РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 745 373**(13) **C2**

(51) МПК
A61K 39/135 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
***A61K 39/135** (2021.01); **C12N 7/00** (2021.01); **A61P 31/12** (2021.01)*

(21)(22) Заявка: **2017113571, 23.09.2015**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.09.2015

Дата регистрации:
24.03.2021

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
23.09.2014 US 62/054,073

(43) Дата публикации заявки: **26.10.2018** Бюл. № **30**

(45) Опубликовано: **24.03.2021** Бюл. № **9**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **24.04.2017**

(86) Заявка PCT:
US 2015/051755 (23.09.2015)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2016/049209 (31.03.2016)

Адрес для переписки:
101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 5, ООО "Союзпатент"

(72) Автор(ы):
ОДОННЕ Жан-Кристоф (FR),
ХАННАС-ДЖЕББАРА Захия (FR),
МЕБАТСЬОН Тезом (US),
ЧИАН Юй-Вэй (US),
ВАЙДНЕР Джастин (US),
РЕНАР Фредерик (FR)

(73) Патентообладатель(и):
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ЭНИМАЛ ХЕЛТ ЮЭсЭй ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 0200251 A1, 03.01.2002. US 2009253185 A1, 08.10.2009. Mohana Subramanian B et al. Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency // Antiviral Res. 2012 Dec; 96 (3): 288-95. Claudine Porta et al. Efficient production of foot-and-mouth disease virus empty capsids in** (см. прод.)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАКЦИНЫ ОТ FMDV И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к ветеринарии, и может быть использована для получения композиций для борьбы с заражением вирусом ящура (FMDV) у животных. Для этого получают рекомбинантный вирусный вектор, экспрессирующий антиген вируса ящура (FMDV), который образует вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV, при этом указанный антиген FMDV представляет собой модифицированный полипептид P1, который образует дисульфидный мостик, что является следствием модификации полипептида P1 цистеиновой заменой в положении, соответствующем 179 аминокислоте в SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 или 16, и указанные вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV обладают повышенной термо- и кислотоустойчивостью. Группа изобретений также относится к композиции для индукции иммунной реакции у животного против FMDV, содержащей указанный рекомбинантный вирусный вектор, к плазмиде, экспрессирующей антиген FMDV, и к клетке насекомого, стабильно трансформированной данной плазмидой. Использование данной группы изобретений позволяет получить вирусоподобные частицы

RU 2745373 C2
RU 2745373 C2

или пустые капсиды FMDV, обладающие повышенной термо- и кислотоустойчивостью, обеспечивая уровни защиты против заражений гомологичными и гетерологичными FMDV. 6 н. и 13 з.п. ф-лы, 26 ил., 11 табл., 14 пр.

(56) (продолжение):
insect cells following down regulation of 3C protease activity // J Virol Methods. 2013 Feb; 187 (2): 406-412. Zhou G et al. Recombinant adenovirus expressing type Asia1 foot-and-mouth disease virus capsid proteins induces protective immunity against homologous virus challenge in mice // Res Vet Sci. 2013 Jun; 94 (3): 796-802. Alejo D. et al. An adenovirus vectored mucosal adjuvant augments protection of mice immunized intranasally with an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease virus subunit vaccine // Vaccine. 2013 Apr 26; 31 (18): 2302-9.

RU 2745373 C2

RU 2745373 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 745 373**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 39/135 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 39/135 (2021.01); C12N 7/00 (2021.01); A61P 31/12 (2021.01)

(21)(22) Application: **2017113571, 23.09.2015**

(24) Effective date for property rights:
23.09.2015

Registration date:
24.03.2021

Priority:
(30) Convention priority:
23.09.2014 US 62/054,073

(43) Application published: **26.10.2018** Bull. № **30**

(45) Date of publication: **24.03.2021** Bull. № **9**

(85) Commencement of national phase: **24.04.2017**

(86) PCT application:
US 2015/051755 (23.09.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/049209 (31.03.2016)

Mail address:
101000, Moskva, ul. Myasnitskaya, 13, str. 5, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):
AUDONNET, Jean-christophe (FR),
HANNAS-DJEBBARA, Zahia (FR),
MEBATSION, Teshome (US),
CHIANG, Yu-Wei (US),
WIDENER, Justin (US),
REYNARD, Frederic (FR)

(73) Proprietor(s):
BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA INC. (US)

RU 2745373 C2

(54) FMDV RECOMBINANT VACCINES AND USE THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: set of inventions relates to medicine, in particular to veterinary medicine, and can be used for producing compositions for controlling the infection of the foot and mouth disease virus (FMDV) in animals. For this purpose, a recombinant viral vector expressing the foot and mouth disease virus antigen (FMDV) which forms viral-like particles or empty capsids FMDV is produced, wherein the above-mentioned FMDV antigen is a modified polypeptide P1 which forms a disulfide bridge, which is a consequence of the modification of polypeptide P1 by cysteine substitution in a position corresponding to 179 amino acid in SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 or 16, and said viral-like particles or empty capsids FMDV have increased thermal and acid resistance. Set of inventions also relates to a composition for inducing an immune reaction in an animal against FMDV, which comprises a recombinant viral vector, to a plasmid expressing FMDV antigen, and to an insect cell which is stabilized by said plasmid.

EFFECT: use of this set of inventions enables producing viral-like particles or empty FMDV capsids exhibiting increased thermal and acidic resistance, providing levels of protection against contamination with homologous and heterologous FMDV.

19 cl, 26 dwg, 11 tbl, 14 ex

RU 2745373 C2

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США 62/054073, поданной 23 сентября 2014.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям для борьбы с заражением вирусом ящура (FMDV) у животных. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим антиген FMDV, способам вакцинации против FMDV и наборам для применения с такими способами и композициями.

Предпосылки создания изобретения

Ящур (FMD) является одним из наиболее опасных и контагиозных заболеваний, поражающих сельскохозяйственных животных. Это заболевание является эндемическим во многих странах в мире, в особенности в Африке, Азии и Южной Америке. Кроме того, периодически могут происходить эпидемические вспышки. Наличие такого заболевания в стране может иметь очень тяжелые экономические последствия, являющиеся результатом потери продуктивности, потери в массе и производстве молока в зараженных стадах и от эмбарго на торговлю, наложенного на такие страны. Меры, предпринимаемые против этого заболевания, заключаются в строгом применении ограничений на импорт, использовании инактивированных вакцин или как превентивная мера на национальном или региональном уровне или периодически, когда происходит эпидемическая вспышка.

FMD характеризуется коротким инкубационным периодом, высококонтагиозным характером, образованием язв в ротовой полости и на ногах и иногда гибелью молодых животных. FMD поражает ряд видов животных, в частности, крупный рогатый скот, свиней, овец и коз. Агентом, ответственным за это заболевание, является вирус, содержащий рибонуклеиновую кислоту (РНК), принадлежащий к роду Aphthovirus семейства Picornaviridae (Cooper et al., Intervirology, 1978, 10, 165-180). В настоящее время известно по меньшей мере семь типов вируса ящура (FMDV): европейские типы (A, O и C), африканские типы (SAT1, SAT2 и SAT3) и азиатский тип (Азия 1). Также различают многочисленные подтипы (Kleid et al., Science (1981), 214, 1125-1129).

FMDV представляет собой «раздетый» икосаэдрический вирус примерно 25 нм в диаметре, содержащий молекулу одноцепочечной РНК в примерно 8500 нуклеотидов, с положительной полярностью. Такая молекула РНК включает одну открытую рамку считывания (ORF), кодирующую один полипротеин, содержащий, среди прочего, предшественник капсида, также известный как белок P1 или P88. Белок P1 миристилирован по его аминоконцу. Во время процесса созревания белок P1 расщепляется протеазой 3C на три белка, известные как VP0, VP1 и VP3 (или 1AB, 1D и 1C, соответственно; Belsham G. J., Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 60, 241-261). Затем в вирионе белок VP0 расщепляется на два белка VP4 и VP2 (или 1A и 1B, соответственно). Механизм конверсии белков VP0 в VP4 и VP2 и образования зрелых вирионов неизвестен. Белки VP1, VP2 и VP3 имеют молекулярную массу примерно 26000 Да, в то время как белок VP4 меньше – примерно 8000 Да.

Простая комбинация белков капсида образует протомер или 5S молекулу, которая является элементарной составной частью капсида FMDV. Затем такой протомер образует комплекс пентамер с образованием молекулы 12S. Вирион является результатом инкапсидирования молекулы геномной РНК путем сборки двенадцати пентамеров 12S, составляя таким образом частицы 146S. Вирусный капсид также может образоваться в отсутствие молекулы РНК внутри него (далее в настоящем описании «пустой капсид»). Пустой капсид также обозначается как частица 70S. Образование пустого капсида

может происходить естественно во время репликации вируса, или его можно получить искусственно химической обработкой.

Осуществлены некоторые исследования с природными пустыми капсидами. В частности, Rowlands et al. (Rowlands et al., J. Gen. Virol., 1975, 26, 227-238) показали, что вирионы A10 ящура включают, главным образом, четыре белка VP1, VP2, VP3 и VP4. Для сравнения, природные пустые капсиды (полученные не рекомбинацией, но очищенные из культур вируса A10 ящура) по существу содержат нерасщепленный белок VP0; идентичные результаты с вирусом ящура A-Pando описаны Rweyemamu (Rweyemamu et al., Archives of Virology, 1979, 59, 69-79). Искусственные пустые капсиды, полученные после диализа в присутствии трис-ЭДТК и после центрифугирования, не содержат белок VP4. Такие искусственные капсиды являются слабо иммуногенными согласно Rowlands et al., и природные пустые капсиды являются иммуногенными только после обработки формальдегидом для их стабилизации, хотя образование антител, вызванное природными пустыми капсидами у морской свинки, все же является непостоянным, как отмечает автор. Более того, Rowlands et al. и Rweyemamu et al. не согласны с необходимостью стабилизировать природные пустые капсиды. Для Rweyemamu et al. отсутствие обработки формальдегидом не является пагубным для уровня антигенности природных пустых капсидов. Иммуногенность проверяли только по индукции нейтрализующих антител у морской свинки.

Экспрессию гена, кодирующего предшественника P1 капсидных белков, при помощи рекомбинантного бакуловируса в клетках насекомых сравнивают с экспрессией гена, кодирующего P1, связанного с протеазой 3C, в E. coli (Grubman et al., Vaccine, 1993, 11, 825-829; Lewis et al., J. Virol., 1991, 65, 6572-6580). Коэкспрессия P1 и 3C в E. coli приводит к сборке пустых капсидов 70S. Продукт экспрессии таких двух конструкций продуцирует нейтрализующие антитела у морских свинок и свиней. Титры, полученные с конструкцией P1/бакуловирус, являются низкими. Эти же продукты экспрессии вызывают частичную защиту у свиней. Однако некоторые свиньи, защищенные от заболевания, не защищены от репликации контрольного вируса. Однако экспрессирующая система E. coli не миристилирует белки, и протеаза 3C является токсичной для такой клетки. Lewis et al. приходят к выводу, что на фундаментальные вопросы, касающиеся получения вируса и структуры капсида, необходимого для получения максимальной защиты животного, ответов нет. Кроме того, Grubman et al. устанавливают, что может быть необходимо стабилизировать пустые капсиды перед составлением вакцины; в этом они согласны с проблемами, встречающимися в связи с пустыми капсидами, полученными экстракцией из культур вирусов (см. выше).

Слитые белки, содержащие часть или весь белок P1, также получают, используя вирусные векторы, а именно, вирус герпеса или вакцину от герпеса. В CA-A-2047585, в частности, описывается вирус герпеса коров, используемый для получения слитых белков, содержащих пептидную последовательность вируса ящура (аминокислоты 141-158 P1 связаны с аминокислотами 200-213 P1), слитого с гликопротеином gpIII такого вируса герпеса коров. Вирусные векторы также используют для экспрессии стабилизированного пустого капсида FMDV (US 7531182). В последнее время исследуют растения как источник для получения антигенов FMDV (US 2011/0236416).

Многие гипотезы, пути исследования и проекты разрабатываются в попытке создать эффективные вакцины против FMD. В настоящее время наиболее подходящие вакцины на рынке содержат инактивированный вирус. Существует беспокойство о безопасности вакцины с FMDV, так как вспышки FMD в Европе ассоциируются с недостатками в изготовлении вакцин (King, A.M.Q. et al., 1981, Nature, 293: 479-480). Инактивированные

вакцины не предоставляют длительный иммунитет, причем таким образом требуются бустерные инъекции каждый год или чаще в случае эпидемических вспышек. Кроме того, существуют опасности, связанные с неполной инактивацией и/или избавлением от вируса во время получения инактивированных вакцин (King, A.M.Q., там же). Задачей в технике является конструирование конформационно правильных иммуногенов, лишенных инфективного генома FMDV, для получения эффективных и безопасных вакцин.

Сообщается, что антитела материнского происхождения (MDA) способны ингибировать реакцию у телят (крупного рогатого скота моложе 2 лет) на вакцинацию от FMD (Graves, 1963, Journal of Immunology, 91:251-256; Brun et al., 1977, Developments in Biological Standardisation, 25:117-122).

С учетом восприимчивости животных (включая людей, хотя редко) к FMDV способ предупреждения заражения FMDV и защиты животных жизненно необходим. Соответственно, существует необходимость в более эффективных и устойчивых вакцинах против FMDV.

Сущность изобретения

Раскрыты композиции или вакцины, включающие антигенный полипептид FMDV и его фрагменты и варианты, и композиции или вакцины, включающие рекомбинантные вирусные векторы, экспрессирующие полипептид FMDV, фрагменты и варианты его. Антигены FMDV и их фрагменты и варианты обладают иммуногенными и защитными свойствами. Антигены FMDV могут быть получены с помощью бакуловирусного экспрессирующего вектора в клетках насекомых. Антигены FMDV могут быть модифицированы для усиления устойчивости пустых капсидов FMDV или FMDV вирусоподобные частицы. Рекомбинантные вирусные векторы могут представлять собой аденовирусные векторы, экспрессирующие антигены FMDV.

Антигенные полипептиды и их фрагменты и варианты или рекомбинантные вирусные векторы можно включать в вакцины и/или фармацевтические композиции. Такие вакцины или композиции можно использовать для вакцинации животных и предоставить защиту против гомологичных и гетерологичных штаммов FMDV.

Предлагаются способы усиленной защиты нормальных животных и животных, положительных к антителам материнского происхождения (MDA-положительных), против заражений FMDV. Также предлагаются наборы, включающие по меньшей мере один антигенный полипептид или его фрагмент или вариант и инструкции для применения.

Краткое описание чертежей

Следующее подробное описание, которое дается как пример, но не предназначено для ограничения изобретения только конкретными описанными воплощениями, можно понять наилучшим образом в сочетании с прилагаемыми чертежами, которые кратко описаны далее.

Фиг. 1 отображает таблицу, обобщающую последовательности ДНК и белков.

Фиг. 2 представляет экспрессированный полипротеин FMDV и обработку с помощью 3C.

Фиг. 3 отображает карту плазмиды pMEB097.

Фиг. 4 отображает результат электронной микроскопии MacMEB097.

Фиг. 5 отображает результаты вестерн-блоттинга капсидного белка FMDV штамма A24.

Фиг. 6A и 6B отображают электронную микроскопию и специфический ELISA BacMEB097.

Фиг. 7A-7D отображают выравнивание последовательностей белковых последовательностей.

Фиг. 8 отображает FMDV вирусоподобные частицы.

Фиг. 9 отображает эволюцию средних титров нейтрализующих антител к A24 Cruzeiro FMDV.

Фиг. 10 отображает титры нейтрализующих антител к A24 Cruzeiro FMDV.

Фиг. 11A и 11B отображают эволюцию средних титров нейтрализующих антител к A24 Cruzeiro FMDV.

Фиг. 12A-12C отображают эволюцию средней температуры после заражения.

Фиг. 13 отображает ЭМ анализ вирусоподобных частиц A24 Cruzeiro с или без ковалентно запирающей мутации в присутствии или отсутствии нагревания или кислоты.

Фиг. 14 отображает анализ ELISA с или без ковалентно запирающей мутации для серотипа A24 Cruzeiro после нагревания.

Фиг. 15 отображает анализ ELISA вирусоподобных частиц A24 Cruzeiro с или без ковалентно запирающей мутации при хранении при 5°C со временем.

Фиг. 16 отображает результаты ELISA и изображения ЭМ, показывающие устойчивость ковалентно запертых вирусоподобных частиц к нагреванию.

Фиг. 17 отображает результаты ELISA, показывающие устойчивость ковалентно запертых вирусоподобных частиц O1 Manisa к кислоте (вверху) и при нагревании (внизу).

Фиг. 18A отображает вакцинацию и схему анализа. Фиг. 18B отображает эволюцию титров нейтрализующих антител против FMD Asia1 Shamir и A22 Iraq FMD.

Фиг. 19A отображает схему гуморального ответа (детекция B-клеток памяти). Фиг. 19B отображает серологические данные для ковалентно запертых вирусоподобных частиц Asia Shamir и A22 Iraq.

Фиг. 20 отображает анализ ELISPOT B-клеток у вакцинированных FMDV вирусоподобными частицами животных в день 27.

Фиг. 21 отображает анализ ELISPOT B-клеток у вакцинированных FMDV вирусоподобными частицами животных в день 43 (измерение B-клеток памяти).

Фиг. 22 отображает анализ специфических клеток, секретирующих γ-интерферон (IFNγ), у вакцинированных FMDV вирусоподобными частицами животных в день 27.

Фиг. 23 отображает log10 титра FMDV SVN в группах на день 42.

Фиг. 24 отображает среднее log10 титра FMDV SVN в ходе исследования (день 0 – день 42).

Фиг. 25 отображает карту плазмиды pAD3027.

Фиг. 26 отображает вестерн-блоттинг vAD3027.

Подробное описание

Предлагаются композиции, включающие полипептид FMDV, антиген и его фрагменты и варианты, и композиции, включающие рекомбинантные вирусные векторы, экспрессирующие антигены FMDV, которые выявляют иммунную реакцию у животного. Антигенные полипептиды или их фрагменты или варианты получают с помощью бакуловирусного экспрессирующего вектора в клетках насекомых. Рекомбинантные вирусные векторы могут представлять собой аденовирусные векторы, экспрессирующие антигены FMDV. Антигенные полипептиды или их фрагменты или варианты или рекомбинантные вирусные векторы, экспрессирующие антигены, можно включить в вакцины или фармацевтические композиции и использовать для выявления или стимуляции защитной реакции у животного. В одном воплощении полипептидный антиген представляет собой полипептид FMDV P1, VP2 или 3C или его активный фрагмент или вариант. Антигены FMDV можно модифицировать для усиления

устойчивости пустых капсидов FMDV или FMDV вирусоподобных частиц.

Выяснено, что антигенные полипептиды по изобретению могут представлять собой полноразмерные полипептиды или их активные фрагменты или варианты. Предполагается, что «активными фрагментами» или «активными вариантами» являются фрагменты или варианты, которые сохраняют антигенный характер полипептида. Таким образом, настоящее изобретение охватывает любой полипептид FMDV, антиген или эпитоп или иммуноген, который выявляет иммунную реакцию у животного. Полипептид FMDV, антиген, эпитоп или иммуноген могут представлять собой любой полипептид FMDV, антиген, эпитоп или иммуноген, такой как, но без ограничения, белок, пептид или его фрагмент или вариант, который выявляет, вызывает или стимулирует реакцию у животного, такого как овца, корова, коза или свинья.

Определенные антигенные полипептиды FMDV включают P1, VP2 и 3C. FMDV представляет собой безоболочечный икосаэдрический вирус примерно 25 нм в диаметре, содержащий молекулу одноцепочечной РНК в примерно 8500 нуклеотидов, с положительной полярностью. Такая молекула РНК включает одну открытую рамку считывания (OFR), кодирующую один полипротеин, содержащий, среди прочего, предшественник капсида, известный как белок P1 или P88. Белок P1 миристилирован по его аминоконцу. Во время процесса созревания белок P1 расщепляется протеазой 3C на три белка, известные как VP0, VP1 и VP3 (или 1AB, 1D и 1C, соответственно; Belsham G. J., Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 60, 241-261). Затем в вирионе белок VP0 расщепляется на два белка VP4 и VP2 (или 1A и 1B, соответственно). Белки VP1, VP2 и VP3 имеют молекулярную массу примерно 26000 Да, в то время как белок VP4 меньше - примерно 8000 Да. Последовательности FMDV также описаны в документах US 7527960 и US 7531182, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Простая комбинация капсидных белков образует протомер или 5S молекулу, которая является элементарной составной частью капсида FMDV. Затем такой протомер образует комплекс пентамер с образованием молекулы 12S. Вирион является результатом инкапсидирования молекулы геномной РНК путем сборки двенадцати пентамеров 12S, составляя таким образом частицы 146S. Вирусный капсид также может образоваться в отсутствие молекулы РНК внутри него (далее в настоящем описании «пустой капсид»). Пустой капсид также обозначается как частица 70S. Образование пустого капсида может происходить естественно во время репликации вируса, или его можно получить искусственно химической обработкой.

Настоящее изобретение относится к вакцинам или композициям для коров, овец, коз или свиней, которые могут содержать эффективное количество рекомбинантного антигена FMDV или рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего антиген FMDV, и фармацевтически или ветеринарно-приемлемый носитель, эксципиент, адъювант или носитель.

В некоторых воплощениях вакцины дополнительно включают адъюванты, такие как эмульсии масло-в-воде (O/W), описанные в патенте США 7371395.

В еще других воплощениях адъюванты включают EMULSIGEN, гидроксид алюминия, сапонин и CpG или их комбинации.

В некоторых воплощениях реакция у животного является защитной иммунной реакцией.

Под «животным» подразумеваются млекопитающие, птицы и т.п. Животное или хозяин включает млекопитающих и человека. Животное можно выбрать из группы, состоящей из лошадиных (например, лошади), собачьих (например, собак, волков, лис,

койотов, шакалов), кошачьих (например, львов, тигров, домашних кошек, диких кошек, других крупных кошек, и других кошачьих, включая гепардов и рысей), овечьих (например, овцы), коровьих (например, крупного рогатого скота, коровы), свиней (например, свиньи), козлиных (например, козы), птиц (например, курицы, утки, гуся, индейки, перепела, фазана, попугая, вьюрка, сокола, вороны, страуса, эму и казуара), приматов (например, полуобезьяны, долгопята, обезьяны, гиббона) и рыб. Термин «животное» также включает отдельное животное на всех стадиях развития, включая эмбриональную и фетальную стадии.

Если не поясняется иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют те же значения, какие им обычно придают специалисты в данной области техники, к которым это раскрытие относится. Термины в единственном числе включают множественное число, если контекст не указывает четко на иное. Подобным образом, предполагается, что слово «или» включает «и», если контекст не указывает четко на иное.

Отмечается, что в данном раскрытии, и особенно в формуле изобретения и/или разделах, термины, такие как «включает», «включенный», «включающий» и т.п., могут иметь значения, приписанные им в Патентном законе США; например, они могут означать «охватывать», «охваченный», «охватывающий» и т.п.; и термины, такие как «состоящий по существу из» и «состоит по существу из» имеют значения, приписанные им в Патентном законе США; например, они допускают элементы, не приведенные специально, но исключают элементы, которые обнаруживаются на известном уровне техники, или которые влияют на основной или новый признак изобретения.

Антигенные полипептиды по изобретению способны защищать от FMDV. Иными словами, они способны стимулировать иммунную реакцию у животного. «Антиген» или «иммуноген» обозначает вещество, которое вызывает специфическую иммунную реакцию у животного-хозяина. Антиген может включать весь организм, убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; кусок или фрагмент ДНК, способный вызывать иммунную реакцию после презентации животному-хозяину; полипептид, эпитоп, гаптен или их любую комбинацию. С другой стороны, иммуноген или антиген может включать токсин или антитоксин.

Термин «иммуногенный белок, полипептид или пептид», используемый в настоящем описании, включает полипептиды, которые являются иммунологически активными в том смысле, что, как только введены хозяину, способны вызывать иммунную реакцию гуморального и/или клеточного типа, направленную против белка. Предпочтительно фрагмент белка является таким, что по существу имеет такую же иммунологическую активность, как полный белок. Таким образом, фрагмент белка согласно изобретению включает или состоит по существу из по меньшей мере одного эпитопа или антигенной детерминанты. «Иммуногенный» белок или полипептид, как используется в настоящем описании, включает полноразмерную последовательность белка, его аналогов или его иммуногенных фрагментов. «Иммуногенным фрагментом» именуется фрагмент белка, который включает один или несколько эпитопов и таким образом выявляет иммунологическую реакцию, описанную выше. Такие фрагменты можно идентифицировать с использованием любого из ряда методов картирования эпитопов, хорошо известных в технике. См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Например, линейные эпитопы можно определить путем, например, конкурентного синтеза большого числа пептидов на твердых носителях, причем пептиды соответствуют частям молекулы белка, и

взаимодействия пептидов с антителами в то время, когда пептиды еще присоединены к носителям. Такие методы известны в технике и описаны в, например, пат. США № 4708871; Geysen et al., 1984, PNAS USA, 81(13): 3998-400; Geysen et al., 1985, PNAS USA, 82(1): 178-82. Подобным образом, конформационные эпитопы легко идентифицируются путем определения пространственной конформации аминокислот, таким как, например, рентгеновская кристаллография и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols, цит. выше. Способы, особенно применимые к белкам T. parva, хорошо описаны в PCT/US2004/022605, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Как упоминалось, изобретение охватывает активные фрагменты и варианты антигенных полипептидов. Таким образом, термин «иммуногенный белок, полипептид или пептид» также предполагает делеции, добавки или замены в последовательности до тех пор, пока полипептидные фракции вырабатывают иммунологическую реакцию, как определено в настоящем описании. Термин «консервативная вариация» обозначает замену аминокислотного остатка другим биологически схожим остатком или замену нуклеотида в нуклеотидной последовательности такую, что кодированный аминокислотный остаток не заменяется или представляет собой другой биологически схожий остаток. В этом отношении особенно предпочтительные замены будут, как правило, консервативными по природе, т.е., такими заменами, которые происходят в пределах семейства аминокислот. Например, аминокислоты вообще разделяют на четыре семейства: (1) кислотные – аспартат и глутамат; (2) основные – лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные – аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные – глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Примеры консервативных вариаций включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток или замену одного полярного остатка на другой полярный остаток, например, замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамина на аспарагин, и т.п.; или подобную консерватину замену аминокислоты структурно родственной аминокислотой, которая не будет иметь сильного влияния на биологическую активность. Белки, имеющие по существу такую же аминокислотную последовательность, как эталонная молекула, но обладающие минорными заменами аминокислот, которые по существу не влияют на иммуногенность белка, поэтому входят в определение эталонного полипептида. Все полипептиды, полученные путем таких модификаций, включены в настоящее изобретение. Термин «консервативная вариация» также включает применение заменяющей аминокислоты вместо незамененной исходной аминокислоты при условии, что антитела к полипептиду с заменой также вступают в иммунную реакцию с исходным полипептидом.

