cOX₄₀L;

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 такого 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 cOX₄₀L (вместе представленные SEQ ID NO:7);

фиг. 16 - предсказанная аминокислотная последовательность синтетического cOX₄₀L (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 cOX₄₀L, 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 NpuI 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 cOX₄₀L (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 flankирующие 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 OX₄₀L). 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 OX₄₀L или его активные фрагменты или варианты. В частности, полипептид OX₄₀L является собачьим OX₄₀L (cOX₄₀L).

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 антигennую 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, индуцирующим или стимулирующим 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 цельный 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 взаимозаменяющими 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 OX₄₀L" или "полинуклеотид OX₄₀L" относятся к любому природному или оптимизированному полипептиду OX₄₀L или полинуклеотиду OX₄₀L, 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 цельный 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.рагва, исчерпывающие 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 глутамина - 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 (взаимозаменямо) термину "антigenная 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, выорков, 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 (индивидуа) 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 OX₄₀L.

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 вириуса бешенства содержит полипептид G вириуса бешенства или его фрагмент, или его вариант. В одном из вариантов этого воплощения данного изобретения полипептид G вириуса бешенства или его фрагмент, или его вариант является рекомбинантным полипептидом - продуктом гена вириуса бешенства. В другом варианте этого воплощения данного изобретения ген G вириуса бешенства по меньшей мере на 70% идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO:5 или 16. В другом варианте этого воплощения данного изобретения полипептид G вириуса 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 OX₄₀L, антиген, или фрагмент, или вариант является рекомбинантным полипептидом - продуктом гена OX₄₀L. В другом варианте этого воплощения данного изобретения ген OX₄₀L по меньшей мере на 70% идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO:10. В другом варианте этого воплощения данного изобретения полипептид OX₄₀L 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 адьювантом 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 OX₄₀L. В другом воплощении данного изобретения указанный вектор может содержать поксвирус канареек. В другом воплощении данного изобретения ген поверхностного гликопротеина вириуса бешенства может кодировать гликопротеин G вириуса бешенства, аминокислотная последовательность которого представлена SEQ ID NO:1, и полипептид OX₄₀L, аминокислотная последовательность которого представлена SEQ ID NO:12, 63, 64, 65, 66 или 67.

Приведенное определение охватывает также синтетические антигены, например полиепитопы, 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 (слингового) белка, содержащую по меньшей мере один эпитоп данного белка.

Соответственно минимальная структура полинуклеотида, проявляющаяся как эпитоп, содержит нуклеотиды, кодирующие эпитоп, или антигенную детерминанту, полипептида вириуса бешенства (или состоит из этих нуклеотидов, или в основном состоит из этих нуклеотидов). Полинуклеотид, кодирующий фрагмент полипептида вириуса 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 кэпирование, 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 нукleinовых кислот, обеспечивающим образование мРНК или функциональной РНК, или кодирующими определенный белок, которые включают регуляторные последовательности.

Что касается вариаций OX₄₀L, то словосочетание "функциональный фрагмент или вариант OX₄₀L" в настоящем документе означает пептид, который стимулирует/усиливает иммунный ответ, вызываемый иммуногенным пептидом посредством того же механизма и в сравнимой степени (по сравнению с OX₄₀L по данному изобретению). Например, если кошачий OX₄₀L 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 OX₄₀L действует посредством того же механизма (например, включающего связывание рецептора TNF), то этот кошачий OX₄₀L можно считать функциональным фрагментом или вариантом собачьего OX₄₀L, служащего примером в настоящем документе. Аналогично, полиморфные варианты собачьего OX₄₀L, способные усиливать иммунный ответ, тоже являются функциональными фрагментами или вариантами собачьего OX₄₀L. Наконец, если укороченный вариант OX₄₀L стимулирует/усиливает иммунный ответ в сравнимой степени (по сравнению с соответствующим OX₄₀L полной длины), то этот укороченный вариант считается функциональным фрагментом или вариантом OX₄₀L.

Данное изобретение также охватывает нуклеотидные последовательности, комплементарные полинуклеотидам, кодирующими антиген, эпитоп или иммуногенный агент вируса бешенства, или полинуклеотидам, кодирующими антиген, эпитоп или иммуногенный агент OX₄₀L. Комплémentарная 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, нукleinовой 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) нукleinовые кислоты и белки включают нукleinовые кислоты и белки, очищенные стандартными методами очистки такого рода веществ. Определение "изолированный" ("выделенный") также охватывает нукleinовые 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 OX₄₀L. 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 видеообразования 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, разделенных в результате дупликации 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 OX₄₀L, 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 локус. 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 кодирующему его нукleinовой 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 OX₄₀L, 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 нукleinовой 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 OX₄₀L 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 OX₄₀L 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 OX₄₀L, 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 вириуса бешенства или полипептиды OX₄₀L, последовательность ДНК гена G вириуса бешенства или гена OX₄₀L может быть модифицирована, чтобы 1) содержать кодоны, предпочтительные для генов с высоким уровнем экспрессии у данного вида живых организмов; 2) иметь содержание A+T или G+C, близкое к обычно имеющему место у данного вида; 3) образовывать инициаторную 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 вириуса бешенства или белка OX₄₀L 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 вириуса бешенства и полипептида OX₄₀L.

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 также 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 (T) в последовательностях ДНК считается эквивалентным урацилу (U) в последовательностях РНК. Таким образом, последовательности РНК входят в объем данного изобретения; их можно вывести из последовательностей ДНК, полагая тимидин (T) в последовательностях ДНК эквивалентным урацилу (U) 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., Haeberlie 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 OX₄₀L, 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 OX₄₀L. 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 OX₄₀L. 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 OX₄₀L, 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 плазмида pVR1020 или 1012 plasmid (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, см., например, патенты США №№ 5846946 и 6451769). Плазмида pVR1020 происходит из плазмида 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 плазмида, используемая как вектор для внедрения полинуклеотидной последовательности, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид лошадиного инсулиноподобного фактора роста IGF1 с аминокислотным остатком M(24) до аминокислотного остатка A(48) последовательности, зарегистрированной в базе данных Genbank под номером U28070. Дополнительная информация о ДНК-плазмидах, которую можно использовать для консультирования или практического использования, имеется, например, в патентах США №№ 6852705; 6818628; 6586412; 6576243; 6558674; 6464984; 6451770; 6376473 и 6221362.

Термин "плазмида" 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 плазмида 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 мышного 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 Равса. 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 (polyA) для плазмид и вирусных векторов, отличных от поксивирусных, можно использовать сигнал полиаденилирования гена гормона роста крупного рогатого скота (bGH) (см. патент США № 5122458) или гена β-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 плазмида 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 эксципiente. 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; птичьи поксвирусы или ослабленные птичьи поксвирусы, например поксвирусы канареек, куриных, голубиных, перепелиных, вакцины ALVAC и TROVAC; см., например, патенты США №№ 5505941 и 54948070; поксвирус енотов, поксвирус свиней), аденоовирсы (например, аденоовирус человека, аденоовирус 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 плазмида по данному изобретению. Или же вакцинация в режиме прайм-буст предполагает по меньшей мере одно первичное введение композиции на основе плазмида 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 вириуса 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 соответственно помеченные стерильные емкости с запаянной крышкой и держать на льду до использования. В день заражения рекомендуется ввести животным обезболивающее/противовоспалительное средство; в случае собак это может быть фироксиб 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 вириуса бешенства в сыворотке, используя метод RFFIT (быстрый тест на ингибирование флуоресценции) или FAVN (нейтрализация вириуса 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), интрафермальные (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), Vejet или Vitajet (производство Bioject, шт. Орегон, США). Для введения плазмидных композиций можно также использовать другой подход - электропорацию (см., например, Tollesen et al., 2002; Tollesen 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 вириуса бешенства в клетках-мишениях. 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 вириуса 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 плазмidaх 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.

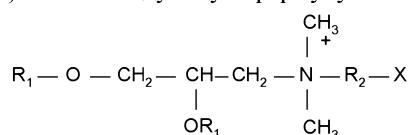
Другое воплощение данного изобретения представляет собой набор для практического осуществления способа индуцирования иммунологической или защитной реакции у животных против бешенства, включающий композицию или вакцину, содержащую рекомбинантный вирусный вектор по данному изобретению и основанную на плазмиде 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-мишениях. 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, и 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_1 представляет насыщенный или ненасыщенный неразветвленный алифатический радикал, содержащий 12-18 атомов углерода; R_2 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 изо-

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

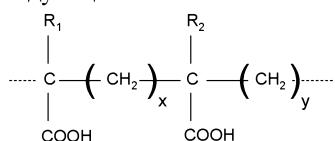
Из этих катионных липидов предпочтителен DMRIE (см. публикацию WO96/34109), предпочтительно связанный с нейтральным липидом, предпочтительно DOPE (см. Behr, 1994), с образованием DMRIE-DOPE.

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 адьювантных 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 аллилпентагиригитролом. В их числе упомянем карбополы 974Р, 934Р и 971Р.

Что касается сополимеров малеинового ангидрида и алкенильных производных, то предпочтителен EMA (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 EMA основной единицей является предпочтительно следующая:



где R_1 и R_2 , которые могут быть одинаковыми или же различными, представляют H или CH₃;

$x = 0$ или 1, предпочтительно $x = 1$;

$y = 1$ или 2, причем $x + y = 2$.

В случае EMA $x = 0$ 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 адьювантный 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 (IFN α), интерферон β (IFN β), интерферон γ (IFN γ), интерлейкин-1 α (IL-1 α), интерлейкин-1 β (IL-1 β), 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 (TNF α), фактор некроза опухолей β (TNF β) и трансформирующий фактор роста β (TGF β). Ясно, что эти цитокины можно вводить пациенту вместе и/или последовательно с иммунологической или вакциновой 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 гликопroteина 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 поксивиуса 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 (р397-синтетический ген полипептида G вируса бешенства, фиг. 1). Донорную плазмиду получали, взяв ПЦР-фрагмент длиной ~1,6 т.п.н., полученный с рестриктазами XbaI-XmaI, синтетического гена полипептида G вируса бешенства, с промотором I3L и клонировав его в pHM606.1 (рC3), что дало р397-синтетический ген полипептида G вируса бешенства (рC3 I3Lр 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 хемиллюминисцентного 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 врачающихся 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.1R (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 мышиными антителами против гликопротеина G вируса бешенства (Chemicon #MAB8727) в разведении 1:500, а затем - с антимышными антителами, коньюгированными 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 monoclonalные 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 соответственных 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 OX₄₀L.

Краткое изложение.

Был получен и охарактеризован рекомбинантный ALVAC, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая собачий лиганд OX₄₀ (cOX₄₀L), 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 OX40 (cOX₄₀L, подобный белку 4 из надсемейства лигандов фактора некроза опухолей) внедрили в локус C6 исходного вируса ALVAC CP65a (титр $6,1 \times 10^{17}$ БОЕ/мл, ресуспендированный в 1 мл буферного раствора Tris с pH 9). Донорная плазмида p397-cOX₄₀L (pC6 42 Кр cOX₄₀L) -синтетический полинуклеотид, кодирующий cOX₄₀L, с промотором 42K в локусе C6 -была получена исходя из фрагмента синтетической нуклеотидной последовательности, кодирующей собачий OX₄₀L, 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 cOX₄₀L. 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 врачающихся флакона) vCP3015.9.2.1.2. Собирали P3, осаждали зараженные клетки CEF, супернатант отбрасывали. Зараженные клетки CEF ресуспендировали в буферном растворе Tris 1 mM (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 повторах 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 OX₄₀L либо зонда на природный ген гликопротеина G вируса бешенства. Для амплификации зонда на OX₄₀L использовали праймеры OX₄₀L.1F (SEQ ID NO:61) и OX₄₀L.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 Р3 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 гликопroteина G вируса бешенства (Chemicon #MAB8727) в разведении 1:500, а затем - антимышьиных антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой.

Анализ последовательности.

В случае природного гена полипептида G вируса бешенства в сайте С5 подробное исследование геномной ДНК Р3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования локуса С5, содержащего вставленный природный ген гликопroteина G вируса бешенства. Для амплификации целого фрагмента С5R-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 С5. Затем для секвенирования этого фрагмента были использованы праймеры, представленные на фиг. 37. В случае сOX₄₀L в локусе С6 подробное исследование геномной ДНК Р3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования локуса С6, содержащего вставленную нуклеотидную последовательность, кодирующую ОХ₄₀L. Для амплификации целого фрагмента С6R-сOX₄₀L-C6L были использованы праймеры С6R.1F (SEQ ID NO:57) и С6L.1R (SEQ ID NO:60), расположенные на концах плечей локуса С6. Для секвенирования этого фрагмента были использованы праймеры, представленные на фиг. 37.

Результаты.

Гомогенность пула Р3 vCP3015 подтверждалась гибридизацией - на 100% положительной для вставки сOX₄₀L и на 100% отрицательной для сайта С6 без вставки. Титр vCP3015 из Р3 составлял 8,5 × 10⁹ БОЕ/мл. Целостность рекомбинантного vCP3015 проверяли также путем Саузерн-блоттинга. В случае сOX₄₀L 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 С5, фрагмент длиной 23014 п.н. для правого сайта С5 и фрагмент длиной 806 п.н. для обоих сайтов С5 (фиг. 12).

Для исследования экспрессии природного гена гликопroteина G вируса бешенства первичные клетки CEF заражали vCP3015 из пула Р3 при MOI=10. Зарраженные клетки и супернатанты соответствующим образом обрабатывали и проводили вестерн-блоттинг. Как видно из фиг. 13, гликопroteин 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 С6 и вставку сOX₄₀L, использовали праймеры, показанные на фиг. 14. Анализ последовательности показал, что последовательности, кодирующие сOX₄₀L, и области С6L and С6R соответствовали ожидаемому (фиг. 15). Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса С5 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 гликопroteина G вируса бешенства, кодон-оптимизированного гена гликопroteина G вируса бешенства и ОХ₄₀L.

Краткое изложение.

Был получен и охарактеризован рекомбинантный ALVAC, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая собачий лиганд ОХ40 (сOX₄₀L), вставлена в локус С6 (одна копия) vCP3006, несущего природный ген полипептида G вируса бешенства в локусах С5 (две копии) и кодон-оптимизированный ген полипептида G вируса бешенства в локусах С3 (две копии). Кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая собачий ОХ₄₀L, (с промотором 42K перед ней) была вставлена в локус С6 исходного вируса ALVAC vCP3006 из пула Р5 (титр 1,88 × 10⁹ БОЕ/мл). Донорная плазмида 397-сOX₄₀L (рС6 42 Кр сOX₄₀L) 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 сOX₄₀L. 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 Р1 (6-луночный планшет), Р2 (флакон T75) и Р3 (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 (Р3), 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 сOX₄₀L, на синтетический ген гликопroteина G вируса бешенства и на природный ген гликопroteина G вируса бешенства. Для амплификации зонда на сOX₄₀L, использовали праймеры ОХ₄₀L.1F (SEQ ID NO:61) и ОХ₄₀L.1R (SEQ ID NO:62); для амплификации зонда на природный ген гликопroteина 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 Р3 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 антимышьими антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой.

Анализ последовательности.

В случае сOX₄₀L в локусе С6 исследование геномной ДНК из пула Р3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования локуса С6, содержащего вставку сOX₄₀L. Для амплификации целого фрагмента C6R-сOX₄₀L-C6L использовали праймеры C6R.1F (SEQ ID NO:57) и C6L.1R (SEQ ID NO:60), расположенные на концах плечей локуса С6. 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 Р3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования плечей локуса С3 и вставленного синтетического гена полипептида G вируса бешенства. Для амплификации целого фрагмента C3R-вставленный синтетический ген полипептида G вируса бешенства-С3Ь были использованы праймеры C3R2F (SEQ ID NO:43) и C3L.1R (SEQ ID NO:47), расположенные в плечах локуса С6. В случае природного гена полипептида G вируса бешенства исследование геномной ДНК из пула Р3 проводили путем амплификации (ПЦР) и секвенирования локуса С5, 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 С5. Для секвенирования этого фрагмента были использованы праймеры, представленные на фиг. 37.

Результаты.

Гомогенность пула Р3 vCP3012 подтверждалась гибридизацией - на 100% положительной для вставки сOX₄₀L и на 100% отрицательной для сайта С6 без вставки. Титр вируса vCP3012 из пула Р3 составлял 4×10^9 БОЕ/мл. Целостность рекомбинантного vCP3012 проверяли также путем Саузерн-блоттинга. В случае сOX₄₀L 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 С3 и фрагмент длиной 5248 п.н. для правого сайта С5 (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 С5 и 23275 п.н. - для правого сайта С5 (фиг. 23). Эти ожидаемые размеры свидетельствуют о правильном встраивании последовательности, кодирующую сOX₄₀L, в локус С6, синтетического гена полипептида G вируса бешенства - в локус С3 и природного гена полипептида G вируса бешенства - в локус С5.

Для исследования экспрессии синтетического и природного генов гликопротеина G вируса бешенства первичные клетки CEF заражали vCP3012 из пула Р3 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 С6 и вставку сOX₄₀L, использовали праймеры, показанные на фиг. 25. Анализ последовательности показал, что последовательности, кодирующие сOX₄₀L, и области С6L и С6R соответствовали ожидаемому (фиг. 26). Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса С3 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 С3 слева и справа от вставленного синтетического гена полипептида G вируса бешенства в vCP3012 соответствовали ожидаемому. Для секвенирования ПЦР-продукта, включающего плечи локуса С5 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 С5 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 ₅₀ /мл)	Путь однократного введения	Объем	Число особей в группе
A	Испытываемая вакцина #1 vCP3006	10 ^{5,9}	Подкожно	1 мл	6
B	Испытываемая вакцина #2 vCP3012	10 ^{5,9}	Подкожно	1 мл	6
C	Испытываемая вакцина #3 vCP3015	10 ^{5,9}	Подкожно	1 мл	6
D	Контрольная вакцина vCP65A	10 ^{5,9}	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 сOX₄₀L, 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 сOX₄₀L. 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 сOX₄₀L 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 сOX₄₀L 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 ₅₀ /мл.)	Вводимое TCID ₅₀	Объем, мл	Число особей в группе
A	Испытываемая вакцина #1 vCP3006	10 ^{6,16}	10 ^{6,16}	1	6
B	Испытываемая вакцина #2 vCP3012	10 ^{6,54}	10 ^{6,22}	0,7	6
C	Испытываемая вакцина #3 vCP3015	10 ^{6,08}	10 ^{5,87}	1	6
D	Контрольная вакцина vCP65A	10 ^{6,12}	10 ^{6,07}	1	6
E (отрицательный контроль)	-	-	-	-	6

* Вводимое количество вакцины (титр) 10⁵⁻⁹ TCID₅₀/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 ингибицию флуоресценции (RFFIT). Собак группы С (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-SM-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 Р=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 Д.