Термин «эпитоп» относится к сайту на антигене или гаптене, с которым реагируют специфические B-клетки и/или T-клетки. Термин также используют взаимозаменяемо с термином «антигенная детерминанта» и «антигенный детерминантный сайт». Антитела, которые узнают один и тот же эпитоп, можно идентифицировать простым иммуноанализом, показывающим способность антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью.

«Иммунологическая реакция» на композицию или вакцину представляет собой развитие у хозяина клеточной и/или антителоопосредованной иммунной реакции на композицию или вакцину, представляющую интерес. Обычно «иммунологическая

реакция» включает, но не ограничивается, одно или несколько из следующих действий: продуцирование антител, В-клеток, хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных специфически на антиген или антигены, включенные в композицию или вакцину, представляющую интерес. Предпочтительно хозяин будет отображать или терапевтическую или защитную иммунологическую реакцию, такую, что будет усиливаться сопротивление новой инфекции и/или снижаться клиническая тяжесть заболевания. Такая защита будет демонстрироваться или уменьшением или исчезновением симптомов, обычно отображаемых инфицированным хозяином, более коротким временем восстановления и/или сниженным вирусным титром у инфицированного хозяина.

Синтетические антигены также включены в изобретение, например, полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие рекомбинантно или синтетически полученные антигены. См., например, Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998. Иммуногенные фрагменты для целей настоящего изобретения обычно будут включать по меньшей мере примерно 3 аминокислоты, по меньшей мере примерно 5 аминокислот, по меньшей мере примерно 10-15 аминокислот или по меньшей мере примерно 15-25 аминокислот или больше аминокислот молекулы. Существует верхний критический предел для длины фрагмента, который может включать почти полноразмерную белковую последовательность или даже слитый белок, включающий по меньшей мере один эпитоп белка.

Соответственно, минимальная структура полинуклеотида, экспрессирующего эпитоп, является такой, которая включает или состоит по существу из нуклеотидов, кодирующих эпитоп или антигенную детерминанту полипептида FMDV. Полинуклеотид, кодирующий фрагмент полипептида FMDV, может включать или состоять по существу из или состоять из минимум 15 нуклеотидов, примерно 30-45 нуклеотидов, примерно 45-75 нуклеотидов или по меньшей мере 57, 87 или 150 последовательных или соприкасающихся нуклеотидов последовательности, кодирующей полипептид.

Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» относятся к РНК или ДНК, которая является линейной или разветвленной, одно- или двухцепочечной или их гибридом. Термины также охватывают гибриды РНК/ДНК. Далее следуют неограничительные примеры полинуклеотидов: ген, фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированная ДНК любой последовательности, изолированная РНК любой последовательности, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может включать модифицированные полинуклеотиды, такие как метилированные полинуклеотиды, и нуклеотидные аналоги, урацил, другие сахара и соединяющие группы, такие как флуорорибоза и тиолат, и нуклеотидные ответвления. Последовательность нуклеотидов после полимеризации можно дополнительно модифицировать, например, путем конъюгации, метящими компонентами. Другие типы модификаций, охваченных данным термином, включают кэпирование, замещение одного или более нуклеотидов аналогами и введение средств для связывания полинуклеотидов с белками, ионами металлов, метящими компонентами, другими полинуклеотидами или твердой подложкой. Полинуклеотиды можно получить химическим синтезом или получить из микроорганизма.

Термин «ген» используется широко для обозначения любого сегмента полинуклеотида, связанного с биологической функцией. Так, гены включают интроны и экзоны, как в геномной последовательности, или только кодирующие последовательности, как в кДНК, и/или регуляторные последовательности, требуемые

для их экспрессии. Например, ген также относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который экспрессирует мРНК или функциональную РНК или кодирует специфический белок, и который включает регуляторные последовательности.

Изобретение также относится к комплементарной цепи к полинуклеотиду, кодирующему антиген FMDV, антиген, эпитоп или иммуноген. Комплементарная цепь может быть полимерной и любой длины и может содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и аналоги в любой комбинации.

Термины «белок», «пептид», «полипептид» и «фрагмент полипептида» в настоящем описании используются взаимозаменяемо для обозначения полимеров из аминокислотных остатков любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может включать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот, и он может прерываться химическими группами иными, чем аминокислоты. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который модифицирован естественно или путем вмешательства, например, образования дисульфидных связей, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования, или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с метящим или биоактивным компонентом.

«Изолированным» биологическим компонентом (таким как нуклеиновая кислота или белок или органелла) называют компонент, который по существу отделен от других биологических компонентов в клетке организма, в котором компоненты встречаются в природе, например, других хромосомных и внехромосомных ДНК и РНК, белков и органелл. Нуклеиновые кислоты и белки, которые являются «изолированными», включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными методами очистки. Термин также включает нуклеиновые кислоты и белки, полученные рекомбинантной технологией, а также химическим синтезом.

Термин «очищенный», используемый в настоящем описании, не требует абсолютной чистоты; он скорее предназначен в качестве условного термина. Так, например, получение очищенного полипептида является получением, при котором полипептид является более обогащенным, чем полипептид в своем естественном окружении. Иными словами, полипептид отделяют от клеточных компонентов. Предполагается, что «по существу очищенный» это такой полипептид, который представляет собой несколько воплощений, в которых удалено по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или больше клеточных компонентов материала. Таким же образом полипептид может быть частично очищенным. В случае «частично очищенного» полипептида предполагается, что удалено менее 60% клеточных компонентов материала. То же применяется к полинуклеотидам. Полипептиды, раскрытые в настоящем описании, можно очищать любым из способов, известных в технике.

Как отмечалось выше, антигенные полипептиды или их фрагменты или варианты являются антигенными полипептидами FMDV, которые получают с помощью бакуловирусного экспрессирующего вектора в клетках насекомых in vitro или с помощью вирусного вектора in vivo. Фрагменты и варианты раскрытых полинуклеотидов и полипептидов, кодированных ими, также охватываются настоящим изобретением. Под «фрагментом» подразумевается часть полинуклеотида или часть антигенной аминокислотной последовательности, кодированной им. Фрагменты полинуклеотида могут кодировать фрагменты белка, которые сохраняют биологическую активность нативного белка и, следовательно, имеют иммуногенную активность, как отмечалось уже в настоящем описании. Фрагменты последовательности полинуклеотида сохраняют

способность индуцировать защитную иммунную реакцию у животного.

«Варианты» предназначены для обозначения по существу подобных последовательностей. В случае полипептидов вариант включает делецию и/или добавление одного или нескольких нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в нативном полинуклеотиде и/или замену одного или нескольких нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в нативном полинуклеотиде. При использовании в настоящем описании «нативный» полинуклеотид или полипептид включает встречающуюся в природе нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность, соответственно. Варианты определенного полинуклеотида по изобретению (т.е. эталонного полинуклеотида) также можно оценить путем сравнения идентичности последовательностей в процентах между полипептидом, кодированным вариантом полинуклеотида, и полипептидом, кодированным эталонным полинуклеотидом. «Вариантный» белок предназначен для обозначения белка, образованного от нативного белка путем делеции или добавления одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких сайтах в нативном белке и/или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких сайтах в нативном белке. Вариантные белки, охватываемые настоящим изобретением, являются биологически активными, т.е., они способны выявлять иммунную реакцию.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам FMDV из овечьих, коровьих, козьих или свиных изолятов FMDV. В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16, и его варианту или фрагменту.

В другом аспекте изобретение относится к улучшению термо- и/или кислотоустойчивости пустых капсидов FMDV или FMDV вирусоподобные частицы. Термо- и/или кислотоустойчивость пустых капсидов FMDV преимущественно обеспечивается образованием дисульфидных связей.

В частности, такое улучшение получают путем замены аминокислоты исходной последовательности цистеином в полипептидной последовательности структурного белка капсида белка V2 (образованного из P1), например, в позиции 179 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 или 16 (P1 штамма FMDV A24, штамма FMDV O1 manisa, штамма FMDV Iraq или штамма FMDV Asia). Как общее правило, позиция такой аминокислоты идентична белку VP2, образованному из другого вируса ящура (как в случае, в частности, со штаммами, описанными в примерах). Участок, содержащий такую аминокислоту, соответствует альфа-спирали. Для того, чтобы идентифицировать или подтвердить аминокислоту, которая должна быть мутирована, аминокислотные последовательности этого участка выравнивают с соответствующим участком (например, порядка примерно десяти или несколько больше – например, 10-20 – аминокислот) на последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 или 16, принимая во внимание тот факт, что последовательности являются вполне консервативными по структуре среди различных FMDV. Аминокислота, которую мутируют, располагается в позиции 179 FMDV P1 (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 или 16). Как правило, метионин, соответствующий инициирующему кодону (который не присутствует в природной последовательности и поэтому добавлен), нумеруют 1.

Кроме того, предполагается, что гомологи полипептидов FMDV от овцы, коровы, козы или свиньи, находятся в объеме настоящего изобретения. Используемый в настоящем описании термин «гомологи» включает ортологи, аналоги и паралоги. Термин «аналоги» относится к двум полинуклеотидам или полипептидам, которые имеют одну и ту же или подобную функцию, но развивались раздельно в неродственных

организмах. Термин «ортологи» относится к двум полинуклеотидам или полипептидам из различных видов, но развивались из обычного предкового гена путем видообразования. Обычно ортологи кодируют полипептиды, имеющие одни и те же или схожие функции. Термин «паралог» относится к двум полинуклеотидам или полипептидам, которые являются родственными за счет дупликации в геноме. Паралоги обычно имеют различные функции, но эти функции могут быть родственными. Аналоги, ортологи и паралоги полипептида FMDV дикого типа могут отличаться от полипептида FMDV дикого типа посттранскрипционной модификацией, различиями в аминокислотной последовательности или тем и другим. В частности, гомологи по изобретению будут, как правило, показывать по меньшей мере 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательностей с последовательностями полипептида или полинуклеотида FMDV дикого типа полностью или частично, и будут показывать схожую функцию. Варианты включают аллельные варианты. Термин «аллельный вариант» относится к полинуклеотиду или полипептиду, содержащему полиморфизмы, которые ведут к изменениям в аминокислотных последовательностях белка, и которые существуют в природной популяции (например, виду вируса или вариации). Такие природные аллельные вариации могут привести к 1-5% дисперсии в полинуклеотиде или полипептиде. Аллельные варианты можно идентифицировать путем секвенирования нуклеотидной последовательности, представляющей интерес, в ряде различных видов, которое можно легко осуществить путем использования гибридизирующих зондов для идентификации одних и тех же генетических локусов гена в таких видах. Предполагается, что любые и все такие нуклеотидные вариации и полученные аминокислотные полиморфизмы или вариации, которые являются результатом природной аллельной вариации, и которые не изменяют функциональной активности гена, представляющего интерес, входят в объем изобретения.

Используемый в настоящем описании термин «производное» или «вариант» относится к полипептиду или нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, которые имеют одну или несколько консервативных вариаций аминокислот или другие минорные модификации, такие что (1) соответствующий полипептид имеет по существу эквивалентную функцию при сравнении с полипептидом дикого типа, или (2) антитело, созданное против полипептида, является иммунореактивным с полипептидом дикого типа. Такие варианты или производные включают полипептиды, имеющие минорные модификации первичных аминокислотных последовательностей полипептида FMDV, которые могут привести к пептиду, который имеет по существу эквивалентную активность по сравнению с немодифицированным полипептидом-двойником. Такие модификации могут быть преднамеренными, как за счет сайт-направленного мутагенеза, или могут быть спонтанными. Термин «вариант» дополнительно включает делеции, прибавления и замены в последовательности до тех пор, пока полипептид функционирует как вызывающий иммунологическую реакцию, как определено в настоящем описании.

Термин «консервативная вариация» обозначает замену аминокислотного остатка другим биологически схожим остатком или замену нуклеотида в нуклеотидной последовательности такую, что кодированный аминокислотный остаток не изменяется или представляет собой другой биологически схожий остаток. В этом отношении особенно предпочтительные замены будут консервативными по природе, как описано выше.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению включают последовательности, которые являются вырожденными в результате генетического кода, например, применения оптимизированного кодона для специфического хозяина. При использовании

в настоящем описании, «оптимизированный» относится к полинуклеотиду, который сконструирован методом генной инженерией для повышения его экспрессии в данном виде. Для получения оптимизированных полинуклеотидов, кодирующих полипептиды FMDV, последовательность ДНК белка FMDV можно модифицировать для 1) включения предпочтительных кодонов с помощью высокоэкспрессированных генов в определенном виде; 2) включения такого содержания A+T или G+C в композиционный состав нуклеотидных оснований, которое обычно обнаруживается в указанном виде; 3) образования инициирующей последовательности указанного вида; или 4) устранения последовательностей, которые вызывают дестабилизацию, несоответствующее полиаденилирование, деградацию и терминацию РНК, или которые образуют шпилькообразные вторичные структуры или сайты сплайсинга РНК. Повышенной экспрессии белка FMDV в указанном виде можно достичь путем использования частоты распределения использования кодона в эукариотах и прокариотах или в определенных видах. Термин «частота использования предпочтительных кодонов» относится к предпочтению, демонстрируемому специфической клеткой-хозяином, в использовании нуклеотидных кодонов для определения данной аминокислоты. Существует 20 природных аминокислот, большинство которых определяются более чем одним кодоном. Следовательно, все вырожденные нуклеотидные последовательности включены в раскрытие до тех пор, пока аминокислотная последовательность полипептида FMDV, кодированного нуклеотидной последовательностью, является функционально неизменной.

Идентичность последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями можно установить с помощью попарного вычеркивания и матрицы blosum62 NCBI (National Center for Biotechnology Information), с использованием стандартных параметров (см., например, алгоритм BLAST или BLASTX, доступные на сервере «National Center for Biotechnology Information» (NCBI, Bethesda, Md., USA), а также в Altschul et al.; и таким образом, в данном документе под словом “blasts” подразумевается применение алгоритма или BLAST или BLASTX и матрицы BLOSUM62).

«Идентичность» в связи с последовательностями может относиться к числу позиций с идентичными нуклеотидами или аминокислотами, деленному на число нуклеотидов или аминокислот в более короткой из двух последовательностей, при этом выравнивание двух последовательностей может быть сделано в соответствии с алгоритмом Вилбура и Липмана. Идентичность или подобие двух аминокислотных последовательностей или идентичность двух нуклеотидных последовательностей можно определить с использованием пакета программ Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA). Когда говорят, что последовательности РНК подобны или имеют степень идентичности последовательностей или гомологию с последовательностями ДНК, тимидин (T) в последовательности ДНК считают равным урацилу (U) в последовательности РНК. Таким образом, последовательности РНК входят в объем изобретения и могут быть получены из последовательностей ДНК, причем тимидин (T) в последовательностях ДНК считают равным урацилу (U) в последовательностях РНК.

Реакции гибридизации можно выполнить в условиях различной «строгости». Условия, которые повышают строгость реакции гибридизации, хорошо известны. См., например, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», второе издание (Sambrook et al., 1989).

Изобретение дополнительно охватывает полинуклеотиды FMDV, содержащиеся в векторной молекуле или в экспрессионном векторе и операбельно соединенные с промоторным элементом и, необязательно, с энхансером.

Термин «вектор» относится к рекомбинантной ДНК- или РНК-плазмиде или вирусу, который включает гетерологичный полинуклеотид, который доставляется в клетку-мишень или in vitro, или in vivo. Гетерологичный полинуклеотид может включать последовательность, интересную для целей предупреждения или терапии, и может находиться в форме экспрессирующей кассеты. При использовании в настоящем описании вектор не нуждается в способности к репликации в основной клетке-мишени или субъекте. Термин включает клонирующие векторы и вирусные векторы.

Термин «рекомбинантный» обозначает полинуклеотид полусинтетического или синтетического происхождения, который или не встречается в природе или соединен с другим полинуклеотидом в компоновке, не встречающейся в природе.

«Гетерологичный» означает полученный из организма, генетически отличающегося от остальных частей организма, с которыми сравнивают. Например, полинуклеотид может быть методами генной инженерии помещен в плазмиду или вектор, полученный из другого источника, и представляет собой гетерологичный полинуклеотид. Промотор, удаленный из нативной кодирующей последовательности и оперативно соединенный с кодирующей последовательностью иной, чем нативная последовательность, представляет собой гетерологичный промотор.

Настоящее изобретение относится к овечьим, коровьим, козьим и свиным вакцинам или фармацевтическим или иммунологическим композициям, которые могут включать эффективное количество рекомбинантных антигенов FMDV и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант, вспомогательное вещество или носитель.

Предмет изобретения, описанный в настоящем описании, направлен частично на композиции и способы, связанные с антигеном FMDV, полученным в экспрессирующей системе бакуловирус/клетка насекомого, который является высоко иммуногенным и защищает животных от заражения гомологичными и гетерологичными штаммами FMDV.

Композиции

Настоящее изобретение относится к вакцине или композиции от FMDV, которая может включать эффективное количество рекомбинантного антигена FMDV и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носитель. В одном воплощении рекомбинантный антиген FMDV экспрессируется бакуловирусным экспрессирующим вектором в клетках насекомых. В другом воплощении вакцина или композиция от FMDV включает рекомбинантный вирусный вектор, экспрессирующий антигены FMDV.

Одно воплощение изобретения относится к вакцине или композиции от FMDV, включающей пустой капсид FMDV. В другом воплощении изобретение относится к вакцине или композиции от FMDV, включающей вирусный вектор, экспрессирующий пустые капсиды FMDV. Пустые капсиды FMDV получают экспрессией кДНК участков P1, 2A/2B'/3B' и 3C. Пустые капсиды FMDV или FMDV вирусоподобные частицы можно модифицировать для усиления термо- и/или кислотостойкости (при низком pH).

Настоящее изобретение относится к вакцинам против ящура и, в частности, к улучшению их термо- и/или кислотостойкости (при низком pH). Оно также относится к способам получения таких вакцин, применению антигенов для получения таких вакцин и методам вакцинации с их использованием.

Настоящее изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, в частности, кДНК, и к аминокислотным последовательностям, модифицированным по сравнению с природными последовательностями вируса. Изобретение также относится к продуктам экспрессии модифицированных нуклеотидных последовательностей и к

антигенам FMDV и таким включающим вирус модификациям.

Настоящее изобретение охватывает любой полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген FMDV, который выявляет иммунную реакцию у животного, такого как овца, корова, коза или свинья. Полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген FMDV также может представлять собой любой полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген FMDV, такой как, но без ограничения, белок, пептид или их фрагмент, который выявляет, вызывает или стимулирует реакцию у животного, такого как овца, корова, коза или свинья.

В одном воплощении, в котором иммунологическая композиция или вакцина от FMDV представляет собой рекомбинантную иммунологическую композицию или вакцину, композиция или вакцина включает рекомбинантный вектор и фармацевтически или ветеринарно приемлемое вспомогательное вещество, носитель, адъювант или несущую лекарственное средство среду; рекомбинантный вектор представляет собой бакуловирусный экспрессирующий вектор, который может включать полинуклеотид, кодирующий полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген FMDV. Полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген FMDV может представлять собой VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, NS1, VP7, NS2, VP6, NS3, NS3a, P1, VP0, 3C или их любой фрагмент.

В другом воплощении антиген FMDV представляет собой P1, VP0, VP3, VP1, VP2, VP4, 2A, 2B или 3C.

В одном воплощении молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая один или несколько антигенов FMDV, представляет собой кДНК, кодирующую участок P1 FMDV, и кДНК, кодирующую FMDV 3C протеазу FMDV.

В одном воплощении антиген FMDV может представлять собой полипептид P1-3C. В другом воплощении антиген FMDV может представлять собой один P1 или P1-2A/2B1. В еще одном воплощении антиген FMDV может представлять собой VP0-VP3. В другом воплощении антиген FMDV может представлять собой VP4-VP2. В еще одном воплощении антиген FMDV может представлять собой 3C или может представлять собой 3C с 5'UTR, оптимизированным для экспрессии в клетках насекомых. В одном воплощении полипептиды как P1-2A/2B1, так и 3C могут экспрессироваться в клетках насекомых с использованием единственной конструкции, и экспрессию можно регулировать одной или несколькими промоторными последовательностями. В другом воплощении антиген FMDV представляет собой модифицированный P1 или VP2.

В другом воплощении антиген FMDV может быть получен из FMDV O1 Manisa, O1 BFS or Campos, A24 Cruzeiro, Asia 1 Shamir, A Iran'96, A22 Iraq, SAT2 Saudi Arabia.

Настоящее изобретение относится к вакцине от FMDV, которая может включать эффективное количество рекомбинантного антигена FMDV или рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего антиген FMDV, и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носящую лекарственное средство среду.

В другом воплощении фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носящая лекарственное средство среда может представлять собой эмульсию вода-в-масле. В еще одном воплощении эмульсия вода-в-масле может представлять собой эмульсию масло-в-воде.

Изобретение также охватывает полинуклеотиды FMDV, содержащиеся в молекуле вектора или экспрессирующем векторе, и операбельно соединенные с промоторным элементом и, необязательно, энхансером.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам FMDV, в частности, овечьим, коровьим, козьим или свиным полипептидам, имеющим

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16, и их вариантам или фрагментам.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с антигенным полипептидом по изобретению, особенно, полипептидами, имеющими последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фрагментам и вариантам полипептидов FMDV, идентифицированных выше (SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16), которые может легко получить специалист в данной области техники с использованием хорошо известных методов молекулярной биологии.

Варианты представляют собой гомологичные полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16.

Иммуногенный фрагмент полипептида FMDV включает по меньшей мере 8, 10, 15 или 20 последовательных аминокислот, по меньшей мере 21 аминокислоту, по меньшей мере 23 аминокислоты, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот полипептида FMDV, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16, или его вариантов. В другом воплощении фрагмент полипептида FMDV включает специфический антигенный эпитоп, обнаруженный в полноразмерном полипептиде FMDV.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид FMDV, такому как полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16, или консервативным вариантом, аллельным вариантом, гомологом или иммуногенным фрагментом, включающим по меньшей мере восемь или по меньшей мере десять консервативных аминокислот одного из таких полипептидов, или комбинацией таких полипептидов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, имеющему нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 14, 15, 17, 18, 19 или 20, или его варианту. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, имеющему по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с одним из полинуклеотидов, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 14, 15, 17, 18, 19 или 20, или его варианту.

Полинуклеотиды по изобретению могут включать дополнительные последовательности, такие как дополнительные кодирующие последовательности в одной и той же транскрипционной единице, регулирующие элементы, такие как промоторы, рибосомсвязывающие сайты, энхансер, 5' UTR, 3'UTR, терминаторы транскрипции, сайты полиаденелирования, дополнительные транскрипционные единицы

под контролем одного и того же или различных промоторов, последовательности, которые допускают клонирование, экспрессию, гомологичную рекомбинацию и трансформацию клетки-хозяина, и любую другую конструкцию, которая может быть желательна для осуществления воплощений данного изобретения.

Элементы для экспрессии полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена FMDV преимущественно присутствуют в векторе по изобретению. Минимально это включает, состоит по существу из или состоит из инициирующего кодона (ATG), стоп-кодона и промотора и, необязательно, также последовательности полиаденелирования для некоторых векторов, таких как плазмида и некоторые вирусные векторы, например, вирусные векторы иные, чем поксвирусы. Когда полинуклеотид кодирует фрагмент полипротеина, например, пептид FMDV, преимущественно в векторе, ATG помещают в 5' рамке считывания, и стоп-кодон помещают в 3'. Могут присутствовать другие элементы для регулирования экспрессии, такие как энхансерные последовательности, стабилизирующие последовательности, такие как интрон, и сигнальные последовательности, допускающие секрецию белка.

Настоящее изобретение также относится к препаратам, включающим векторы, такие как экспрессирующие векторы, например, терапевтическим композициям. Препараты могут включать один или несколько векторов, например, экспрессирующие векторы, такие как векторы экспрессии in vivo, включающие и экспрессирующие один или несколько полипептидов, антигенов, эпитопов или иммуногенов FMDV. В одном воплощении вектор содержит и экспрессирует полинуклеотид, который включает, состоит по существу из или состоит из полинуклеотида, кодирующего (и преимущественно экспрессирующего) антиген, эпитоп или иммуноген FMDV, в фармацевтически или ветеринарно приемлемом носителе, вспомогательном веществе или несущей лекарственное средство среде. Так, согласно одному воплощению изобретения, другой вектор или векторы в препарате включают, состоят по существу из или состоят из полинуклеотида, который кодирует, и в соответствующих обстоятельствах вектор экспрессирует, один или больше других белков полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена FMDV или их фрагментов.

Согласно другому воплощению, вектор или векторы в препарате включают, состоят по существу из или состоят из полинуклеотида(ов), кодирующего(их) один или несколько белков или их фрагментов полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена FMDV, причем вектор или векторы экспрессируют полинуклеотид(ы). В другом воплощении препарт включает один, два или больше векторов, включающих полинуклеотид, кодирующий и экспрессирующий, преимущественно in vivo, полипептид, антиген, слитый белок FMDV или его эпитоп. Изобретение также относится к смесям векторов, которые включают полинуклеотиды, кодирующие и экспрессирующие различные полипептиды, антигены, эпитопы или иммуногены FMDV, например, полипептид, антиген, эпитоп или иммуноген FMDV различных видов животных, таких как, но без ограничения, овца, корова, коза или свинья.

Согласно еще одному воплощению изобретения, экспрессирующий вектор представляет собой плазмидный вектор или ДНК-плазмидный вектор, в частности, вектор экспрессии in vivo. В конкретном неограничивающем примере плазмиду pVR1020 или плазмиду 1012 (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, Hum. Gene Ther., 7 (10): 1205-17; см., например, патенты США №№ 5846946 и 6451769) можно использовать в качестве вектора для вставки полинуклеотидной последовательности. Плазмида pVR1020 получена из pVR1012 и содержит сигнальную последовательность человека tPA. В одном воплощении сигнальная последовательность человека tPA включает

аминокислоты от аминокислоты M(1) до аминокислоты S(23) в Genbank под инвентарным номером HUMTPA14. В другом конкретном неограничивающем примере плазмида, используемая в качестве вектора для вставки полинуклеотидной последовательности, может содержать сигнальную пептидную последовательность лошадиного IGF1 от аминокислоты M(24) до аминокислоты A(48) в Genbank под инвентарным номером U28070. Дополнительная информация о ДНК-плазмидах, на которые можно обратить внимание или использовать на практике, имеется, например, в патентах США №№ 6852705; 6818628; 6586412; 6576243; 6558674; 6464984; 6451770; 6376473 и 6221362.

Термин «плазмида» перекрывает любую транскрипционную единицу ДНК, включающую полинуклеотид по изобретению и элементы, необходимые для экспрессии in vivo в клетке или клетках желательного хозяина или мишени; и в этом отношении отмечается, что в объем изобретения входит плазмида в сверхспирализованной, несверхспирализованной и круговой форме, а также в линейной форме.