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
A vCP3006	0,57	0,78	0,68	0,66	0,55	0,39	0,40*
B vCP3012	0,61	3,36*	4,84*	3,06*	1,81*	1,16*	0,96*
C vCP3015	0,47	0,98	1,97*	1,63	1,06*	0,58*	0,48*
D vCP65A	0,41	0,54	0,92	1,15	0,35	0,26	0,25
E (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 сохранили текущий номер исследования вплоть до его окончания позже. Рассчитанная 50%-ная летальная доза инфекционного агента для мышей (MLD50) составляла 2,2 logio (158,5 MLD50) в объеме 0,03 мл. Каждой собаке вводили 1 мл, соответственно доза составляла 3,96 logio MLD50. 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	≤0,2	0,9	Отрицательный	30
	CCECAN	≤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	CBCCSX	≤0,2	≤0,2	Положительный	13
	CBDCCCE	≤0,2	≤0,2	Положительный	17
	CBDCCY	≤0,2	0,4	Положительный	12

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

**CBCCSX, CBDCCCE 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 $10^{5.9}$ TCID₅₀/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 вакцинового препарата, содержащего две копии гена полипептида G вируса бешенства и иммуномодулирующий агент OX₄₀L, (vCP3015) в количестве $10^{5.87}$ TCID₅₀/мл, обретали защиту от инфекции бешенства через год после вакцинации. Препарат vCP3012, содержащий четыре копии гена полипептида G вируса бешенства и иммуномодулирующий агент OX₄₀L, вызывал более ранний и мощный антителенный 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 OX₄₀L.

Авторы данного изобретения полагают, что возможно множество других сочетаний антигена и OX₄₀L, 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 OX₄₀L, в которых OX₄₀L выбран за его вероятную способность действовать в организме подлежащего вакцинации животного как эффективный генетический адьювант. На фиг. 38 представлено выравнивание известных и предполагаемых OX₄₀L из различных видов животных. Специалист в данной области техники должен обратить внимание на то, что белки OX₄₀L могут также несколько варьировать в пределах одного рода или вида животных (например, у Canis familiaris). Следовательно, белки OX₄₀L, имеющие достаточную степень гомологии с SEQ ID NO:12, тоже должны действовать как эффективные генетические адьюванты 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 OX₄₀L, служащий адьювантом. Например, вирусные векторы включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) ДНК-содержащие вирусы, РНК-содержащие вирусы, герпесвирусы, адено-вирусы 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 OX₄₀L, которые
предположительно должны действовать как эффективные
вакцинныe композиции с генетическим адьювантом

Антиген	Животные	OX ₄₀ L
Грипп, чума (CDV), CPV, лихорадка Западного Нила, коронавирусы	Псовые	SEQ ID NO:12 или ее варианты со сравнимым адьювантным действием у псовых
Грипп, FCV, FeLV, FIPV, FIV, WNV и др.	Кошачьи	SEQ ID NO:63 или ее варианты со сравнимым адьювантным 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 адьювантным действием у лошадиных
BRSV, BVD, герпес, плевропневмония, аденоизирысы, парвовирусы, энтеровирусы, FMDV, BTV,	Крупный рогатый скот	SEQ ID NO:65 или ее варианты со сравнимым адьювантным действием у крупного рогатого скота
PCV2, PRRSV, FMDV, BVD, инфекционный менингоэнцефалит, вирус Нипах и др.	Свиньи	SEQ ID NO:66 или ее варианты со сравнимым адьювантным действием у свиней
MDV, SB1, HVT, NDV, IBDV, IBV	Птицы	SEQ ID NO:70 или ее варианты со сравнимым адьювантным действием у птиц
BTV и др.	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 OX₄₀L 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;

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

2. Вакцина по п.1, в которой указанный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид OX₄₀L псовых, кошачьих, лошадиных, крупного рогатого скота, нежвачных парнокопытных, птиц, овец или приматов.

3. Вакцина по п.2, в которой полипептид OX₄₀L 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 OX₄₀L 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 OX₄₀L имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.

8. Вакцина по п.7, в которой полипептид OX₄₀L 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:

(a) полипептид G вируса бешенства и

(b) полипептид OX₄₀L 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 OX₄₀L 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 OX₄₀L 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 OX₄₀L, 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 OX40L, И ВАКЦИНЫ, СОЗДАННЫЕ НА ИХ ОСНОВЕ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ 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	85	Tyr Thr Asn Phe Val Gly Tyr	95
Val Thr Thr Phe Lys Arg Lys His	100	Phe Arg Pro Thr Pro Asp Ala	110
Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys	115	Met Ala Gly Asp Pro Arg Tyr Glu	125
Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp	130	Tyr Arg Trp Leu Arg Thr Val	140
Lys Thr Thr Lys Glu Ser Leu Val Ile	145	Ile Ser Pro Ser Val Ala Asp	155
Ile Ser Pro Ser Val Ala Asp	150	160	
Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His	165	Ser Arg Val Phe Pro Ser Gly	175
Ser Cys Ser Gly Val Ala Val Ser Ser	180	Thr Tyr Cys Ser Thr Asn His	190
Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg	195	Leu Gly Met Ser Cys	205
Leu Gly Met Ser Cys	200		
Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala	210	Ser Lys Gly Ser Glu	220
Ser Lys Gly Ser Glu	215		
Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu	225	Tyr Lys Ser Leu Lys Gly	240
Tyr Lys Ser Leu Lys Gly	230	235	
Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val	245	Leu Gly Leu Arg Leu Met Asp	255
Leu Gly Leu Arg Leu Met Asp	250		
Gly Thr Trp Val Ala Met Gln Thr Ser Asn Glu	260	Thr Lys Trp Cys Pro	270
Thr Lys Trp Cys Pro	265		
Pro Asp Gln Leu Val Asn Leu His Asp Phe Arg	275	Ser Asp Glu Ile Glu	285
Ser Asp Glu Ile Glu	280		
His Leu Val Val Glu Glu Leu Val Arg Lys Arg	290	Glu Glu Cys Leu Asp	300
Glu Glu Cys Leu Asp	295		
Ala Leu Glu Ser Ile Met Thr Thr Lys Ser Val	305	Ser Phe Arg Arg Leu	320
Ser Phe Arg Arg Leu	310		

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	tttacatttt	aaaatatcg	caccgtgttc	tagtaataat	60
tttaccattt	ctatacaga	aataacttacg	gctaaataca	aagacgttga	tagtatattt	120
acgttattgt	atttgcattt	tttaagtata	taccttacta	aatttatatc	tctatacctt	180
atagctttat	gcagttcatt	tataagtctt	ccattactca	tttctggtaa	tgaagtatta	240
tatatcatta	tgatattatc	tctatttat	tctaataaaa	accgttatca	tgttatttat	300
tatttgttat	aattatacta	tttaataaaat	tataccaaat	acttagatac	ttattaatac	360
catcctagaa	cttgttatttc	ttgcccccta	aactggaca	tgcactccat	taggcgttcc	420
ttgtttcga	catcgctc	cttaacatat	cctactgtt	tgtgaggatt	ccacggattt	480
tctactgtga	tatcaccaaa	cacgtccttc	gaacagggt	ccgcatttcag	cagaacattt	540
cttagggctc	taagttcatc	agatacctcc	agtttcataa	ctacagcgca	tcotttcgct	600
cccaactgtt	tagaggcg	ttactctgagga	aaacacatct	cttctttaca	gactatagaa	660
atagtctgta	aatcttgatc	agttatttgc	ttttgaaat	tttcaaattt	atcacattga	720
tccatatttg	ctattccaag	agttatatga	ggaaaaat	cacatcctgt	catgtat	780
attgtaacat	tattataatc	tgtaacatca	gtatctaacc	taacgtcgta	aaagttaaca	840
gatgccca	gtactataatc	ccaaggaacc	ttaacatcta	atcccattaa	aatagtatcc	900
tttctactat	tttttcatt	ggcaagtatg	tggcttagtt	tacacaaaat	tcotgccatt	960
ttgtaacgat	agcgaagcaa	tagttgtat	gcttttatt	tgattaacta	gtcataaaaa	1020
tcgggatccc	tcgagatgag	ataaaagtgaa	aatatataatc	attatattac	aaagtacaat	1080
tat taggtt	taatcatgg	gccccaggcc	ctgctgttcg	tgcccctgct	ggtgttcccc	1140
ctgtgttcg	gcaagttccc	catctacacc	atccccgaca	agctgggccc	ctggagcccc	1200
atcgacatcc	accacctgag	ctgccccaa	aatctggtgg	tggaggatga	gggctgcacc	1260
aatctgagcg	gcttcagcta	catggagctg	aaagtgggct	acatcctggc	catcaagatg	1320
aacggcttca	cctgcaccgg	cgtggtgacc	gaggccgaga	cctacaccaa	cttggggc	1380
tacgtgacca	ccaccttcaa	gcggaaagcac	ttcagaccta	ccccgcacgc	ctgcagagcc	1440
gcctacaact	ggaagatggc	cggcgaccct	agatacgagg	agagcctgca	caacccctac	1500
cccgactaca	gatggctg	gaccgtgaaa	accaccaagg	agtccctgg	gatcatcagc	1560
cctagcgtgg	ccgatctgga	cccctacgac	agaagcctgc	acagcagagt	gttccctagc	1620
ggcaagtgc	gcggcgtggc	cgtgtccagc	acctactgca	gcaccaacca	cgactacacc	1680
atctggatgc	ccgagaaccc	tagactgggc	atgagctgcg	acatcttcac	caacagccgg	1740
ggcaagagag	ccagcaaggg	cagcgagacc	tgcggcttcg	tggacgagag	aggcctgtac	1800
aagagcctga	agggcgctg	caagctgaag	ctgtgcggcg	tgctggccct	gagactgatg	1860
gacggcacct	gggtggccat	gcagaccagc	aacgagacca	agtggtgccc	tcctgaccag	1920

ctggtaacc	tgcacgactt	ccggagcgat	gagatcgagc	acctggtgt	ggaagagctg	1980
gtgcggaaga	gagaggagtg	cctggacgcc	ctggagagca	tcatgaccac	caagagcgtg	2040
tcctccgga	gactgagcca	cctgagaaag	ctggtgcccg	gctttggcaa	ggctcacaca	2100
atcttcaaca	agaccctgtat	ggaggccgat	gcccaactaca	agtctgtgcg	gacctggAAC	2160
gagatcctgc	ctagcaaggg	ctgcctgaga	gtggcggca	gatgccaccc	ccacgtgaac	2220
ggcgtgttct	tcaacggcat	catcctgggc	cctgacggca	acgtgctgtat	ccctgagatg	2280
cagagcagcc	tgctgcagca	gcacatggaa	ctgctggaga	gcagcgtgtat	ccccctggtg	2340
cacccctgg	ccgaccccag	caccgtgttc	aaggatggcg	acgaggccga	ggacttcgtg	2400
gaggtgcacc	tgcccgtgt	gcacaaccag	gtgtccggcg	tggacctggg	cctgcccAAC	2460
tggggcaagt	acgtgctgct	gagcggccga	gccctgaccg	ccctgatgtct	gatcatcttc	2520
ctgatgacct	gctgcccggag	ggtgaacaga	agcgagccca	cccagcacaa	cctgagaggc	2580
accggcagag	aggtgtccgt	gaccccccag	agcggcaaga	tcatcagcag	ctgggagagc	2640
cacaagagcg	gcggagagac	cagactatga	tttttatgcc	cgggtttta	tagctaatta	2700
gtcaaatgtg	agttaatatt	agtatactac	attactaatt	tattacatat	tcatttat	2760
caatctagta	gcatttagct	tttataaaac	aatataactg	aatagtacat	actttactaa	2820
taagttataa	ataagagata	catattata	gtattttact	ttctacactg	aatataataa	2880
tataattata	caaataataat	ttttaatact	atatagtata	taactgaaat	aaaataccag	2940
tgtatata	ttattataca	tttataaccac	atcaaagatg	agttataaca	tcagtgtcac	3000
tgttagcaac	agtagttata	cgatgagtag	ttactctcg	atggcgtag	tatgtatgt	3060
tcttctagtt	ttcttagtag	gcattatagg	aaacgtcaag	cttataaggt	tattaatgg	3120
atctagaaat	atatctatta	taccgtttct	caacttggga	atagccgatt	tgcgtttgt	3180
gatattcata	ccttataaca	ttatatacat	actaagtaat	ttccattggc	atttggtaa	3240
agcactttgt	aaaattagtt	ctttctttt	tacttcta	atgtttgcaa	gtatatttt	3300
aataactgta	ataagcgtat	atagatatgt	aaaaattacc	cttcctggat	ttacctataa	3360
atatgttaac	attagaaata	tgtacattac	tatattttc	atatggatta	tttctattat	3420
actagggatt	cctgctctt	acttttagaaa	tactatcgta	acaaaaaata	acgacacgct	3480
gtgtttaat	cattatcatg	ataatagaga	aattgctgaa	ttgatttaca	aagttattat	3540
ctgtatcaga	tttatttttag	gatacctact	acctacgata	attatactcg	tatgctatac	3600
gttactgat						3609

<210> 3
<211> 991
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> vCP3006 C3 правое плечо

<400> 3
gctttatgaa gaggaggatt tttacatttt aaaatatcg caccgtgttc tagtaataat 60
tttaccattt ctatatcaga aataacttacg gctaaataca aagacgttga tagtatattt 120
acgttattgt attgcattt tttaagtata taccttacta aatttatatc tctataccctt 180
atagcttat gcagttcatt tataagtctt ccattactca tttctggtaa tgaagtatta 240
tatatcatta tgatatttac tctatTTTAT tctaataaaa accgttatca tgTTTATTAT 300
tatttggat aattataacta tttaataaat tataccaaat acttagatac ttattaatac 360
catcctagaa ctgttatttc ttgcccccta aacttggaca tgcactccat taggcgttcc 420
ttgtttcga catcgtcctc cttaacatat cctactgtta tgtgaggatt ccacggatttt 480
tctactgtga tatcaccaaa cacgtccttc gaacaggta ccgcattcag cagaacattt 540
cttagggctc taagttcatc agataacctcc agtttcataa ctacagcgca tccttcgct 600
cccaactgtt tagaggcggtt actctgagga aaacacatct cttctttaca gactatagaa 660
atagtctgtt aatcttgatc agttatttgc ttttggaaat tttcaaattct atcacatgtt 720
tccatatttgc ctattccaag agtttatatga ggaaaaatatac cacatcctgt catgtatTTT 780
attgttaacat tattataatc tgtaacatca gtatctaacc taacgtcgta aaagttaaca 840
gatgcccagt tactataatc ccaaggaacc ttaacatcta atcccattaa aatagtatcc 900
tttctactat tttttcattt ggcaagtatg tggcttagtt tacacaaaat tcctgcccattt 960
ttgttaacgat aqcgaaqcaaa tagcttgtat q 991

<210> 4

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пр.

atgagata

<211> 2

<212> ДНК

<213> Иск

<223>

qctttatq

tttaccattt	cstatatcaga	aatacttacg	gctaaataca	aagacgttga	tagtatattt	120
acgttattgt	atttgcattt	tttaagtata	taccttacta	aatttatatc	tctataccctt	180
atagctttat	gcagttcatt	tataagtctt	ccattactca	tttctggtaa	tgaagtatta	240
tatatcatta	tgtatattatc	tctatTTTat	tctaataaaa	accgttatca	tgttattttat	300
tatttggat	aattatacta	tttaataaaat	tataccaaat	acttagatac	ttattaatac	360
catcctagaa	cttgttatttc	ttgcccccta	aacttggaca	tgcactccat	taggcgttcc	420
ttgtttcga	catcgctc	cttaacatat	cctactgtta	tgtgaggatt	ccacggattta	480
tctactgtga	tatcaccaaa	cacgtccttc	gaacaggta	ccgcattcag	cagaacattt	540
cttagggctc	taagttcatc	agatacctcc	agtttcataa	ctacagcgca	tccttcgct	600
cccaactgtt	tagaggcggt	actctgagga	aaacacatct	cttcttaca	gactatagaa	660
atagtctgta	aatcttgatc	agttatttgc	ttttgaaat	tttcaaattct	atcacattga	720
tccatatttg	ctattccaag	agttatata	ggaaaaat	cacatcctgt	catgtatTTT	780
attgtaacat	tattataatc	tgtaacatca	gtatctaacc	taacgtcgta	aaagttaaca	840
gatgcccaagt	tactataatc	ccaaggaacc	ttaacatcta	atcccattaa	aatagtatcc	900
tttctactat	tttttcatt	ggcaagtatg	tggcttagtt	tacacaaaat	tcotgccatt	960
ttgtaacgat	agcgaagcaa	tagttgtat	gcttttatt	tgattaacta	gtcataaaaa	1020
tcgggatccc	tcgagatgag	ataaaagtgaa	aatatataatc	attatattac	aaagtacaat	1080
tatttaggtt	taatcatgg	gccccaggcc	ctgctgttcg	tgcccctgct	ggtgttcccc	1140
ctgtgcttcg	gcaagttccc	catctacacc	atccccgaca	agctgggccc	ctggagcccc	1200
atcgacatcc	accacctgag	ctgccccaa	aatctggtgg	tggaggatga	gggctgcacc	1260
aatctgagcg	gcttcagcta	catggagctg	aaagtggct	acatcctggc	catcaagatg	1320
aacggcttca	cctgcaccgg	cgtggtgacc	gaggccgaga	cctacaccaa	ctttgtggc	1380
tacgtgacca	ccaccccaa	gcggaagcac	ttcagaccta	ccccgacgc	ctgcagagcc	1440
gcctacaact	ggaagatggc	cggcgaccct	agatacgagg	agagcctgca	caacccctac	1500
cccgactaca	gatggctgct	gaccgtgaaa	accaccaagg	agtccctgg	gatcatcage	1560
cctagcgtgg	ccgatctgga	cccctacgac	agaagcctgc	acagcagagt	gttccctagc	1620
ggcaagtgca	gcggcgtggc	cgtgtccagc	acctactgca	gcaccaacca	cgactacacc	1680
atctggatgc	ccgagaaccc	tagactgggc	atgagctgct	acatcttcac	caacagccgg	1740
ggcaagagag	ccagcaaggg	cagcgagacc	tgcggcttcg	tggacgagag	aggcctgtac	1800
aagagcctga	agggcgcctg	caagctgaag	ctgtgcggcg	tgctggcct	gagactgtg	1860
gacggcacct	gggtggccat	gcagaccagc	aacgagacca	agtggtgccc	tcctgaccag	1920

ctggtaacc	tgcacgactt	ccggagcgat	gagatcgagc	acctgggt	ggaagagctg	1980
gtgcggaaga	gagaggagtg	cctggacgcc	ctggagagca	tcatgaccac	caagagcgtg	2040
tccttccgga	gactgagcca	cctgagaaag	ctggtgccc	gctttggcaa	ggcctacaca	2100
atcttcaaca	agaccctgat	ggaggccgat	gcccaactaca	agtctgtgcg	gacctggaac	2160
gagatcctgc	ctagcaaggg	ctgcctgaga	gtggcggca	gatgccaccc	ccacgtgaac	2220
ggcgtgttct	tcaacggcat	catcctgggc	cctgacggca	acgtgctgat	ccctgagatg	2280
cagagcagcc	tgctgcagca	gcacatggaa	ctgctggaga	gcagcgtgat	ccccctggtg	2340
cacccctgg	ccgacccca	caccgtgttc	aaggatggcg	acgaggccga	ggacttcgtg	2400
gaggtgcacc	tgcccgtgt	gcacaaccag	gtgtccggcg	tggacctggg	cctgcccac	2460
tggggcaagt	acgtgctgct	gagcgccgga	gccctgaccg	ccctgatgct	gatcatcttc	2520
ctgatgacct	gctgccggag	ggtgaacaga	agcgagccca	cccagcacaa	cctgagaggc	2580
accggcagag	aggtgtccgt	gaccccccag	agcggcaaga	tcatcagcag	ctggagagc	2640
cacaagagcg	gcggagagac	cagacta				2667