Каждая плазмида включает или содержит или состоит по существу из, кроме полинуклеотида, кодирующего антиген, эпитоп или иммуноген FMDV, необязательно слитого с гетерологичной пептидной последовательностью, вариант, аналоги или фрагмент, необязательно соединенный с промотором или под контролем промотора или зависящий от промотора. Как правило, это выгодно для использования сильного промотора, функционального в эукариотических клетках. Сильный промотор может представлять собой, но без ограничения, немедленно-ранний цитомегаловирусный промотор (CMV-IE) человеческого или мышиного происхождения или необязательно имеющий другое происхождение, например, от крысы или морской свинки, суперпромотор (Ni M. et al., Plant. J., 7, 661-676, 1995). Промотор CMV-IE может включать основную часть промотора, которая может или не может ассоциироваться с энхансерной частью. Можно сослаться на EP-A-260148, EP-A-323597, патенты США №№ 5168062, 5385839 и 4968615, а также на заявку PCT № WO87/03905. Промотор CMV-IE преимущественно представляет собой человеческий CMV-IE (Boshart et al., 1985, Cell, 41(2): 521-30) или мышиный CMV-IE.

В более общем смысле, промотор имеет вирусное, растительное или клеточное происхождение. Сильный вирусный промотор иной, чем CMV-IE, который можно использовать при практическом осуществлении изобретения, представляет собой ранний/поздний промотор SV-40 или промотор LTR вируса саркомы Рауса. Сильный клеточный промотор, который можно использовать при практическом осуществлении изобретения, представляет собой промотор гена цитоскелета, такой как, например, десминный промотор (Kwissa et al., 2000, Vaccine, 18(22): 2337-44), или актинный промотор (Miyazaki et al., 1989, Gene, 79(2): 269-77).

Плазмиды могут включать другие регулирующие экспрессию элементы. Особенно выгодно включать стабилизирующую(ие) последовательность(и), например, интронную (ые) последовательность(и), например, интрон алкогольдегидрогеназы маиса (Callis et al., Genes & Dev., 1(10): 1183-1200, Dec. 1987), первый интрон hCMV-IE (заявка PCT № WO1989/01036), интрон II гена β-глобина кролика (van Ooyen et al., 1979, Science, 206 (4416): 337-44). В другом воплощении плазмиды могут включать 3' UTR. 3' UTR может представлять собой, но без ограничения, 3' UTR нопалинсинтазы Agrobacterium (Nos) (Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. Depicker A. et al., J. Mol. Appl. Genet., 1982; Bevan, NAR, 1984, 12(22): 8711-8721).

Что касается сигнала полиаденилирования (полиА) для плазмид и вирусных векторов иных, чем поксвирусы, предпочтительнее применять сигнал поли(А) гена бычьего

гормона роста (bGH) (см. U.S. 5122458), или сигнал поли(A) гена β-глобина кролика, или сигнал поли(A) вируса SV40.

«Клетка-хозяин» обозначает прокариотическую или эукариотическую клетку, которая генетически изменена или способна генетически изменяться путем введения экзогенного полинуклеотида, такого как рекомбинантная плазмида или вектор. Когда речь идет о генетически измененных клетках, термин относится как к начально измененной клетке, так и к ее потомству.

В одном воплощении рекомбинантный антиген FMDV экспрессируется в клетках насекомых.

Способы применения

В одном воплощении предмет изобретения относится к способу вакцинации овцы, коровы, козы или свиньи, включающему введение овце, корове, козе или свинье эффективного количества вакцины, которая может включать эффективное количество рекомбинантного антигена FMDV или рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего антиген FMDV, и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носящее лекарственное средство среду.

В одном воплощении настоящего изобретения способ включает одно введение вакцинной композиции, полученной с эмульсией по изобретению. Например, в одном воплощении иммунологическая или вакцинная композиция включает экспрессированные бакуловирусом антигены FMDV, включающие полипепитды и вирусоподобные частицы или пустые капсиды, или рекомбинантный вирусный вектор, экспрессирующий антиген FMDV. Электронная микроскопия показывает клетки насекомых, трансформированные бакуловирусным экспрессирующим вектором, продуцируют FMDV вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV, и таким образом, иммунологические или вакцинные композиции по настоящему изобретению охватывают иммунологические или вакцинные композиции, включающие FMDV вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV.

В другом воплощении настоящего изобретения способ включает одно введение двух гетерологичных вакцинных композиций. Гетерологичные вакцины или композиции могут представлять собой различные типы вакцин, такие как вакцина с FMDV вирусоподобными частицами или вакцины с вирусными векторами. Гетерологичные вакцины также могут представлять собой вакцины одного и того же типа, экспрессирующие капсиды различных серотипов FMDV, таких как штаммы A24, O1 Manisa, Asia или Iraq.

В одном воплощении предмет, раскрытый в настоящем описании, относится к способу вакцинации овцы, коровы, козы или свиньи, включающему введение овце, корове, козе или свинье антигена FMDV, продуцированного бакуловирусным вектором в клетках насекомых, или рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего антиген FMDV.

В одном воплощении предмет, раскрытый в настоящем описании, относится к способу выявления иммунной реакции, включающему введение овце, корове, козе или свинье вакцины, включающей антиген FMDV, продуцированного бакуловирусным вектором в клетках насекомых, или рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего антиген FMDV.

В одном воплощении предмет, раскрытый в настоящем описании, относится к способу получения вакцины или композиции, включающему изоляцию антигена FMDV, продуцированного бакуловирусным вектором в клетках насекомых, или рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего антиген FMDV, и необязательно объединение с фармацевтически или ветеринарно приемлемым носителем,

вспомогательным веществом, адъювантом или носящим лекарственное средство средой.

Как гомологичные, так и гетерологичные штаммы FMDV используют для заражения, чтобы проверить эффективность вакцины. Введение может быть подкожное или внутримышечное. Введение может быть безигольным (например, Pigjet или Bioject).

В одном воплощении изобретения может быть использована схема прайм-буст, которая состоит из по меньшей мере одного первичного введения и по меньшей мере одного бустерного введения с использованием по меньшей мере одного обычного полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена. Иммунологическая композиция или вакцина, используемая в первичном введении, отличается по природе от композиций или вакцин, используемых в качестве бустера. Однако отмечается, что можно использовать одну и ту же композицию для первичного введения и как бустер. Протокол введения называется «прайм-буст».

Прайм-буст согласно настоящему изобретению может включать рекомбинантный вирусный вектор, который используют для экспрессии кодирующей последовательности FMDV или его фрагментов, кодирующих антигенный полипептид или его фрагмент или вариант. Конкретно вирусный вектор может экспрессировать ген FMDV или его фрагмент, который кодирует антигенный полипептид. Вирусный вектор, рассматриваемый в настоящем описании, включает, но не ограничивается, поксвирус [например, вирус коровьей оспы или ослабленный вирус коровьей оспы, вирус оспы птиц или ослабленный вирус оспы птиц (например, оспы канареек, оспы кур, оспы голубей, оспы голубиных, оспы перепелов, ALVAC, TROVAC; см., например, US 5505941, US 54948070), вирус оспы енота, вирус оспы свиней и т.д.], аденовирус (например, аденовирус человека, аденовирус собак), вирус герпеса (например, вирус герпеса собак, вирус герпеса индеек, вирус болезни Марека, вирус инфекционного ларинготрахеита, вирус герпеса кошачьих, вирус ларинготрахеита (ILTV), вирус герпеса коровы, вирус герпеса свиней), бакуловирус, ретровирус и т.д. В другом воплощении экспрессирующий вектор на основе вируса оспы птиц может представлять собой вектор на основе вируса оспы канареек, такого как ALVAC. В еще одном воплощении экспрессирующий вектор на основе вируса оспы птиц может представлять собой вектор на основе вируса оспы кур, такой как TROVAC. Антиген FMDV по изобретению, который экспрессирован, встраивают под контролем специфического поксвирусного промотора, например, среди прочего, промотора энтомопоксвируса Amsacta moorei 42K (Barcena, Lorenzo et al., 2000, J. Gen. Virol., 81(4): 1073-85), промотора вируса коровьей оспы в 7,5 кДа (Cochran et al., 1985, J. Virol., 54(1): 30-7), промотора вируса коровьей оспы I3L (Riviere et al., 1992, J. Virol., 66(6): 3424-34), промотора вируса коровьей оспы HA (Shida, 1986, Virology, 150 (2): 451-62), промотора вируса коровьей оспы ATI (Funahashi et al., 1988, J. Gen. Virol., 69 (1): 35-47), промотора вируса коровьей оспы H6 (Taylor et al., 1988, Vaccine, 6(6): 504-8; Guo et al., 1989, J. Virol., 63(10): 4189-98; Perkus et al., 1989, J. Virol., 63(9): 3829-36).

В другом воплощении экспрессирующий вектор на основе вируса оспы птиц может представлять собой вектор на основе вируса оспы канареек, такого как ALVAC. Антиген, эпитоп или иммуноген FMDV может представлять собой FMDV P1-3C. Вектор на основе вируса FMDV может представлять собой вектор на основе вируса оспы канареек, такого как vCP2186, vCP2181 или vCP2176, или на основе вируса оспы кур, такого как vFP2215 (см. US 7527960). В еще одном воплощении антиген, эпитоп или иммуноген FMDV может быть получен в ряске (US 2011/0236416).

В другом аспекте протокола прайм-буст по изобретению композицию, включающую антиген FMDV по изобретению, вводят после введения вакцины или композиции, включающей рекомбинантный вирусный вектор, который содержит и экспрессирует

антиген FMDV in vivo, или инактивированной вирусной вакцины или композиции, включающей антиген FMDV, или вакцины с ДНК-плазмидой, или композиции, которая содержит или экспрессирует антиген FMDV. Подобным образом, протокол прайм-буст может включать введение вакцины или композиции, включающей рекомбинантный вирусный вектор, который содержит и экспрессирует антиген FMDV in vivo, или инактивированной вирусной вакцины, или композиции, включающей антиген FMDV, или вакцины с ДНК-плазмидой, или композиции, которая содержит или экспрессирует антиген FMDV, после введения композиции, включающей антиген FMDV по изобретению. Дополнительно отмечается, что как первичное, так и вторичное введение может включать композицию, включающую антиген FMDV по изобретению.

Протокол прайм-буст включает по меньшей мере одно первичное введение и по меньшей мере одно буст-введение с использованием по меньшей мере одного общего полипептида и/или его вариантов или фрагментов. Вакцина, используемая при первичном введении, может отличаться по природе от вакцин, используемых как более поздние бустерные вакцины. Первичное введение может включать одно или несколько введений. Подобным образом, бустерное введение может включать одно или несколько введений.

Объем дозы композиции для видов-мишеней, которыми являются млекопитающие, например, объем дозы овечьих, коровьих, козьих или свиных композиций, на основе вирусных векторов, например, композиций на основе не-поксвирусных векторов, как правило, составляет от примерно 0,1 до примерно 5,0 мл, от примерно 0,1 до примерно 3,0 мл и от примерно 0,5 до примерно 2,5 мл.

Эффективность вакцин можно проверить через примерно 2-4 недели после последней иммунизации путем заражения животных, таких как овца, корова, коза или свинья, вирулентным штаммом FMDV, преимущественно, штаммами FMDV O1 Manisa, O1 BFS or Campos, A24 Cruzeiro, Asia 1 Shamir, A Iran'96, A22 Iraq, SAT2 Saudi Arabia.

Другие еще штаммы могут включать штаммы FMDV A10-61, A5, A12, A24/Cruzeiro, C3/Indaial, O1, C1-Santa Pau, C1-C5, A22/550/Azerbaijan/65, SAT1-SAT3, A, A/TNC/71/94, A/IND/2/68, A/IND/3/77, A/IND/5/68, A/IND/7/82, A/IND/16/82, A/IND/17/77, A/IND/17/82, A/IND/19/76, A/IND/20/82, A/IND/22/82, A/IND/25/81, A/IND/26/82, A/IND/54/79, A/IND/57/79, A/IND/73/79, A/IND/85/79, A/IND/86/79, A/APA/25/84, A/APN/41/84, A/APS/44/05, A/APS/50/05, A/APS/55/05, A/APS/66/05, A/APS/68/05, A/BIM/46/95, A/GUM/33/84, A/ORS/66/84, A/ORS/75/88, A/TNAn/60/947/Asia/1, A/IRN/05, Asia/IRN/05, O/HK/2001, O/UKG/3952/2001, O/UKG/4141/2001, Asia 1/HNK/CHA/05 (GenBank, инвентарный номер EF149010, включен в настоящее описание в качестве ссылки), Asia I/XJ (Li, ZhiYong et al. Chin Sci Bull, 2007), HK/70 (Chin Sci Bull, 2006, 51(17): 2072—2078), O/UKG/7039/2001, O/UKG/9161/2001, O/UKG/7299/2001, O/UKG/4014/2001, O/UKG/4998/2001, O/UKG/9443/2001, O/UKG/5470/2001, O/UKG/5681/2001, O/ES/2001, HKN/2002, O5India, O/BKF/2/92, K/37/84/A, KEN/1/76/A, GAM/51/98/A, A10/Holland, O/KEN/1/91, O/IND49/97, O/IND65/98, O/IND64/98, O/IND48/98, O/IND47/98, O/IND82/97, O/IND81/99, O/IND81/98, O/IND79/97, O/IND78/97, O/IND75/97, O/IND74/97, O/IND70/97, O/IND66/98, O/IND63/97, O/IND61/97, O/IND57/98, O/IND56/98, O/IND55/98, O/IND54/98, O/IND469/98, O/IND465/97, O/IND464/97, O/IND424/97, O/IND423/97, O/IND420/97, O/IND414/97, O/IND411/97, O/IND410/97, O/IND409/97, O/IND407/97, O/IND399/97, O/IND39/97, O/IND391/97, O/IND38/97, O/IND384/97, O/IND380/97, O/IND37/97, O/IND352/97, O/IND33/97, O/IND31/97, O/IND296/97, O/IND23/99, O/IND463/97, O/IND461/97, O/IND427/98, O/IND28/97, O/IND287/99, O/IND285/99, O/IND282/99, O/IND281/97, O/IND27/97, O/IND278/97, O/IND256/99, O/IND249/99, O/IND210/99, O/IND208/99, O/IND207/99, O/IND205/99, O/IND185/99, O/IND175/99, O/IND170/97, O/IND164/99, O/IND160/99, O/IND153/99, O/IND148/99, O/IND146/99, O/SKR/2000, A22/India/

17/77.

Другие подробности о таких штаммах FMDV можно найти на веб-страницах European Bioinformatics Information (EMBL-EBI), и все ассоциированные нуклеотидные последовательности включены в настоящее описание в качестве ссылок. Изобретение предполагает, что все штаммы FMDV как перечисленные в настоящем описании, так и пока не идентифицированные, могут быть экспрессированы согласно указаниям настоящего раскрытия для получения, например, эффективных вакцинных композиций. Как гомологичные, так и гетерологичные штаммы используют для заражения для проверки эффективности вакцин. Животное можно заразить интрадермально, подкожно, спреем, интраназально, внутриглазным путем, интратекально и/или перорально.

Введение прайм-буст можно преимущественно осуществлять с интервалом 1-6 недель, например, с интервалом примерно 3 недели. Согласно одному воплощению, также предусматриваются полугодовой бустер или годовой бустер, преимущественно с использованием вакцины на основе вирусного вектора. Животные на момент первого введения преимущественно имеют возраст по меньшей мере 6-8 недель.

Композиции, включающие рекомбинантные антигенные полипептиды по изобретению, используемые в протоколах прайм-буст, содержатся в фармацевтически или ветеринарно приемлемой среде, разбавителе, адъюванте или вспомогательном веществе. Протоколы по изобретению защищают животное от овечьего, коровьего, козьего или свиного FMDV и/или предотвращают развитие заболевания у инфицированного животного.

Специалисту в данной области техники следует иметь в виду, что раскрытое в настоящем описании приводится как пример, и настоящее изобретение не ограничивается этим. Из раскрытого в настоящем описании и знаний на уровне техники специалист может определить число введений, путь введения и дозы, используемые для каждого протокола инъекции без дополнительного экспериментирования.

Настоящее изобретение рассматривает по меньшей мере одно введение животному эффективного количества терапевтической композиции, полученной согласно изобретению. Животное может представлять собой самца, самку, беременную самку и новорожденного. Введение может осуществляться различными путями, включая, но без ограничения, внутримышечную (IM), интрадермальную (ID) или подкожную (SC) инъекцию или интраназальное или пероральное введение. Терапевтическую композицию по изобретению также можно вводить безигольным прибором (таким как, например, Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Merial, GA, USA), прибором Vetjet или Vitajet (Bioject, Oregon, USA)). Другим подходом к введению плазмидных композиций является применение электропорации (см., например. Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; заявка PCT № WO99/01158). В другом воплощении терапевтическую композицию доставляют животному с помощью генной пушки или бомбардировки частицами золота.

В одном воплощении изобретение относится к введению терапевтически эффективного количества препарата для доставки и экспрессии антигена или эпитопа FMDV в клетку-мишень. Определение терапевтически эффективного количества является рутинным экспериментом для специалиста в данной области техники. В одном воплощении препарат включает экспрессирующий вектор, включающий полинуклеотид, который экспрессирует антиген или эпитоп FMDV, и фармацевтически или ветеринарно приемлемые носитель, носящую лекарственное средство среду или вспомогательное вещество. В другом воплощении фармацевтически или ветеринарно приемлемые носитель, носящее лекарственное средство среда или вспомогательное вещество

облегчают трансфекцию или другие способы переноса полинуклеотидов в животное-хозяина и/или улучшают сохранение вектора или белка у хозяина.

В одном воплощении предмет, раскрытый в настоящем описании, относится к способу детекции для установления различий между инфицированными и вакцинированными животными (DIVA).

В настоящем описании раскрывается, что применение вакцины или композиции по настоящему изобретению дает возможность обнаружить заражение животного FMDV. В настоящем описании раскрывается, что применение вакцины или композиции по настоящему изобретению дает возможность обнаружить заражение у животных путем установления различий между инфицированными и вакцинированными животными (DIVA). В настоящем описании раскрывается способ диагностики заражения животного FMDV с использованием неструктурированного белка FMDV (например, FMDV 3ABC или 3D-специфический ELISA).

Получаемое изделие

В одном воплощении предметом, раскрытым в настоящем описании, является набор для выполнения способа выявления или индукции иммунной реакции, который может включать любую из иммунологических композиций или вакцин на основе рекомбинантного FMDV или иммунологических композиций или вакцин на основе инактивированного FMDV, вирусных композиций или вакцин на основе рекомбинантного FMDV и инструкции для выполнения способа.

Другим воплощением изобретения является набор для выполнения способа индукции иммунологической или защитной реакции против FMDV у животного, включающий композицию или вакцину, включающую антиген FMDV по изобретению, и рекомбинантную FMDV вирусную иммунологическую композицию или вакцину и инструкции для выполнения способа доставки эффективного количества для выявления иммунной реакции у животного.

Другим воплощением изобретения является набор для выполнения способа индукции иммунологической или защитной реакции против FMDV у животного, включающий композицию или вакцину, включающую антиген FMDV по изобретению, и иммунологическую композицию или вакцину на основе инактивированного FMDV и инструкции для выполнения способа доставки эффективного количества для выявления иммунной реакции у животного.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к набору для вакцинации прайм-буст по настоящему изобретению, описанной выше. Набор может включать по меньшей мере две ампулы: первую ампулу, содержащую вакцину или композицию для первичной вакцинации согласно настоящему изобретению, и вторую ампулу, содержащую вакцину для бустерной вакцинации согласно настоящему изобретению. Набор может преимущественно содержать дополнительные первые или вторые ампулы для дополнительных первичных вакцинаций или дополнительных бустерных вакцинаций.

Следующие далее воплощения охватываются изобретением. В одном воплощении раскрывается композиция, включающая антиген FMDV или его фрагмент или вариант и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носящую лекарственное средство среду. В другом воплощении раскрывается композиция, включающая рекомбинантный вирусный вектор, экспрессирующий антигены FMDV, и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носящую лекарственное средство среду. В другом воплощении раскрывается композиция, описанная выше, в которой антиген FMDV или его фрагмент или вариант включает иммуногенный фрагмент,

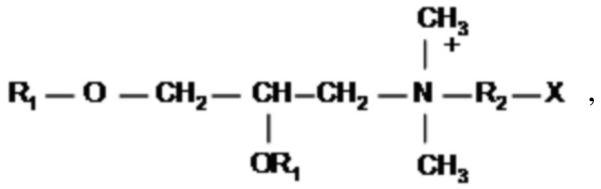
включающий по меньшей мере 15 аминокислот антигена овечьего, коровьего, козьего или свиного FMDV. В одном воплощении раскрывается композиция, описанная выше, в которой антиген FMDV или его фрагмент или вариант является частично очищенным. В одном воплощении раскрывается композиция, описанная выше, в которой антиген FMDV или его фрагмент или вариант является по существу очищенным.

В одном воплощении раскрываются композиции, описанные выше, в которых антиген FMDV или его фрагмент или вариант представляет собой полипептид овечьего, коровьего, козьего или свиного FMDV. В одном воплощении раскрываются композиции, описанные выше, в которых полипептид FMDV представляет собой полипептид P1-3C, полипептид P1, полипептид VP0, полипептид VP1, полипептид VP3, полипептид VP2, полипептид VP4, полипептид 2A, полипептид 2B1 или полипептид 3C. В одном воплощении раскрываются композиции, описанные выше, в которых антиген FMDV или его фрагмент или вариант имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16. В одном воплощении раскрываются композиции, описанные выше, в которых антиген FMDV кодирован полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 70% идентичность последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 14, 15, 17, 18, 19 или 20. В одном воплощении раскрываются композиции, описанные выше, в которых фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носящее лекарственное средство среда представляет собой эмульсию вода-в-масле или эмульсию масло-в-воде. В другом воплощении раскрывается способ вакцинации животного, восприимчивого к овечьему, коровьему, козьему или свиному FMDV, включающий введение указанных композиций указанному животному. В другом воплощении раскрывается способ вакцинации животного, восприимчивого к овечьему, коровьему, козьему или свиному FMDV, включающий прайм-буст. В одном воплощении раскрывается по существу очищенный антигенный полипептид, экспрессированный в клетках насекомых, при этом полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 или 16. В любом воплощении животное предпочтительно представляет собой овцу, корову, козу или свинью. В одном воплощении раскрывается способ диагностики инфекции FMDV у животного. В еще одном воплощении раскрывается набор для вакцинации прайм-буст, включающий по меньшей мере две ампулы, причем первая ампула содержит композицию, включающую антиген FMDV или его фрагмент или вариант, и вторая ампула содержит рекомбинантный вирусный вектор, который содержит или экспрессирует антиген FMDV.

Фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители или среды или адъюванты или эксципиенты хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или носящая лекарственное средство среда или вспомогательное вещество могут представлять собой 0,9% раствор NaCl (например, физиологический раствор) или фосфатный буфер. Другой фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или носящая лекарственное средство среда или вспомогательное вещество, который можно использовать для способов настоящего изобретения, включает, но не ограничивается перечисленным, поли(L-глутамат) или поливинилпирролидон. Фармацевтически или ветеринарно приемлемые носитель или носящее лекарственное средство среда или адъюванты или вспомогательное вещество могут представлять собой любые соединения или комбинации соединений, облегчающие введение вектора (или белка, экспрессированного из вектора

по изобретению in vitro); преимущественно носитель, носящая лекарственное средство среда или вспомогательное вещество могут облегчать трансфекцию и/или улучшать сохранение вектора (или белка). Дозы и объемы доз обсуждаются в настоящем описании в общем описании и также могут быть определены специалистом в данной области техники из прочтенного настоящего раскрытия в сочетании со знаниями в данной области техники без какого-либо дополнительного экспериментирования.

Катионные липиды, содержащие соль четвертичного аммония, которые преимущественно, но не исключительно, подходят для плазмид, преимущественно представляют собой соединения, имеющие следующую формулу:



в которой R1 представляет собой насыщенный или ненасыщенный линейный алифатический радикал с 12-18 атомами углерода, R2 представляет собой другой алифатический радикал с 2-3 атомами углерода, и X представляет собой аминную или гидроксильную группу, например, DMRIE. В другом воплощении катионный липид может быть связан с нейтральным липидом, например, DOPE.

Среди таких катионных липидов предпочтение отдается DMRIE (N-(2-гидроксиэтил) -N.N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)-1-пропанаммоний; WO 96/34109), преимущественно ассоциированному с нейтральным липидом, преимущественно DOPE (диолеоилфосфатидилэтаноламин, Behr, 1994), с образованием DMRIE-DOPE.

Преимущественно смесь плазмиды с адъювантом формируют непосредственно перед введением и преимущественно одновременно с введением препарата или незадолго до введения препарата, например, незадолго до или перед введением препарата; например, незадолго до или перед введением формируют смесь плазмида-адъювант, преимущественно так, чтобы получить достаточное время перед введением смеси для образования комплекса, например, от примерно 10 минут до примерно 60 минут перед введением, например, приблизительно 30 минут перед введением.

Когда присутствует DOPE, молярное отношение DMRIE:DOPE преимущественно составляет от примерно 95: примерно 5 до примерно 5: примерно 95, предпочтительнее, примерно 1: примерно 1, например, 1:1.

Массовое отношение для DMRIE или DMRIE:DOPE адъювант:плазмида может составлять между примерно 50: примерно 1 и примерно 1: примерно 10, такое как примерно 10: примерно 1 и примерно 1: примерно 5, и примерно 1: примерно 1 и примерно 1: примерно 2, например, 1:1 и 1:2.

В другом воплощении фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носящая лекарственное средство среда может представлять собой эмульсию вода-в-масле. Примеры подходящих эмульсий вода-в-масле включают вакцинные эмульсии вода-в-масле на основе масел, которые являются устойчивыми и жидкими при 4°C, содержащие от 6 до 50%, об./об., антигенсодержащей водной фазы, предпочтительно от 12 до 25%, об./об., от 50 до 94%, об./об., масляной фазы, содержащей все или часть неметаболизируемого масла (например, минерального масла, такого как парафиновое масло) и/или метаболизируемого масла (например, растительного масла или жирной кислоты, полиола или сложных эфиров спиртов), от 0,2 до 20%, p/v, поверхностно-активных веществ, предпочтительно от 3 до 8%, p/v, причем последнее в целом или в части, или в смеси или сложных эфиров полиглицерина,

причем указанные сложные эфиры полиглицерина предпочтительно представляют собой полиглицерол(поли)рицинолеаты, или полиоксиэтилированных масел клещевины или еще гидрированных полиоксиэтилированных масел клещевины. Примеры поверхностно-активных веществ, которые можно использовать в эмульсии вода-в-масле, включают этоксилированные эфиры сорбитана (например, полиоксиэтилен(20) моноолеат сорбитана (твин 80), доступный от Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Кроме того, что касается эмульсии вода-в-масле, см. также патент США № 6919084, например, пример 8, включенный в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях антигенсодержащая водная фаза включает физиологический раствор, включающий один или больше буферных агентов. Примером подходящего буферирного раствора является забуференный фосфатом физиологический раствор. В преимущественном воплощении эмульсия вода-в-масле может представлять собой тройную эмульсию вода/масло/вода (W/O/W) (патент США № 6358500). Примеры других подходящих эмульсий описаны в патенте США № 7371395.

Иммунологические композиции и вакцины по изобретению могут включать или состоять по существу из одного или нескольких адъювантов. Подходящими адъювантами для применения на практике настоящего изобретения являются (1) полимеры акриловой или метакриловой кислоты, малеинового ангидрида и полимеры алкенилпроизводных, (2) иммуностимулирующие последовательности (ISS), такие как олигодезоксирибонуклеотидные последовательности, имеющие одну или больше неметилированных единиц CpG (Klinman et al., 1996, PNAS USA, 93(7): 2879-83; WO98/16247), (3) эмульсия масло-в-воде, такая как эмульсия SPT, описанная на странице 147 «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach», опубликованной M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, 6: 147, 183, и эмульсия MF59, описанная на странице 183 той же работы, (4) катионные липиды, содержащие соль четвертичного аммония , например, DDA, (5) цитокины, (6) гидроксид алюминия или фосфат алюминия, (7) сапонин или (8) другие адъюванты, обсуждаемые в любом документе, цитированном и включенном в настоящую заявку в качестве ссылки, или (9) любые их смеси или комбинации.

Эмульсия масло-в-воде (3), которая по существу соответствует вирусным векторам, может быть на основе легкого жидкого парафинового масла (типа по Европейской фармакопее), изопреноидного масла, такого как скалан, сквален, масло, полученное при олигополимеризации алкенов, например, изобутена или децена, эфиров кислот или спиртов, имеющих линейную алкильную группу, таких как растительные масла, этилолеат, пропиленгликоль, ди(каприлат/капрат), глицеролтри(каприлат/капрат) и диолеат пропиленгликоля, или эфиров разветвленных жирных спиртов или кислот, в особенности, эфиров изостеариновой кислоты.

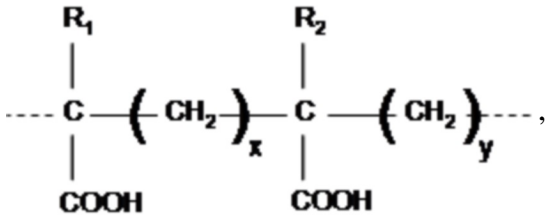
Масло используют в комбинации с эмульгаторами для образования эмульсии. Эмульгаторы могут представлять собой неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как сложные эфиры, с одной стороны, сорбитана, маннида (например, олеат ангидроманнита), глицерина, полиглицерина или пропиленгликоля, и с другой стороны, олеиновой, изостеариновой, рицироleиновой или гидроксистераиновой кислот, причем указанные эфиры необязательно этоксилированы, или блок-сополимеры полиоксипропилен-полиоксиэтилен, такие как Pluronic, например, L121.

Среди типа (1) адъювантов полимеров предпочтение отдается сшитым полимерам акриловой или меакриловой кислоты, в особенности, сшитым простыми полиалкиленэфирами сахаров или многоатомных спиртов. Такие соединения известны под названием карбомеры (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). Специалист в данной области техники также может обратиться к патенту США № 2909462, который относится

к таким акриловым полимерам, сшитым полигидроксильным соединением, имеющим по меньшей мере три гидроксильные группы, замещаемые ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере два атома углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы, содержащие 2-4 атома углерода, например, винильные, аллильные и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы также могут содержать другие заместители, такие как метил. Особенно подходящими являются твердые продукты под названием Carbopol (BF Goodrich, Ohio, USA). Они сшиты аллилсахарозой или аллилпентаэритритом. Среди них можно отметить Carbopol 974P и 971P.

В отношении сополимеров малеинового ангидрида и алкенильных производных предпочтение отдается EMA (Monsanto), которые представляют собой линейные или сшитые сополимеры этилена и малеинового ангидрида, и они сшиты, например, дивиниловым эфиром. Соответствующая отсылка также может быть сделана к J. Fields et al., 1960.

Что касается структуры, полимеры акриловой и метакриловой кислоты и EMA предпочтительно образованы основными звеньями, имеющими следующую формулу:



в которой

- R1 и R2, которые могут быть одинаковыми или различными, представляют собой H или CH3;
- x = 0 или 1, предпочтительно x=1;
- y = 1 или 2, причем x+y=2.

Для EMA x=0, и y=2, и для карбомеров x=y=1 .

Такие полимеры растворимы в воде или физиологическом солевом растворе (20 г/л NaCl), и pH можно отрегулировать до 7,3-7,4, например, содой (NaOH), для получения раствора адъюванта, в котором можно внедрять экспрессирующий(е) вектор(ы). Концентрация полимера в конечной иммунологической или вакцинной композиции может колебаться от примерно 0,01 до примерно 1,5%, мас./об., от примерно 0,05 до примерно 1%, мас./об., и от примерно 0,1 до примерно 0,4%, мас./об..

Цитокин или цитокины (5) могут находиться в иммунологической или вакцинной композиции в белковой форме или могут быть коэкспрессированы в хозяине с иммуногеном или иммуногенами или его (их) эпитопом(амии). Предпочтение отдается коэкспрессии цитокина или цитокинов или с помощью того же вектора, какой экспрессирует иммуноген или иммуногены или его (их) эпитоп(ы), или с помощью их отдельного вектора.

Изобретение включает получение таких комбинированных композиций, например, путем смешивания активных компонентов преимущественно вместе с адъювантом, носителем, цитокином и/или разбавителем.

Цитокины, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон α (IFNα), интерферон β (IFNβ), интерферон γ, (IFNγ), интерлейкин-1α (IL-1α), интерлейкин-1β (IL-1β), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-4

(IL-4), интерлейкин-5 (IL-5), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-11 (IL-11), интерлейкин-12 (IL-12), фактор некроза опухоли α (TNFα), фактор некроза опухоли β (TNFβ), полинозиновую и полицитидиловую кислоту, цитидин-фосфат-гуанозинсодержащие олигодезоксинуклеотиды (CpG ODN) и трансформирующий фактор роста β (TGFβ). Понятно, что цитокины можно вводить совместно и/или вводить последовательно с иммунологической или вакцинной композицией по настоящему изобретению. Таким образом, например, вакцина по настоящему изобретению может также содержать молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует in vivo подходящий цитокин, например, цитокин, соответствующий хозяину, которого вакцинируют или у которого следует выявить иммунологическую реакцию (например, бычий цитокин для препаратов, вводимых коровьим).

В определенном воплощении адъювант может включать эмульсии TS6, TS7, TS8 и TS9 (US 7371395); LR3 и LR4 (US7691368); TSAP (US20110129494); TRIGEN™ (Newport Labs); синтетические дцРНК (например, поли-IC, поли-ICLC [HILTONOL®]); и адъюванты MONTANIDE™ (W/O, W/O/W, O/W, IMS и Gel; все производятся SEPPIC).

В случае иммунологической композиции и/или вакцины на основе полипептидов, экспрессированных системой бакуловирус/клетка насекомого, доза может включать примерно 1 мкг – примерно 2000 мкг, примерно 50 мкг – примерно 1000 мкг и от примерно от 100 мкг до примерно 500 мкг антигена, эпитопа или иммуногена FMDV. Доза может включать от примерно 10^2 до примерно 10^{20}, примерно 10^3 – примерно 10^{18}, примерно 10^4 – примерно 10^{16}, примерно 10^5 – примерно 10^{12} вирусоподобных частиц. В случае иммунологической композиции и/или вакцины на основе вирусного вектора, экспрессирующего антигены FMDV, доза может включать примерно 10^3 $TCID_{50}$ – примерно 10^{15} $TCID_{50}$ (инфицирующая доза для 50% тканевой культуры), примерно 10^3 $TCID_{50}$ – примерно 10^{14} $TCID_{50,}$ примерно 10^3 $TCID_{50}$ – примерно 10^{13} $TCID_{50}$, примерно 10^3 $TCID_{50}$ – примерно 10^{12} $TCID_{50}$. Объемы дозы могут составлять от примерно 0,1 до примерно 10 мл, преимущественно от примерно 0,2 до примерно 5 мл.

Изобретение теперь будет дополнительно описываться с помощью приведенных далее неограничивающих примеров.

Примеры

Конструирование вставок ДНК, плазмид и рекомбинантных вирусных или бакуловирусных векторов осуществляют с использованием стандартных методов молекулярной биологии, описанных в J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Пример 1. Конструирование и экспрессия антигенов FMDV в системе бакуловирус/клетки насекомых

Положительный геном РНК штамма серотипа A FMDV составляют из одной открытой рамки считывания (ORF) (1662 аминокислоты), фланкированной двумя некодирующими участками. ORF имеет 3 части. Первая часть представляет собой полипротеин P1-2A, который приводит к экспрессии 4 капсидных компонентов (VP4, VP2, VP3 и VP1) после созревания и расщепления. Вторая часть представляет собой P2, содержащий 2 белка (2B и 2C), и вовлекается в синтез РНК и увеличение числа пузырьков клеточной мембраны. Первая часть представляет собой P3, содержащий 4 белка (3A, 3B, 3C и 3D). 3C является основным белком, вовлеченным в расщепление полипротеина.

3D представляет собой другую протеазу, и 3A/3B включаются в якорную подложку мембраны, патогенез, синтез РНК и капсулирование. P1-2A и 3C необходимы для экспрессии и расщепления всех белков, составляющих капсидные частицы FMDV или FMDV вирусоподобные частицы (см. фиг. 2). Потенциальные функциональные домены показаны ниже в таблице 1.

Таблица 1. Потенциальные функциональные домены, аннотированные в GenBank, инвентарный № AAT01711

Предполагаемые домены	От до (или позиция)	Длина
Некодирующая последовательность 5’	1-201	201
VP4	202-286	85
VP2	287-504	218
VP3	505-725	221
VP1	726-938	213
2A	939-954	16
2B	955-1108	154
2C3A+начало 2B	1109-1587	479
3B’ (конец)	1588-1650	63
	1651-1863	213
Сигнальная последовательность	Нет	
N-гликозилирование	14, 18, 24, 25, 33, 42, 133, 277, 625, 764	
Дисульфидный мостик	Нет	

Пример 1.1. Конструирование плазмиды pMEB097, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипротеин FMDV штамма A24 Cruzeiro с мутацией в VP2 (H93C), для создания дисульфидного мостика (+ оптимизированный контекст инициации трансляции) и генерация соответствующего рекомбинантного бакуловируса BacMEB097

Получение плазмиды pMEB097

Плазмиду pMEB096, содержащую полинуклеотид дикого типа, кодирующий полипротеин FMDV штамма A24 Cruzeiro, мутируют для получения плазмиды pMEB097. Плазмида pMEB097 содержит полинуклеотид (SEQ ID NO: 3), кодирующий модифицированный полипротеин (SEQ ID NO: 2), содержащий мутацию в VP2 (H93C) или P1 (H179C). Модифицированный полипротеин (SEQ ID NO: 2) содержит замену гистидина на цистеин в позиции 93 VP2 или позиции 179 P1.

Получение рекомбинантного бакуловируса BacMEB097

Плазмиду pMEB097 (см. фиг. 3) используют для получения рекомбинантного бакуловируса, кодирующего ген FMDV P1/2A/2B’3B’/3C (с цистеином в позиции 93 VP2) FMDV штамма A24 Cruzeiro под контролем промотора полигедрина, с помощью гомологичной рекомбинации. Клетки насекомого Spodoptera frugiperda (Sf9) из ATCC котрансфицируют плазмидой pMEB097 и линеаризованной тремя разрезами Bsu36I ДНК AcNPV согласно протоколу изготовителя (Baculogold, Pharmingen). Рекомбинантный бакуловирус из супернатанта котрансфекции очищают дважды. Амплифицируют пять клонов (пассаж 1) при 28°C в монослое 25 см² в плоскодонной колбе. Пять клонов амплифицируют в клетках насекомого Sf9, и рекомбинантные клоны анализируют вестерн-блоттингом с использованием моноклонального антитела, специфического для серотипа FMDV A24. Клон 2 показывает хороший уровень экспрессии. Этот клон дополнительно амплифицируют (пассаж 2) при 28°C в объеме 50 мл в колбах Эрленмейера (суспензия) при 105 об/мин. Выполняют третий пассаж (пассаж 3) в объеме 200 мл для того, чтобы получить штамм вируса, используемый для экспрессии белка. Затем этот штамм вируса титруют с помощью анализа бляшкообразования. Получение штамма вируса выполняют с использованием сред SF900III с добавлением 2% of FCS.

После титрования бульон рекомбинантного бакуловируса (пассаж 3) используют для получения белка в бессывороточной среде.

Анализ экспрессии бакуловируса BacMEB097

Клетки насекомого (Sf9-Invitrogen) инфицируют полученным бакуловирусом BacMEB097 и BacMEB084 (как эталоном без мутации) при множественности заражения (MOI) 1 бое/мл. Клетки насекомого выращивают при 105 об/мин в среде Sf900II без FCS в течение 4 дней при 28°C. Супернатанты концентрируют примерно в 4 раза и обрабатывают так: A = без обработки; B = 1 час при 56°C; C = добавляют HCl до достижения pH ниже 5.

Правильную сборку капсидного белка в вирусоподобные частицы оценивают электронной микроскопией (см. фиг. 4, колонка «A»). Частицы 25-30 нм показывают весьма однородную круглую – икосаэдрическую морфологию, постоянный размер 31 нм и характеризуются проникновением красителя и поэтому интерпретируются как FMDV-подобные. Число частиц оценивают примерно в 10^8 на мл.

Кроме того, устойчивость вирусоподобных частиц явно повышается за счет образования дисульфидного мостика, привнесенного мутацией в BacMEB097, как видно после обработки 1 час при 56°C (колонка «B») и подкислением среды (колонка «C»).

Идентичность белка FMDV подтверждают анализом супернатанта методом вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител, которые специфичны для серотипа FMDV A24 (см. фиг. 5).

В итоге, бакуловирус BacMEB097, полученный переносом плазмиды pMEB097, вызывает экспрессию капсидов FMDV и процессирование в клетках насекомого Sf9. Такие экспрессированные капсиды FMDV сами собираются в вирусоподобные частицы с характерной морфологией FMDV-подобных вирионов. Мутация, предполагающая образование дисульфидного мотика, повышает устойчивость вирусоподобных частиц (после тепловой обработки или подкисления) по сравнению с вирусоподобными частицами, полученными с помощью BacMEB084 (содержащего плазмиду pMEB096, содержащую полинуклеотид дикого типа, кодирующий полипротеин FMDV штамма A24 Cruzeiro).

Пример 1.2. Конструирование плазмиды pMEB099, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипротеин FMDV штамма O1 manisa, с мутацией в VP2 (S93C), для создания дисульфидного мостика (+ оптимизированный контекст инициации трансляции) и генерация рекомбинантного бакуловируса BacMEB099, экспрессирующего капсидные белки FMDV

Плазмиду pMEB095, содержащую полинуклеотид дикого типа, кодирующий полипротеин FMDV штамма O1 manisa, мутируют для получения плазмиды pMEB099. Плазмида pMEB099 содержит полинуклеотид (SEQ ID NO: 7), кодирующий модифицированный полипротеин (SEQ ID NO: 6), содержащий мутацию в VP2 (S93C) или P1 (S179C). Модифицированный полипротеин (SEQ ID NO: 6) содержит замену серина на цистеин в позиции 93 VP2 или позиции 179 P1.

Получение и экспрессию рекомбинантного бакуловируса BacMEB099 выполняют согласно процедурам, описанным в примере 1.1 для BacMEB097. Клетки насекомого (Sf9-Inv.) инфицируют бакуловирусом BacMEB099 при множественности заражения (MOI) 0,5 бое/мл. Клетки насекомого выращивают при 105 об/мин в среде Sf900II без FCS в течение 4 дней при 28°C. Получение белка выполняют после обработки супернатанта: концентрирование и нагревание в течение 1 часа при 56°C или без нагревания (для того, чтобы увидеть действие запирающей мутации). Обработанный супернатант непосредственно анализируют электронной микроскопией и специфическим

ELISA (см. фиг. 6).

Результат (фиг. 6A и 6B) показывает, что методом ELISA получают существенный титр. Такой ELISA является специфичным для вирусоподобных частиц, что предполагает присутствие вирусоподобных частиц после заражения BacMEB099.

Правильную сборку капсидного белка в вирусоподобные частицы оценивают электронной микроскопией (фиг. 6B). Частицы 25-30 нм показывают весьма однородную круглую – икосаэдрическую морфологию, постоянный размер 31 нм и характеризуются проникновением красителя и поэтому интерпретируются как FMDV-подобные. Число частиц оценивают примерно в 10^8 на мл.

В итоге, бакуловирус BacMEB099, полученный переносом плазмиды pMEB099, вызывает экспрессию капсидов FMDV и процессирование в клетках насекомого Sf9. Такие экспрессированные капсиды FMDV сами собираются в вирусоподобные частицы с характерной морфологией FMDV-подобных вирионов.

Пример 1.3. Конструирование плазмиды pMEB106, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипротеин FMDV штамма Iraq, и плазмиды pMEB104, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипротеин FMDV штамма Asia, с мутацией в VP2 для создания дисульфидного мостика (+ оптимизированный контекст инициации трансляции) и генерация рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего капсидные белки FMDV

Плазмиды, содержащие полинуклеотид (SEQ ID NO: 9), кодирующий модифицированный полипротеин (SEQ ID NO: 8), содержащий мутацию в P1 (C в позиции 179) FMDV штамма Iraq, и полинуклеотид (SEQ ID NO: 11), кодирующий модифицированный полипротеин (SEQ ID NO: 10), содержащий мутацию в P1 (C в позиции 179) FMDV штамма Asia, конструируют согласно процедуре, описанной в примере 1.1.

Получение и экспрессию рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего модифицированный полипротеин (SEQ ID NO: 8) FMDV штамма Iraq и полипротеин (SEQ ID NO: 10) FMDV штамма Asia, выполняют согласно процедурам, описанным в примере 1.1 для BacMEB097.

Бакуловирус BacMEB106, который получают переносом плазмиды pMEB106, вызывает экспрессию капсидов FMDV и процессирование в клетках насекомого Sf9. Бакуловирус BacMEB104, полученный переносом плазмиды pMEB104, вызывает экспрессию капсидов FMDV и процессирование в клетках насекомого Sf9. Такие экспрессированные капсиды FMDV сами собираются в вирусоподобные частицы, которые характеризуются морфологией FMDV-подобных вирионов.

Пример 2. Устойчивость экспрессированной бакуловирусом «запертых» FMDV вирусоподобных частиц

Показана способность продуцировать FMDV вирусоподобные частицы в большом масштабе (150 л). При выращивании партии в масштабе изготовления 150 л получают удовлетворительные титры экспресиированных бакуловирусом FMDV вирусоподобные частицы A24 «запертого» и дикого типа ($log10CCID_{50}$ 7,14/мл) (CCID: инфицирующая доза для клеточной культуры). Неожиданно присутствуют большие количества устойчивых FMD вирусоподобных частиц даже после нагревания образцов ($log10\ CCID_{50}$ 2,14/мл нагретых против $log10\ CCID_{50}$ 2,19/мл без нагревания) (см. фиг. 8). Кроме того, как показано на фиг. 8, подсчет ЭМ показывает превосходные количества вирусоподобных частиц как в партиях 4 л, так и в партиях 150 л.

Пример 3. Вакцинация крупного рогатого скота FMDV, экспрессированным бакуловирусом, ряской и вирусом оспы канареек, и последующее контрольное заражение

Цель этого исследования проверить эффективность против контрольного заражения вирулентным FMD 3 экспериментальных антигенов FMD A24 Cruzeiro в композиции с адъювантом TS6 для крупного рогатого скота.

Вакцины, содержащие Lemna (ряска, см. US2011/0236416), бакуловирусом или vCP (вирус оспы канареек) экспрессированные антигены, вводят коровам в день D0 (таблица 2.1). Вакцинную защиту оценивают согласно монографии Европейской фармакопеи через контрольное заражение вирулентым FMDV A24 Cruzeiro, выполняемым в день D21, с последующим клиническим мониторингом коров (таблица 2.2). Поражения FMD у контрольных животных подтверждают контрольное заражение. Двое животных в группе, вакцинированной бакуловирусом, полностью защищены от поражений, что указывает на полную защиту, в то время как другие три животных представили совсем небольшое распространение поражений, представляя частичную защиту. Животные в G2 и G3 все показывают поражения с меняющейся интенсивностью поражений. Результаты по титрам нейтрализации приводятся на фиг. 9 и фиг. 10. Через три недели после вакцинации (D21) у всех телят в G2 наблюдают сероконверсию. В G1 и G3 наблюдают небольшую сероконверсию или ее отсутствие. Контрольные животные являются отрицательными на эту дату. Все телята имеют сильную сероконверсию после контрольного заражения (D25 или D28). Сывороточная реакция оказывается более интенсивной в D28, чем в D25, и у вакцинированных животных в G2, чем у контрольных животных. Такое наблюдение предполагает примирующий эффект вакцинации в G2. Результаты показывают, что группа вакцины на основе бакуловирусного FMDV A24 (A24 дикого типа) обеспечивают самые высокие титры SN при сравнении с другими двумя группами и обеспечивают защиту против контрольного заражения вирулентным FMDV A24 Cruzeiro.

Таблица 2.1. Схема вакцинации

Природа антигена	Объем смешанного антигена	Объем смешанного адъюванта TS6	Объем инъецируемой вакцины на корову
G1: Lemna FMDV 5x концентрированный (см. US 2011/0236416)	4 мл	8 мл	2 мл
G2: бакуловирусный FMDV (дикий тип) 14,4 x концентрированный	4 мл	8 мл	2 мл
G3: vCP2186 (FMDV вектора вируса оспы канареек) (см. US 7527960)	2,5 мл	8 мл	2 мл

Таблица 2.2. План исследования с контрольным заражением

Группа	Число животных	Вакцина в D0	FMD A24 Cruzeiro, контр. зараж. в D21
G1	5	Лемна FMDV + TS6	Да
G2	5	Бакуловирусный FMDV + TS6	Да
G3	5	vCP2186 + TS6	Да
G4	2	-	Да

Пример 4. Оценка защитных свойств различных экспериментальных вакцин на основе FMDV A24 Cruzeiro (бакуловирус, экспрессирующий FMDV дикого типа) для крупного рогатого скота при исследовании с контрольным заражением FMDV

Целью исследование является проверка эффективности против заражения вирулентным FMD 3 экспериментальных антигенов FMDV A24 Cruzeiro в композиции с адъювантом TS6/сапонин для крупного рогатого скота. Вакцины, содержащие антиген FMDV A24 Cruzeiro, экспрессированный в системе с бакуловирусом (BacMEB084, фильтрованный или нефильтрованный) или вирусом оспы канареек, вводят коровам

в день D0. Оценивают защитные свойства вакцин (согласно монографии Европейской фармакопеи) против контрольного заражения вирулентым FMDV A24 Cruzeiro, выполняемым в D21.

Таблица 3.1. Схема вакцинации

Группа	Число животных (возраст 7-9 месяцев на D0)	Вводимая вакцина в D0	Объем инъекции	FMD A24 Cruzeiro, контр. зараж. в D21
G1	5	A24 (BAC фильтр.* + TS6/сапонин)	2 мл	Да
G2	5	A24 (BAC фильтр. + TS6/сапонин)	0.5 мл	Да
G3	5	A24 (BAC фильтр. + TS6/сап.)	0.125 мл	Да
G4	2	- (конроль)	-	Да
G5	5	A24 (BAC не фильтр.**+TS6/сап.)	2 мл	Да
G6	5	A24 (BAC не фильтр. + TS6/Sap)	0.5 мл	Да
G7	5	(vCP2166***+TS6/Sap)	2 мл	Да

A24 BAC фильтр.*: инфекционный титр бакуловируса 8,71 $\log_{10}CCID_{50}$/мл

A24 BAC не фильтр.**: инфекционный титр бакуловируса 5,58 $\log_{10}CCID_{50}$/мл, 10^8 вирусоподобных частиц

vCP2166***: инфекционный титр бакуловируса 8,8 $\log_{10}CCID_{50}$/мл

Таблица 3.2. Сумма поражений от FMD, наблюдаемых при аутопсии, и проценты защиты

Группа	FMD-специфические поражения. Число животных с поражениями ног (число поврежденных ног на животное)	Процент защиты
G1	0 (0, 0, 0, 0, 0)	100
G2	0 (0, 0, 0, 0, 0)	100
G3	0 (0, 0, 3, 4, 0)	60
G4	2 (4, 4)	0
G5	0 (0, 0, 0, 0, 0)	100
G6	1 (0, 0, 1, 0, 0)	100
G7	1 (0, 0, 1, 0, 0)	80

Две бакуловирусные вакцины показывают защиту животных на 100% при полной дозе и одной четвертой дозы вакцины. Фильтрованная бакуловирусная вакцина все еще защищает 60% животных при 1/16 дозы вакцины. Вакцина на основе вируса оспы канареек показывают защиту животных на 80% при полной дозе. Фиг. 11A, 11B и 12C представляют графики и таблицу, отображающие титры антитела к FMDV A24 Cruzeiro со временем. Результаты показывают, что через три недели после вакцинации (D21) наблюдается явная сероконверсия у всех вакцинированных телят. Имеется зависимость эффект/доза в группах, вакцинированных бакуловирусной вакциной (G1-G2-G3 и G5-G6). Контрольные животные являются отрицательными на обе даты. Все вакцинированные телята имеют сильную сероконверсию после контрольного заражения (D25 и D28). Сывороточная реакция оказывается более интенсивной в D28, чем в D25. Сероконверсия у контрольных животных наоборот слабая. Фиг. 12A и 12B представляют повышение температуры со временем. Результаты показывают, что только у контрольных животных присутствует значительное повышение температуры. Вакцины

не повышают ректальную температуру.

С использованием таких данных вычисляют PD50 с использованием методов логарифмической регрессии и Спермана-Карбера. Метод логарифмической регрессии оценивает силу вакцины А >16 PD_{50}. Метод Карбера оценивает силу вакцины А >26 PD_{50}. Хотя имеется различие между двумя оценками, оба метода предполагают весьма значительную и существенную эффективность вакцины А. С учетом клинических результатов схожие оценки для вакцины В также предполагают высокую эффективность вакцины В.

Пример 5. Иммуногенность у поросят экспериментальных композиций против FMDV с использованием бакуловируса

Целью этого исследования является оценка иммуногенности 4 антигенов FMDV, экспрессированных в бакуловирусе, и в композиции с TS6 и TS6+сапонин. Вакцины получают согласно указанным далее пропорциям (таблица 4.1).

Таблица 4.1. Вакцинная композиция

BACMEB097	Модифицированный (ковалентной запирающей мутацией) антиген FMD A24 (водный раствор, 656,5 мкл), сапонин (10 гемагглютинирующих единиц), эфир жирных кислот и или полиолы (12мкл), триэфир жирных кислот и этоксилированных полиолов (6 мкл), легкое парафиновое масло (586,7 мкл), эфир жирных кислот и этоксилированных полиолов (20% раствор, 75 мкл) и фосфатный буфер (до дозы 2 мл).
BACMEB095	Антиген FMD O1 Manisa дикого типа (водный раствор, 656,5 мкл), сапонин (10 гемагглютинирующих единиц), эфир жирных кислот и или полиолы (12 мкл), триэфир жирных кислот и этоксилированных полиолов (68 мкл), легкое парафиновое масло (586,7 мкл), эфир жирных кислот и этоксилированных полиолов (20% раствор, 75 мкл) и фосфатный буфер (до дозы 2 мл).
BACMEB084	Антиген FMD A24 дикого типа (водный раствор, 656,5 мкл), сапонин (10 гемагглютинирующих единиц), эфир жирных кислот и или полиолы (12 мкл), триэфир жирных кислот и этоксилированных полиолов (68 мкл), легкое парафиновое масло (586,7 мкл), эфир жирных кислот и этоксилированных полиолов (20% раствор, 75 мкл) и фосфатный буфер (до дозы 2 мл).
BACMEB084	Антиген FMD A24 дикого типа, водный раствор, 656,5 мкл), эфир жирных кислот и или полиолы (12 мкл), триэфир жирных кислот и этоксилированных полиолов (68 мкл), легкое парафиновое масло (586,7 мкл), эфир жирных кислот и этоксилированных полиолов (20% раствор, 75 мкл) и фосфатный буфер (до дозы 2 мл).