<210> 6

<211> 939

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> правое плечо vCP3006 C3

<400> 6

tttttatgcc	cgggtttta	tagctaatta	gtcaaatgtg	agttaatatt	agtatactac	60
attactaatt	tattacatat	tcatttat	caatctagta	gcatttagct	tttataaaac	120
aatataactg	aatagtagcat	actttactaa	taagttataa	ataagagata	catattata	180
gtatTTTact	ttctacactg	aatataataa	tataattata	caaataataat	ttttaatact	240
atatagtata	taactgaaaat	aaaataccag	tgtaatatag	ttattataca	tttataaccac	300
atcaaagatg	agttataaca	tcagtgtcac	tgttagcaac	agtagttata	cgatgagtag	360
ttactctcgt	atggcgtag	tatgtatgta	tcttctagtt	ttcttagtag	gcattatagg	420
aaacgtcaag	cttataaggt	tattaatgg	atctagaaat	atatctatta	taccgtttct	480
caacttggga	atagccgatt	tgctgttgt	gatattcata	cctttataca	ttatatacat	540
actaagtaat	ttccattggc	atTTTggtaa	agcactttgt	aaaatttagtt	ctttctttt	600
tacttctaac	atgtttgcaa	gtatatttt	aataactgta	ataagcgtat	atagatatgt	660
aaaaattacc	cttcctggat	ttacctataa	atatgttaac	attagaaata	tgtacattac	720
tatatttttc	atatggatta	tttctattat	actaggatt	cctgctctt	acttttagaaa	780
tactatcgta	acaaaaaata	acgacacgct	gtgtttaat	cattatcatg	ataatagaga	840

aattgctgaa ttgatttaca aagttattat ctgtatcaga tttatttttag gatacctact	900
acctacgata attatactcg tatgctatac gttactgtat	939
<210> 7	
<211> 2141	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Фрагмент vCP3015 с C6R до C6L	
<400> 7	
gttctaaagt tcttcctcc gaaggatata gacaaagtat ttcttctaca tcottactat	60
ttattgcagc tttaaacagc ctatcacgtc tcctattttt agtattggta gaacgttttta	120
gttctaaagt taaaatatta gacataattt gcatattgtt tattccttgc atagttgagt	180
ctgttagatcg tttcagttata tcactgatata atgtactact gttatgtga aatatagaat	240
cgtatattggc atttaactgt tttgttatac taagtctaga ttttaaatct tctagtaata	300
tgcattttaa tataaaagct tccacgtttt tgtatacatt tctttccata ttagtagcta	360
ctactaaatg attatcttct ttcatatctt gtagataaga tagactatct ttatcttat	420
tagtagaaaa tacttctggc catacatcgta taaattttt tgggttggtt agatataata	480
ttaaatatct agaggatcct attatttggtt gttaaatgtt tatagagtaa aatgatctgg	540
ctattaaaca taggcagtt accatagaat gctgctccc gttacagtgt tttaccataa	600
ccatagatct gcctgtattt tgatacata taacagctgt aaatcctaaa aaattcctat	660
cataattattt aatatttagt aattcatttc catgtgaaag atagactaat ttatatcct	720
ttacctccaa ataattattt acatctctt aacaatctat ttatatatca ttaactggta	780
ttttataata tccagaaagg ttgttgggg ttgttggaaat aagtcttata acatcgtaa	840
gttaaattattt aatatcatga atcttttata tattataccc ataagttaaa ttatattta	900
ctttctcattt atctgactta gtttttgtt aataagggtgt gtctgaaaaa attaaaaggt	960
aattcggttga atgaagctgtt atttgctgtt cttttttat ctaattttgg agatttagca	1020
gtacttactt cattagaaga agaatctgcc agttcctgtc tattactgtt attcgtttc	1080
attattatattt gatttatattt ttacttttc aatttatattt actcatttga ctgttaatc	1140
aataaaaaaga attctcaaaa ttgaaaatata aatattacaa tataaaatgg aaggagtaca	1200
accatttagat caaaatgtt gaaatacacc aggaagaaga tttcaaaaaa ataaagtattt	1260
attagtagca gcaataattc aagggttagg attattata ttgtttacat atatatgttt	1320
acactttat gcatctcaag taccacctca atatccaccc atacaaagta taagagttca	1380
gtttacaaga tgtgaaaatg aaaaagggtt tattattaca tctccaagta aagatgaaac	1440

032389

tatgaaaagta caagataatt caataatcat aaattgtat ggttttact taatttagttt	1500
aaaaggatat tttcagaag aattatcatt atctttat tatagaaaag gtagaggacc	1560
tttattttct ttatcaaaag taacatcagt tgattctatt ggagttgcat attggcttt	1620
taaagataaa gtatattta atgttacaac tcattctact agttataaag atatacaagt	1680
aatggtggt gaattaat taatacatca aaatcctggt ggattttgt cttattaatt	1740
tttatccgg gttttatag ctaattagtc attttcgta agtaagtatt tttatthaat	1800
acttttatt gtacttatgt taaatataac tgatgataac aaaatccatt atgtatttt	1860
tataactgta atttcttag chtagttaga tgtccaatct ctctcaaata catcggtat	1920
cttttagtg agattttgat ctatgcagtt gaaacctatg aacgcgtgat gataaaatg	1980
tgaaccgtcc aaatttgcag tcattatatg agcgtatcta ttatctacta tcatacatctt	2040
ttagttatta atatcatcta cttagaatt gataggaaat atgaataacct ttgttagtaat	2100
atctatactacta tctacaccta actcattaag actttgata g	2141

<210> 8
<211> 1148
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> vCP3015 C6R

<400> 8	
gttctaaagt ttttcctcc gaaggatata gacaaagttt ttcttctaca tccttactat	60
ttattgcagc tttaacagc ctatcacgt tcctatttt agtattggta gaacgtttta	120
gttctaaagt taaaatatta gacataattg gcattttgt tattccttgc atagttgagt	180
ctgttagatcg tttcagttata tcactgatata atgtactact gttatgatga aatatagaat	240
cgtatattggc atttaactgt tttgttatac taagtctaga ttttaatct tctagtaata	300
tgctatttaa tataaaagct tccacgttt tttatcatt tctttccata ttagtagctt	360
ctactaaatg attatcttct ttcataatctt gtagataaga tagactatct ttatctttat	420
tagtagaaaa tacttctggc catacatcgt taaattttt tttttttttt agatataata	480
ttaaatatct agaggatcct attatttgat gtaaaatgtt tatagagttt aatgtatctgg	540
ctattaaaca taggcagtt accatagaat gctgctccc gttacagtgt tttaccataa	600
ccatagatct gcctgtattt ttgatacata taacagctgt aaatcctaaa aaattcctat	660
cataattattt aatatttagt aattcatttc catgtgaaag atagactaat ttatatcct	720
ttacctccaa ataattattt acatctctt aacaatctat ttatataatca ttaactggta	780
ttttataata tccagaaagg ttgaagggg ttgatggaaat aagtcttata acatcgtaa	840
gtaaattttt aatatcatga atcttttattt tattataccc ataagttaaa ttatattta	900

ctttctcatc atctgactta gtttagttgt aataagggtgt gtctgaaaaa attaaaaggt	960
aattcggtga atgaagctgt atttgctgta tcatttttat ctaattttgg agattttagca	1020
gtacttactt cattagaaga agaatctgcc agttcctgtc tattactgtat atttcgtttc	1080
attattatat gatttatatt ttacttttc aattatatat actcatttga ctatgttaatc	1140
aataaaaaa	1148

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

<220>
<223> промотор 42K

<400> 9 attctcaaaa ttgaaaatat ataattacaa tataaa	36
--	----

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

<220>
<223> COX40L

<400> 10 atgaaaggag tacaaccatt agatcaaaat gttggaaata caccaggaag aagatttcaa aaaaataaaag tattattagt agcagcaata attcaagggtt taggattatt attatgtttt	60
acatatatat gtttacactt ttatgcacatc caagtaccac ctcaatatcc acctatacaa agtataagag ttcatgtttac aagatgtgaa aatgaaaaag gttgtattat tacatctcca	120
agtaaagatg aaactatgaa agtacaagat aattcaataa tcataaatttgc tgatggttt tacttaatta gtttaaaagg atattttca gaagaattat cattatctt atattataga	180
aaaggttagag gacctttatt ttctttatca aaagtaacat cagttgattc tattggagtt gcataatttgg cttttaaaga taaagtataat ttatgtta caactcattc tactagttat	240
aaagatatac aagtaaatgg tggtaatcataatatac atcaaaatcc tggtggtttt tgtgcttat	300
	360
	420
	480
	540
	549

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

<220>
<223> плечо vCP3015 C6L

<400> 11

032389

gtaagtaagt atttttat	ttt aatactttt attgtactta tggtaaatat aactgatgat	60
aacaaaatcc attatgtatt	atttataact gtaatttctt tagcgttagtt agatgtccaa	120
tctctctcaa atacatcg	gc tatcttttta gtgagatttt gatctatgca gttgaaactt	180
atgaacgcgt gatgattaaa	atgtgaaccg tccaaatttg cagtcattat atgagcgtat	240
ctattatcta ctatcatcat	ctttgagta ttaatatcat ctactttaga attgatagga	300
aatatgaata cctttagt	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 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

032389

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

<210> 13
<211> 3279
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Фрагмент правого плеча vCP3015 C5 G классического вируса бешенства

<400> 13
gctataaata tgcatggaa aaataatcca tttaaagaaa ggattcaaata actacaaaac 60
ctaaggcata atatgttaac taagcttatt cttaacgacg cttaaatat acacaaataa 120
acataatttt tgtataacct aacaataac taaaacataa aaataataaa aggaaatgt 180
atatcgtaat tattttactc aggaatgggg tttaatattt atatcacgtg tatatctata 240
ctgttatcgt atactctta caattactat tacgaatatg caagagataa taagattacg 300
tatttaagag aatcttgtca tgataattgg gtacgacata gtgataatg ctatttcgca 360
tcgttacata aagttagttg gaaagatgga tttgacagat gtaacttaat aggtgc当地 420
atgttaaata acagcattct atcggaaagat aggataccag ttatattata caaaaatcac 480
tggttggata aaacagattc tgcaatattc gtaaaagatg aagattactg cgaatttgta 540
aactatgaca ataaaaagcc atttatctca acgacatcgt gtaattcttc catgtttat 600
gtatgtgttt cagatattat gagattacta taaactttt gtatacttat attccgtaaa 660
ctatattaat catgaagaaa atgaaaaagt atagaagctg ttcacgagcg gttgttggaa 720
acaacaaaat tatacattca agatggctta catatacgtc tgtgaggcta tcattggataa 780
tgacaatgca tctctaaata ggttttggaa caatggattc gaccctaaca cggaatatgg 840
tactctacaa tctcctcttg aaatggctgt aatgttcaag aataccgagg ctataaaaat 900
cttggatgagg tatggagcta aacctgttagt tactgaatgc acaacttctt gtctgcatga 960
tgccgtgttg agagacgact acaaaaatgt gaaagatctg ttgaagaata actatgtaaa 1020
caatgttctt tacagcggag gcttactcc ttgtgttttgcagcttacc ttaacaaagt 1080
taatttggtt aaacttctat tggctcattc ggcggatgtat gatattcaa acacggatcg 1140
gttaactcct ctacatatacg ccgtatcaaa taaaattta acaatggta aacttctatt 1200
gaacaaaggt gctgatactg acttgctgga taacatggga cgtactcatt taatgatcgc 1260
tgtacaatct gggaaatatttggaaatgttag cacactactt aaaaaaaaaata aatgtccag 1320

aactggaaa aattgatctt gccagctgta attcatggta gaaaagaagt gctcaggcta	1380
ctttcaaca aaggagcaga tgtaaactac atcttgaaa gaaatggaaa atcatatact	1440
gtttggaat tgattaaaga aagttactct gagacacaaa agaggtagct gaagtggtag	1500
tctcaaaagc ttcccggtt aattaattag ttattagaca aggtgaaaac gaaactattt	1560
gtagcttaat taattagagc ttctttattc tatacttaaa aagtgaaaat aaatacaaag	1620
gttcttgagg gttgtgttaa attgaaagcg agaaataatc ataaattatt tcattatcgc	1680
gatatccgtt aagtttgtat cgtaatggtt cctcaagctc tcctgttgt accccttctg	1740
gttttccgt tgtgtttgg aaaattccct attcacacaa tcccagacaa gcttggtccc	1800
tggagcccga ttgacataca tcacccctcagc tgcccaaaca atttggtagt ggaggacgaa	1860
ggatgcacca acctgtcagg gttctcctac atgaaactta aagttggata catcttagcc	1920
ataaaaaatga acgggttcac ttgcacaggc gttgtgacgg aggctgaaac ctacactaac	1980
ttcggttgggtt atgtcacaac cacgttcaaa agaaagcatt tccgccccaa accagatgca	2040
tgtagagccg cgtacaactg gaagatggcc ggtgacccca gatatgaaga gtctctacac	2100
aatccgtacc ctgactaccg ctggcttcga actgtaaaaa ccaccaagga gtctctcggt	2160
atcatatctc caagtgttagc agatttggac ccatatgaca gatcccttca ctcgagggtc	2220
ttccctagcg ggaagtgcgc aggagtagcg gtgtcttcta cctactgcgc cactaaccac	2280
gattacacca tttggatgcc cgagaatccg agacttaggta tgtcttgta catttttacc	2340
aatagtagag ggaagagagc atccaaaggg agtgagactt gcggcttgc agatgaaaga	2400
ggcctatata agtctttaaa aggagcatgc aaactcaagt tatgtggagt tctaggactt	2460
agacttatgg atggaacatg ggtcgcatg caaacatcaa atgaaaccaa atgggtccct	2520
cccgatcagt tggtaacct gcacgacttt cgctcagacg aaattgagca ccttgggt	2580
gaggagttgg tcaggaagag agaggagtgt ctggatgcac tagagtccat catgacaacc	2640
aagtcagtga gtttcagacg tctcagtcat ttaagaaaaac ttgtccctgg gttggaaaa	2700
gcatatacca tattcaacaa gaccttgatg gaagccgatg ctcactacaa gtcagtcaga	2760
acttggaaatg agatcctccc ttcaaaaaggc tggtaagag ttggggggag gtgtcatcct	2820
catgtgaacg ggggtttttt caatggata atattaggac ctgacggcaa tgtcttaatc	2880
ccagagatgc aatcatccct cctccagcaa catatggagt tggtaatc ctgggttac	2940
cccttgc accccctggc agacccgtct accgtttca aggacggta cgaggctgag	3000
gattttggta aagttcacct tcccgatgtg cacaatcagg tctcaggagt tgacttgggt	3060
ctcccaact gggggaaagta tgtattactg agtgcagggg ccctgactgc cttgatgttgc	3120
ataattttcc tcatgacatg ttgttagaaga gtcaatcgat cagaacctac gcaacacaat	3180

ctcagaggga cagggaggga ggtgtcagtc actccccaaa gcgggaagat catatctca	3240
tggyaatcac acaagagtgg gggtgagacc agactgtga	3279
<210> 14	
<211> 1508	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> vCP3015 C5R	
<400> 14	
gctataaaata tgcattggaa aaataatcca tttaaagaaa ggattcaa at actacaaaac	60
ctaagcgata atatgttaac taagcttatt cttaacgacg cttaaatat acacaataa	120
acataatttt tgtataacct aacaataac taaaacataa aaataataaa aggaaatgt	180
atatcgtaat tattttactc aggaatgggg tttaaatattt atatcacgtg tatatctata	240
ctgttatcgt atactcttta caattactat tacgaatatg caagagataa taagattacg	300
tatthaagag aatcttgtca tgataattgg gtacgacata gtgataatg ctatttcgca	360
tcgttacata aagttagttg gaaagatgga tttgacagat gtaacttaat aggtgc	420
atgttaaata acagcattct atcggaaagat aggataccag ttatattata caaaaatcac	480
tgggtggata aaacagattc tgcaatattc gtaaaagatg aagattactg cgaatttgta	540
aactatgaca ataaaaagcc atttatctca acgacatcgt gtaatttttc catgttttat	600
gtatgtgtt cagatattat gagattacta taaactttt gtatacttat attccgtaaa	660
ctatattaat catgaagaaa atgaaaaagt atagaagctg ttcacgagcg gttgtgaaa	720
acaacaaaat tatacattca agatggctt catatacgtc tgtgaggcta tcattggataa	780
tgacaatgca tctctaaata ggttttgga caatggattc gaccctaaca cggaatatgg	840
tactctacaa tctcctcttg aaatggctgt aatgttcaag aataccgagg ctataaaaat	900
cttgatgagg tatggagcta aacctgttagt tactgaatgc acaacttctt gtctgcattga	960
tgcgggtttg agagacgact acaaaaatgt gaaagatctg ttgaagaata actatgtaaa	1020
caatgttctt tacagcggag gctttactcc tttgtgtttg gcagcttacc ttaacaaagt	1080
taatttggtt aaacttctat tggctcattc ggcggatgt aatatttcaa acacggatcg	1140
gttaactcct ctacatatacg ccgtatcaa taaaattta acaatggta aacttctatt	1200
gaacaaaggt gctgatactg acttgctgga taacatggta cgtaactcctt taatgtatgc	1260
tgtacaatct ggaaatattt aatatgttag cacactactt aaaaaaaaaaa aatgtccag	1320
aactggaaa aattgatctt gccagctgta attcatggta gaaaagaagt gctcaggcta	1380
ctttcaaca aaggagcaga tgtaaactac atcttgaaa gaaatggaaa atcatataact	1440
gttttggaaat tgattaaaga aagttactct gagacacaaa agaggtagct gaagtggta	1500

tctcaaaa		1508
<210> 15		
<211> 124		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> промотор vCP3015 H6		
<400> 15		
ttctttattc tatacttaaa aagtgaaaat aaatacaaag gttcttgagg gttgtgttaa	60	
attgaaaagcg agaaaataatc ataaaattatt tcattatcgc gatatccgtt aagtttgtat	120	
cgtat	124	
<210> 16		
<211> 1572		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Ген G классического вируса бешенства (дикий тип)		
<400> 16		
atggttcctc aagctctcct gtttgtaccc cttctgggtt ttccgttgcg ttttggaaaa	60	
ttccctattt acacaatccc agacaagctt ggtccctgga gcccgattga catacatcac	120	
ctcagctgcc caaacaattt ggttagtggag gacgaaggat gcaccaacct gtcaagggttc	180	
tcctacatgg aacttaaagt tggatacatc ttagccataa aaatgaacgg gttcacttgc	240	
acaggcggtt tgacggaggc tgaaacctac actaacttcg ttggttatgt cacaaccacg	300	
ttcaaaagaa agcattccg cccaacacca gatgcacatgta gagccgcgta caactggaaag	360	
atggccggtg accccagata tgaagagtct ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg	420	
cttcgaactg taaaaaccac caaggaggtct ctcgttatca tatctccaag tgttagcagat	480	
ttggacccat atgacagatc ctttcactcg agggctttcc ctagcggaa gtgctcagga	540	
gtagcgggtt cttctaccta ctgctccact aaccacgatt acaccatgg gatccccgag	600	
aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt tttaccaata gtagaggaa gagagcatcc	660	
aaagggagtg agacttgcgg cttttagat gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga	720	
gcatgcaaacc tcaagttatg tggagttcta ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc	780	
gcgatgcaaa catcaaatga aaccaaattt tgccctcccg atcagtttgtt gaacctgcac	840	
gactttcgct cagacgaaat tgagcacctt gttgttagagg agttggtcag gaagagagag	900	
gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg acaaccaagt cagttagttt cagacgtctc	960	
agtcatatcaa gaaaacttgt ccctgggtt ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc	1020	

ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca gtcagaactt ggaatgagat cctcccttca	1080
aaagggtgtt taagagttgg ggggagggtgt catcctcatg tgaacggggt gttttcaat	1140
ggtataatat taggacctga cggcaatgtc ttaatcccag agatgcaatc atccctcctc	1200
cagcaacata tggagttgtt ggaatcctcg gttatcccc ttgtgcaccc cctggcagac	1260
ccgtctaccg tttcaagga cggtgacgag gctgaggatt ttgtgaagt tcaccttccc	1320
gatgtgcaca atcaggtctc aggagttgac ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta	1380
ttactgagtg cagggccct gactgccttg atgtgataa tttcctgat gacatgttgt	1440
agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa cacaatctca gagggacagg gagggaggtg	1500
tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata tcttcatggg 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

gttctaaagt tcttcctcc gaaggtagat aacaaagtat ttcttctaca tcottactat	60
ttattgcagc ttttaacagc ctatcacgta tcctatttt agtattggta gaacgtttta	120
gttctaaagt taaaatatta gacataattg gcatattgct tattccttgc atagttgagt	180
ctgttagatcg tttcagtata tcactgatta atgtactact gttatgatga aatatagaat	240
cgatattggc atttaactgt tttgttatac taagtctaga ttttaatct tctagtaata	300
tgctatttaa tataaaagct tccacgttt tgtatacatt tcttcata ttagtagcta	360
ctactaaatg attatcttct ttcatatctt gtagataaga tagactatct ttatctttat	420
tagtagaaaa tacttctggc catacatcgt taaattttt tggtgtgtt agatataata	480
ttaaatatct agaggatcct attatttggt gtaaaatgtt tatagagtaa aatgatctgg	540
ctattaaaca taggcagtt accatagaat gctgctccc gttacagtgt tttaccataa	600
ccatagatct gcctgtattg ttgatacata taacagctgt aaatcctaaa aaattcctat	660
cataattatt aatatttagt aattcatttc catgtgaaag atagactaat tttatatcct	720
ttacctccaa ataatttattt acatctctta aacaatctat ttaaatatca ttaactggta	780
ttttataata tccagaaagg tttgaagggtt ttgatggat aagtcttata acatcgtaa	840
gtaaaattatt aatatcatga atcttttata tattataccc ataagttaaa tttatattta	900
ctttctcatac atctgactta gttagttgt aataaggtgt gtctgaaaaa attaaaaggt	960
aattcggtga atgaagctgt atttgctgta tcattttat ctaattttgg agattnagca	1020

gtacttactt cattagaaga agaatctgcc agttcctgac tattactgat atttcgttc	1080
attattatat gatttatatt ttacttttc aattatatat actcattga ctatgtttc	1140
aataaaaaga attctcaaaa ttgaaaatat ataattacaataaaaatgg aaggagtaca	1200
accatttagat caaaatgttg gaaatacacc aggaagaaga tttcaaaaaa ataaagtatt	1260
attagtagca gcaataattc aaggtttagg attattatta tgtttacat atatatgttt	1320
acactttat gcatctcaag taccaccta atatccacct atacaaagta taagagttca	1380
gtttacaaga tgtgaaaatg aaaaaggttg tattattaca tctccaagta aagatgaaac	1440
tatgaaaagta caagataatt caataatcat aaattgtgat ggttttact taattagtt	1500
aaaaggatat tttcagaag aattatcatt atctttat tatagaaaag gtagaggacc	1560
tttattttct ttatcaaaag taacatcagt tgattctatt ggagttgcat atttggcttt	1620
taaagataaa gtatatttta atgttacaac tcattctact agttataaag atatacaagt	1680
aaatggtgtt gaattaatat taatacatca aaatcctggg ggattttgtg cttattaaatt	1740
tttatcccgg gttttatag ctaattagtc attttcgta agtaagtatt tttatttat	1800
actttttatt gtacttatgt taaatataac tgatgataac aaaatccatt atgtatttt	1860
tataactgta atttccttag cgtagttaga tgtccaatct ctctcaaata catcggttat	1920
ctttttatgt agattttgat ctatgcaggaaactttagt aacgcgtgat gattaaaatg	1980
tgaaccgtcc aaatttgcag tcattatatg agcgtatcta ttatctacta tcattatctt	2040
tgagttatta atatcatcta cttagaaatt gataggaaat atgaataacct ttgttagtaat	2100
atctatacta tctacaccta actcattaag actttgata g	2141

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

<220>
<223> Плечо С6Р vCP3012

<400> 18	
gttctaaagt tcttcctcc gaaggtatag aacaaagtat ttcttctaca tcottactat	60
ttattgcagg tttaacagc ctatcacgtt tcctatttt agtattggta gaacgtttta	120
gttctaaagt taaaatatta gacataattg gcattttgtt tattccttgc atagttgagt	180
ctgttagatcg ttctaggata tcactgatata atgtactact gttatgtga aatatagaat	240
cgtatattggc atttaactgt ttgttatac taagtctaga tttaaatct tcttagtaata	300
tgctatttaa tataaaagct tccacgttt tttatctactt tctttccata ttagtagctt	360
ctactaaatg attatcttct ttcatatctt gtagataaga tagactatct ttatctttat	420

032389

tagtagaaaa tacttctggc catacatcg taaattttt tgttgttgtt agatataata	480
ttaaatatct agaggatcct attatttggt gtaaaatgtt tatagagtaa aatgatctgg	540
ctattaaaca taggccagtt accatagaat gctgctccc gttacagtgt tttaccataa	600
ccatagatct gcctgttattg ttgatacata taacagctgt aaatcctaaa aaattcctat	660
cataattatt aatatttaggt aattcatttc catgtgaaag atagactaat ttatatcct	720
ttacctccaa ataattattt acatctctta aacaatctat tttaatatca ttaactggta	780
ttttataata tccagaaagg ttgaagggg ttgatggat aagtctatta acatcgtaa	840
gtaaattatt aatatcatga atctttatta tattataccc ataagttaaa ttatattta	900
ctttctcattc atctgactta gttagttgt aataaggtgt gtctgaaaaa attaaaaggt	960
aattcggtga atgaagctgt atttgctgta tcattttat ctaattttgg agatttagca	1020
gtacttactt cattagaaga agaatctgcc agttcctgtc tattactgat atttcgttcc	1080
attattatatt gatttatatt ttacttttc aattatataat actcatttga ctatgttatac	1140
aataaaaaa	1148

<210> 19

<211> 365

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плечо С6L vCP3012

<400> 19

cgtaagtaag tatttttatt taatactttt tattgtactt atgttaaata taactgtatga	60
taacaaaatc cattatgtat tatttataac tgtaatttct ttagcgttgt tagatgtcca	120
atctctctca aatacatcg ctatctttt agtgagattt tgatctatgc agttgaaact	180
tatgaacgcg ttagtattaa aatgtgaacc gtccaaattt gcagtcattt tatgagcgta	240
tctattatct actatcatca tctttgagtt attaatatca tctactttt aattgtatagg	300
aaatatgaat acctttgttag taatatctat actatctaca cctaactcat taagactttt	360
gatag	365

<210> 20

<211> 4089

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> vCP3012 с плеча С3R до плеча С3L

<400> 20

tgttaatgggg ttttacctaa atcatctgt tcgtttagtgc atttataagt	60
aacgcttattt tatcgtaact acaattatattt ttaagtgcct ttatgagata ctgtttagtgc	120

aaaaataaac	tttatctat	tttaatacta	ttatctaaca	atatccta	aat	tata	180
ttcttatact	ttatagcgta	atgtaacgga	gttcaaaat	ttctagttt	tg	tatattaaga	240
tcaatattaa	aatctataaa	tatttatac	atatcatcag	atatcttac	c	atacagtaca	300
tcgtaataat	ttagaaagaa	tctattacaa	ttaacacacctt	ttttaataa	a	atatctagtt	360
aatgacttat	tgtttctata	tacagaaata	tataacggac	tattccaga	atgtatctgt		420
tctatgtcag	cgcagaatc	tatttagt	ttagcaattt	ctgtattatc	taaactagca		480
gc	tttatgaa	gaggaggatt	tttacattt	aaaatatcg	caccgtgttc	tagtaataat	540
tttaccattt	ctatatcaga	aatacttacg	gctaaataca	aagacgttga	tagtata	ttt	600
acgttattgt	at	ttgcattt	tttaagtata	taccttacta	aatttata	tctatacctt	660
atagctttat	gcagttcatt	tataagtctt	ccattactca	tttctggtaa	tgaagtatta		720
tat	atcatta	tgatattatc	tctat	tctaataaaa	accgttatca	tgttattt	780
tatttgttat	aattatacta	tttaataaaat	tataccaaat	acttagatac	ttattaatac		840
catcctagaa	cttgttattc	ttgcccccta	aactggaca	tgcactccat	taggcgtt	c	900
ttgtttcga	catcgcc	cttaacat	cctactgtt	tgtgaggatt	ccacggatta		960
tctactgtga	tatcaccaa	cacgtcc	ttc	gaacagggt	ccgcattcag	cagaacattt	1020
cttagggctc	taagttcatc	agatacctcc	agttcataa	ctacagcgca	tcotttcgct		1080
cccaactgtt	tagaggcg	tt	actctgagga	aaacacatct	cttcttaca	gactatagaa	1140
atagtctgta	aatcttgatc	agttatttgc	ttttgaaat	tttcaa	atc	acattga	1200
tccatattt	ctattccaag	agttat	atg	aaat	cacatc	ctgtat	1260
attgtaacat	tattataatc	tgtaacatca	gtatctaacc	taacgtcgta	aaagttaaca		1320
gatgccc	agtataatc	ccaaggaacc	ttaacatcta	atcccattaa	aatagtatcc		1380
tttctactat	tttttcatt	ggcaagtat	tggtttagt	tacaca	aaat	tcotgccatt	1440
ttgtaacgat	agcgaagcaa	tagttgtat	gcttttatt	tgattaacta	gtcataaaaa		1500
tcggatccc	tcgagatgag	ataaaagt	aatatata	attatattac	aaagtacaat		1560
tat	taggtt	taatcatggt	gccccaggcc	ctgctgtt	cg	tgcccctgct	1620
ctgtgctt	cg	caagttccc	catctacacc	atccccgaca	agctggccc	ctggagcccc	1680
atcgacatcc	accac	ctg	ccccaa	aatctgg	tg	ggaggatga	1740
aatctgagcg	gttca	catgg	gct	aaagtgg	gc	catcaagatg	1800
aacggcttca	cctgcac	ccgg	cgtgg	gacc	gagg	ccgaga	1860
tacgtgacca	ccac	ttcaa	cg	gaa	gac	ttcagaccta	1920
gcctacaact	gga	atggc	cg	cgacc	at	agatacgagg	1980
						agac	

cccgactaca gatggctgcg gaccgtaaa accaccaagg agtccctggc gatcatcagc	2040
cctagcgtgg ccgatctgga cccctacgac agaagcctgc acagcagagt gttccctagc	2100
ggcaagtgcg cggcggtggc cgtgtccagc acctactgca gcaccaacca cgactacacc	2160
atctggatgc ccgagaaccc tagactgggc atgagctgcg acatcttcac caacagccgg	2220
ggcaagagag ccagcaaggg cagcgagacc tgccgcttcg tggacgagag aggccctgtac	2280
aagagcctga agggcgctg caagctgaag ctgtgcggcg tgctggcct gagactgtat	2340
gacggcacct gggtgccat gcagaccagc aacgagacca agtggtgcggcc tcctgaccag	2400
ctggtaacc tgcacgactt ccggagcgat gagatcgagc acctggtgtt ggaagagctg	2460
gtgcggaaaga gagaggagtg cctggacgcc ctggagagca tcatgaccac caagagcgtg	2520
tccttccgga gactgagcca cctgagaaag ctggtgcccg gctttggcaa ggctacacaca	2580
atcttcaaca agaccctgat ggaggccgat gcccaactaca agtctgtgcg gacctggAAC	2640
gagatcctgc ctagcaaggg ctgcctgaga gtggcgccgat gatgccaccc ccacgtgaac	2700
ggcgtgttct tcaacggcat catcctgggc cctgacggca acgtgctgat ccotgagatg	2760
cagagcagcc tgctgcagca gcacatggaa ctgctggaga gcagcgtgat cccctggtg	2820
cacccctgg ccgaccccaag caccgtgttc aaggatggcg acgaggccga ggacttcgtg	2880
gaggtgcacc tgcccgtatgt gcacaaccag gtgtccggcg tggacctggg cctgccccac	2940
tggggcaagt acgtgctgct gagcgccgga gccctgaccg ccctgatgct gatcatcttc	3000
ctgatgacct gtcgcggag ggtgaacaga agcgagccca cccagcacaa cctgagaggg	3060
accggcagag aggtgtccgt gaccccccag agcggcaaga tcatcagcag ctggagagcc	3120
cacaagagcg gcggagagac cagactatga ttttatgcc cgggtttta tagtaatta	3180
gtcaaatgtg agttaatatt agtataactac attactaatt tattacatat tcatttat	3240
caatctagta gcatttagct ttataaaaac aatataactg aatagtacat actttactaa	3300
taagttataa ataagagata catattata gtattttact ttctacactg aatataataa	3360
tataattata caaatataat ttttaatact atatagtata taactgaaat aaaataccag	3420
tgtatataat ttattataca tttataaccac atcaaagatg agttataaca tcagtgtcac	3480
tgttagcaac agtagttata cgatgagtag ttactctcgat atggcgtag tatgtatgt	3540
tcttctagtt ttcttagtag gcattatagg aaacgtcaag cttataaggt tattatgtt	3600
atctagaaat atatctatta taccgtttct caacttggga atagccgatt tgctgtttgt	3660
gatattcata ctttataaca ttatatacat actaagtaat ttccattggc atttggtaa	3720
agcactttgt aaaattagtt ctttctttt tacttctaact atgtttgcaa gtatatttt	3780
aataactgta ataagcgtat atagatatgt aaaaattacc cttcctggat ttacctataa	3840
atatgttaac attagaaata tgtacattac tatattttc atatggatta tttctattat	3900

actaggatt cctgctctt actttagaaa tactatcgta acaaaaaata acgacacgct	3960
gtgttattaat 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 acaattattt ttaagtgcct ttatgagata ctgttatgc	120
aaaaataaaac ttttatctat tttaatacta ttatctaaca atatcctaattaaatctata	180
ttcttatact ttatagcgta atgtaacgga gtttcaaaat ttctagtttg tatattaaga	240
tcaatattaa aatctataaa tattttatac atatcatcg atatcttac atacagtaca	300
tcgtaataat ttagaaagaa tctattacaa ttaacacctt ttttaataa atatcttagtt	360
aatgacttat tgtttctata tacagaaata tataacggac tatttccaga atgtatctgt	420
tctatgtcag cgccagaatc tatttagt ttagcaattt ctgtattatc taaactagca	480
gctttatgaa gaggaggatt ttacatttt aaaatatcg caccgtgttc tagtaataat	540
tttaccattt ctatatcaga aatacttacg gctaaataca aagacgttga tagtataattt	600
acgttattgt atttgcattt tttaagtata taccttacta aatttatatc tctatacctt	660
atagctttat gcagttcatt tataagtctt ccattactca tttctggtaa tgaagtatta	720
tatatcatta ttagatttac tctattttat tctaataaaa accgttatca tgttattttat	780
tatttggatt aattatacta ttaataaaat tataccaaat acttagatac ttattaatac	840
catcctagaa cttgtatttc ttgcccccta aacttggaca tgcactccat taggcgttcc	900
ttgtttcga catcgcttc cttaacatat cctactgtt ttaggaggatt ccacggatttt	960
tctactgtga tatcaccaaa cacgtccttc gaacaggta ccgcatttcag cagaacattt	1020
cttagggctc taagttcatc agataccccc agttcataa ctacagcgca tccttcgct	1080
cccaactgtt tagaggcggtt actctgagga aaacacatct cttcttaca gactatagaa	1140
atagtctgtatc aatcttgatc agttatttgc ttttgaaat tttcaatct atcacattgt	1200
tccatatttg ctattccaag agttatgtt gaaaaatatac cacatcctgt catgtat	1260
attgtacat tattataatc ttagtacatca gtatctaacc taacgtcgta aaagttaaca	1320

gatgccagg tactataatc ccaaggaacc ttaacatcta atcccataa aatagtatcc	1380
tttctactat tttttcatt ggcaagtatg tggcttagtt tacacaaaat tcctgccatt	1440
ttgttaacgat agcgaagcaa tagcttgtat g	1471

<210> 22

<211> 907

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плечо C3R vCP3012

<400> 22

caaataatgttgc ttaatattatg tataactacat tactaattta ttacatattc atttatataca	60
atcttagtagc atttagcttt tataaaacaa tataactgaa tagtacatac tttactaata	120
agttataaat aagagataca tatttatagt attttacttt ctacactgaa tataataata	180
taattataaca aatataaattt ttaataactat atagtatata actgaaataa aataccagtg	240
taatataatgtt attatacatt tataccacat caaagatgag ttataacatc agtgtcactg	300
ttagcaacag tagttatacg atgagtagtt actctcgat ggcgttagta tgtatgtatc	360
ttcttagttt cttagtaggc attataggaa acgtcaagct tataaggta ttaatggat	420
ctagaaatat atctattata ccgtttctca acttggaaat agccgatttg ctgtttgtga	480
tattcataacc tttatacatt atatacatac taagtaattt ccattggcat tttggtaaag	540
cactttgtaa aattagttct ttctttttta cttctaacat gtttgcaagt atattttaa	600
taactgtaat aagcgtatat agatatgtaa aaattaccct tcctggattt acctataaat	660
atgttaacat tagaaatatg tacattacta tattttcat atggatttatt tctattatac	720
tagggattcc tgctcttac ttttagaaata ctatcgtaac aaaaaataac gacacgctgt	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

gctataaaata tgcattggaa aaataatcca tttaaagaaa ggattcaaat actacaaaac	60
ctaaggcata atatgttaac taagcttatt cttAACGACG ctttaaatat acacaaataa	120
acataatttt tgtataacct aacaaataac taaaacataa aaataataaa aggaaatgta	180

atatcgtaat tattttactc aggaatgggg ttaaatattt atatcacgtg tatatctata	240
ctgttatcgt atactcttta caattactat tacgaatatg caagagataa taagattacg	300
tattnaagag aatcttgtca tgataattgg gtacgacata gtgataaatg ctatttcgca	360
tcgttacata aagttagttg gaaagatgga tttgacagat gtaacttaat aggtgc当地	420
atgttaaata acagcattct atcggaaagat aggataccag ttatattata caaaaatcac	480
tgggtggata aaacagattc tgcaatattc gtaaaagatg aagattactg cgaatttgta	540
aactatgaca ataaaaagcc atttatctca acgacatcgt gtaatttttc catgttttat	600
gtatgtgttt cagatattat gagattacta taaaactttt gtatacttat attccgtaaa	660
ctatattaat catgaagaaa atgaaaaagt atagaagctg ttcacgagcg gttgttgaaa	720
acaacaaaat tatacattca agatggctta catatacgctc tgtgaggcta tcattggataa	780
tgacaatgca tctctaaata gtttttgga caatggattc gaccctaaca cgaaatatgg	840
tactctacaa ttcctcttg aaatggctgt aatgttcaag aataccgagg ctataaaaat	900
cttgcattgagg tatggagcta aacctgttagt tactgaatgc acaacttctt gtctgcattga	960
tgccgtgttg agagacgact acaaaaatgt gaaagatctg ttgaagaata actatgtaaa	1020
caatgttctt tacagcggag gctttactcc tttgtgtttg gcagcttacc ttaacaaagt	1080
taatttgggtt aaacttctat tggctcatc ggcggatgta gatatttcaa acacggatcg	1140
gttaactcct ctacatatacg ccgtatcaa taaaattta acaatggta aacttctatt	1200
gaacaaaggt gctgatactg acttgctgga taacatggga cgtactcctt taatgatcgc	1260
tgtacaatct ggaaatattt aatatgttag cacactactt aaaaaaaaaata aatgtccag	1320
aactggaaaa aattgatctt gccagctgta attcatgta gaaaagaagt gctcaggcta	1380
cttttcaaca aaggagcaga tgtaaactac atctttgaaa gaaatggaaa atcatatact	1440
gttttggaaat tgattaaaga aagttactct gagacacaaa agaggtagct gaagtggtag	1500
tctcaaaaagc ttccccgggtt aattaattag ttattagaca aggtgaaaac gaaactattt	1560
gtagcttaat taattagagc ttctttattc tatacttaaa aagtgaaaat aaatacaaag	1620
gttcttgagg gttgtgttaa attgaaagcg agaaataatc ataaattatt tcattatcgc	1680
gatatccgtt aagtttgtat cgtaatggtt cctcaagctc tcctgtttgt accccttctg	1740
gttttccgt tgggtttgg aaaattccct atttacacaa tcccagacaa gcttggccc	1800
tggagcccga ttgacataca tcacctcagc tgcccaaaca atttggttagt ggaggacgaa	1860
ggatgcacca acctgtcagg gttctcctac atgaaactta aagttggata catcttagcc	1920
ataaaaaatga acgggttcac ttgcacaggc gttgtgacgg aggctgaaac ctacactaac	1980
ttcggttgggtt atgtcacaac cacgttcaaagaaagcatt tccgccccaaac accagatgca	2040

032389

tgttagagccg cgtacaactg gaagatggcc ggtgacccca gatatgaaga gtctctacac	2100
aatccgtacc ctgactaccg ctggcttcga actgtaaaaaa ccaccaagga gtctctcggtt	2160
atcatatatctc caagtgttagc agattggac ccatatgaca gatcccttca ctggagggtc	2220
ttccctagcg ggaagtgcgc aggagtagcg gtgtcttcta cctactgctc cactaaccac	2280
gattacacca tttggatgcc cgagaatccg agactaggga tgtcttgtga catttttacc	2340
aatagtagag ggaagagagc atccaaaggg agtgagactt gcggcttgt agatgaaaga	2400
ggccttatata agtcttaaa aggagcatgc aaactcaagt tatgtggagt tctaggactt	2460
agacttatgg atggaacatg ggtcgcatg caaacatcaa atgaaaccaa atggtgcct	2520
cccgatcagt tggtaaacct gcacgacttt cgctcagacg aaattgagca ctttgttga	2580
gaggagttgg tcaggaagag agaggagtgt ctggatgcac tagagtccat catgacaacc	2640
aagtcagtga gtttcagacg tctcagtcat ttaagaaaac ttgtccctgg gtttggaaaa	2700
gcatatacca tattcaacaa gaccttgatg gaagccgatg ctcactacaa gtcagtcaga	2760
acttggaatg agatcctccc ttcaaaaggg tggtaagag ttggggggag gtgtcatcct	2820
catgtgaacg ggggtttttt caatggata atattaggac ctgacggcaa tgtcttaatc	2880
ccagagatgc aatcatccct cctccagcaa catatggagt tggttgaatc ctggttatc	2940
cccccttgtgc accccctggc agacccgtct accgtttca aggacggtga cgaggctgag	3000
gattttgttg aagttcacct tcccgatgtg cacaatcagg tctcaggagt tgacttgggt	3060
ctcccgaaact gggggaaagta tgtattactg agtgcagggg ccctgactgc ctgtatgtt	3120
ataattttcc tcatgacatg ttgtagaaga gtcaatcgat cagaacctac gcaacacaat	3180
ctcagagggc cagggagggc ggtgtcagtc actccccaaa gcgggaagat cttatctca	3240
tggaaatcac acaagagtgg gggtgagacc agactgtga	3279

<210> 24

<211> 3279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Плечо C5R vCP3012

<400> 24

gctataaaata tgcattggaa aaataatcca tttaaagaaa ggattcaaattt actacaaaac	60
ctaagcgata atatgttaac taagcttattt ctttaacgcgc cttaatataat acacaaataaa	120
acataatttt tgtataaccc aacaaataac taaaacataaa aaataataaa agggaaatgtt	180
atatcgtaat tattttactc aggaatgggg tttaaatattt atatcacgtt tttatctata	240
ctgttatcgt atactttta caattactat tacgaatatg caagagataa taagattacg	300
tatttaagag aatcttgtca tgataattgg gtacgacata gtgataaaatg ctatccgca	360

tcgttacata aagttagttt gaaagatggaa ttgacagat gtaacttaat aggtgc
atgttaaata acaggattct atcgaaagat aggataccag ttatattata caaaaatcac
tggttggata aaacagattc tgcaatattc gtaaaagatg aagattactg cgaatttgc
aactatgaca ataaaaagcc atttatctca acgacatcgt gtaattcttc catgtttat
gtatgtttt cagatattat gagattacta taaactttt gtatacttat attccgtaaa
ctatattaat catgaagaaa atgaaaaagt atagaagctg ttcacgagcg gttgttggaa
acaacaaaat tatacattca agatggctta catatacgtc tgtgaggcta tcataggataa
tgacaatgca tctctaaata ggttttgga caatggattc gaccctaaca cgaaatatgg
tactctacaa tctcctcttg aaatggctgt aatgttcaag aataccgagg ctataaaaat
cttgatgagg tatggagcta aacctgttgt tactgaatgc acaacttctt gtctgcatga
tgcgggtttt agagacgact acaaaaatagt gaaagatctg ttgaagaata actatgtaaa
caatgttctt tacagcggag gcttactcc tttgttttg gcagcttacc ttaacaaatgt
taatttgggtt aaacttctat tggctcattc ggccgtatgtt gatatttcaa acacggatcg
gttaactcctt ctacatatacg ccgtatcaaa taaaaatttta acaatggta aacttctatt
gaacaaaggt gctgatactg acttgctgga taacatggga cgtactcctt taatgatcgc
tgtacaatct gggaaatattt aatatgttag cacactactt aaaaaaaaata aatgtccag
aactggaaa aattgatctt gccagctgtt attcatggta gaaaagaagt gctcaggctt
ctttcaaca aaggagcaga tgtaaactac atctttggaa gaaatggaaa atcatatact
gttttggaaat tgattaaaga aagttactctt gagacacaaa agaggttagt gaagtggtag
tctcaaaagc ttcccgggtt aattaattttt ttattagaca aggtgaaaac gaaactattt
gtagcttaat taatttagac ttcttttattt tatactttttt aagtggaaaat aaatacaaaag
gttcttgagg gttgtgtttaa attgaaagcg agaaataatc ataaattttt tcattatcgc
gatatccgtt aagttgtat cgtaatggtt cctcaagctc tcctgtttgt accccttctg
gtttttccgt ttttttttttgg aaaattccctt atttacacaaa tcccaacaa gcttgggtccc
tggagcccgaa ttgacataca tcacccctcagc tgcccaaaaca atttggtagt ggaggacgaa
ggatgcacca acctgtcagg gttctccttac atggaaactt aagtggata catcttagcc
ataaaaaatgtt acgggttcac ttgcacaggc gttgtgacgg aggctgaaac ctacactaac
ttcggttggaaat atgtcacaac cacgttcaaa agaaagcatt tccggccaaac accagatgca
tgttagagccg cgtacaactg gaagatggcc ggtgacccca gatatgaaga gtctctacac
aatccgttacc ctgactaccg ctggcttcgaa actgtttttt ccaccaagga gtctctcgaa
atcatatctc caagtgttagc agattggac ccatatgaca gatcccttca ctcgagggtc
2220

ttccctagcg ggaagtgctc aggagtagcg gtgtcttcta cctactgctc cactaaccac	2280
gattacacca tttggatgcc cgagaatccg agactaggaa tgtcttgta cattttacc	2340
aatagtagag ggaagagagc atccaaaggg agtgagactt gcggcttgc agatgaaaga	2400
ggcctatata agtcttaaa aggagcatgc aaactcaagt tatgtggagt tctaggactt	2460
agacttatgg atggaacatg ggtcgcatg caaacatcaa atgaaaccaa atggtcccct	2520
cccgatcagt tggtaaacct gcacgacttt cgctcagacg aaattgagca cttgttgta	2580
gaggagttgg tcaggaagag agaggagtgt ctggatgcac tagactccat catgacaacc	2640
aagtcagtga gttcagacg tctcagtcat ttaagaaaac ttgtccctgg gtttgaaaaa	2700
gcatatacca tattcaacaa gaccttgatg gaagccgatg ctcactacaa gtcagtcaga	2760
acttggaatg agatcctccc ttcaaaaggg tggtaagag ttggggggag gtgtcatcct	2820
catgtgaacg ggggtttttt caatggtata atattaggac ctgacggcaa tgtcttaatc	2880
ccagagatgc aatcatccct cctccagcaa cataggagt tggttgaatc ctgggttatac	2940
ccccctgtgc accccctggc agacccgtct accgtttca aggacggtga cgaggctgag	3000
gattttgttg aagttcacct tcccgtatgtc cacaatcagg tctcaggagt tgacttgggt	3060
ctccccgaact gggggaaagta tgtattactg agtgcagggg ccctgactgc cttgtatgttgc	3120
ataattttcc tcatgacatg ttgttagaaga gtcaatcgat cagaacctac gcaacacaat	3180
ctcagagggc cagggagggc ggtgtcagtc actccccaaa gcgggaagat catatcttca	3240
tggaaatcac acaagagtgg gggtgagacc agactgtga	3279

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

<220>
<223> праймер C5R.1R

<400> 25
ctcttgata ttcgtaatag taatttgc

26

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

<220>
<223> праймер C5R.1F

<400> 26
attctatcg aagataggat accag

25

<210> 27
<211> 25

<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	праймер C5R.2R	
<400>	27	
tcaacaaccg ctcgtgaaca gcttc		25
<210>	28	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	праймер C5R.2F	
<400>	28	
atgcacaact tcttgctgc atgatg		26
<210>	29	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	праймер C5R.3R	
<400>	29	
tacggctata ttagaggag 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 aacgcgttag tatat		25
<210>	32	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	

<220>		
<223>	праймер C5L.1R	
<400>	32	
	ttagaaat tta tgcat ttt tag a	21
<210>	33	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	праймер C5L.2R	
<400>	33	
	ggagata cc ct ttagat at gg atctg	25
<210>	34	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	праймер C5L.3R	
<400>	34	
	ttgtaaccat agtat at ctt 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 aggctctcct gtttg	25
<210> 38 <211> 25 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> праймер CP65.1R	
<400> 38 tcacagtctg gtctcacccc 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 gtctcacccc cactcttgtg 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 catagttta taaaaggag 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 gagaggatt 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 tatagcatac 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	
	atagtttgc tgcttttat 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	
	gtaaaaaccca ccaaggagtc	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
tggtgaagat gtcgcagctc atgcc 25

<210> 55
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер RabG.2F

<400> 55
accaccaaga gcgtgtcctt 20

<210> 56
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер RabG.3F

<400> 56
ttcctgatga cctgctgccc 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 cttagata aga 23

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

<220>
<223> праймер C6R.3F

<400> 59
tgaagggtt gatggaataa 20

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

<220>
<223> праймер C6L.1R

<400> 60
ctatcaaaag 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

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 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

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

ggaaattgt	aacgttaata	ttttgttaaa	attcgcgtt	aattttgtt	aatcagctc	60
atttttaac	caataggccg	aaatcgccaa	aatcccttat	aaatcaaaag	aatagaccga	120
gatagggttg	agtgttgttc	cagttggaa	caagagtcca	ctattaaga	acgtggactc	180
caacgtcaaa	ggcgaaaaaa	ccgtctatca	gggcgatggc	ccactacgt	aaccatcacc	240
ctaatcaagt	ttttggggt	cgaggtgccg	taaagcacta	aatcggaacc	ctaaagggag	300
cccccgattt	agagcttgac	ggggaaagcc	ggcgaacgt	gcgagaaaagg	aagggaaagaa	360
agcgaaagga	gcggcgcta	ggcgctggc	aagttagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	420
cacacccgccc	gcgcattat	cgccgtaca	gggcgcgtcg	cgccattcgc	cattcaggct	480
gcgcactgt	tggaaaggc	gatcggtgc	ggcctttcg	ctattacgc	agotggcgaa	540
agggggatgt	gctgcaaggc	gattaagtt	ggtaacgcca	gggtttccc	agtacgacg	600
ttgtaaaacg	acggccagt	aattgtata	cgactcacta	tagggcgaat	tggtagctt	660
cataaataca	agtttgatta	aacttaagt	gttctaaagt	tcttcctcc	gaaggtatag	720
aacaaagtat	ttcttctaca	tccttactat	ttattgcagc	tttaaacagc	ctatcacgt	780
tcctattttt	agtattggta	gaacgttta	gttctaaagt	taaaatatta	gacataatt	840
gcatattgct	tattccttgc	atagttgagt	ctgtagatcg	tttcagtata	tcactgatta	900
atgtactact	gttatgatga	aatatagaat	cgatattggc	atthaactgt	tttggtagtt	960
taagtctaga	tttaaatct	tcttagtaata	tgctattaa	tataaaagct	tccacgttt	1020
tgtatacatt	tcttccata	ttagtagcta	ctactaaatg	attatcttct	ttcatatctt	1080
gtagataaga	tagactatct	ttatctttat	tagtagaaaa	tacttctggc	catacatcgt	1140
taaatttttt	tgttgggtt	agatataata	ttaaatatct	agaggatcct	attatttgg	1200
gtaaaatgtt	tatagagtaa	aatgatctgg	ctattaaaca	taggcagtt	accatagaat	1260