Исследуемые антигены различаются по серотипу (A24 Cruzeiro или O1- Manisa), способу получения (клетки насекомых или шелкопряда) или вставке (стандартная или ковалентная запирающая мутация). Термин «ковалентная запирающая мутация» относится к созданию не встречающейся в природе дисульфидной связи в пептиде FMDV P1, которой достигают путем замещения цистеинового остатка. Оценку выполняют на поросятах, вакцинированных дважды интрадермально с 21-дневным интервалом. Поросят контролируют на общие реакции после каждой вакцинации и контролируют на титры нейтрализующих антител к FMDV A24 или FMDV-O1M в дни D1, D20 и D42.

Таблица 4.2. Группы вакцинации

Группа	Число свиней	Активный ингредиент (AI)	Вставка	Культура AI	Адъювант
G1	7	A24 крузейро	Дикий тип	Клетки SF9	TS6
G2	7	A24 крузейро	Дикий тип	Клетки SF9	TS6+сапонин
G3	7	A24 крузейро	Ковалентная запирающая мутация	Клетки SF9	TS6+сапонин
G4	7	A24 крузейро	Дикий тип	Шелкопряд	TS6+сапонин
G5	7	O1-маниса	Дикий тип	Клетки SF9	TS6+сапонин
G6	7	-	-	-	-

Антигены O1-Manisa, экспрессированные бакуловирусом, не выявляют сероконверсии у какого-либо животного в группе G5. Такие результаты показывают, что сначала продуцированные бакуловирусом субъединицы FMDV, содержащие «ковалентную запирающую мутацию», являются иммуногенными (см. таблицу 5 внизу). Более того, в данном случае результаты точно показывают, что «запертые» субъединицы FMDV по существу более продуктивны, эффективны и устойчивы при сравнении с

немодифицированным FMDV дикого типа. Кроме того, оказывается, что вакцина на основе шелкопряда не содержит существенно больше антигена, чем другие испытываемые вакцины.

Таблица 5

Группа	Титр нейтрализации FMD-A24 (log10PD_{50})						Число, превышающее пороговую величину (связано с защитным иммунитетом)*	
	D1		D20		D42			
	среднее	sd**	среднее	sd	среднее	sd	D20	D42
G1	0,90	0,12	1,26	0,19	1,56	0,17	1/7	6/7
G2	1,03	0,13	1,29	0,17	1,67	0,20	2/7	7/7
G3	>0,96	0,24	1,46	0,27	2,08	0,29	3/7	6/6
G4	>1,09	0,17	1,48	0,13	1,58	0,23	4/7	4/6
G6 контроль	0,92	0,18	1,07	0,13	0,94	0,17	0/7	0/7

*: титр ≥ 1,35 log10PD_{50}; sd**: стандартное отклонение.

В итоге, как показывают результаты в таблице 5, все культивированные в клетках SF9 экспрессированные бакуловирусом вирусоподобных частиц A24 (группы G1, G2 и G3), дают существенный «бустерный» эффект (т.е. вторая доза существенно повышает число животных, испытывающих сероконверсию). Напротив, оказывается, что культивированные шелкопрядом вирусоподобные частицы A24 выявляют начальную и персистентную серологическую реакцию при отсутствии проявляемого бустерного эффекта.

Пример 6. Устойчивость к воздействию кислоты и нагревания эксперсированных бакуловирусом FMDV A24 вирусоподобных частиц

FMDV A24 вирусоподобные частицы подвергают обработкам нагреванием и кислотой, и оценивают их устойчивость с использованием ЭМ (фиг. 13) и анализом ELISA (фиг. 14). Как показано на фигурах, вирусоподобные частицы с ковалентной запирающей мутацией, но не вирусоподобные частицы дикого типа, весьма устойчивы как к низкому pH, так и к нагреванию. Более того, как показано на фиг. 15 и в таблице 6, вирусоподобные частицы с ковалентной запирающей мутацией существенно устойчивее со временем при хранении при 5°C относительно их двойников дикого типа.

Таблица 6. Устойчивость A24 вирусоподобных частиц (с ковалентной запирающей мутацией против дикого типа)

	T0	T 1 месяц	T 6 месяцев	T 9 месяцев	T 12 месяцев
вирусоподобные частицы FMDV A24 с ковалентной корзиной	10 E9	5,10 E8	3,10 E8	3,10 E9	10E8
вирусоподобные частицы FMDV A24 дикого типа	10 E9	5,10 E8	5,10 E7	Не наблюдают вирусоподобные частицы	Не наблюдают вирусоподобные частицы

В итоге, стабилизация вирусоподобных частиц из серотипа FMDV A24 Cruzeiro с «ковалентной запирающей мутацией» высокоэффективна в отношении устойчивости к обработке нагреванием или подкислением. Ковалентная запирающая мутация стабилизирует вирусоподобные частицы при хранении в течение 18 месяцев. Видно, что некоторые серотипы FMDV эффективно стабилизируются путем введения ковалентной запирающей мутации, включая A24 Cruzeiro; O1 Manisa (фиг. 16, ЭМ и фиг. 17, ELISA); Asia 1 Shamir и A22 Iraq. Фиг. 17 показывает отсутствие воздействия нагревания на стабилизированные вирусоподобные частицы (ковалентная запирающая мутация, BacMEB099), при этом не детектируется сигнал для стандартного активного ингредиента FMDV O1- Manisa после нагревания, что указывает на отсутствие сборки вирусоподобных частиц для стандартного FMDV O1- Manisa после нагревания.

Пример 7. Иммуногенность вакцин, полученных с бакуловирусным FMDV O1 Manisa, у нормальных поросят

Целью исследования является оценка безопасности и эффективности двух бакуловирусных антигенов FMDV O1 Manisa в составе с TS6 и одного антигена FMDV O1 Manisa, экспрессированного аденовирусным вектором. Каждую композицию вводят двумя инъекциями через три недели (D0 – D21). Поросята имеют возраст 11-12 недель на D0 и получают 2 мл вакцины внутримышечной инъекцией. Безопасность оценивают через мониторинг местных и общих реакций. Эффективность оценивают через серологический контроль (D1, D20, D43) и анализы клеточноопосредованного иммунитета (CMI) (D27, D43).

Таблица 7.1 Характеристики антигенов и вакцин

Группа	Вакцина	Тип	Адъювант
G1	Bac099 FMDV вирусоподобные частицы, ковалентная запирающая мутация, партия 1	O1- Manisa (ковалентная корзина)	TS6
G2	Bac099 FMDV вирусоподобные частицы, ковалентная запирающая мутация, партия 2	O1- Manisa (ковалентная корзина)	TS6
G3	AFTOPOR™, классическая вакцина с неактивированным FMDV (O1 маниса)	O1- Manisa O Тайланд O1 BSF	-
G4	FMDV аденовирусного вектора	O1- Manisa	-
G5	Контроль	-	-

Образцы крови для анализов клеточноопосредованного иммунитета (CMI) берут в D27 и D43. Образцы анализируют после рестимуляции на количество секретируемого клетками γ–интерферона (IFNγ), количество плазматических клеток или количество B-клеток памяти (см. таблицу 7.2). Все количественные определения выполняют ELISApot.

Таблица 7.2. Анализ CMI

Количественные анализы	Рестимуляция ex vivo с	D27	D43
Клетки, секретирующие IFNγ	вирусоподобные частицы FMDV O1 M + иррелевантный контроль	+	NT
	Пул пептидов O1 M + иррелевантный контроль	+	NT
Специфические плазматические клетки. секретирующие IgG	вирусоподобные частицы FMDV O1 M + иррелевантный контроль	+	NT
Специфические B-клетки памяти, секретирующие IgG	вирусоподобные частицы FMDV O1 M + иррелевантный контроль	NT	+

+: испытываемые; NT: не испытывались

Результаты неожиданно показывают, что в отличие от экспрессированного бакуловирусом FMDV O1 M дикого типа (см. пример 5), экспрессированный бакуловирусом модифицированный (ковалентная запирающая мутация) FMDV O1 M выявляет сероконверсию у поросят. Как видно ниже в таблице 7.3, после первой вакцинации (D0) сероконверсию наблюдают в 2 бакуловирусных группах (G1 и G2) на день 20. После второй вакцинации бустерное действие наблюдают в обеих группах (G1 и G2).

Таблица 7.3. Серологическое исследование бакуловирусного FMDV O1 Manisa на поросятах

Серологическая оценка	Число поросят	Титр SN (log 10), D1	Титр SN (log 10), D20	Титр SN (log 10), D43
G1	7	1,19	1,65	1,91
G2	7	1,48	1,49	1,80
G3	4	1,50	2,22	2,67
G4	5	1,32	1,74	1,77
G5	1	NT	NT	1,27

Как видно на фигуре 20, специфические секретирующие IgG плазматические клетки обнаруживают в обеих вакцинированных экспрессированными бакуловирусом FMDV вирусоподобные частицы (модифицированные, ковалентная запирающая мутация)/TS6 группах (G1 и G2). Специфических секретирующих IgG плазматических клеток в G1 и G2 значительно больше, чем в G4. Не обнаружены специфические секретирующие IgG плазматические клетки в G3.

Фигура 21 показывает, что более высокие числа специфических секретирующих IgG B-клеток памяти обнаруживают у всех вакцинированных свиней в группах G1 и G2, небольшую часть специфических секретирующих IgG B-клеток памяти обнаруживают в G3, и не обнаруживают специфические секретирующие IgG B-клетки памяти в G4.

Фигура 22 показывает, что специфические секретирующие IFNγ клетки обнаруживают во всех вакцинированных группах в порядке G1 и G2 > G4 > G3. Не имеется различий между группами G1 и G2. Специфических секретирующих IFNγ клеток в G1 и G2 значительно больше, чем в G3.

Высокие уровни специфических секретирующих IFNγ клеток, специфических секретирующих IgG плазматических клеток и специфических секретирующих IgG B-клеток памяти в обеих вакцинированных экспрессированными бакуловирусом FMDV вирусоподобные частицы (модифицированные, ковалентная корзина)/TS6 группах (G1 и G2) указывают на хорошие уровни защиты против заражений FMDV.

Пример 8. Asia Shamir BacMEB102 (дикий тип) и BacMEB104 (ковалентная запирающая мутация)

Таблица 8. Устойчивость вирусоподобных частиц Asia Shamir (BacMEB102, дикий тип, и BacMEB104, ковалентная запирающая мутация), измеренная с помощью ЭМ

	ЭМ
Shamir BacMEB102 (WT), P3 D4, pH7, нагретый	Нет вирусоподобных частиц
Shamir BacMEB104 (ковалентная запирающая мутация), P3 D4, pH7, нагретый	5,10E7; 1,0E9 (7 месяц); 2,10E9 (9 месяц); 10E8 (15 месяц)

Результаты показывают, что в случае BacMEB104 (ковалентная запирающая мутация) большие количества устойчивых FMDV вирусоподобных частиц присутствуют после нагревания, и вирусоподобные частицы устойчивы в течение по меньшей мере 15 месяцев, в то время как BacMEB102 (WT) после нагревания не образуют какие-либо детектируемые вирусоподобные частицы.

Пример 9. Устойчивость Iraq 22 BacMEB106 (ковалентная запирающая мутация)

Таблица 9. Устойчивость вирусоподобных частиц Iraq 22 (BacMEB105, дикий тип, и BacMEB106, ковалентная корзина) после нагревания, измеренная с помощью ЭМ

AI	ЭМ	Biacore
A22- Iraq BacMEB106	3x10E9; 5x10E8 (3 месяца)	+

По сравнению с вирусоподобными частицами Iraq 22 с ковалентной корзиной, вирусоподобные частицы Iraq 22 дикого типа не устойчивы после нагревания в день 0.

Пример 10. Серологическое исследование Asia Shamir с ковалентной запирающей мутацией и вирусоподобные частицы Iraq 22 с ковалентной запирающей мутацией на свиньях

Целью исследования является оценка иммуногенности у нормальных свиней антигенов вирусоподобных частиц FMD Asia Shamir и FMD A22 Iraq, продуцированных в системе с бакуловирусом. Две партии антигенов Asia Shamir и две партии антигенов A22 Iraq испытывают в композициях с TS6. Каждую композицию вводят свиньям в двух

инъекциях через три недели (D0 – D21). Свиньи на D0 имеют возраст 8-9 недель. Иммуногенность оценивают через серологический мониторинг (D-1, D20, D42) и анализы клеточноопосредованного иммунитета (CMI) (D26, D41).

Таблица 10. Схема вакцинации Asia Shamir вирусоподобными частицами Asia Shamir (BacMEB104, ковалентная запирающая мутация) и вирусоподобных частиц A22 Iraq (BacMEB106, ковалентная корзина), две инъекции в D0 и D21

Группа	Антиген	Адъювант
G1 (n=5)	вирусоподобные частицы Asia Shamir CC	TS6
G2 (n=5)	вирусоподобные частицы A22 Iraq CC	TS6
G3 (n=4)	вирусоподобные частицы Asia Shamir CC	TS6
G4 (n=4)	вирусоподобные частицы A22 Iraq CC	TS6
G5 (n=2)	Невакцинированные	-

Как показано на фиг. 18, вирусоподобные частицы с ковалентной запирающей мутацией из обоих штаммов вызывают сильные серотипспецифические серологические реакции.

Все свиньи, вакцинированные вирусоподобные частицы Asia Shamir (G1 и G3), имеют отчетливую серологическую реакцию на первую вакцинацию со средним титром до log10 PD50 1,20. Также имеется ясный бустерный эффект после второй вакцинации, причем у большинства свиней титр превышает log10 PD50 1,8. Контрольные (G5) и большинство из вакцинированных A22 Iraq свиней (G2 и G4) не показывают какой-либо серологической реакции против Asia Shamir даже после бустерной вакцинации.

Все свиньи, вакцинированные вирусоподобными частицами A22 Iraq (G2 и G4), имеют серологическую реакцию на первую вакцинацию со средним титром до log10 PD50 1,15. Также имеется сильный бустерный эффект после второй вакцинации, причем у большинства свиней титр превышает log10 PD50 2,0. Контрольные (G5) и большинство из вакцинированных Asia Shamir свиней (G1 и G3) не показывают какой-либо серологической реакции против Asia Shamir даже после бустерной вакцинации.

Неожиданно наблюдается перекрестная реакционная способность, как показано на фиг. 19. Результаты показывают, что специфическая IFNγ–реакция (клеточная реакция) обнаруживается в обеих группах с вирусоподобными частицами Asia Shamir, когда используют пул пептида Asia Shamir FMDV, и специфическая IFNγ–реакция (клеточная реакция) обнаруживается в обеих группах с вирусоподобными частицами A22 Iraq, когда используют пул пептида A22 Ирак FMDV. Группа с вирусоподобными частицами Asia Shamir показывает перекрестную иммуногенность, когда используют пул пептида A22 Iraq FMDV. Специфические плазматические клетки (гуморальная реакция) обнаруживают в обеих группах с вирусоподобными частицами Asia Shamir и в обеих группах с вирусоподобными частицами A22 Iraq с оболочкой AI инактивированного Asia Shamir и оболочкой AI инактивированного A22 Iraq, соответственно. Перекрестную иммуногенность (плазматические клетки) в группах с вирусоподобными частицами Asia Shamir наблюдают с оболочкой AI инактивированного A22 Iraq. Специфические B-клетки памяти (гуморальная реакция) обнаруживают в обеих группах с вирусоподобными частицами Asia Shamir и обеих группах с вирусоподобными частицами A22 Iraq с оболочкой AI Asia Shamir и оболочкой AI A22 Ирак, соответственно. Хорошую перекрестную иммуногенность (B-клетки) в группах с вирусоподобными частицами Asia Shamir обнаруживают с оболочкой AI A22 Ирак. Некоторую перекрестную иммуногенность (B-клетки) в группах с вирусоподобными частицами A22 Iraq также наблюдают с оболочкой AI Asia Shamir. Взятые вместе результаты показывают, что вирусоподобные частицы могут выявлять иммунную реакцию, достаточную для защиты

против гетерологичного контрольного заражения.

В заключение, антигены вирусоподобных частиц 4 серотипов FMDV (A24, O1 Manisa, Asia1 Shamir и A22 Iraq) в адъюванте TS6 вызывают гуморальные и клеточные реакции с сильной серотипспецифичностью, реакции нейтрализации антителами, сообразную пропорцию специфических IFNγ–реакций, присутствие В-клеток памяти (с перекрестной реакционной способностью между 2 серотипами), показывая хорошие уровни защиты против заражений гомологичными и гетерологичными FMDV.

Пример 11. Конструирование рекомбинантного FMDV с вектором аденовируса 5 человека

Целью исследования является создание рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего кодоноптимизированные структурные белки FMDV и неоптимизированную протеазу 3C с мутацией в сайте C142T для серотипа A24 Cruzeiro. Антиген FMDV содержит предшественник капсида FMDV (VP1, VP2 (с мутацией в сайте H93C, ковалентная корзина), VP3, VP4, 2A и полный кодоноптимизированный 2B) и неоптимизированный неполный 3B и полноразмерную протеазу 3C с мутацией в сайте C142T (SEQ ID NO: 16).

Клетки HEK 293 (ATCC) сохраняют в MEM (Gibco #11095) с 10% сыворотки плода коровы (Moregate Batch #81827101) при 37°C в 5% CO2. Такие клетки используют для высвобождения рекомбинантного аденовируса vAD3027 и получения штаммов вирусов.

Экспрессирующая плазмида pAD3027 (см. фиг. 25) содержит кодоноптимизированный полинуклеотид (SEQ ID NO: 17, кодирующий капсидный белок FMDV SEQ ID NO: 16), соединенный с промотором CMV и хвостом SV40 полиA. Полинуклеотид включает синтетический интрон.

Экспрессирующие клоны получают рекомбинацией LR исходного вектора с вектором доставки с использованием технологии Gateway (Invitrogen). Рекомбинантный аденовирус vAD3027 получают трансфекцией линеаризованных экспрессирующих клонов в клетках HEK 293 с помощью реагента трансфекции. После спасения каждый вирус харвестируют с помощью цикла замораживание-оттаивание и очистки клеточного дебриса центрифугированием. Для пассажа каждый вирус инокулируют в монослой клеток HEK 293, и приблизительно через 3-4 дня после заражения вирус харвестируют с помощью цикла замораживание-оттаивание и очистки центрифугированием. Проводят пять пассажей для получения штамма вируса, который хранят при -80°C.

Анализ последовательностей рекомбинантного клона подтверждает, что последовательности от начала промотора CMV до конца хвоста SV40 являются правильными (SEQ ID NO: 20). Иммунуфлуоресцентная проверка показывает, что обнаружено, что все проверенные бляшки vAD3027 экспрессируют капсидный белок FMDV. Вестерн-блоттинг с использованием антител против белка VP2 обнаруживает линейный эпитоп VP2 как VP2 (полностью процессированный ~25 кДа), VP0 (частично процессированный трансген ~37 кДа) или P1 (непроцессированный трансген ~80 кДа), экспрессированный vAD3027 (см. фиг. 26).

Аденовирусный рекомбинанты, экспрессирующие кодоноптимизированный модифицированный (ковалентная запирающая мутация) капсидный белок FMDV для штаммов O1 Manisa, Asia и Iraq, конструируют согласно процедурам, описанным выше.

Пример 12. Серологическая оценка различных кандидатов в вакцины от вируса ящура (FMDV) после вакцинации свиней

Пример 12.1. Серологическая оценка вакцин от FMDV A24

Целью исследования является оценка иммуногенности различных составов вакцин от FMDV A24, включающих вакцину от FMDV с вектором аденовируса 5 человека и

вакцину с экспрессированными бакуловирусом вирусоподобными частицами рекомбинантного FMDV A24 (ковалентная запирающая мутация) в сочетании с различными адъювантами (или без них), после вакцинации свиней.

Шестьдесят обычным образом выращенных свиней (в возрасте приблизительно 1 месяц) произвольно распределяют в одну из девяти групп обработки, содержащие, каждая, 4-7 свиней. Полученный состав групп представлен ниже в таблице 11.

Таблица 11. Схема вакцинации вакциной FMDV с вектором аденовируса 5 человека и вакциной с экспрессированными бакуловирусом вирусоподобными частицами рекомбинантного FMDV A24, две инъекции в D0 и D21

Группа	Вакцина**	Адъювант(ы)	Число животных
1	BacA24 вирусоподобные частицы [1] (TV1)	TS6	5
2	BacA24 вирусоподобные частицы (TV2)	TS6 +карбопол	6
3	BacA24 вирусоподобные частицы (TV3)	TS6 +полимер	6
4	BacA24 вирусоподобные частицы (TV4)	ISA206 + карбопол	6
5	BacA24 вирусоподобные частицы (TV5)	ISA206 + полимер	3
6	vAD3027[2] (TV6)	Поли-IC	7
7	vAD3027 (TV8)	Поли-ICLC	7
8*	vAD3027 TV7 (D0); BacA24 вирусоподобные частицы TV1(D21)	N/A (D0); TS6 (D21)	7
9	Контроль	N/A	4

TV: Испытываемая вакцина.

BacA24 вирусоподобные частицы [1]: вакцина с экспрессированными бакуловирусом вирусоподобными частицами рекомбинанта FMDV A24 (ковалентная запирающая мутация).

vAD3027[2]: вакцина FMDV A24 с вектором аденовируса 5 человека (ковалентная запирающая мутация).

*Группа 8 получает TV7 в D0 и TV1 в D21.

** Целевая доза на поросенка составляет $10^{3,9}$ вирусоподобные частицы в 0,6 мл активного ингредиента для поросят, вакцинированных BacA24 вирусоподобными частицами, и $10^{10,35}$ $TCID_{50}$ для поросят, вакцинированных конструкцией vAD3027.

Каждого поросенка, за исключением поросят из группы 9 (контроль), вакцинируют дважды с 21-дневным интервалом 2 мл испытываемой вакцины. Все инъекции осуществляют внутримышечным путем (IM) в область шеи позади уха, поочередно с правой и левой стороны.

Образцы крови берут у всех поросят в дни 0 (перед вакцинацией), 7, 15, 21 (перед вакцинацией), 28, 35 и 42. В день 42 проверяют образцы сыворотки от всех поросят на антитела к FMDV методом нейтрализации вирусов в сыворотке (SYN). Образцы от поросят, вакцинированных конструкцией vAD3027, и из группы контроля (группы 6-9) подвергают анализу SYN во все дни взятия крови.

Все поросята из групп 1-9 являются отрицательными на антитела к FMDV перед началом исследования. Все поросята в контрольной группе являются отрицательными на антитела к FMDV на протяжении всего исследования.

Результаты SYN FMDV приводятся на фиг. 23. Результаты показывают, что как вакцина на основе вирусоподобных частиц рекомбинанта FMDV A24, так и вакцина FMDV на основе вектора аденовируса человека 5 вызывают хорошую иммунную реакцию у животных. Животные, вакцинированные вакциной FMDV на основе вектора аденовируса человека 5 (группы 6-7), имеют более высокое образование антител по

двухдозовой схеме вакцинации, чем животные, вакцинированные низкой дозой вакцины на основе вирусоподобных частиц рекомбинанта FMDV A24. Неожиданно, схема гетерологичной прайм-буст с вакциной FMDV на основе вирусного вектора и вакциной на основе вирусоподобных частиц BacA24 показывает более сильную иммунную реакцию, чем прайм-буст с теми же вакцинами.

Фиг. 24 показывает титры антител к FMDV в группах 6-9 в ходе исследования (день 0 – день 42). На день 15 (2 недели после 1-ой вакцинации) все привитые vAD3027 из группы 8 сероконвертированы к FMDV. Из животных в группах 6-7 сероконвертированы 29-57% поросят. Кроме того, средний титр антител на группу более высокий в группе 8 (схема гетерологичной прайм-буст с вакциной от FMDV на основе вирусного вектора и вакциной с вирусоподобными частицами BacA24), чем титры в группах 6-7.

Реакции образования антител к аденовирусу (SYN) определяют у всех животных из всех групп в образцах, собранных в день 42. Результаты приводятся в $\log_{10}$, и величина $\log_{10} \leq 0{,}6$ рассматривается как отрицательная на антитела в сыворотке.

Результаты показывают, что все контрольные поросята и поросята, вакцинированные вакцинами на основе BacA24 вирусоподобных частиц, являются отрицательными на титры антител к аденовирусу по SN в день 42 ($\log_{10} \leq 0{,}6$). Все животные, вакцинированные vAD3027, в группах 6 и 7 сероконвертируются с титрами, колеблющимися между 1,8 и 3,0, в то время как в группе 8 сероконвертируются 50% поросят. В целом животные в группе 6 имеют более сильное образование антител к аденовирусу.

Пример 12.2. Серологическая оценка вакцин от FMDV O1 Manisa, Asia и Iraq

Целью исследования является оценка вакцинных композиций, включая вакцину FMDV на основе аденовируса человека 5, и вакцины на основе экспрессированных бакуловирусом вирусоподобными частицами рекомбинантов (ковалентная запирающая мутация) FMDV O1 Manisa, Asia и Iraq, в сочетании с различными адъювантами (или без них), после вакцинации свиней.

План исследования такой же, как описано в примере 12.1. Образцы крови берут у вакцинированных животных на различных стадиях, как описано в примере 12.1, и проверяют на серологию. Результаты показывают, что состав вакцины по настоящему изобретению является иммуногенным и обеспечивает защиту у животных.

Пример 14. Серологическая оценка и эффективность различных кандидатов в вакцины от вируса ящура (FMDV) после вакцинации обычных свиней и (крупного рогатого) скота и MDA-положительных свиней и скота

Целью исследования является оценка прайм-буст введения (два введения) двух гетерологичных вакцин или введения в одно и то же время (одно введение) двух гетерологичных вакцин обычным свиньям или скоту для усиления иммунной реакции и также MDA-положительным свиньям и скоту для преодоления MDA и усиления иммунной реакции. Гетерологичные вакцины могут представлять собой различные типы вакцин, такие как вакцина на основе FMDV вирусоподобных частиц или вакцина с FMDV-вирусным вектором, экспрессирующие капсид из того же серотипа FMDV. Гетерологичные вакцины также могут представлять собой один и тот же тип вакцин, экспрессирующих капсид различных серотипов FMDV, таких как штаммы A24, O1 Manisa, Asia и Iraq. Гетерологичные вакцины также могут представлять собой различные типы вакцин, экспрессирующих капсиды различных серотипов FMDV, таких как штаммы A24, O1 Manisa, Asia и Iraq. Гетерологичные вакцины также могут представлять собой различные типы вакцин, т.е., вакцину на основе FMDV вирусоподобных частиц или

вакцину с FMDV-вирусным вектором, экспрессирующие капсиды различных серотипов FMDV, таких как штаммы A24, O1 Manisa, Asia и Iraq.