032389

ctcactcaaa	ggcgtaata	cgttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	gaaaagaaca	3240
tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttgc	ctggcgcccc	3300
tccataggct	ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagaggtggc	3360
gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgttcccccc	tggaagctcc	ctcggtcgct	3420
ctcctgttcc	gaccctgccc	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcggaaagcg	3480
tggcgcttcc	tcatagctca	cgctgttaggt	atctcagttc	ggtgttaggtc	gttcgctcca	3540
agctgggctg	tgtgcacgaa	ccccccgttc	agcccgaccg	ctgcgcctta	tccggtaact	3600
atcgctttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatacgcc	actggcagca	gcoactggta	3660
acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tggtggccta	3720
actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	3780
tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	caccgctgg	agcggtggtt	3840
ttttgttttgc	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaaaagg	atctcaagaa	gatcctttga	3900
tctttctac	ggggctgac	gctcagtgg	acgaaaactc	acgttaaggg	attttggtca	3960
tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tcctttaaa	ttaaaaatga	agttttaaat	4020
caatctaaag	tatatatgag	taaacttgg	ctgacagtt	ccaatgctta	atcagtgagg	4080
cacccatctc	agcgatctgt	ctatttcgtt	catccatagt	tgcctgactc	cccgctgtgt	4140
agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgcgag	4200
acccacgctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	4260
gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgcgggaag	4320
ctagagtaag	tagtcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	tgttgccatt	gctacaggca	4380
tcgtgggtgc	acgctcgctg	tttggtatgg	cttcattcag	ctccgggttcc	caacgatcaa	4440
ggcgagttac	atgatcccc	atgttgtgca	aaaaagcggt	tagtccttc	ggtcctccga	4500
tcgttgtcag	aagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	ggttatggca	gcactgcata	4560
attctcttac	tgtcatgcca	tccgtaagat	gctttctgt	gactggtgag	tactcaacca	4620
agtcattctg	agaatagtgt	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccggcg	tcaatacggg	4680
ataataccgc	gccacatagc	agaactttaa	aagtgcctcat	cattggaaaa	cgttcttcgg	4740
ggcgaaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccactcg	4800
cacccaactg	atcttcagca	tctttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gaaaaaacag	4860
gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggataa	ggcgacacg	gaaatgtga	atactcatac	4920
tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtt	ttgtctcatg	agcgataca	4980
tatggatg	tatggatgaa	aataaaca	taggggttcc	gcccacattt	ccccgaaaag	5040

tgccacacctg	5049
<210> 69	
<211> 7865	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Плазмида p397-Syn Rabies G (pC3 I3Lp Syn Rabies G)	
<400> 69	
agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtcaa attgttatcc gctcacaatt	60
ccacacaaca tacgagccgg aagcataaaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc	120
taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa cctgtcggtc	180
cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tggcgctct	240
tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggcgttc ggctgcggcg agcggtatca	300
gctcactcaa aggccgtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc agggaaagaac	360
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt	420
ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg	480
cgaaacccga caggactata aagataaccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgctgcgc	540
tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ccttctccc ttccggaaagc	600
gtggcgctt ctcatagctc acgctgttagg tatctcagtt cggtgttaggt cggtcgctcc	660
aagctggct gtgtgcacga acccccccgtt cagccgcacc gctgcgcctt atccgtaac	720
tatcgcttg agtccaaccc ggtaaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactgg	780
aacaggatta gcagagcgag gtatgttaggc ggtgctacag agttctgaa gtggtggcct	840
aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc	900
ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggttgt	960
ttttttgttt gcaaggcagca gattacgcgc agaaaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg	1020
atctttctta cggggcttga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatttggtc	1080
atgagattat caaaaaggat ctccacctag atcctttaa attaaaaatg aagttttaaa	1140
tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag	1200
gcacctatct cagcgatctg tctatttctgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcg	1260
tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggccca gtgctgcaat gataccgcga	1320
gaccgcacgct caccggctcc agatttatca gcaataaaacc agccagccgg aagggccgag	1380
cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccggcc tccatccagt ctattaattg ttgccggaa	1440
gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc	1500
atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccgggttc ccaacgatca	1560

aggcgagtt	catgatcccc	catgttgtgc	aaaaaaagcgg	ttagctcctt	cggccctccg	1620
atcggttgtca	gaagtaagtt	ggccgcagt	ttatcactca	tggttatggc	agcaactgc	1680
aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgctttctg	tgactggta	gtactcaacc	1740
aagtcaattct	gagaatagt	tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcggcgc	gtcaatacgg	1800
gataataccg	cggcacatag	cagaacttta	aaagtgtca	tcattggaaa	acgttctcg	1860
gggcgaaaac	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	accactcgt	1920
gcacccaact	gatcttcagc	atctttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	agcaaaaaaca	1980
ggaaggcaaa	atgcccääaa	aaagggaata	agggcgacac	ggaaatgtt	aataactcata	2040
ctcttcctt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	gagcggatac	2100
atatttgaat	gtatttagaa	aaataaaca	ataggggttc	cgcgcacatt	tcccccääaa	2160
tgcccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	aaataggcgt	2220
atcacgaggg	ccttcgtct	cgcgcgttc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	ctgacacatg	2280
cagctccgg	agacggtcac	agcttgtctg	taagcggatg	ccgggagcag	acaagcccgt	2340
cagggcgcgt	cagcgggtgt	tggcgggtgt	cgggctggc	ttaactatgc	ggcatcagag	2400
cagattgtac	tgagagtgc	ccatatgcgg	tgtgaaatac	cgcacagatg	cgttaaggaga	2460
aaataccgca	tcagggcaca	ttcgccattc	aggctgcgca	actgtggga	agggcgatcg	2520
gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	gatgtgctgc	aaggcgatta	2580
agttggtaa	cgcagggtt	ttcccagtca	cgacgttgta	aaacgacggc	cagtgaatta	2640
attcgagctc	tttatactac	tgggttacaa	cagctggta	taacagaatg	taaatcatta	2700
ttacttaata	gttccattat	tatatgttg	atatctatag	gtaacctacc	tattattcct	2760
agattcttac	tctctttac	agctttaact	attagctgat	gtctatgaaa	agctaataatgat	2820
ttattttcc	gtattaattc	cctatatata	cgtatacatg	caggtatctt	attaactcta	2880
ggatttagtta	cgaactttac	cataagatct	atgttattgt	caagaaagat	attaaaagaa	2940
tatatagaat	ttaactttat	atgtgttata	acatctagtt	cttttcgca	tgattcttt	3000
atagatagta	gtctttatt	actgtttata	tgttccatgt	ttactataaa	acottctgaa	3060
ttagctattt	caggatttt	agatatttct	aacatcattt	tagatattt	cataatagct	3120
atcttgtcat	ctaaaaagct	aacacaagg	agaggcgtat	taccgtgatt	atttagagaa	3180
ttatagtcgg	cgttataaga	taaaagtaat	tttatattat	taaaactatt	agataacata	3240
gccttatgta	aaggagtatt	tccagataac	ttagctttag	cattacgta	agcaccgtgg	3300
tcaagtaaga	gtttaacaaa	ttctgtttc	atagaactaa	ctgccatgta	tagaggagt	3360
aaacctttat	gattatagac	gtttacatag	caaccatata	ataagatcgc	attcagtata	3420

ttaatatctt tcatttctat agctatgtga ataacatgtt tatctaattcc taccaacttt	3480
gtatcagtagc cgtagttcag taataagttt actatagttt tgtttttaga tgcaacagct	3540
atatttagaa cggtatctat atgattatta accacattaa cattagatcc tctttctaaa	3600
agtgtctttg ttgttgcgt atcggtacgt gaaacagcgt aatgttaagg actgcccata	3660
cagtcatcta ttacgttat atcagctcct agattnaaca gaagtgcgt tacatcttt	3720
cttctattaa ttaccgaatg atgtatggg gtttaccta aatcatcttg ttgcgttata	3780
ggcactccgt gatttataag taacgctatt atatcgtaac tacaattatt tttaaatgcc	3840
tttatgagat actgtttatg caaaaataaa ctttatctta tttaataact attatctaacc	3900
aatatcctaa ttaaatctat attcttatac tttatgcgt aatgtaacgg agtttcaaaa	3960
tttctagttt gtatattaag atcaatatta aaatctataa atattttata catatcatca	4020
gatatcttat catacagtagc atcgtaataa ttttagaaaga atctattaca attaacacct	4080
tttttaata aatatcttagt taatgactta ttgttctat atacagaaat atataacgga	4140
ctatttccag aatgtatctg ttctatgtca gcgcagaat ctatttagtag ttttagcaatt	4200
tctgtattat ctaaactagc agctttatga agaggaggat ttttacattt taaaatatcg	4260
gcaccgtgtt ctagtaataa ttttaccatt tctatatcag aaatacttac ggctaaatac	4320
aaagacgttg atagtatatt tacgttattt tatttgcatt ttttaagtat ataccttact	4380
aaatttataat ctctataacct tatacgctta tgcagttcat ttataagtct tccattactc	4440
atttctggta atgaagtatt atatatcatt atgatattat ctctatttttta ttctaataaa	4500
aaccgttatac atgttattta ttatttgttta taattataact atttaataaa ttataccaaa	4560
tacttagata cttattaata ccatcctaga acttgttattt cttgccccct aaacttggac	4620
atgcactcca ttaggcgtt cttgtttcg acatcgctt ccttaacata tcctactgtt	4680
atgtgaggat tccacggatt atctactgtg atatcaccaa acacgtcctt cgaacagggt	4740
accgcattca gcagaacatt tcttagggct ctaagttcat cagatacctc cagtttcata	4800
actacagcgc atccttcgc tcccaactgt ttagaggcgt tactctgagg aaaacacatc	4860
tcttctttac agactataga aatagtctgt aaatcttgat cagttatgg cttttgaaa	4920
ttttcaaatc tatacatttgc atccatattt gctattccaa gagttatattg aggaaaaata	4980
tcacatcctg tcatgttattt tattgttaaca ttattataat ctgttaacatc agtatctaacc	5040
ctaacgtcgt aaaagttaac agatgccag ttactataat cccaaaggaaac cttaacatct	5100
aatcccatta aaatagttatc ctttctacta ttttttcat tggcaagtat gtggcttagt	5160
ttacacaaaaa ttccctgccat tttgttaacga tagcgaagca atagcttgcata tgcttttat	5220
ttgattaact agtcataaaaa atcgggatcc ctcgagatga gataaagtga aaatataata	5280
cattatatta caaagtacaa ttattnaggt ttaatcatgg tgccccaggc cctgctgttc	5340

gtgccccctgc	tggtgttccc	cctgtgcttc	ggcaagttcc	ccatctacac	catccccgac	5400
aagctgggcc	cctggagccc	catcgacatc	caccacctga	gctgccccaa	aatctggtg	5460
gtggaggatg	agggctgcac	caatctgagc	ggcttcagct	acatggagct	gaaaagtggc	5520
tacatcctgg	ccatcaagat	gaacggcttc	acctgcaccg	gcgtggtgac	cgaggccgag	5580
acctacacca	actttgtggg	ctacgtgacc	accaccttca	agcggaaagca	cttcagacct	5640
accccccacg	cctgcagagc	cgcctacaac	tggaagatgg	ccggcgaccc	tagatacgag	5700
gagagcctgc	acaaccccta	ccccgactac	agatggctgc	ggaccgtgaa	aaccaccaag	5760
gagtccctgg	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	aagggcgect	gcaagctgaa	gctgtgcggc	6060
gtgctgggcc	tgagactgat	ggacggcacc	tgggtggcca	tgcagaccag	caacgagacc	6120
aagtggtgcc	ctcctgacca	gctggtaac	ctgcacgact	tccggagcga	tgagatcgag	6180
cacctggtgg	tggaagagct	ggtgcggaag	agagaggagt	gcctggacgc	cctggagagc	6240
atcatgacca	ccaagagcgt	gtcctccgg	agactgagcc	acctgagaaa	gctggtgccc	6300
ggcttggca	aggcctacac	aatcttcaac	aagaccctga	tggaggccga	tgcccactac	6360
aagtctgtgc	ggacctggaa	cgagatcctg	cctagcaagg	gctgcctgag	agtgggcggc	6420
agatgccacc	cccacgtgaa	cggcgtgttc	ttcaacggca	tcatcctggg	ccotgacggc	6480
aacgtgctga	tccctgagat	gcagagcagc	ctgctgcagc	agcacatgga	actgctggag	6540
agcagcgtga	tccccctggt	gcacccctg	gccgacccca	gcaccgtgtt	caaggatggc	6600
gacgaggccg	aggacttcgt	ggaggtgcac	ctgcccgtatg	tgcacaacca	ggtgtccggc	6660
gtggacctgg	gcctggccaa	ctggggcaag	tacgtgctgc	tgagcgcgg	agccctgacc	6720
gccctgatgc	tgatcatctt	cctgatgacc	tgctgccgga	gggtgaacag	aagcgagccc	6780
acccagcaca	acctgagagg	caccggcaga	gaggtgtccg	tgacccccc	gagcggcaag	6840
atcatcagca	gctgggagag	ccacaagagc	ggcggagaga	ccagactatg	atttttatgc	6900
ccgggtttt	atagctaatt	agtcaaatgt	gagtaatat	tagtatacta	cattactaat	6960
ttattacata	ttcatttata	tcaatctagt	agcatttagc	ttttataaaa	caatataact	7020
gaatagtaca	tacttacta	ataagttata	aataagagat	acatatttat	agtattttac	7080
tttctacact	gaatataata	atataattat	acaaatataa	ttttaatac	tatatagtat	7140
ataactgaaa	taaaatacca	gtgtaatata	gttattatac	atttatacca	catcaaagat	7200

032389

gagttataac atcagtgtca ctgttagcaa cagtagttat acgatgagta gttactctcg 7260
tatggcgtta gtatgtatgt atcttctagt tttcttagta ggcattatag gaaacgtcaa 7320
gcttataagg ttattaatgg tatctagaaa tataatctatt ataccgttcc tcaacttggg 7380
aatagccgat ttgctgtttg tgatattcat accttatac attatataca tactaagtaa 7440
tttccattgg catttggta aagcacttg taaaattagt tctttcttt ttacttctaa 7500
catgtttgca agtataattt taataactgt aataagcgta tatagatatg taaaaattac 7560
ccttcctgga tttacctata aatatgttaa cattagaaat atgtacatta ctatatttt 7620
catatggatt atttctatta tactagggat tcctgcttt tactttagaa atactatcgt 7680
aacaaaaaat aacgacacgc tgtgtattaa tcattatcat gataatagag aaattgctga 7740
attgatttac aaagttatta tctgtatcag atttattta ggatacc tacctacgat 7800
aattataactc gtatgctata cgttactgat ctacagaact aacaatgcat gtgcacgcgg 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 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 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

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 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 OX₄₀L 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

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

2. Вакцина по п.1, в которой указанный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид OX₄₀L псовых, кошачьих, лошадиных, крупного рогатого скота, нежвачных парнокопытных, птиц, овец или приматов.

3. Вакцина по п.2, в которой полипептид OX₄₀L 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 OX₄₀L 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 OX₄₀L имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.

8. Вакцина по п.7, в которой полипептид OX₄₀L 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:

 (a) полипептид G вируса бешенства и

 (b) полипептид OX₄₀L 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 OX₄₀L 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 OX₄₀L 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.

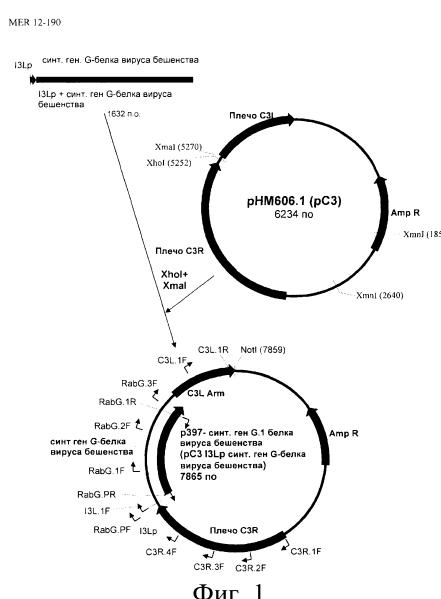
16. Вектор по п.15, где животное является представителем псовых.

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

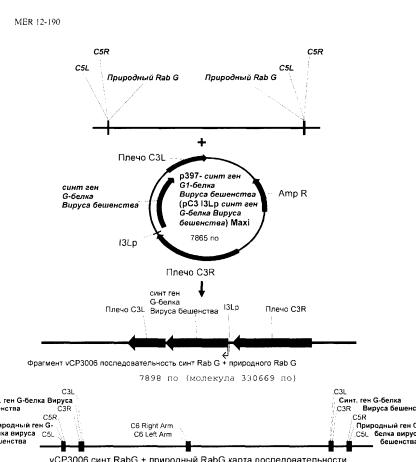
18. Вектор по п.13 или 14, в котором полинуклеотид кодирует полипептид G вируса бешенства, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, и полипептид OX₄₀L, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.

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

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

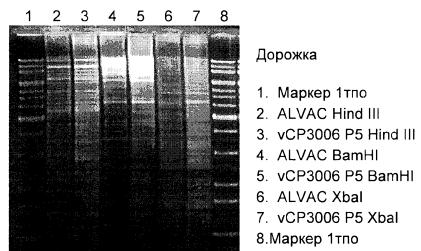


Фиг. 1

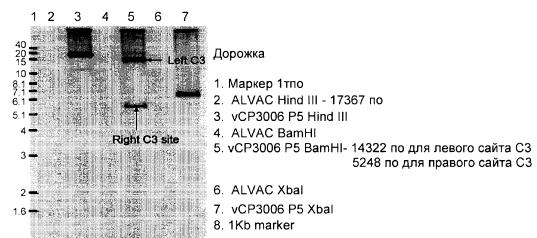


Фиг. 2

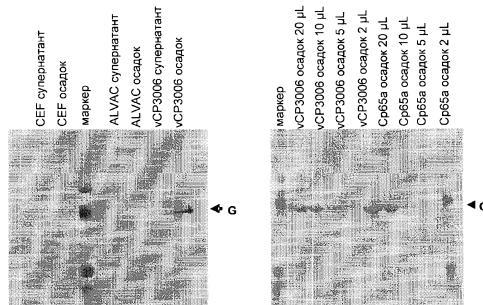
032389



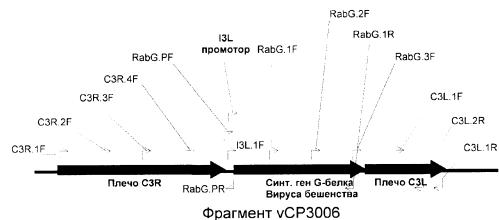
ФИГ. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

032389

Ключ к последовательности фрагмента в CRP1006 (полная последовательность представлена SEO ID №: 2):

1-й ТЕКСТ ПРОПИНСИМИ: правое плечо C3 (SEQ ID NO: 3)
1-й ТЕКСТ ПРОПИНСИМИ: промотор ISL (SEQ ID NO: 4)
2-й ТЕКСТ ПРОПИНСИМИ: синтетический ген полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO: 5)
2-й Текст строками: правое плечо C3 (SEQ ID NO: 6)
Полченная последовательность: клонирующий вектора

Фиг. 7

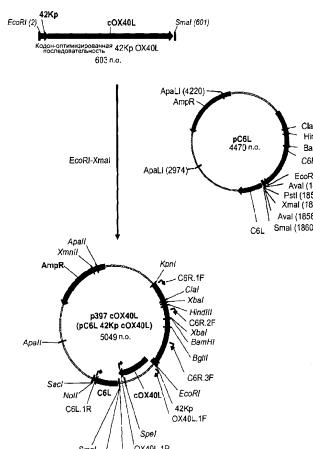
Аминокислотная последовательность, кодируемая кодон-оптимизированным синтетическим геном полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO: 1)

```

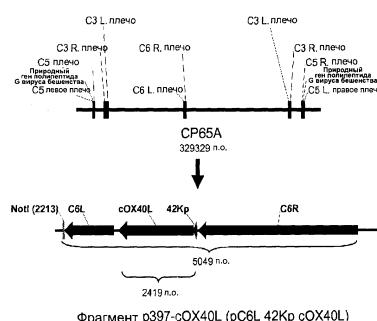
1  MVPQALLFV P LIVFPLCFGK FPIYTIPDKL GPWSPIDIH H LSCPNNLVVE
51  DEGCTNLSGF SYMELKVGYI LAIKMNGFTC TGVVTEAETY INFVGYVTCT
101  FKRKHFRPTP DACRAAYNWK MAGDPRYEES LHNYPDYRW LRTVKTTKES
151  IVIDSPSVAAD LDPPYDRSLSHS RVPSPGKCSG VAVSSTYCST NHDTIIMPE
201  NPLRLGMSCDI FTNSRGKRAS KGSETCGFVD ERGLYKSLKG ACKLKLCGVL
251  GLRLMDGTWV AMQTSNETKW CPPDQIVNLH DFRSDEIEHL VVEELVRKRE
301  ECLOALESIM CTKSVSFRRL SHIRKLVPGF GKAYTIFNKT LMEADAHYKS
351  VRTWNNEILPS KCCLRVGGRC HPFVNGVFFN GIILGPDGTV LIPEMQSSLL
401  QQHMELESS VIPLVHPLAD PSTVFKDGE AEDFVEVHLP DVHNQVSGVD
451  LGLPNWKYY LLSAGALTAL MLIIFIMTCC RRVNRSEPTQ HNLRGTCREV
501  SVTPQSGKII SSWESBHKSGG ETRL*

```

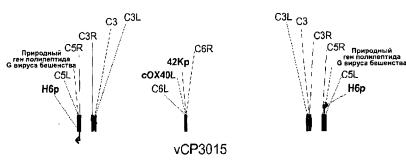
Фиг. 8



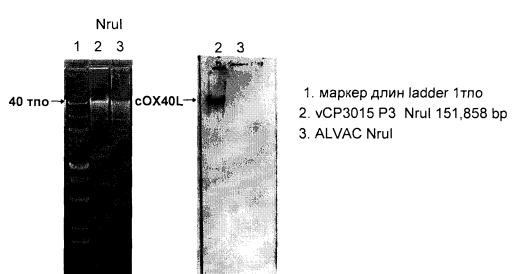
Фиг. 9



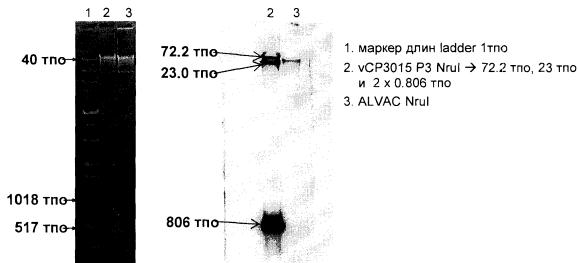
Фрагмент p397-cOX40L (pC6L 42Kp cOX40L)



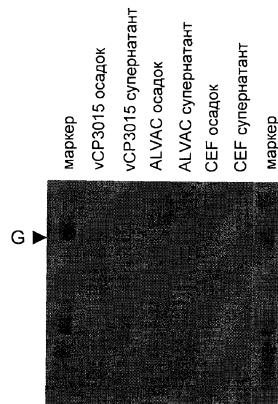
Фиг. 10



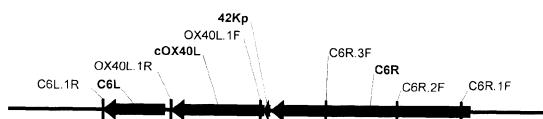
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

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

Промотор C6 (1-1148): SEQ ID NO:8

Промотор 42K (1155-1186): SEQ ID NO:9

COX40L (1187-1735): SEQ ID NO:10

Лозеин C6 (1777-2141): SEQ ID NO:11

```

1   GTTCTAAAGT TCTTCCTCC GAAGGTATAG AACAAAGTAT TTCTTCTACA
51  TCCCTACTAT TTATTGCAGC TTTTAACAGC CTATCACGTA TCCTAATTTT
101 AGTATTGGTA GAACGTTTTA GTTCTAAAGT TAAAATATTA GACATAATTG
151 GCATATTGCT TATTCCTTGCG ATAGTTGAGT CTGTAGATCG TTTCAGTATA
201 TCACTGATA ATGTACTACT GTTATGATGA AATATAGAT CGATATTGCC
251 ATTAACTGT TTTGTATAC TAAGTCTAGA TTCAAATCT TCTAGATAA
301 TGCTATTTAA TATAAAAGCT TCCACGTTTT TGATACATT TCTTCCATA
351 TTAGTAGCCA CTACTAAATG ATTATCTCTT TTCAATATCTT GTAGATAAGA
401 TAGACTAICT TTATCITAT TAGTAGAAAA TACTCTGGC CATACTCGT
451 TAAATTTTTT TGTGTTGTT AGACATATAA TTAATATCTT AGAGGATCCCT
501 ATTATTTGCG GTAAAATGTT TATAGACTAA AATGATCTGC CTATTAACAA
551 TAGGCCACTT ACCATGAATG GCTGCTTCCC GTACAGTGT TTTACCAATA
601 CCATAGACCT GCCCTGATAG TTGATACATA TAACACCTGT AAATCTAAA
651 AAATTCCTAT CATATTATT AATATTAGT AATTCATTTT CATTGGAAG
701 ATAGACTAT TTTATATCTT TTACCTCCAA ATAATTATTT ACATCTCTTA
751 AACAACTCTAT TTTAATATCA TTAACGGTA TTCTTATAATA TCCAGAAAGG
801 TTGAGGGG TTGATGGAAT AAGCTTATTA ACATCGTTA GTAAATTATT
851 AATATCATGA ATCTTTATTA TATGATACCC ATAAGTTAA TTTATATTAA
901 CTTCTCTCATC ATCTGACTTA GTTACTTTGTT AATAAGGTTG GTCTGAAAAA
951 ATTAAGGTT AATTCGTTGA ATGAAGCTGT ATTTGCTGTA TCATTTTAT
1001 CTAATTGAGG AGATTTAGCA GTACTTACTT CATTAGAAGA AGAATCTGCC
1051 AGTTCTGTC TATTAATGAT ATTTCGTTT ATTAATATAT GATTATATT

```

1101 TTACTTTTC AATTATATAT ACTCATTGTA CTAGTTAATC AATAAAAAGA
 1151 ATTCTCAAAA TTGAATAAT ATATTACAA TAIAAAATGG AAAGGATACA
 1201 ACCATTAGAT CAAAATGTG GAATACACC AGGAAGAAGA TTTCAAAAAA
 1251 ATAAAGTAACT ATAGTAGCA GCAATAATTC AGAGTTAGG ATTATTATTA
 1301 TGTTTACAT ATATATGTT ACACATTTAT GCATCTCAAG TACCCCTCA
 1351 ATATCCACCT ATACAAAGTA TAASAGITCA GITACAAAGA TGTGAAAATG
 1401 AAAAGGTG TATTATTACA TCTCCAAGTA AAGATGAAAC TATGAAAGTA
 1451 CAAAGATACT CAATAATCAT AAATGTGAT GTTTTTACT TAATTAGTT
 1501 AAAAGGATAT TTTCAGAAG AATTATCAT ATCTTATAT TATAGAAAAG
 1551 GTAGAGGCC TTTATTCTTCTTAACTAAAG TAACATCAGT TGATTCATT
 1601 GGAGTTGCAT ATTGGCTTA TAAGATAAA GTATATTAA ATGTTAACAC
 1651 TCATTCTACT AGTATAAAG ATAACAAGI AAATGGTGT GAATTATAT
 1701 TAATACATCA AAATCCTGGT GGATTTGTG CTIAATTAATT TTTATCCCG
 1751 GTTTTATAG CTAATTAGTC ATTTCGTA AGTAACATT TTTATTAAAT
 1801 ACTTTTATG GTACTTATGT TAAATATAAC TGATGATAAC AAAATCCATT
 1851 ATCTTATTAT TATAACTGTA ATTCCTTATG CGTACCTTGA TGTCCTAATC
 1901 CTCTCAAATA CATCGCTAT CTTTTAGT AGATTTGT CTATGCAGTT
 1951 GAAACTTATG AACCGCTGAT GATTAATG TGAAACCGTCC AAATTGCG
 2001 TCATTATAATG AGCGTATCTA TTACCTACTA TCATCATCTT TGAGTTATA
 2051 ATATCATCTA CTTAGAATT GATAGAAAAT ATGAAACCTT TTGAGTTAAT
 2101 ATCTATACCTA TCTACACCTA ACTCATTAAG ACTTTGATA G

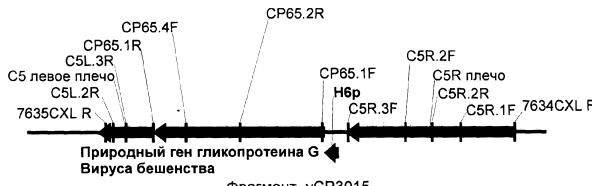
Фиг. 15

MER 12-190

Предсказанный аминокислотный последовательность синтетического cOX40L (SEQ ID NO:12)

1 MEGVQPLDQN VGNTPGRRFQ KNKVLLVAAI IQGLGLLCF TYICLHFYAS
 51 QVPPQYPPIQ SIRVQFTRCE NEKGCIITSP SKDETMVKQD NSIIINCDGF
 101 YLISILKGYFS EELSLSLYYR KGRGPLSLS KVTSVDSIGV AYLAFKDKVY
 151 FNVTTTHSTSY KDIQVNNGEL ILIHQNPGGF 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)

Подчеркнута последовательность вектора

GCTATAAATATGCATTGGAAAAAATCCAATTAAAGAAGGATTCAAATACTACAAACCTAACGCGATA
 ATATGTTAACTAAAGCTTAACTCTAACGACGTTAAATATACACAAATAACATAATTGTTGATAACCT
 AACAAATAACTAAACATAAAAATATAAAAGGAATGTAATACGTAATTATTTACTCAGGAATGGGG
 TTAAATATATATCACGTGATATCTAACTACTGTTATCGTATACCTTTACAATTACTATTACGAATATG
 CAAGAGATAAAAGATTAGTATTTAAGAGATCTTGTCATGATAATTGGGTACGACATAGTGTAAATG
 CTATTGCGATCGTTACATAAAGTCAGCTGGAAAATGGATTTCACAGATGTACTTAAATGGTGC
 ATGTTAAATAACACGATTCTATCGGAAGATGGATACAGTTAAATACAAAAACTACTGGTTGATA
 AACACAGATTCTGCATATTCTGAAAGATGAGAGATTACTGCGAATTGTAACATGACATAAAAGCC
 ATTTATCTCAACGACATCGTGTATTCTCCATGTTTATGTTATGTTGAGATATTATGAGATTACTA
 TAAACCTTTGTTACTTATATTCCGTAACATATTAAATCATGAGAAATGAAAAAGTATAGAACGCTG
 TTTCACGAGCGGTGTTGAAAACAACAAATIATCATTCAAGAIGGCCTACATACGTCIGTGAGGCTA
 TCATGGGAAATGACAATGCACTCTAAATAGTTTGGACAAIGGATTCGACCCAAACACGGAAATATGG
 TACTCTACATCTCTCTGAAATGGCCTGTAATCTTCAGAAATCCGGAGGCTATAAAATCTTGATGAGG
 TATGGGACTAAACCTGTAGTTACTGAAAGCAGACTCTCTGTCIGTCATGATGGGGTGTGAGAGACGACT
 ACAAAATAGTGAAGAAATCTGTTGAAAGATAACTGTTAAACAAAGTCTTACGGGGAGGCTTTACTCC
 TTGTTGTTGCGAGCTTACCTAAACAAAGCTTAACTCTGTTACTGTTGAGGCTAATCCGGGGATGTA
 GATATTTCACAAACAGGCTGTTAATCTCTCTCATATAGCCGATACCAAAATAAATTCACATGGGTTA
 AACCTCTATTGAACAAAGGTGCTGACTCTGACTTGGATAACATGGGAGGCTACTCCCTTAATGATGCC
 TGTCACATCTGAAATATTGAAAATGTTGAGCACACTACTTAAACAAATAATGTCAGACTGGGAAA
 AATTGATCTTCCGCGCTGTTAATTCTGTTGAAAGAAGTGTCTCAGGGTACTTTCAACAAAGGAGCAGA
 TGTTAAACTACATCTTGGAAAATGGAAAATCATATACTGTTTGGGATTGATTAAGAAAAGTTACTCT
 GAGACACAAAAGAGGTGAGCTGAGTGGTACICTCAAAAGCTCCCGGGTTAATTAATTAGTTATTAGACA
AGGTGAAACGAAATATTGTTGCTTAAATIAATTAGAGCTTctttatctataacttaaaaaagtgaasat
aaatacacaaggttcttgagggttgttaaat: gaaagcgagaataatcataaattttcattatcgc
gatatccgttaagttgtatcgtatGGTTCTCAAGCTCTCCTGTTGACCCCTCTGGTTTCCGT

TGTGTTTGGAAAATCCCTATTACACAAICCAGACAAGCTGGTCCCTGGAGCCCGATTGACATACA
TCACCTCAGCTGCCAAACAAATTGGTAGTGAGGAGGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCTAC
ATCCAACCTAAACTTCCATACATCTAACCCATAAAATCAACCCCTTCACCTGCACACCCCTTCACCC
AGGCTGAAACCTACACTAACCTGTTGTTATGTCACAACCAGTTCAAAGAAGCATTCCGCCCCAAC
ACCAGATGCATGAGCCGGTACAACGTAAAGATGGCGGTGCCCCAGATATGAAGAGTCTACAC
AATCCGTACCCCTGACTACCGCTGGCTTCAACTGTAAGTAAAAACCAACCAAGAGTCTCTGTTATCATATCTC
CAAGTGTAGCAGATTGGACCCATATGACAGATCCCTCACTCGAGGGCTTCCCTAGCGGAAGTGC
AGAGTAGCGGTGCTTACTGCTCACACTAACCCAGATCACCATTTGGATGCCAGAGATCG
AGACTAGGGATGTTGACATTTTACCAATAGTAGAGGGAGAGAGCATCCAAAGGAGTGGACT
GGGGCTTGTAGATGAAAGAGGCCTATAATAAGTCTTAAAGGAGCATGCAAACATCAAGTATGAG
TCTAGGACTTAACTTGGATGAAACATGGCTGCAGACTTGCCTAGACGAAITGAGCACCTTGTGAG
CCCGATCAGTGGTGAACCTGCACGACTTGCCTAGACGAAITGAGCACCTTGTGAG
TCAGGAAGAGAGGAGTGTGGATGACIAGACTCATCATGACAACCAAGTCAGTGAGTTAGACG
TCTCAGTCATTAGAAAACITGTCGCTGGTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTGATG
GAAGCCGATGTCACACTAACAGTCAGTAACTTGGAAATGAGATCTCCCTTCAAAGGGTTAAAGAG
TTGGGGAGGGTGTGTCATCTCATGGAAACGGGGTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGCCAA
TGTCTTAACCCAGAGATGCAATCATCCCCTCCAGCACACATGGAGTTGGAAATCTCGTTATC
CCCCCTTGTCACCCCTGGAGACCCGCTACCGTTCAAGGACGGTACGGCTGAGGTTGG
AAGTCACCTTCGGATGTCACATCAGGICTCAGGAGTGAATTGGGCTCCGAACGGGGAAAGTA
TGTATTACTGAGTGCAGGGGCCCTGACTGCCTGATGATAATTCTGATGACATGTTGAGAAGA
GTCAAATGATCAGAACCTACGCAACACATCTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTCAGTCACCCCCAA
GCGGGAAAGATCATATCTCAIGGAAATCACACAGACTGGGGTGAACCGAGACTGTGA

Фиг. 18

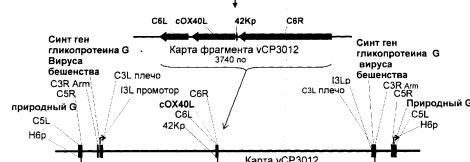
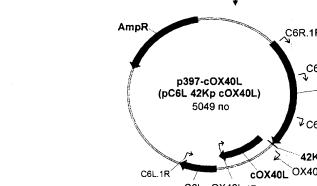
Предсказанная аминокислотная последовательность природного гена полипептида G вириса бешенства (SEQ ID NO: 1)

```

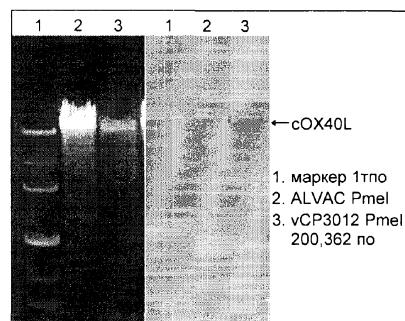
1 MVPQALLFVP LLVPLCFGK FPIYTIPLDKL GPWSPIDIH LSCPNNLVVE
51 DEGCTNLSGF SYMELKVGYI LAIKMNGFTC TGVVTEAETY TNFVGVVT
101 FKRKHFRPTP DACRAAYNWK MAGDPRYEES LHNPPYPDYFW LRTVKTTKES
151 IIVICSPSVAD LPYDPLRSLHS RVFPSPKGCSG VAVSSTYCYST NHDYTIWMPE
201 NPLRLGMSCDI FTNSRGKRAS KGSETCGFVD ERGLYKSLKG ACKLKLCGVL
251 GLRLMDGTWV AMQTSNETKW CPPDQLVNHL DFRSDEIEHL VVEELVRKRE
301 ECILDALESIM TTKSVSFRLR SHLRK1VPGF GKAYTIFNKNT LMEADAHYKS
351 VRTWNEILPS KGCLRVGGRC HPEVNVGFNN GIILGPDGKV LIPIQMSSL
401 QQIMELESS VIPLVIIPLAD PSTVFLKDGE AEDFVEVILP DVINQVSGVD
451 IGLPNWGKYV LLSAGALTAL MLIIFLMTCC RRVNRSEPTQ HNLRTGTREV
501 SVTPQSGKII SSWESHKSGG ETRL*