В одной группе обычных свиней или скот вакцинируют дважды с интервалом 3-5 недель вакциной на основе FMDV вирусоподобных частиц и затем рекомбинантной вирусной FMDV вакциной, или примируют рекомбинантной вирусной FMDV вакциной и повторно иммунизируют вакциной на основе FMDV вирусоподобных частиц. В другой группе обычных свиней или скот вакцинируют один раз как вакциной на основе FMDV вирусоподобных частиц, так и рекомбинантной вирусной FMDV вакциной в одно и то же время.

В одной группе свиней или скот, которые являются MDA-положительными, вакцинируют дважды с интервалом 3-5 недель вакциной на основе FMDV вирусоподобных частиц и затем рекомбинантной вирусной FMDV вакциной или примируют рекомбинантной вирусной FMDV вакциной и повторно иммунизируют вакциной на основе FMDV вирусоподобных частиц. В другой группе свиней или скот, которые являются MDA-положительными, вакцинируют один раз как вакциной на основе FMDV вирусоподобных частиц, так и рекомбинантной вирусной FMDV вакциной в одно и то же время.

Осуществляют контрольное заражение животных после вакцинации гомологичными или гетерологичными штаммами FMDV.

Защитную эффективность, вызванную композицией или вакциной, оценивают против патогенна FMDV путем вакцинации и контрольного заражения обычных животных или MDV-положительных животных. Защитное действие оценивают путем клинических наблюдений и/или по вирусной нагрузке специфического патогена в тканях и крови. Образцы крови вакцинированных животных берут на различных стадиях и проверяют серологию. Результаты показывают, что композиция или вакцина по настоящему изобретению является иммуногенной и обеспечивает защиту у обычных животных и MDV-положительных животных.

Имея таким образом описанные подробные предпочтительные воплощения настоящего изобретения, следует иметь в виду, что изобретение, поясняемое приведенными выше примерами, не огранивается определенными деталями, представленными выше в описании, так как возможны их многие очевидные вариации без отхода от сущности и объема настоящего изобретения.

Все документы, цитированные или упомянутые в настоящем описании («цитированные в настоящем описании документы») и все документы, цитированные или упомянутые в цитированных в настоящем описании документах, вместе с инструкциями изготовителей, описаниями, описаниями продуктов и листами получения любых продуктов, упомянутых в настоящем описании или в любом документе, включены в настоящее описании в качестве ссылок и могут использоваться при практическом осуществлении изобретения.

SEQUENCE LISTING

<110> Merial, Inc.

AUDONNET, Jean-Christophe MEBATSION, Teshome HANNAS, Zahia

CHIANG, Yu-Wei

WIDENER, Justin

<120> FMDV RECOMBINANT VACCINES AND USES THEREOF

<130> MER 14-244

<150> 62/054,073

<151> 2014-09-23

<160> 20
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 2333
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Wild-type polyprotein of A24 Cruzeiro Strain (GenBank AAT01711)
<400> 1
Met Asn Thr Thr Asp Cys Phe Ile Ala Leu Val His Ala Ile Arg Glu
1 5 10 15
Ile Arg Ala Phe Phe Leu Pro Arg Ala Thr Gly Arg Met Glu Phe Thr
20 25 30
Leu His Asn Gly Glu Arg Lys Val Phe Tyr Ser Arg Pro Asn Asn His
35 40 45
Asp Asn Cys Trp Leu Asn Thr Ile Leu Gln Leu Phe Arg Tyr Val Gly
50 55 60
Glu Pro Phe Phe Asp Trp Val Tyr Asp Ser Pro Glu Asn Leu Thr Leu
65 70 75 80
Glu Ala Ile Glu Gln Leu Glu Glu Leu Thr Gly Leu Glu Leu His Glu
85 90 95
Gly Gly Pro Pro Ala Leu Val Ile Trp Asn Ile Lys His Leu Leu His
100 105 110
Thr Gly Ile Gly Thr Ala Ser Arg Pro Ser Glu Val Cys Met Val Asp
115 120 125
Gly Thr Asn Met Cys Leu Ala Asp Phe His Ala Gly Ile Phe Leu Lys
130 135 140
Gly Gln Glu His Ala Val Phe Ala Cys Val Thr Ser Asn Gly Trp Tyr
145 150 155 160
Ala Ile Asp Asp Glu Asp Phe Tyr Pro Trp Thr Pro Asp Pro Ser Asp
165 170 175
Val Leu Val Phe Val Pro Tyr Asp Gln Glu Pro Leu Asn Gly Glu Trp
180 185 190
Lys Thr Lys Val Gln Gln Lys Leu Lys Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro
195 200 205
Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn
210 215 220
Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly
225 230 235 240
Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr
245 250 255
Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu
260 265 270
Ala Ser Ser Ala Phe Thr Gly Leu Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys
275 280 285
Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg
290 295 300
Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val Gly Val Thr His

305 310 315 320
Gly Tyr Ser Thr Glu Glu Asp His Val Ala Gly Pro Asn Thr Ser Gly
325 330 335
Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala Glu Arg Phe Tyr Lys Lys Tyr Leu
340 345 350
Phe Asp Trp Thr Thr Asp Lys Ala Phe Gly His Leu Glu Lys Leu Glu
355 360 365
Leu Pro Ser Asp His His Gly Val Phe Gly His Leu Val Asp Ser Tyr
370 375 380
Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Val Glu Val Ser Ala Val Gly Asn
385 390 395 400
Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val Ala Met Val Pro Glu Trp Lys
405 410 415
Glu Phe Asp Thr Arg Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln
420 425 430
Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met Thr Ala His Ile Thr Val Pro Tyr
435 440 445
Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Lys His Lys Pro Trp Thr
450 455 460
Leu Val Val Met Val Val Ser Pro Leu Thr Val Asn Asn Thr Ser Ala
465 470 475 480
Ala Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn Ile Ala Pro Thr Tyr Val His Val
485 490 495
Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu Gly Ile Phe Pro Val Ala Cys Ala
500 505 510
Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro
515 520 525
Ala Tyr Gly Lys Val Tyr Asn Pro Pro Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg
530 535 540
Phe Thr Asn Leu Leu Asp Val Ala Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys
545 550 555 560
Phe Asp Asp Gly Lys Pro Tyr Val Thr Thr Arg Thr Asp Asp Thr Arg
565 570 575
Leu Leu Ala Lys Phe Asp Leu Ser Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn
580 585 590
Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala Gln Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr
595 600 605
Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg
610 615 620
Tyr Met Val Ala Tyr Ile Pro Pro Gly Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr
625 630 635 640
Pro Glu Arg Ala Ala His Cys Ile His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu
645 650 655
Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr
660 665 670
Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala Glu Thr Ile Asn Val Gln Gly Trp
675 680 685
Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His Gly Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu

690 695 700

Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile
705 710 715 720

Asp Pro Arg Gln Gln Thr Thr Ala Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val
725 730 735

Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg
740 745 750

His His Thr Asp Ile Gly Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln
755 760 765

Ser Leu Ser Pro Thr His Val Ile Asp Leu Met Gln Thr His Gln His
770 775 780

Gly Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp
785 790 795 800

Leu Glu Ile Val Val Arg His Glu Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn
805 810 815

Gly Ala Pro Glu Ser Ala Leu Leu Asn Thr Ser Asn Pro Thr Ala Tyr
820 825 830

Asn Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His
835 840 845

Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly
850 855 860

Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val
865 870 875 880

Lys Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Ile Lys Ala Asp Ala
885 890 895

Ile His Glu Leu Leu Val Arg Met Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro
900 905 910

Arg Pro Leu Leu Ala Ile Glu Val Ser Ser Gln Asp Arg His Lys Gln
915 920 925

Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys
930 935 940

Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Phe Phe Phe Ser Asp
945 950 955 960

Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu Val Asp Thr Ile Asn Gln Met Gln
965 970 975

Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly Pro Asp Phe Asn Arg Leu Val Ser
980 985 990

Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly Val Lys Ala Ile Arg Thr Gly Leu
995 1000 1005

Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys Leu Ile Lys Leu Leu Ser Arg
1010 1015 1020

Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala Arg Ser Lys Asp Pro Val
1025 1030 1035

Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly Leu Glu Ile Leu Asp
1040 1045 1050

Ser Thr Phe Val Val Lys Lys Ile Ser Asp Ser Leu Ser Ser Leu
1055 1060 1065

Phe His Val Pro Ala Pro Val Phe Ser Phe Gly Ala Pro Ile Leu

1070 1075 1080
Leu Ala Gly Leu Val Lys Val Ala Ser Ser Phe Phe Arg Ser Thr
1085 1090 1095
Pro Glu Asp Leu Glu Arg Ala Glu Lys Gln Leu Lys Ala Arg Asp
1100 1105 1110
Ile Asn Asp Ile Phe Ala Ile Leu Lys Asn Gly Glu Trp Leu Val
1115 1120 1125
Lys Leu Ile Leu Ala Ile Arg Asp Trp Ile Lys Ala Trp Ile Ala
1130 1135 1140
Ser Glu Glu Lys Phe Val Thr Thr Thr Asp Leu Val Pro Gly Ile
1145 1150 1155
Leu Glu Lys Gln Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Lys Tyr Lys Glu
1160 1165 1170
Ala Lys Glu Trp Leu Asp Asn Ala Arg Gln Ala Cys Leu Lys Ser
1175 1180 1185
Gly Asn Val His Ile Ala Asn Leu Cys Lys Val Val Ala Pro Ala
1190 1195 1200
Pro Ser Arg Ser Arg Pro Glu Pro Val Val Val Cys Leu Arg Gly
1205 1210 1215
Lys Ser Gly Gln Gly Lys Ser Phe Leu Ala Asn Val Leu Ala Gln
1220 1225 1230
Ala Ile Ser Thr His Phe Thr Gly Arg Thr Asp Ser Val Trp Tyr
1235 1240 1245
Cys Pro Pro Asp Pro Asp His Phe Asp Gly Tyr Asn Gln Gln Thr
1250 1255 1260
Val Val Val Met Asp Asp Leu Gly Gln Asn Pro Asp Gly Lys Asp
1265 1270 1275
Phe Lys Tyr Phe Ala Gln Met Val Ser Thr Thr Gly Phe Ile Pro
1280 1285 1290
Pro Met Ala Ser Leu Glu Asp Lys Gly Lys Pro Phe Asn Ser Lys
1295 1300 1305
Val Ile Ile Ala Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Gly Phe Thr Pro Arg
1310 1315 1320
Thr Met Val Cys Pro Asp Ala Leu Asn Arg Arg Phe His Phe Asp
1325 1330 1335
Ile Asp Val Ser Ala Lys Asp Gly Tyr Lys Ile Asn Asn Lys Leu
1340 1345 1350
Asp Ile Ile Lys Ala Leu Glu Asp Thr His Thr Asn Pro Val Ala
1355 1360 1365
Met Phe Gln Tyr Asp Cys Ala Leu Leu Asn Gly Met Ala Val Glu
1370 1375 1380
Met Lys Arg Met Gln Gln Asp Met Phe Lys Pro Gln Pro Pro Leu
1385 1390 1395
Gln Asn Val Tyr Gln Leu Val Gln Glu Val Ile Glu Arg Val Glu
1400 1405 1410
Leu His Glu Lys Val Ser Ser His Pro Ile Phe Lys Gln Ile Ser
1415 1420 1425
Ile Pro Ser Gln Lys Ser Val Leu Tyr Phe Leu Ile Glu Lys Gly

1430 1435 1440
Gln His Glu Ala Ala Ile Glu Phe Phe Glu Gly Met Val His Asp
1445 1450 1455
Ser Ile Lys Glu Glu Leu Arg Pro Leu Ile Gln Gln Thr Ser Phe
1460 1465 1470
Val Lys Arg Ala Phe Lys Arg Leu Lys Glu Asn Phe Glu Ile Val
1475 1480 1485
Ala Leu Cys Leu Thr Leu Leu Ala Asn Ile Val Ile Met Ile Arg
1490 1495 1500
Glu Thr Arg Lys Arg Gln Lys Met Val Asp Asp Ala Val Ser Glu
1505 1510 1515
Tyr Ile Glu Arg Ala Asn Ile Thr Thr Asp Asp Lys Thr Leu Asp
1520 1525 1530
Glu Ala Glu Lys Asn Pro Leu Glu Thr Ser Gly Ala Ser Thr Val
1535 1540 1545
Gly Phe Arg Glu Arg Pro Leu Pro Gly Gln Lys Ala Arg Asn Asp
1550 1555 1560
Glu Asn Ser Glu Pro Ala Gln Pro Ala Glu Glu Gln Pro Gln Ala
1565 1570 1575
Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys
1580 1585 1590
Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro
1595 1600 1605
Met Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala Lys Ala Pro Val
1610 1615 1620
Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val Ala
1625 1630 1635
Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr Glu Ser Gly Ala
1640 1645 1650
Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Leu Val Met Gly Asn Thr Lys Pro
1655 1660 1665
Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys Cys Ala
1670 1675 1680
Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu Phe
1685 1690 1695
Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr
1700 1705 1710
Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly
1715 1720 1725
Gln Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly
1730 1735 1740
Asn Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg
1745 1750 1755
Met Lys Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Ile Asn Asn Ala Asp
1760 1765 1770
Val Gly Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp
1775 1780 1785
Ile Val Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala

1790 1795 1800
Tyr Lys Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu
1805 1810 1815
Ala Lys Asp Gly Ala Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala
1820 1825 1830
Gly Gly Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met
1835 1840 1845
Leu Leu Lys Met Lys Ala His Val Asp Pro Glu Pro His His Glu
1850 1855 1860
Gly Leu Ile Val Asp Thr Arg Asp Val Glu Glu Arg Val His Val
1865 1870 1875
Met Arg Lys Thr Lys Leu Ala Pro Thr Val Ala His Gly Val Phe
1880 1885 1890
Asn Pro Glu Phe Gly Pro Ala Ala Leu Ser Asn Lys Asp Pro Arg
1895 1900 1905
Leu Asn Asp Gly Val Val Leu Asp Glu Val Ile Phe Ser Lys His
1910 1915 1920
Lys Gly Asp Thr Lys Met Ser Glu Glu Asp Lys Ala Leu Phe Arg
1925 1930 1935
Arg Cys Ala Ala Asp Tyr Ala Ser Arg Leu His Ser Val Leu Gly
1940 1945 1950
Thr Ala Asn Ala Pro Leu Ser Ile Tyr Glu Ala Ile Lys Gly Val
1955 1960 1965
Asp Gly Leu Asp Ala Met Glu Pro Asp Thr Ala Pro Gly Leu Pro
1970 1975 1980
Trp Ala Leu Gln Gly Lys Arg Arg Gly Ala Leu Ile Asp Phe Glu
1985 1990 1995
Asn Gly Thr Val Gly Pro Glu Val Glu Ala Ala Leu Lys Leu Met
2000 2005 2010
Glu Lys Arg Glu Tyr Lys Phe Ala Cys Gln Thr Phe Leu Lys Asp
2015 2020 2025
Glu Ile Arg Pro Met Glu Lys Val Arg Ala Gly Lys Thr Arg Ile
2030 2035 2040
Val Asp Val Leu Pro Val Glu His Ile Leu Tyr Thr Arg Met Met
2045 2050 2055
Ile Gly Arg Phe Cys Ala Gln Met His Ser Asn Asn Gly Pro Gln
2060 2065 2070
Ile Gly Ser Ala Val Gly Cys Asn Pro Asp Val Asp Trp Gln Arg
2075 2080 2085
Phe Gly Thr His Phe Ala Gln Tyr Arg Asn Val Trp Asp Val Asp
2090 2095 2100
Tyr Ser Ala Phe Asp Ala Asn His Cys Ser Asp Ala Met Asn Ile
2105 2110 2115
Met Phe Glu Glu Val Phe Arg Thr Glu Phe Gly Phe His Pro Asn
2120 2125 2130
Ala Glu Trp Ile Leu Lys Thr Leu Val Asn Thr Glu His Ala Tyr
2135 2140 2145
Glu Asn Lys Arg Ile Thr Val Glu Gly Gly Met Pro Ser Gly Cys

2150 2155 2160
Ser Ala Thr Ser Ile Ile Asn Thr Ile Leu Asn Asn Ile Tyr Val
2165 2170 2175
Leu Tyr Ala Leu Arg Arg His Tyr Glu Gly Val Glu Leu Asp Thr
2180 2185 2190
Tyr Thr Met Ile Ser Tyr Gly Asp Asp Ile Val Val Ala Ser Asp
2195 2200 2205
Tyr Asp Leu Asp Phe Glu Ala Leu Lys Pro His Phe Lys Ser Leu
2210 2215 2220
Gly Gln Thr Ile Thr Pro Ala Asp Lys Ser Asp Lys Gly Phe Val
2225 2230 2235
Leu Gly His Ser Ile Thr Asp Val Thr Phe Leu Lys Arg His Phe
2240 2245 2250
His Met Asp Tyr Gly Thr Gly Phe Tyr Lys Pro Val Met Ala Ser
2255 2260 2265
Lys Thr Leu Glu Ala Ile Leu Ser Phe Ala Arg Arg Gly Thr Ile
2270 2275 2280
Gln Glu Lys Leu Ile Ser Val Ala Gly Leu Ala Val His Ser Gly
2285 2290 2295
Pro Asp Glu Tyr Arg Arg Leu Phe Glu Pro Phe Gln Gly Leu Phe
2300 2305 2310
Glu Ile Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Tyr Leu Arg Trp Val Asn Ala
2315 2320 2325
Val Cys Gly Asp Ala
2330
<210> 2
<211> 1126
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Modified polyprotein of A24 Cruzeiro Strain in VP2 (H93C) or P1 (H179C)
<400> 2
Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15
Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30
Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln
50 55 60
Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Thr Gly Leu
65 70 75 80
Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu
85 90 95
Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr
100 105 110
Gln Ser Ser Val Gly Val Thr His Gly Tyr Ser Thr Glu Glu Asp His
115 120 125

Val Ala Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala
130 135 140
Glu Arg Phe Tyr Lys Lys Tyr Leu Phe Asp Trp Thr Thr Asp Lys Ala
145 150 155 160
Phe Gly His Leu Glu Lys Leu Glu Leu Pro Ser Asp His His Gly Val
165 170 175
Phe Gly Cys Leu Val Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp
180 185 190
Val Glu Val Ser Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu
195 200 205
Val Ala Met Val Pro Glu Trp Lys Glu Phe Asp Thr Arg Glu Lys Tyr
210 215 220
Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met
225 230 235 240
Thr Ala His Ile Thr Val Pro Tyr Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln
245 250 255
Tyr Lys Lys His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ser Pro
260 265 270
Leu Thr Val Asn Asn Thr Ser Ala Ala Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn
275 280 285
Ile Ala Pro Thr Tyr Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
290 295 300
Gly Ile Phe Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr
305 310 315 320
Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ala Tyr Gly Lys Val Tyr Asn Pro
325 330 335
Pro Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg Phe Thr Asn Leu Leu Asp Val Ala
340 345 350
Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys Phe Asp Asp Gly Lys Pro Tyr Val
355 360 365
Thr Thr Arg Thr Asp Asp Thr Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Leu Ser
370 375 380
Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala Gln
385 390 395 400
Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr
405 410 415
Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Ile Pro Pro
420 425 430
Gly Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr Pro Glu Arg Ala Ala His Cys Ile
435 440 445
His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile
450 455 460
Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala
465 470 475 480
Glu Thr Ile Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His
485 490 495
Gly Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys
500 505 510

Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Gln Gln Thr Thr Ala
515 520 525
Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly
530 535 540
Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr Asp Ile Gly Phe Ile
545 550 555 560
Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Leu Ser Pro Thr His Val Ile
565 570 575
Asp Leu Met Gln Ala His Gln His Gly Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg
580 585 590
Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Ile Val Val Arg His Glu
595 600 605
Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ser Ala Leu Leu
610 615 620
Asn Thr Ser Asn Pro Thr Ala Tyr Asn Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu
625 630 635 640
Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn
645 650 655
Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met
660 665 670
Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn
675 680 685
Tyr Gly Ala Ile Lys Ala Asp Ala Ile His Glu Leu Leu Val Arg Met
690 695 700
Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Ile Glu Val
705 710 715 720
Ser Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln
725 730 735
Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
740 745 750
Pro Gly Pro Phe Phe Phe Ala Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu
755 760 765
Val Asp Thr Ile Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly
770 775 780
Pro Asp Phe Asn Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly
785 790 795 800
Val Lys Ala Ile Arg Thr Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys
805 810 815
Leu Ile Lys Leu Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala
820 825 830
Arg Ser Lys Asp Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly
835 840 845
Leu Glu Arg Gln Arg Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln
850 855 860
Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val
865 870 875 880
Lys Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val
885 890 895

Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr
900 905 910
Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn
915 920 925
Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys
930 935 940
Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu
945 950 955 960
Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr
965 970 975
Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln
980 985 990
Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg
995 1000 1005
Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys
1010 1015 1020
Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly
1025 1030 1035
Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val
1040 1045 1050
Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys
1055 1060 1065
Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys
1070 1075 1080
Asp Gly Ala Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly
1085 1090 1095
Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu
1100 1105 1110
Arg Met Lys Ala His Val Asp Pro Glu Pro Gln His Glu
1115 1120 1125
<210> 3
<211> 3378
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Polynucleotide encoding modified polyprotein of A24
<400> 3
atgggtgctg gccagtcctc ccctgctacc ggttcccaga accagtccgg caacaccggt 60
tccatcatca acaactacta catgcagcag taccagaact ccatggacac ccagctggga 120
gacaacgcta tctccggtgg ttccaacgag ggttccaccg acaccacctc tacccacacc 180
accaacaccc agaacaacga ctggttctcc aagctggctt cctccgcttt caccggcctg 240
ttcggtgctc tgctggctga caagaaaacc gaggaaacca ccctgctcga ggaccgtatc 300
ctgaccaccc gtaacggtca caccacttcc accacccagt cctccgtggg cgtgacccac 360
ggttactcca ccgaagagga ccacgtggcc ggtcctaaca cctccggcct ggaaacccgt 420
gtggtgcagg ctgagcgctt ctacaagaag tacctgttcg actggaccac cgacaaggct 480
ttcggtcacc tggaaaagct ggaactgccc tccgaccacc acggcgtgtt cggatgcctg 540
gtggactcct acgcttacat gcgtaacggc tgggacgtgg aggtgtccgc tgtgggcaac 600
cagttcaacg gtggttgcct gctggtggct atggtgcccg agtggaagga atttgacacc 660

cgcgagaagt accagctgac cctgttcccc caccagttca tctccccccg taccaacatg 720
accgctcaca tcaccgtgcc ctacctgggc gtgaaccgtt acgaccagta caagaagcac 780
aagccctgga ccctggtggt catggtggtg tccccccctga ccgtgaacaa cacctccgct 840
gctcagatca aggtgtacgc taacatcgct cccacctacg tgcacgtcgc cggagagctg 900
ccctccaagg aaggcatctt ccccgtcgct tgcgctgacg gttacggtgg cctggtcacc 960
accgacccca agaccgctga ccccgcttac ggcaaggtgt acaacccccc tcgcaccaac 1020
taccccggtc gtttcaccaa cctgctggac gtggccgagg cttgccccac cttcctgtgc 1080
ttcgacgacg gcaagcccta cgtgaccacc aggaccgacg acacccgtct gctggctaag 1140
ttcgacctgt ccctggctgc taagcacatg tccaacacct acctgtccgg tatcgctcag 1200
tactacaccc agtactccgg caccatcaac ctgcacttca tgttcaccgg ctccaccgac 1260
tccaaggctc gttacatggt ggcttacatc ccccctggtg tcgagactcc ccccgacact 1320
cctgagcgtg ctgctcactg catccacgct gagtgggaca ccggcctgaa ctccaagttc 1380
accttctcca tcccttacgt gtccgctgct gactacgcgt acaccgcttc cgacaccgct 1440
gagactatca acgtgcaggg ctgggtctgc atctaccaga tcacccacgg caaggctgag 1500
aacgacaccc tggtcgtgtc cgtgtccgcc ggcaaggact tcgagctgcg tctgcccatc 1560
gaccctcgtc agcagaccac cgctaccggc gagtctgctg acccagtgac caccaccgtg 1620
gagaactacg gtggcgagac tcagatccag cgtcgtcacc acaccgacat cggtttcatc 1680
atggaccgct tcgtgaagat ccagtccctg tcccctaccc acgtgatcga cctgatgcag 1740
gctcaccagc acggactcgt gggtgctctc ctgcgtgctg ctacctacta cttctccgac 1800
ctggaaatcg tcgtgcgtca cgagggcaac ctgacctggg tgcccaacgg tgctcctgag 1860
tccgctctgc tgaacacctc caaccccacc gcttacaaca aggctccctt cacccgtctg 1920
gctctgcctt acaccgctcc ccaccgtgtg ctggctaccg tgtacaacgg cacctccaag 1980
tacgctgtgg gcggttccgg tcgtcgtggc gacatgggtt ccctggccgc tcgtgtggtc 2040
aagcagctgc ccgcttcctt caactacggt gctatcaagg ctgacgctat ccacgagctg 2100
ttggtgcgta tgaagcgtgc tgagctgtac tgcccccgtc ccctgctggc tatcgaggtg 2160
tcctcccagg accgtcacaa gcagaagatc atcgctcccg ctaagcagct gctgaacttc 2220
gacctgctga agctggctgg cgacgtcgag tccaaccccg gtcccttctt cttcgctgac 2280
gtgcgttcca acttctctaa gctggtggac actatcaacc agatgcaaga ggacatgtcc 2340
accaagcacg gtcccgactt caaccgtctg gtgtccgctt tcgaggaact ggctaccggc 2400
gtgaaggcta tccgtaccgg cctggacgag gctaagccct ggtacaagct gatcaagctg 2460
ctgtcccgtc tgtcctgcat ggctgctgtg gctgctcgtt ccaaggaccc cgtgctggtg 2520
gccatcatgc tggccgacac cggcttggag cgccagcgtc ccctgaaggt ccgcgctaag 2580
ctgccccagc aggaaggccc ttacgctggt cccctcgagc gtcagaagcc tctgaaggtc 2640
aaggctaagg ctcccgtggt caaggaagga ccctacgagg gacccgtgaa gaagcccgtc 2700
gctctcaagg ttaaggccaa gaacctgatc gtgaccgagt ccggtgctcc tcccaccgac 2760
ctgcaaaaga tggtcatggg caacaccaag cccgtggagc tgatcctgga cggcaagacc 2820
gtggctatct gctgcgctac cggtgttttc ggcaccgctt acctggtgcc ccgtcacctg 2880
ttcgctgaga agtacgacaa gatcatgctg gacggtcgtg ctatgaccga ctccgactac 2940
cgtgtgttcg agttcgagat caaggtcaag ggccaggaca tgctgtccga cgctgctctg 3000
atggtgctgc accgtggcaa ccgtgtgcgt gacatcacca agcacttccg tgacaccgct 3060
cgtatgaaga agggcacccc cgtcgtcggt gtcgtgaaca acgctgacgt gggtcgtctg 3120
atcttctccg gcgaggctct gacctacaag gacatcgtcg tgtgcatgga cggcgacacc 3180
atgcccggac tgttcgctta caaggctgct accaaggctg gttactgcgg tggtgctgtg 3240
ctggccaagg acggtgctga caccttcatc gtgggcaccc actccgctgg tggcaacggt 3300
gtcggttact gctcctgcgt gtcccgttcc atgctgctgc gcatgaaggc tcacgtggac 3360
cccgagcccc agcacgag 3378