```

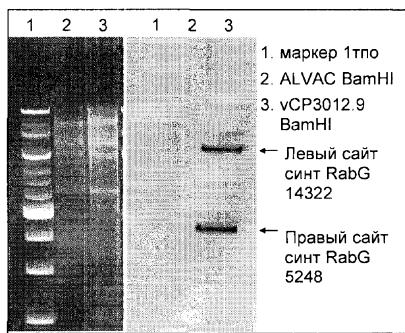
Фиг. 19



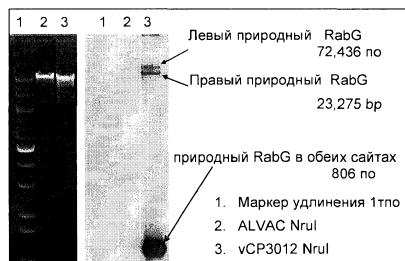
Фиг. 20



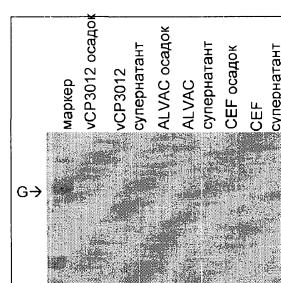
Фиг. 21



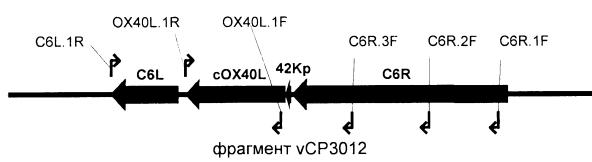
Фиг. 22



Фиг. 23

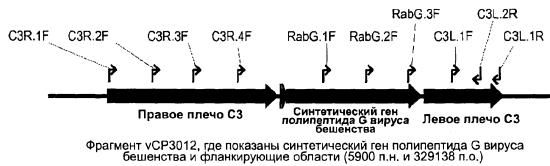


Фиг. 24



Фиг. 25

Фиг. 26



Фиг. 27

Фиг. 28



Фиг. 29

Фрагмент vCP3012: ген полипептида G вируса бешенства и flankирующие области (SEQ ID NO: 23)
1-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: правое плечо C5 (SEQ ID NO: 24)

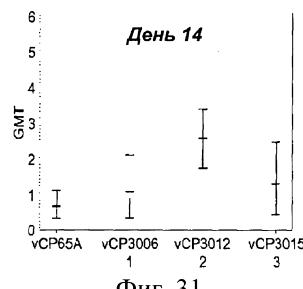
текст строчными: промотор H6 (SEQ ID NO: 15)
2-й ТЕКСТ ПРОПИСНЫМИ: природный ген полипептида G вируса бешенства (SEQ ID NO: 16)
Подчеркнута последовательность вектора

GCTATAAAAATGCGATTGGAAAAAAATAATCATTAAAGAAGGATTCAAATACTACAAAACCCTAACG3ATAATATGT
AACTAAGCTTAACTTACAGACCCCTTTAAATTCRACAAAATAACATAATTTCGTAATTCGTAATCCAAAACAACTAA
ACATAAAAATAAATGAGGAATTAATGATTAATCTGTAATTATTTACTCAGGAATGGGGTTAAATATTATATAATCGJG
ATATCAATCTGCTTACATGACTTCATCAAAATCTGTAATTCGAGAATATAATGAGATCTTAACTTAA
AGAGCTTGTCTGATGAAATGGGTACGACAATGTGATAATTCGATTTTGCGATCTTACATAAATGCTGGAAAG
ATGGATTTCAGACGAGTAACTTAACTAGGTCAAAAATGGTTAAATACGACATCTCATCGAGGAAATAGAAGCAGGTT
ATATTCATACAAAATCTGTTGGTAAATACAGATCTGCAATAATCGPAAAGAGTAAAGGRTTACAGGAGCTTGG
AAATACAGCAAAATAAGGCCATTAATCTACCAACATCGCTTAATCTCCTGAACTTGTGTTGTTGTTGTTGAGATA
TATGAGATTAATCTAACTTTTGTAACTTAATTCGTTAACTATAATAACCATGAGAAATAAATGAAAGTATA
GAAGCTTGTCTGAGGCGGTTGGTTGAAACAAAATAATCACATGAGGCTTCATCATGCTGTCGGCTA
TCATGGTTATGAGCTTACGAGCTTACGATCTTAACTAGGTATTTCGAACTATGCTTGTGCTTACAGGAGTATG
CTCTACATACTCCTCTGAAATCTGCTGAAITGTTCAAGAATACCGAGGCTTATAAAATCTTGTAGGGTA
TGGAGCTAAACATGTTAGTTACTGATGATGACAACTCTTGTCTGUTATGTCGGTGTGGAGACGACTAC
AAAATAGTGAAGNAGTGTGTTGAAATRACTATGTAACATGTCTTGTACGGCGAGGCTTAACTCTT
TGTGTTTGGCAGCTTACCTTAAACAGAATTTTGGTTAACTTCTTATGTCGTTACGGCTTACGGAGTATGAGA
TATTCTTACACRGGGCTGGTTAACTCTCTCATCTACGCGCTRAACAAATTTAACATGCTGTT
CTCTTATGACAAAGGGCTGIGATGACTGCTGGTAAACAACTGGACCTTCTCTTATGTCG
TACAATCTGGAAATATGAAAATA.GTAGACGACTACTTTAAAAAAATAAAAGTGCACAGACTGGGAAAA
TTGAGTCTTGCAGCTGTAATTCAGTGTAGAAAAGAATGCTGTCAGCTACTTTTCAACAAAGGAGCAGATG
TAAACATCATCTTGGAAAGATAATGGGAAATATCATACTGTGTTGSAATTTGAAATTAAGGAAAGTATTGCTG
GACACAAACAGACTGCTGAGATGCTACTGCTTCTCCCGSCTTAAATTTACTTATGAGCAG
TGAAAAGAACACTTGTAGCTTAAATTTAGTACGCTTCTTATCTATCATACTAAAGTGAAGAAATA
atacaaaaggctttaggggttgttaataatgtaaaggcgagaaataatcataaaatttttcattccgcga
tatccgttaatgtttatcgtaATGGTCCICACAGCTCTCGTGTGTGACCTCTTCTGGTTTTTCGCTG
TGTGTTTGGGAAATTTCTCTTATTTACACATCTCCAGCAAGCTGTTCTCTGGGGCCCTGTCACATACMC
ACTCTGAGTCCCACAACTTGTAGTGAGGAGACGAGGATGCTACACACCTGTTAGGGTTCCTGAC
AACTTCAAGTGGCTACATCTAGCCGTTAAAAGACGGCTGACTCTGACGCTGTTGGGCTGAC
AACTTCAAGTGGCTACATCTAGCCGTTAAAAGACGGCTGACTCTGACGCTGTTGGGCTGAC

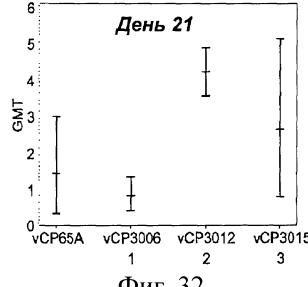
032389

TACACTTAACCTGGTGTATGTCACAACCAAGTCAAAGAAAGCATTCCGCCAACACAGATSCACGTAGAGC
CGCGTACAACCTGGAGAGAAGGCGGTGACCCAGACATGAGAGCTCTACACAAACCGTACCGCIGGC
TTCGAAGTGAANAAACACCAAGGACTCTCGTATCATCTCAGTGTAGAGATTGGACCCRTATGACAGA
TCCCTTCACTCGAGGCTCTCCCTAGCGGAAGTGCTCGGGAGTAGGGGTTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCA
CGATTACACCAATTGGAIAGCOGAGAATCCGGAGACTGGGAT3CTTGTGACATTACCAATAGTAGGGGAGA
GAGCATTCCAAGGGAGTGAGACTTGGGCTTGTAGTGAAGAGGCGCTATATAAGCTTTAAAGGAGCATGCAA
CTCAGTTATGGGRGTCTGAGACTATAGACTPATGATGGACMTGGTCGGATGCAACATCAANTGAMMCAA
ATGGTCCCCTCCGAATCAGTTGGTGAACCTGCACACTTTCGTCAGACGAAAATGGACACCTTGTGTAGAGGAGT
TGGTCAGGAAGAGAGGGAGTCTCGTGTGACTAGGCTCATAGACAAACAGTGTGAGTTCAAGCGTCTC
AGTATTAAAGAAAACCTGCCCCCTGGGAAAGCATATACCAATATICAACAGACCTTGTGAAECOGATGC
TCACACTAAGTCAGTCAGAATCTGGAAATGAGATCCCTTCAAAAGGGGTTTAAAGGTTGGGGGAGGTGTGTCATC
CTCATGTGAACCGGGTGTCTTCAIAIGGTAATAATTAGACCTGACGGCAATGCTTAATCCACAGAGACCAATCA
TCCCCTCCAGAACATATGGAGTGTGGAAATCTCGGTATCCCTTGTGACACCCCTTGGCAAGACCCCTTAC
CGTTTCAGGACGGTGAACGGCTGAGGACTTGTGAGTTCAACCTTCCCGATGTGACAAATCAGGTTCAAGGAG
TTGACTTGCTTCCCGACTGGGGGACTATGATATTACTGAGTCAGGGGGCTTGAGTCCCTGAGTGTGATATT
TTCCTGATGACATGTGAGAGAGGICAMTCGATCAGACCTACCCACACAACTCAGAGGGACAAGGGGGAGGT
GTCAGTCACTCCCAAAGGGAGAGTCATATTCTCATGGAACTACACAGAGTGGGGTGGACCAAGACTGIGA

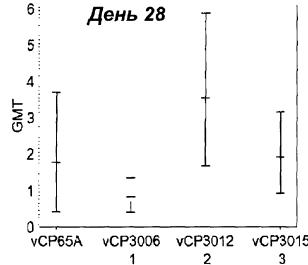
Фиг. 30



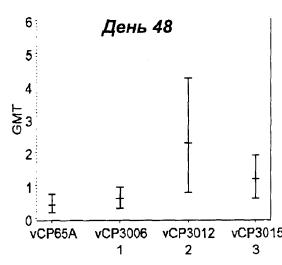
Фиг. 31



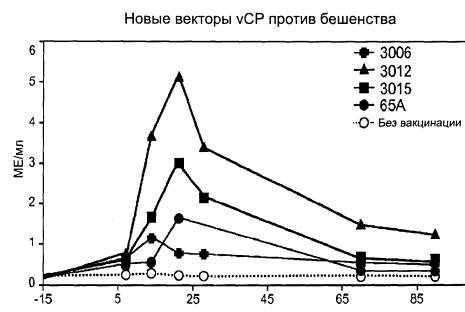
Фиг. 32



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 (дикий тип) 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	CTCTTGCATATTCTGAAATAGTAATTG	Природный G/C5	25
C5R.1F праймер	ATTCTATCGGAAGATAGGATACCCAG		26
C5R.2R праймер	TCAACAACCGCTCGAACAGCTTC		27
C5R.2F праймер	ATGCACAACCTCTGTCTGCATGATG		28
C5R.3R праймер	TACGGCTATATGTAGAGGAGTTAAC		29
C5R.3F праймер	CTCTGAGACACAAAAGAGGGTAGCTG		30
C5L.1F праймер	CATCATGAGCAACCGCTTAGTATAT		31
C5L.1R праймер	TTAGAAATTATGCATTTAGA		32
C5L.2R праймер	GGAGATACTTTAGATATGGATCTG		33
C5L.3R праймер	TTGTAACCATAGTATATCTTAGCGC		34
7634CXL-F	GTTCTCGTAGGAGAGAACTATTGAC		35
7635CXL-R	CGTCTTCAGCTGTAAACAAATATAATG		36
CP65.1F праймер	ATGGTTCTCAGGCTCTCCTGTTG		37
CP65.1R праймер	TCACAGTCTGGTCTACCCCCACTC		38
CP65.2R праймер	GACCCATGTTCCATCCATAA		39
CP65.3F праймер	GTCTCACCCCCACTCTGTGTG		40
CP65.4F праймер	AAAAACGGTAGACGGGTCTG		41
C3R.1F праймер	CATAGCTTTATGTAAAGGAGTAT		42
C3R.2F праймер	TGTAATGGGGTTTACCTAA		43
C3R.3F праймер	GCTTTATGAAGAGGGAGGATTTT		44
C3R.4F праймер	GCATTTCAGCAGAACATTCT		45
C3L.1F праймер	TAGTTACTCTCGTATGGCGT		46
C3L.1R праймер	ATCAGTAACGTATAGCATACG		47
C3L.2R праймер	TACATATTTCTAATGTAAACATATT		48
I3L.1F праймер	GGATCCCTCGAGATGAGATA	Синтетический G/C3	49
RabG.PF праймер	ATAGCTTGATGCTTTTATTTGAT		50
RabG.PR праймер	GAACAGCAGGGCCTGGGCACCATG		51
RabG.1F праймер	GTGAAAACACCAAGGAGTC		52
RabG.1R праймер	TTCTGTTCACCCCTCCGGCAG		53
RabG.2R праймер	TGGTGAAGATGTCGCAGCTCATGCC		54
RabG.2F праймер	ACCACCAAGAGCGTGTCCCT		55
RabG.3F праймер	TTCCCTGATGACCTGCTGCCGGA		56
C6R.1F праймер	GTTCTAAAGTTCTTCCCTCC		57
C6R.2F праймер	TCTTCATATCTTGATGATAAGA		58
C6R.3F праймер	TGAAGGGCTTGATGGATAAA		59
C6L.1R праймер	CTATCAAAGTCTTAATGAGTTAGG		60
OX40L.1F праймер	ATGGAAGGAGTACAACCATTAGATC		61
OX40L.1R праймер	TTAATAAGCACAAATCCACCAAGGA		62

Фиг. 37

032389

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 NC:71(овца)
 SEQ NO:70(курица); первые 50 аминокислот не показаны в этом выравнивании

SEQ ID: 12	51	(1) -MEGVQLDQNVGNTPGRRFQKVKLIVAAIIQGLGHILCFTYICLHYA	100
SEQ ID: 63		(1) -MEGVQLDENVGNAPGRFQSKLILVAVIIGLGHILCFTYICLHYA	
SEQ ID: 67		(1) -MERVQPLEENVNCNAARPREFRNLILVAVIIGLGHILCFTYICLHESA	
SEQ ID: 64		(1) -MEGVQPLEENVGNTPGRRFQPKLILVAVIIGLGHILCFTYICLHYA	
SEQ ID: 65		(1) -MEGVQLDENVGNVPGRFLRKLILVAVSIIQGLGHILCFTYICLHYA	
SEQ ID: 71		(1) -MEGVQLDENVGNAPGRFLRKLILVAVSIIQGLGHILCFTYICLHYA	
SEQ ID: 66		(1) -MEGVQLDENVGNAPGRFLRKLILVAVSIIQGLGHILCFTYICLHYA	
SEQ ID: 70	101	(51) KEPAGMRSDDEWRCWQRGQAKRILYIVSAATOWILHAGSLIXLGTDSIQ	150
SEQ ID: 12	(50)	SQVPPQYPPIQSIRVQFTRCENEKGCIITSPSKDETMKVQDNSIIINEDG	
SEQ ID: 63	(50)	SQVFPQYPPIQSISKVQFTKCGNGTSCITSPNKEDETMKVQDNSIIINEDG	
SEQ ID: 67	(50)	LQVSHRYPRIQSIKVQFTTEYKKEKGFIITSQKEDEVMKVQNNNSIIINEDG	
SEQ ID: 64	(50)	SQVPSQYPPIQSIRVQFTSCENEKGFIITSPEQDEIMKVQDNSIIINEDG	
SEQ ID: 65	(50)	-QVPSQYPPIQSIRVQFTKCEHENGFIIITSPDADGTMKVQNNNSIIINEDG	
SEQ ID: 71	(50)	-QVPSQYPPIQSIRVQFT-CENENGFIITSPDADGTMKVQNNNSIIINEDG	
SEQ ID: 66	(50)	-QVPSQYPPIQSISKVQFTKENDNGFIITPSSKDGTMKVQNNNSIIINEDG	
SEQ ID: 70	(101)	-LWLFPHSDKVWTYIYRQG-SIAQVAMNLSAEFTSIPVINGSIMIPDG	200
SEQ ID: 12	151	FYLISIKGYFSEELSLSLYYR-----KGRKFIFSLSKVTSVCSIGVAY	
SEQ ID: 63	(100)	FYLISIKGYFSEELSLSLYYR-----KGRKFIFSLSKVKSVDSIGVAH	
SEQ ID: 67	(100)	FYLISIKGYFSQEVNISLHYQ-----KDEEFIFQLIKVKRSVSNIMVAS	
SEQ ID: 64	(100)	FYLISIKGYFSQELSLSLHYR-----KGRKFIFSLSKVRSVNSIMVAY	
SEQ ID: 65	(99)	FYLISIKGYFSQELSLRLLYR-----KGRKFIFSLNMVKIVDSVTWAV	
SEQ ID: 71	(98)	FYLISIKGYFSQELSLRLLYR-----KGRKFIFSLNMVKIVDSVTWAV	
SEQ ID: 66	(99)	FYLISIKGYFSQELSLMLQYR-----KGRKFIFSLNKVRSVDSVTWAD	
SEQ ID: 70	(149)	IYVVSISIKVLSQDLEKSSLKLMMKNTESKNAAFWERDVQNSSNAVDLIT	250
SEQ ID: 12	201	(143) LAFKDKVYIIVTTTHSTSYKDIQVNNGGDLILHQNPGEKAY	
SEQ ID: 63	(143)	LAFKDKVYIIVTTTHNTSYKDIQVNNGGDLILHQNPGEKVL	
SEQ ID: 67	(143)	LTYKDKVYIIVTTDNTSLDDFHVNNGGDLILHQNPGEKVL	
SEQ ID: 64	(143)	LAFKDKVYIIVTTTHNTSCDDIQVNNGGDLILHQNPGEKAY	
SEQ ID: 65	(142)	LRFKDKVYIIVTTQNAASCDEDIQVNNGGDLILHQNPGEKSVY	
SEQ ID: 71	(141)	LRFKDKVYIIVTTQNAASCDEDIQVNNGGDLILHQNPGEKSVY	
SEQ ID: 66	(142)	LAFKDKVFLIVTTTHSAASCDEDIQVNNGGDLILHQNPGEKCVY	
SEQ ID: 70	(199)	MLYLF-AQKIIILSTSSNATIQCLTFSVLLNP--VQNP	

Фиг. 38

	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								



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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