<210> 4

<211> 1126

<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Unmodified Polyprotein of A24 Cruzeiro Strain
<400> 4
Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15
Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30
Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln
50 55 60
Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Thr Gly Leu
65 70 75 80
Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu
85 90 95
Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr
100 105 110
Gln Ser Ser Val Gly Val Thr His Gly Tyr Ser Thr Glu Glu Asp His
115 120 125
Val Ala Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala
130 135 140
Glu Arg Phe Tyr Lys Lys Tyr Leu Phe Asp Trp Thr Thr Asp Lys Ala
145 150 155 160
Phe Gly His Leu Glu Lys Leu Glu Leu Pro Ser Asp His His Gly Val
165 170 175
Phe Gly His Leu Val Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp
180 185 190
Val Glu Val Ser Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu
195 200 205
Val Ala Met Val Pro Glu Trp Lys Glu Phe Asp Thr Arg Glu Lys Tyr
210 215 220
Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met
225 230 235 240
Thr Ala His Ile Thr Val Pro Tyr Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln
245 250 255
Tyr Lys Lys His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ser Pro
260 265 270
Leu Thr Val Asn Asn Thr Ser Ala Ala Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn
275 280 285
Ile Ala Pro Thr Tyr Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
290 295 300
Gly Ile Phe Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr
305 310 315 320
Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ala Tyr Gly Lys Val Tyr Asn Pro
325 330 335
Pro Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg Phe Thr Asn Leu Leu Asp Val Ala

340 345 350
Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys Phe Asp Asp Gly Lys Pro Tyr Val
355 360 365
Thr Thr Arg Thr Asp Asp Thr Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Leu Ser
370 375 380
Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala Gln
385 390 395 400
Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr
405 410 415
Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Ile Pro Pro
420 425 430
Gly Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr Pro Glu Arg Ala Ala His Cys Ile
435 440 445
His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile
450 455 460
Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala
465 470 475 480
Glu Thr Ile Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His
485 490 495
Gly Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys
500 505 510
Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Gln Gln Thr Thr Ala
515 520 525
Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly
530 535 540
Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr Asp Ile Gly Phe Ile
545 550 555 560
Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Leu Ser Pro Thr His Val Ile
565 570 575
Asp Leu Met Gln Ala His Gln His Gly Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg
580 585 590
Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Ile Val Val Arg His Glu
595 600 605
Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ser Ala Leu Leu
610 615 620
Asn Thr Ser Asn Pro Thr Ala Tyr Asn Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu
625 630 635 640
Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn
645 650 655
Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met
660 665 670
Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn
675 680 685
Tyr Gly Ala Ile Lys Ala Asp Ala Ile His Glu Leu Leu Val Arg Met
690 695 700
Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Ile Glu Val
705 710 715 720
Ser Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln

725 730 735

Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
740 745 750

Pro Gly Pro Phe Phe Phe Ala Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu
755 760 765

Val Asp Thr Ile Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly
770 775 780

Pro Asp Phe Asn Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly
785 790 795 800

Val Lys Ala Ile Arg Thr Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys
805 810 815

Leu Ile Lys Leu Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala
820 825 830

Arg Ser Lys Asp Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly
835 840 845

Leu Glu Arg Gln Arg Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln
850 855 860

Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val
865 870 875 880

Lys Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val
885 890 895

Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr
900 905 910

Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn
915 920 925

Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys
930 935 940

Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu
945 950 955 960

Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr
965 970 975

Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln
980 985 990

Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg
995 1000 1005

Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys
1010 1015 1020

Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly
1025 1030 1035

Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val
1040 1045 1050

Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys
1055 1060 1065

Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys
1070 1075 1080

Asp Gly Ala Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly
1085 1090 1095

Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu

1100 1105 1110
Arg Met Lys Ala His Val Asp Pro Glu Pro Gln His Glu
1115 1120 1125
<210> 5
<211> 736
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Wild-type polyprotein of FMDV O1 manisa strain (GenBank AAT01766)
<400> 5
Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser Gly
1 5 10 15
Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln Asn
20 25 30
Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Thr Ser Gly Gly Ser Asn
35 40 45
Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln Asn
50 55 60
Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu Phe
65 70 75 80
Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu
85 90 95
Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln
100 105 110
Ser Ser Val Gly Val Thr Tyr Gly Tyr Ala Thr Ala Glu Asp Phe Val
115 120 125
Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Ala Gln Ala Glu
130 135 140
Arg Phe Phe Lys Thr His Leu Phe Asp Trp Val Thr Ser Asp Pro Phe
145 150 155 160
Gly Arg Cys His Leu Leu Glu Leu Pro Thr Asp His Lys Gly Val Tyr
165 170 175
Gly Ser Leu Thr Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Val
180 185 190
Glu Val Thr Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val
195 200 205
Ala Met Val Pro Glu Leu Cys Ser Ile Gln Lys Arg Glu Leu Tyr Gln
210 215 220
Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met Thr
225 230 235 240
Ala His Ile Thr Val Pro Phe Val Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln Tyr
245 250 255
Lys Val His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ala Pro Leu
260 265 270
Thr Val Asn Ser Glu Gly Ala Pro Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn Ile
275 280 285
Ala Pro Thr Asn Val His Val Ala Gly Glu Phe Pro Ser Lys Glu Gly
290 295 300

Ile Phe Pro Val Ala Cys Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr Thr
305 310 315 320
Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ala Tyr Gly Lys Val Phe Asn Pro Pro
325 330 335
Arg Asn Met Leu Pro Gly Arg Phe Thr Asn Phe Leu Asp Val Ala Glu
340 345 350
Ala Cys Pro Thr Phe Leu His Phe Glu Gly Asp Val Pro Tyr Val Thr
355 360 365
Thr Lys Thr Asp Ser Asp Arg Val Leu Ala Gln Phe Asp Leu Ser Leu
370 375 380
Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Phe Leu Ala Gly Leu Ala Gln Tyr
385 390 395 400
Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr Gly
405 410 415
Pro Thr Asp Ala Lys Ala Arg Tyr Met Ile Ala Tyr Ala Pro Pro Gly
420 425 430
Met Glu Pro Pro Lys Thr Pro Glu Ala Ala Ala His Cys Ile His Ala
435 440 445
Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro Tyr
450 455 460
Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala Glu Thr
465 470 475 480
Thr Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Leu Phe Gln Ile Thr His Gly Lys
485 490 495
Ala Asp Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Ala Ser Ala Gly Lys Asp Phe
500 505 510
Glu Leu Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Thr Gln Thr Thr Ser Ala Gly
515 520 525
Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Ala Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu
530 535 540
Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr Asp Val Ser Phe Ile Leu Asp
545 550 555 560
Arg Phe Val Lys Val Thr Pro Lys Asp Gln Ile Asn Val Leu Asp Leu
565 570 575
Met Gln Thr Pro Ala His Thr Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Thr Ala
580 585 590
Thr Tyr Tyr Phe Ala Asp Leu Glu Val Ala Val Lys His Glu Gly Asn
595 600 605
Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ala Ala Leu Asp Asn Thr
610 615 620
Thr Asn Pro Thr Ala Tyr His Lys Ala Pro Leu Thr Arg Leu Ala Leu
625 630 635 640
Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Asn
645 650 655
Ser Lys Tyr Gly Asp Gly Thr Val Ala Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln
660 665 670
Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Ala Leu Pro Thr Ser Phe Asn Tyr
675 680 685

Gly Ala Ile Lys Ala Thr Arg Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys
690 695 700
Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Asp
705 710 715 720
Gln Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Leu Leu
725 730 735
<210> 6
<211> 737
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Modified polyprotein of FMDV O1 manisa strain in VP2 (S93C) or P1 (S179C)
<400> 6
Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15
Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30
Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Thr Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln
50 55 60
Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu
65 70 75 80
Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu
85 90 95
Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr
100 105 110
Gln Ser Ser Val Gly Val Thr Tyr Gly Tyr Ala Thr Ala Glu Asp Phe
115 120 125
Val Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Ala Gln Ala
130 135 140
Glu Arg Phe Phe Lys Thr His Leu Phe Asp Trp Val Thr Ser Asp Pro
145 150 155 160
Phe Gly Arg Cys His Leu Leu Glu Leu Pro Thr Asp His Lys Gly Val
165 170 175
Tyr Gly Cys Leu Thr Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp
180 185 190
Val Glu Val Thr Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu
195 200 205
Val Ala Met Val Pro Glu Leu Cys Ser Ile Gln Lys Arg Glu Leu Tyr
210 215 220
Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met
225 230 235 240
Thr Ala His Ile Thr Val Pro Phe Val Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln
245 250 255
Tyr Lys Val His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ala Pro
260 265 270
Leu Thr Val Asn Ser Glu Gly Ala Pro Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn

275 280 285
Ile Ala Pro Thr Asn Val His Val Ala Gly Glu Phe Pro Ser Lys Glu
290 295 300
Gly Ile Phe Pro Val Ala Cys Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr
305 310 315 320
Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ala Tyr Gly Lys Val Phe Asn Pro
325 330 335
Pro Arg Asn Met Leu Pro Gly Arg Phe Thr Asn Phe Leu Asp Val Ala
340 345 350
Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu His Phe Glu Gly Asp Val Pro Tyr Val
355 360 365
Thr Thr Lys Thr Asp Ser Asp Arg Val Leu Ala Gln Phe Asp Leu Ser
370 375 380
Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Phe Leu Ala Gly Leu Ala Gln
385 390 395 400
Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr
405 410 415
Gly Pro Thr Asp Ala Lys Ala Arg Tyr Met Ile Ala Tyr Ala Pro Pro
420 425 430
Gly Met Glu Pro Pro Lys Thr Pro Glu Ala Ala Ala His Cys Ile His
435 440 445
Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro
450 455 460
Tyr Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala Glu
465 470 475 480
Thr Thr Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Leu Phe Gln Ile Thr His Gly
485 490 495
Lys Ala Asp Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Ala Ser Ala Gly Lys Asp
500 505 510
Phe Glu Leu Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Thr Gln Thr Thr Ser Ala
515 520 525
Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Ala Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly
530 535 540
Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr Asp Val Ser Phe Ile Leu
545 550 555 560
Asp Arg Phe Val Lys Val Thr Pro Lys Asp Gln Ile Asn Val Leu Asp
565 570 575
Leu Met Gln Thr Pro Ala His Thr Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Thr
580 585 590
Ala Thr Tyr Tyr Phe Ala Asp Leu Glu Val Ala Val Lys His Glu Gly
595 600 605
Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ala Ala Leu Asp Asn
610 615 620
Thr Thr Asn Pro Thr Ala Tyr His Lys Ala Pro Leu Thr Arg Leu Ala
625 630 635 640
Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly
645 650 655
Asn Ser Lys Tyr Gly Asp Gly Thr Val Ala Asn Val Arg Gly Asp Leu

660 665 670
Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Ala Leu Pro Thr Ser Phe Asn
675 680 685
Tyr Gly Ala Ile Lys Ala Thr Arg Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met
690 695 700
Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro
705 710 715 720
Asp Gln Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Leu
725 730 735
Leu
<210> 7
<211> 2211
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Polynucleotide encoding modified polyprotein of FMDV O1 manisa strain
<400> 7
atgggtgctg gccagtcctc ccccgctacc ggttcccaga accagtccgg caacaccggt 60
tccatcatca acaactacta catgcagcag taccagaact ccatggacac ccagctgggc 120
gacaacgcta cctccggtgg ttccaacgag ggttccaccg acaccacctc tacccacacc 180
accaacaccc agaacaacga ctggttctcc aagctggctt cctccgcttt ctccggcctg 240
ttcggtgctc tgctggctga caagaagacc gaggaaacca ccctgctcga ggaccgtatc 300
ctgaccaccc gtaacggtca caccacctcc accacccagt cctccgtggg tgtcacctac 360
ggttacgcta ccgctgagga cttcgtgtcc ggtcccaaca cctccggcct ggaaacccgt 420
gtggctcagg ctgagcgctt cttcaagacc cacctgttcg actgggtcac ctccgacccc 480
ttcggtcgtt gccacctgtt ggagctgccc accgaccaca agggcgtgta cggttgcctg 540
accgactcct acgcttacat gcgtaacggc tgggacgtgg aagtgaccgc tgtgggcaac 600
cagttcaacg gtggttgcct gctggtggct atggtgcccg agctgtgctc catccagaag 660
cgcgagctgt accagctgac cctgttcccc caccagttca tcaacccccg taccaacatg 720
accgctcaca tcaccgtgcc cttcgtgggc gtgaaccgtt acgaccagta caaggtgcac 780
aagccctgga ccctggtcgt gatggtggtg gctcccctga ccgtgaactc cgagggtgct 840
ccccagatca aggtgtacgc taacatcgct cccaccaacg tgcacgtggc cggcgagttc 900
ccatccaagg aaggcatctt ccccgtcgct tgctccgacg gttacggtgg cctggtcacc 960
actgacccca agaccgctga ccccgcttac ggcaaggtgt tcaacccccc tcgtaacatg 1020
ctgcccggtc gtttcaccaa cttcttggac gtggccgagg cttgccccac cttcctgcac 1080
ttcgagggcg acgtgcccta cgtgaccacc aagactgact ccgaccgtgt gctggctcag 1140
ttcgacctgt ccctggctgc taagcacatg tccaacactt tcttggctgg cctggctcag 1200
tactacaccc agtactccgg caccatcaac ctgcacttca tgttcaccgg tcccaccgac 1260
gctaaggctc gttacatgat cgcttacgct ccccctggca tggaaccccc caagacccca 1320
gaggctgctg ctcactgcat ccacgctgag tgggacaccg gcctgaactc caagttcacc 1380
ttctccatcc cttacctgtc cgctgctgac tacgcctaca ccgcttccga caccgctgag 1440
actaccaacg tccagggctg ggtctgcctg ttccagatca cccacggcaa ggctgacggc 1500
gacgctctgg tggtgctggc ttccgctggc aaggacttcg agctgcgtct gcccgtggac 1560
gctcgtaccc agaccacctc cgctggcgag tctgctgacc ccgtgaccgc taccgtcgag 1620
aactacggtg gcgagactca ggtgcagcgt cgtcagcaca ccgacgtgtc cttcatcctg 1680
gaccgtttcg tgaaggtcac ccccaaggac cagatcaacg tgctggacct gatgcagacc 1740
cccgctcaca ccctcgtggg cgctctgctg cgtaccgcta cctactactt cgctgacctg 1800
gaagtggctg tgaagcacga gggcaacctg acctgggtgc ccaacggtgc tcccgaggct 1860

gctctggaca acaccactaa ccccaccgct taccacaagg ctcctctgac ccgtctggct 1920
ctgccttaca ctgctcccca ccgcgtgctg gctaccgtgt acaacggcaa ctctaagtac 1980
ggcgacggca ccgtggctaa cgtgcgtggc gatctgcagg tcctggctca gaaggctgct 2040
cgcgctctgc ccacctcctt caactacggt gctatcaagg ctacccgtgt gaccgagctg 2100
ctgtaccgta tgaagcgtgc tgagacttac tgcccccgtc ccctgctggc tatccaccct 2160
gaccaggctc gtcacaagca aaagatcgtg gctcccgtga agcagctgct g 2211

<210> 8
<211> 1126
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> modified polyprotein of FMDV Iraq strain
<400> 8

Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15
Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30
Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln
50 55 60
Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu
65 70 75 80
Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu
85 90 95
Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr
100 105 110
Gln Ser Ser Val Gly Val Thr Tyr Gly Tyr Ser Thr Gln Glu Asp His
115 120 125
Val Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala
130 135 140
Glu Arg Phe Phe Lys Lys His Leu Phe Asp Trp Thr Pro Asp Lys Ala
145 150 155 160
Phe Gly His Leu Glu Lys Leu Glu Leu Pro Thr Asp His Lys Gly Val
165 170 175
Tyr Gly Cys Leu Val Asp Ser Phe Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp
180 185 190
Val Glu Val Ser Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu
195 200 205
Val Ala Met Val Pro Glu Trp Lys Glu Phe Thr Pro Arg Glu Lys Tyr
210 215 220
Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met
225 230 235 240
Thr Ala His Ile Val Val Pro Tyr Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln
245 250 255
Tyr Lys Lys His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ser Pro
260 265 270
Leu Thr Thr Asn Thr Val Ser Ala Gly Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn

275 280 285
Ile Ala Pro Thr His Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
290 295 300
Gly Ile Val Pro Val Ala Cys Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr
305 310 315 320
Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Val Tyr Gly Met Val Tyr Asn Pro
325 330 335
Pro Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg Phe Thr Asn Leu Leu Asp Val Ala
340 345 350
Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys Phe Asp Glu Gly Lys Pro Tyr Val
355 360 365
Val Thr Arg Thr Asp Glu Gln Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Val Ser
370 375 380
Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala Gln
385 390 395 400
Tyr Tyr Ala Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr
405 410 415
Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val Pro Pro
420 425 430
Gly Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr Pro Glu Lys Ala Ala His Cys Ile
435 440 445
His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile
450 455 460
Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Val Ala
465 470 475 480
Glu Thr Thr Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His
485 490 495
Gly Lys Ala Glu Gln Asp Thr Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys
500 505 510
Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Ser Gln Thr Thr Thr
515 520 525
Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly
530 535 540
Gly Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr Asp Val Thr Phe Ile
545 550 555 560
Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Asn Leu Asn Pro Thr His Val Ile
565 570 575
Asp Leu Met Gln Thr His Gln His Gly Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg
580 585 590
Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Ile Val Val Arg His Asp
595 600 605
Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ala Ala Leu Ser
610 615 620
Asn Thr Gly Asn Pro Thr Ala Tyr Leu Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu
625 630 635 640
Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn
645 650 655
Gly Thr Ser Lys Tyr Ser Ala Gly Gly Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu

660 665 670
Gly Pro Leu Ala Ala Arg Val Ala Ala Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn
675 680 685
Phe Gly Ala Ile Gln Ala Thr Thr Ile His Glu Leu Leu Val Arg Met
690 695 700
Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Val Glu Val
705 710 715 720
Ser Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln
725 730 735
Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
740 745 750
Pro Gly Pro Phe Phe Phe Ala Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu
755 760 765
Val Asp Thr Ile Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly
770 775 780
Pro Asp Phe Asn Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly
785 790 795 800
Val Lys Ala Ile Arg Thr Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys
805 810 815
Leu Ile Lys Leu Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala
820 825 830
Arg Ser Lys Asp Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly
835 840 845
Leu Glu Arg Gln Arg Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln
850 855 860
Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val
865 870 875 880
Lys Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val
885 890 895
Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr
900 905 910
Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn
915 920 925
Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys
930 935 940
Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu
945 950 955 960
Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr
965 970 975
Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln
980 985 990
Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg
995 1000 1005
Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys
1010 1015 1020
Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly
1025 1030 1035
Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val

1040 1045 1050
Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys
1055 1060 1065
Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys
1070 1075 1080
Asp Gly Ala Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly
1085 1090 1095
Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu
1100 1105 1110
Arg Met Lys Ala His Val Asp Pro Glu Pro Gln His Glu
1115 1120 1125
<210> 9
<211> 3378
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Polynucleotide encoding modified polyprotein of FMDV Iraq strain
<400> 9
atgggtgctg gccagtcctc ccccgctacc ggttcccaga accagtccgg caacaccggt 60
tccatcatca acaactacta catgcagcag taccagaact ccatggacac ccaactcggc 120
gacaacgcta tctccggtgg ttccaacgag ggttccaccg acaccacctc tacccacacc 180
accaacaccc agaacaacga ctggttctcc aagctggctt cctccgcttt ctccggcctg 240
ttcggtgctc tgctggctga caagaagacc gaggaaacca ccctgctcga ggaccgtatc 300
ctgaccaccc gtaacggtca caccacctcc accacccagt cctccgtggg tgttacctac 360
ggttactcca cccaagagga ccacgtgtcc ggtcccaaca cctccggcct ggaaacccgt 420
gtggtgcagg ctgagcgctt cttcaagaag cacctgttcg actggacccc cgacaaggct 480
ttcggtcacc tcgagaagct cgagctgccc accgaccaca agggcgtgta cggttgcctg 540
gtggacagct tcgcttacat gcgtaacggc tgggacgtcg aggtgtccgc tgtgggcaac 600
cagttcaacg gtggttgcct gctggtggct atggtgcccg agtggaaaga attcacccct 660
cgcgagaagt accagctgac cctgttcccc caccagttca tctccccccg taccaacatg 720
accgctcaca tcgtggtgcc ctacctgggt gtcaaccgtt acgaccagta caagaagcac 780
aagccctgga ccctggtggt tatggtggtg tctcccctga ccactaacac cgtgtccgct 840
ggccagatca aggtgtacgc taacatcgct cccacccacg tgcacgtcgc gggcgagctg 900
ccttccaaag aaggcatcgt ccccgtcgct tgctccgacg gttacggtgg cctggtcacc 960
accgacccca agaccgctga ccccgtgtac ggcatggtgt acaaccccc tcgcaccaac 1020
taccccggtc gtttcaccaa cctgctggac gtggccgagg cttgccccac cttcctgtgc 1080
ttcgacgagg gcaagcccta cgtggtcacc cgtaccgacg agcagcgtct gctggctaag 1140
ttcgacgtgt ccctggctgc taagcacatg tccaacacct acctgtccgg tatcgctcag 1200
tactacgccc agtactccgg caccatcaac ctgcacttca tgttcaccgg ctccaccgat 1260
tccaaggctc gttacatggt ggcttacgtg ccccctggtg tcgagactcc ccccgacacc 1320
cctgagaagg ctgctcactg catccacgct gagtgggaca ccggcctgaa ctccaagttc 1380
accttctcca tcccttacgt gtccgccgct gactacgctt acaccgcttc cgacgtcgcc 1440
gagactacca acgtgcaggg ctgggtctgc atctaccaga tcacccacgg caaggctgag 1500
caggacaccc tggtcgtgtc cgtgtctgct ggcaaggact tcgaactccg tctgcccatc 1560
gacccccgtt cccagaccac caccaccggc gagtctgccg accctgtgac caccaccgtg 1620
gaaaactacg gtggcgagac tcaggtgcag cgtcgtcagc acaccgacgt gaccttcatc 1680
atggaccgtt tcgtgaagat ccagaacctg aaccctaccc acgtgatcga cctgatgcag 1740
actcaccagc acggcctcgt gggcgctctg ctgcgtgctg ctacctacta cttctccgac 1800

ctcgagatcg tcgtccgtca cgacggcaac ctgacctggg tgcccaacgg tgctcccgag 1860
gctgctctgt ctaacaccgg caaccccacc gcttacctga aggctccctt cacccgtctg 1920
gctctgccct acaccgctcc ccaccgtgtg ctggctaccg tgtacaacgg cacctccaag 1980
tactccgctg gtggcaccgg tcgtcgtggc gacttgggtc ctctggctgc tcgtgtggct 2040
gctcagctgc ccgcttcctt caacttcggt gctatccagg ctaccaccat ccacgaactc 2100
ctcgtgcgta tgaagcgtgc tgagctgtac tgcccccgtc ccctgctggc tgtggaagtg 2160
tcctcccagg accgtcacaa gcagaagatc atcgctcccg ctaagcagct gctgaacttc 2220
gacctgctga agctggctgg cgacgtggaa tccaaccccg gtcccttctt cttcgctgac 2280
gtgcgttcca acttctctaa gctggtggac actatcaacc agatgcaaga ggacatgtcc 2340
accaagcacg gtcccgactt caaccgtctg gtgtccgctt tcgaggaact ggctaccggt 2400
gtcaaggcta tccgtaccgg cctggacgag gctaagccct ggtacaagct gatcaagctg 2460
ctgtcccgtc tgtcctgcat ggctgctgtc gctgctcgtt ccaaggaccc cgtgctggtc 2520
gctatcatgc tggccgacac cggcttggag cgtcagcgtc ctctgaaagt ccgcgctaag 2580
ctgccccagc aagagggccc gtacgctggt cccctcgagc gtcagaagcc cctgaaggtt 2640
aaagccaagg ctcccgtggt caaagaaggc ccatacgagg gtcccgtgaa gaagcccgtc 2700
gctctcaagg tcaaggccaa gaacctgatc gtgaccgagt ccggtgctcc ccccaccgac 2760
ctgcaaaaga tggtcatggg caacaccaag cccgtcgagc tgatcctgga cggcaagacc 2820
gtggctatct gctgcgctac cggcgtgttc ggtactgctt acctggtgcc ccgtcacctg 2880
ttcgctgaga agtacgacaa gatcatgctg gacggtcgtg ctatgaccga ctccgactac 2940
cgtgtgttcg agttcgagat caaagtcaag ggccaggaca tgctgtccga cgctgctctg 3000
atggtgctgc accgtggcaa ccgtgtgcgt gacatcacca agcacttccg tgacaccgct 3060
cgtatgaaga agggcacccc cgtcgtcggt gtcgtgaaca acgctgacgt gggtcgtctg 3120
atcttctccg gcgaggctct gacctacaag gacatcgtcg tgtgcatgga tggcgacacc 3180
atgcctggcc tgttcgctta caaggctgct accaaggctg gttactgcgg tggtgctgtc 3240
ctggctaagg acggtgctga caccttcatc gtgggcaccc actccgctgg cggaaacggt 3300
gtcggttact gctcctgcgt gtcccgttcc atgctgctgc gcatgaaggc tcacgtggac 3360
cccgagcccc agcacgag 3378

<210> 10
<211> 1122
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> modified polyprotein of FMDV Asia strain
<400> 10

Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15
Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30
Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Asn Asn Thr Gln
50 55 60
Asn Asn Asp Trp Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu
65 70 75 80
Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu
85 90 95
Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr
100 105 110

Gln Ser Ser Val Gly Val Thr Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Glu Asp Ala
115 120 125
Val Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Gln Gln Ala
130 135 140
Glu Arg Phe Phe Lys Lys His Leu Phe Asp Trp Thr Pro Asn Leu Ala
145 150 155 160
Phe Gly His Cys Tyr Tyr Leu Glu Leu Pro Thr Glu His Lys Gly Val
165 170 175
Tyr Gly Cys Leu Met Gly Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp
180 185 190
Ile Glu Val Thr Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu
195 200 205
Val Ala Leu Val Pro Glu Leu Lys Glu Leu Asp Thr Arg Gln Lys Tyr
210 215 220
Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met
225 230 235 240
Thr Ala His Ile Asn Val Pro Tyr Val Gly Ile Asn Arg Tyr Asp Gln
245 250 255
Tyr Ala Leu His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ala Pro
260 265 270
Leu Thr Val Lys Thr Gly Gly Ser Glu Gln Ile Lys Val Tyr Met Asn
275 280 285
Ala Ala Pro Thr Tyr Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
290 295 300
Gly Ile Val Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Asn Met Val Thr
305 310 315 320
Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Val Tyr Gly Lys Val Phe Asn Pro
325 330 335
Pro Arg Thr Asn Leu Pro Gly Arg Phe Thr Asn Phe Leu Asp Val Ala
340 345 350
Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Arg Phe Gly Glu Val Pro Phe Val Lys
355 360 365
Thr Val Asn Ser Gly Asp Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Val Ser Leu
370 375 380
Ala Ala Gly His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Gln Tyr
385 390 395 400
Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Met Asn Val His Phe Met Phe Thr Gly
405 410 415
Pro Thr Asp Ala Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val Pro Pro Gly
420 425 430
Met Thr Pro Pro Thr Asp Pro Glu His Ala Ala His Cys Ile His Ser
435 440 445
Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro Tyr
450 455 460
Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Val Ala Glu Thr
465 470 475 480
Thr Ser Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His Gly Lys
485 490 495

Ala Glu Gly Asp Ala Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys Asp Phe
500 505 510
Glu Phe Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Gln Gln Thr Thr Thr Thr Gly
515 520 525
Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu
530 535 540
Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr Asp Val Ala Phe Ile Leu Asp
545 550 555 560
Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Pro Lys Asn Ile Gln Thr Leu Asp Leu
565 570 575
Met Gln Ile Pro Ser His Thr Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ser Ala
580 585 590
Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Val Ala Leu Val His Thr Gly Pro
595 600 605
Val Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Lys Asp Ala Leu Asn Asn Gln
610 615 620
Thr Asn Pro Thr Ala Tyr Gln Lys Gln Pro Ile Thr Arg Leu Ala Leu
625 630 635 640
Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Lys
645 650 655
Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg Gly Asp Met Ala Ala Leu
660 665 670
Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr Ser Phe Asn Tyr Gly Ala
675 680 685
Val Lys Ala Asp Thr Ile Thr Glu Leu Leu Ile Arg Met Lys Arg Ala
690 695 700
Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Leu Asp Thr Thr Gln Asp
705 710 715 720
Arg Arg Lys Gln Glu Ile Ile Ala Pro Glu Lys Gln Val Leu Asn Phe
725 730 735
Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Phe
740 745 750
Phe Phe Ala Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu Val Asp Thr Ile
755 760 765
Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly Pro Asp Phe Asn
770 775 780
Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly Val Lys Ala Ile
785 790 795 800
Arg Thr Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys Leu Ile Lys Leu
805 810 815
Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala Arg Ser Lys Asp
820 825 830
Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly Leu Glu Arg Gln
835 840 845
Arg Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr
850 855 860
Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala Lys Ala
865 870 875 880

Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val
885 890 895
Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr Glu Ser Gly Ala
900 905 910
Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn Thr Lys Pro Val
915 920 925
Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys Cys Ala Thr Gly
930 935 940
Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu Phe Ala Glu Lys
945 950 955 960
Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr Asp Ser Asp Tyr
965 970 975
Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asp Met Leu Ser
980 985 990
Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg Val Arg Asp Ile
995 1000 1005
Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro
1010 1015 1020
Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile Phe
1025 1030 1035
Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Cys Met Asp
1040 1045 1050
Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Ala Ala Thr Lys
1055 1060 1065
Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Asp
1070 1075 1080
Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly
1085 1090 1095
Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Arg Met Lys Ala
1100 1105 1110
His Val Asp Pro Glu Pro Gln His Glu
1115 1120
<210> 11
<211> 3366
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Polynucleotide encoding modified protein of FMDV Asia strain
<400> 11
atgggtgctg gccagtcctc ccctgctacc ggttcccaga accagtccgg caacaccggt 60
tccatcatca acaactacta catgcagcag taccagaact ccatggacac ccagctcggc 120
gacaacgcta tctccggtgg ttccaacgag ggttccaccg acaccacctc cacccacacc 180
aacaacaccc agaacaacga ctggttctcc cgtctggctt cctccgcttt ctccggcctg 240
ttcggtgctc tgctggctga caagaagacc gaggaaacca ccctgctcga ggaccgtatc 300
ctgaccaccc gtaacggtca caccacctct accacccagt cctctgtggg tgtcacctac 360
ggttacgctg tggctgagga cgctgtgtcc ggtcccaaca cctccggcct ggaaacccgt 420
gtgcagcagg ctgagcgctt cttcaagaag cacctgttcg actggacccc caacctggct 480
ttcggtcact gctactacct cgagctgccc accgagcaca agggcgtgta cggttgcctg 540

atgggctcct acgcttacat gcgtaacggc tgggacatcg aagtgaccgc tgtgggcaac 600
cagttcaacg gtggttgcct gctggtggct ctggtgcccg agctgaaaga actggacacc 660
cgtcagaagt accagctgac cctgttcccc caccagttca tcaacccccg taccaacatg 720
accgctcaca tcaacgtgcc ctacgtgggt atcaaccgtt acgaccagta cgctctgcac 780
aagccctgga ccctggtcgt gatggtggtg gctcccctga ccgtcaagac cggtggctcc 840
gagcagatca aggtgtacat gaacgctgct cccacctacg tgcacgtggc cggcgagctg 900
ccctccaaag aaggcatcgt ccccgtcgct tgcgctgacg gttacggcaa catggtcacc 960
accgacccca agaccgctga ccccgtgtac ggcaaggtgt tcaacccccc tcgtaccaac 1020
ctgcccggtc gttttaccaa cttcctcgac gtggccgagg cttgccccac cttcctgcgt 1080
ttcggcgagg tccccttcgt caagactgtg aactccggcg accgtctgct ggctaagttc 1140
gacgtgtccc tggctgctgg tcacatgtcc aacacctacc tggctggcct ggctcagtac 1200
tacacccagt actccggcac catgaacgtc cacttcatgt tcaccggtcc caccgacgct 1260
aaggctcgtt acatggtggc ttacgtgccc cctggcatga ccccccctac cgaccctgaa 1320
cacgctgctc actgcatcca ctccgagtgg gacaccggcc tgaactccaa gttcaccttc 1380
tccatccctt acctgtccgc tgctgactac gcctacaccg cttccgatgt cgccgagact 1440
acctccgtgc agggctgggt ttgcatctac cagatcaccc acggcaaggc tgagggcgac 1500
gctctggtgg tgtccgtgtc cgctggcaag gacttcgagt tccgtctgcc cgtggacgct 1560
cgtcagcaga ccaccaccac cggcgagtcc gctgacccag tgaccaccac cgtggaaaac 1620
tacggtggcg agactcagac cgctcgtcgc ctgcacaccg acgtggcctt catcctggac 1680
cgtttcgtga agctgaccgc tcccaagaac atccagaccc tggacctgat gcagatcccc 1740
tcccacaccc tcgtgggcgc tctgctgcgt tccgctacct actacttctc cgacctggaa 1800
gtcgctctgg tccacaccgg tcccgtgacc tgggtgccca acggtgctcc caaggacgct 1860
ctgaacaacc agaccaaccc caccgcttac cagaagcagc ccatcacccg cctggctctg 1920
ccttacaccg ctccccaccg tgtcctggct actgtgtaca acggcaagac cgcttacggc 1980
gaaaccacct cccgtcgtgg cgacatggct gctctggctc agcgtctgtc cgctcgtctg 2040
cccacctcct tcaactacgg tgctgtgaag gctgacacca tcaccgagct gctgatccgt 2100
atgaagcgtg ctgagactta ctgcccccgt cccctgctgg ctctggacac cacccaggac 2160
cgtcgcaagc aagagatcat cgctcccgag aagcaggtcc tgaacttcga cctgctgaag 2220
ctggctggcg acgtcgagtc caaccccggt cccttcttct tcgctgacgt gcgttccaac 2280
ttctccaagc tggtggacac catcaaccag atgcaagagg acatgtccac caagcacggt 2340
cccgacttca accgtctggt gtccgctttc gaggaactgg ctaccggtgt caaggctatc 2400
cgtaccggcc tggacgaggc taagccctgg tacaagctga tcaagctgct gtcccgtctg 2460
tcctgcatgg ctgctgtcgc tgctcgttcc aaggaccccg tgctggtcgc tatcatgctg 2520
gccgacaccg gcttggagcg ccagcgtcct ctgaaggttc gcgctaagct gcctcagcaa 2580
gagggacctt acgctggtcc cctcgagcgt cagaagcccc tgaaggtcaa ggctaaggct 2640
cccgtggtca aagaaggccc ctacgagggt cccgtgaaga agcccgtcgc tctcaaggtc 2700
aaggccaaga acctgatcgt gaccgagtcc ggtgctcccc ccaccgacct gcaaaagatg 2760
gtcatgggca acaccaagcc cgtcgagctg atcctggacg gaaagaccgt ggctatctgc 2820
tgcgctaccg gcgtgttcgg aaccgcttac ctggtgcccc gtcacctgtt cgctgagaag 2880
tacgacaaga tcatgctgga cggtcgtgct atgaccgact ccgactaccg tgtgttcgag 2940
ttcgagatca aggtcaaggg ccaggacatg ctctccgacg ctgctctgat ggtgctgcac 3000
cgtggcaacc gtgtgcgtga catcaccaag cacttccgtg acaccgctcg tatgaagaag 3060
ggcacccccg tcgtcggtgt cgtgaacaac gctgacgtgg gtcgtctgat cttctccggc 3120
gaggctctga cctacaagga catcgtcgtg tgcatggacg gcgataccat gcctggcctg 3180
ttcgcttaca aggctgctac caaggctggt tactgcggtg gtgctgtgct ggccaaggac 3240
ggtgctgaca ccttcatcgt gggcacccac tccgctggtg gcaacggtgt cggttactgc 3300
tcctgcgtgt cccgttccat gctgctgcgt atgaaggctc acgtggaccc cgagccccag 3360
cacgag 3366

<210> 12
<211> 1126
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Wild-type polyprotein of FMDV Iraq strain
<400> 12
Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15
Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30
Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln
50 55 60
Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu
65 70 75 80
Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu
85 90 95
Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr
100 105 110
Gln Ser Ser Val Gly Val Thr Tyr Gly Tyr Ser Thr Gln Glu Asp His
115 120 125
Val Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala
130 135 140
Glu Arg Phe Phe Lys Lys His Leu Phe Asp Trp Thr Pro Asp Lys Ala
145 150 155 160
Phe Gly His Leu Glu Lys Leu Glu Leu Pro Thr Asp His Lys Gly Val
165 170 175
Tyr Gly His Leu Val Asp Ser Phe Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp
180 185 190
Val Glu Val Ser Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu
195 200 205
Val Ala Met Val Pro Glu Trp Lys Glu Phe Thr Pro Arg Glu Lys Tyr
210 215 220
Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met
225 230 235 240
Thr Ala His Ile Val Val Pro Tyr Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln
245 250 255
Tyr Lys Lys His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ser Pro
260 265 270
Leu Thr Thr Asn Thr Val Ser Ala Gly Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn
275 280 285
Ile Ala Pro Thr His Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
290 295 300
Gly Ile Val Pro Val Ala Cys Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr
305 310 315 320
Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Val Tyr Gly Met Val Tyr Asn Pro

325 330 335
Pro Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg Phe Thr Asn Leu Leu Asp Val Ala
340 345 350
Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys Phe Asp Glu Gly Lys Pro Tyr Val
355 360 365
Val Thr Arg Thr Asp Glu Gln Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Val Ser
370 375 380
Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala Gln
385 390 395 400
Tyr Tyr Ala Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr
405 410 415
Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val Pro Pro
420 425 430
Gly Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr Pro Glu Lys Ala Ala His Cys Ile
435 440 445
His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile
450 455 460
Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Val Ala
465 470 475 480
Glu Thr Thr Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His
485 490 495
Gly Lys Ala Glu Gln Asp Thr Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys
500 505 510
Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Ser Gln Thr Thr Thr
515 520 525
Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly
530 535 540
Gly Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr Asp Val Thr Phe Ile
545 550 555 560
Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Asn Leu Asn Pro Thr His Val Ile
565 570 575
Asp Leu Met Gln Thr His Gln His Gly Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg
580 585 590
Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Ile Val Val Arg His Asp
595 600 605
Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ala Ala Leu Ser
610 615 620
Asn Thr Gly Asn Pro Thr Ala Tyr Leu Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu
625 630 635 640
Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn
645 650 655
Gly Thr Ser Lys Tyr Ser Ala Gly Gly Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu
660 665 670
Gly Pro Leu Ala Ala Arg Val Ala Ala Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn
675 680 685
Phe Gly Ala Ile Gln Ala Thr Thr Ile His Glu Leu Leu Val Arg Met
690 695 700
Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Val Glu Val

705 710 715 720
Ser Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln
725 730 735
Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
740 745 750
Pro Gly Pro Phe Phe Phe Ala Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu
755 760 765
Val Asp Thr Ile Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly
770 775 780
Pro Asp Phe Asn Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly
785 790 795 800
Val Lys Ala Ile Arg Thr Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys
805 810 815
Leu Ile Lys Leu Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala
820 825 830
Arg Ser Lys Asp Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly
835 840 845
Leu Glu Arg Gln Arg Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln
850 855 860
Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val
865 870 875 880
Lys Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val
885 890 895
Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr
900 905 910
Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn
915 920 925
Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys
930 935 940
Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu
945 950 955 960
Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr
965 970 975
Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln
980 985 990
Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg
995 1000 1005
Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys
1010 1015 1020
Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly
1025 1030 1035
Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val
1040 1045 1050
Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys
1055 1060 1065
Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys
1070 1075 1080
Asp Gly Ala Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly

1085 1090 1095
Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu
1100 1105 1110
Arg Met Lys Ala His Val Asp Pro Glu Pro Gln His Glu
1115 1120 1125
<210> 13
<211> 1122
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Wild-type polyprotein of FMDV Asia strain
<400> 13
Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15
Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30
Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Asn Asn Thr Gln
50 55 60
Asn Asn Asp Trp Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu
65 70 75 80
Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu
85 90 95
Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr
100 105 110
Gln Ser Ser Val Gly Val Thr Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Glu Asp Ala
115 120 125
Val Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Gln Gln Ala
130 135 140
Glu Arg Phe Phe Lys Lys His Leu Phe Asp Trp Thr Pro Asn Leu Ala
145 150 155 160
Phe Gly His Cys Tyr Tyr Leu Glu Leu Pro Thr Glu His Lys Gly Val
165 170 175
Tyr Gly Ser Leu Met Gly Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp
180 185 190
Ile Glu Val Thr Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu
195 200 205
Val Ala Leu Val Pro Glu Leu Lys Glu Leu Asp Thr Arg Gln Lys Tyr
210 215 220
Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met
225 230 235 240
Thr Ala His Ile Asn Val Pro Tyr Val Gly Ile Asn Arg Tyr Asp Gln
245 250 255
Tyr Ala Leu His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ala Pro
260 265 270
Leu Thr Val Lys Thr Gly Gly Ser Glu Gln Ile Lys Val Tyr Met Asn
275 280 285

Ala Ala Pro Thr Tyr Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
290 295 300
Gly Ile Val Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Asn Met Val Thr
305 310 315 320
Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Val Tyr Gly Lys Val Phe Asn Pro
325 330 335
Pro Arg Thr Asn Leu Pro Gly Arg Phe Thr Asn Phe Leu Asp Val Ala
340 345 350
Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Arg Phe Gly Glu Val Pro Phe Val Lys
355 360 365
Thr Val Asn Ser Gly Asp Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Val Ser Leu
370 375 380
Ala Ala Gly His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Gln Tyr
385 390 395 400
Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Met Asn Val His Phe Met Phe Thr Gly
405 410 415
Pro Thr Asp Ala Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val Pro Pro Gly
420 425 430
Met Thr Pro Pro Thr Asp Pro Glu His Ala Ala His Cys Ile His Ser
435 440 445
Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro Tyr
450 455 460
Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Val Ala Glu Thr
465 470 475 480
Thr Ser Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His Gly Lys
485 490 495
Ala Glu Gly Asp Ala Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys Asp Phe
500 505 510
Glu Phe Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Gln Gln Thr Thr Thr Thr Gly
515 520 525
Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu
530 535 540
Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr Asp Val Ala Phe Ile Leu Asp
545 550 555 560
Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Pro Lys Asn Ile Gln Thr Leu Asp Leu
565 570 575
Met Gln Ile Pro Ser His Thr Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ser Ala
580 585 590
Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Val Ala Leu Val His Thr Gly Pro
595 600 605
Val Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Lys Asp Ala Leu Asn Asn Gln
610 615 620
Thr Asn Pro Thr Ala Tyr Gln Lys Gln Pro Ile Thr Arg Leu Ala Leu
625 630 635 640
Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Lys
645 650 655
Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg Gly Asp Met Ala Ala Leu
660 665 670

Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr Ser Phe Asn Tyr Gly Ala
675 680 685
Val Lys Ala Asp Thr Ile Thr Glu Leu Leu Ile Arg Met Lys Arg Ala
690 695 700
Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Leu Asp Thr Thr Gln Asp
705 710 715 720
Arg Arg Lys Gln Glu Ile Ile Ala Pro Glu Lys Gln Val Leu Asn Phe
725 730 735
Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Phe
740 745 750
Phe Phe Ala Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu Val Asp Thr Ile
755 760 765
Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly Pro Asp Phe Asn
770 775 780
Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly Val Lys Ala Ile
785 790 795 800
Arg Thr Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys Leu Ile Lys Leu
805 810 815
Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala Arg Ser Lys Asp
820 825 830
Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly Leu Glu Arg Gln
835 840 845
Arg Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr
850 855 860
Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala Lys Ala
865 870 875 880
Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val
885 890 895
Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr Glu Ser Gly Ala
900 905 910
Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn Thr Lys Pro Val
915 920 925
Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys Cys Ala Thr Gly
930 935 940
Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu Phe Ala Glu Lys
945 950 955 960
Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr Asp Ser Asp Tyr
965 970 975
Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asp Met Leu Ser
980 985 990
Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg Val Arg Asp Ile
995 1000 1005
Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro
1010 1015 1020
Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile Phe
1025 1030 1035
Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Cys Met Asp
1040 1045 1050

Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Ala Ala Thr Lys
1055 1060 1065
Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Asp
1070 1075 1080
Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly
1085 1090 1095
Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Arg Met Lys Ala
1100 1105 1110
His Val Asp Pro Glu Pro Gln His Glu
1115 1120
<210> 14
<211> 3378
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Polynucleotide encoding wild-type polyprotein of FMDV Iraq strain
<400> 14
atgggtgctg gccagtcctc ccccgctacc ggttcccaga accagtccgg caacaccggt 60
tccatcatca acaactacta catgcagcag taccagaact ccatggacac ccaactcggc 120
gacaacgcta tctccggtgg ttccaacgag ggttccaccg acaccacctc tacccacacc 180
accaacaccc agaacaacga ctggttctcc aagctggctt cctccgcttt ctccggcctg 240
ttcggtgctc tgctggctga caagaagacc gaggaaacca ccctgctcga ggaccgtatc 300
ctgaccaccc gtaacggtca caccacctcc accacccagt cctccgtggg tgttacctac 360
ggttactcca cccaagagga ccacgtgtcc ggtcccaaca cctccggcct ggaaacccgt 420
gtggtgcagg ctgagcgctt cttcaagaag cacctgttcg actggacccc cgacaaggct 480
ttcggtcacc tcgagaagct cgagctgccc accgaccaca agggcgtgta cggtcacctg 540
gtggacagct tcgcttacat gcgtaacggc tgggacgtcg aggtgtccgc tgtgggcaac 600
cagttcaacg gtggttgcct gctggtggct atggtgcccg agtggaaaga attcacccct 660
cgcgagaagt accagctgac cctgttcccc caccagttca tctccccccg taccaacatg 720
accgctcaca tcgtggtgcc ctacctgggt gtcaaccgtt acgaccagta caagaagcac 780
aagccctgga ccctggtggt tatggtggtg tctcccctga ccactaacac cgtgtccgct 840
ggccagatca aggtgtacgc taacatcgct cccacccacg tgcacgtcgc gggcgagctg 900
ccttccaaag aaggcatcgt ccccgtcgct tgctccgacg gttacggtgg cctggtcacc 960
accgacccca agaccgctga ccccgtgtac ggcatggtgt acaacccccc tcgcaccaac 1020
taccccggtc gtttcaccaa cctgctggac gtggccgagg cttgccccac cttcctgtgc 1080
ttcgacgagg gcaagcccta cgtggtcacc cgtaccgacg agcagcgtct gctggctaag 1140
ttcgacgtgt ccctggctgc taagcacatg tccaacacct acctgtccgg tatcgctcag 1200
tactacgccc agtactccgg caccatcaac ctgcacttca tgttcaccgg ctccaccgat 1260
tccaaggctc gttacatggt ggcttacgtg ccccctggtg tcgagactcc ccccgacacc 1320
cctgagaagg ctgctcactg catccacgct gagtgggaca ccggcctgaa ctccaagttc 1380
accttctcca tcccttacgt gtccgccgct gactacgctt acaccgcttc cgacgtcgcc 1440
gagactacca acgtgcaggg ctgggtctgc atctaccaga tcacccacgg caaggctgag 1500
caggacaccc tggtcgtgtc cgtgtctgct ggcaaggact tcgaactccg tctgcccatc 1560
gacccccgtt cccagaccac caccaccggc gagtctgccg accctgtgac caccaccgtg 1620
gaaaactacg gtggcgagac tcaggtgcag cgtcgtcagc acaccgacgt gaccttcatc 1680
atggaccgtt tcgtgaagat ccagaacctg aaccctaccc acgtgatcga cctgatgcag 1740
actcaccagc acggcctcgt gggcgctctg ctgcgtgctg ctacctacta cttctccgac 1800
ctcgagatcg tcgtccgtca cgacggcaac ctgacctggg tgcccaacgg tgctcccgag 1860

gctgctctgt ctaacaccgg caaccccacc gcttacctga aggctccctt cacccgtctg 1920
gctctgccct acaccgctcc ccaccgtgtg ctggctaccg tgtacaacgg cacctccaag 1980
tactccgctg gtggcaccgg tcgtcgtggc gacttgggtc ctctggctgc tcgtgtggct 2040
gctcagctgc ccgcttcctt caacttcggt gctatccagg ctaccaccat ccacgaactc 2100
ctcgtgcgta tgaagcgtgc tgagctgtac tgcccccgtc ccctgctggc tgtggaagtg 2160
tcctcccagg accgtcacaa gcagaagatc atcgctcccg ctaagcagct gctgaacttc 2220
gacctgctga agctggctgg cgacgtggaa tccaaccccg gtcccttctt cttcgctgac 2280
gtgcgttcca acttctctaa gctggtggac actatcaacc agatgcaaga ggacatgtcc 2340
accaagcacg gtcccgactt caaccgtctg gtgtccgctt tcgaggaact ggctaccggt 2400
gtcaaggcta tccgtaccgg cctggacgag gctaagccct ggtacaagct gatcaagctg 2460
ctgtcccgtc tgtcctgcat ggctgctgtc gctgctcgtt ccaaggaccc cgtgctggtc 2520
gctatcatgc tggccgacac cggcttggag cgtcagcgtc ctctgaaagt ccgcgctaag 2580
ctgccccagc aagagggccc gtacgctggt cccctcgagc gtcagaagcc cctgaaggtt 2640
aaagccaagg ctcccgtggt caaagaaggc ccatacgagg gtcccgtgaa gaagcccgtc 2700
gctctcaagg tcaaggccaa gaacctgatc gtgaccgagt ccggtgctcc ccccaccgac 2760
ctgcaaaaga tggtcatggg caacaccaag cccgtcgagc tgatcctgga cggcaagacc 2820
gtggctatct gctgcgctac cggcgtgttc ggtactgctt acctggtgcc ccgtcacctg 2880
ttcgctgaga agtacgacaa gatcatgctg gacggtcgtg ctatgaccga ctccgactac 2940
cgtgtgttcg agttcgagat caaagtcaag ggccaggaca tgctgtccga cgctgctctg 3000
atggtgctgc accgtggcaa ccgtgtgcgt gacatcacca agcacttccg tgacaccgct 3060
cgtatgaaga agggcacccc cgtcgtcggt gtcgtgaaca acgctgacgt gggtcgtctg 3120
atcttctccg gcgaggctct gacctacaag gacatcgtcg tgtgcatgga tggcgacacc 3180
atgcctggcc tgttcgctta caaggctgct accaaggctg gttactgcgg tggtgctgtc 3240
ctggctaagg acggtgctga caccttcatc gtgggcaccc actccgctgg cggaaacggt 3300
gtcggttact gctcctgcgt gtcccgttcc atgctgctgc gcatgaaggc tcacgtggac 3360
cccgagcccc agcacgag 3378

<210> 15
<211> 3366
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Polynucleotide encoding wild-type polyprotein of FMDV Asia strain
<400> 15

atgggtgctg gccagtcctc ccctgctacc ggttcccaga accagtccgg caacaccggt 60
tccatcatca acaactacta catgcagcag taccagaact ccatggacac ccagctcggc 120
gacaacgcta tctccggtgg ttccaacgag ggttccaccg acaccacctc cacccacacc 180
aacaacaccc agaacaacga ctggttctcc cgtctggctt cctccgcttt ctccggcctg 240
ttcggtgctc tgctggctga caagaagacc gaggaaacca ccctgctcga ggaccgtatc 300
ctgaccaccc gtaacggtca caccacctct accacccagt cctctgtggg tgtcacctac 360
ggttacgctg tggctgagga cgctgtgtcc ggtcccaaca cctccggcct ggaaacccgt 420
gtgcagcagg ctgagcgctt cttcaagaag cacctgttcg actggacccc caacctggct 480
ttcggtcact gctactacct cgagctgccc accgagcaca agggcgtgta cggttccctg 540
atgggctcct acgcttacat gcgtaacggc tgggacatcg aagtgaccgc tgtgggcaac 600
cagttcaacg gtggttgcct gctggtggct ctggtgcccg agctgaaaga actggacacc 660
cgtcagaagt accagctgac cctgttcccc caccagttca tcaaccccg taccaacatg 720
accgctcaca tcaacgtgcc ctacgtgggt atcaaccgtt acgaccagta cgctctgcac 780
aagccctgga ccctggtcgt gatggtggtg gctcccctga ccgtcaagac cggtggctcc 840
gagcagatca aggtgtacat gaacgctgct cccacctacg tgcacgtggc cggcgagctg 900

ccctccaaag aaggcatcgt ccccgtcgct tgcgctgacg gttacggcaa catggtcacc 960
accgacccca agaccgctga ccccgtgtac ggcaaggtgt tcaacccccc tcgtaccaac 1020
ctgcccggtc gttttaccaa cttcctcgac gtggccgagg cttgccccac cttcctgcgt 1080
ttcggcgagg tcccccttcgt caagactgtg aactccggcg accgtctgct ggctaagttc 1140
gacgtgtccc tggctgctgg tcacatgtcc aacacctacc tggctggcct ggctcagtac 1200
tacacccagt actccggcac catgaacgtc cacttcatgt tcaccggtcc caccgacgct 1260
aaggctcgtt acatggtggc ttacgtgccc cctggcatga ccccccctac cgaccctgaa 1320
cacgctgctc actgcatcca ctccgagtgg gacaccggcc tgaactccaa gttcaccttc 1380
tccatccctt acctgtccgc tgctgactac gcctacaccg cttccgatgt cgccgagact 1440
acctccgtgc agggctgggt ttgcatctac cagatcaccc acggcaaggc tgagggcgac 1500
gctctggtgg tgtccgtgtc cgctggcaag gacttcgagt tccgtctgcc cgtggacgct 1560
cgtcagcaga ccaccaccac cggcgagtcc gctgacccag tgaccaccac cgtggaaaac 1620
tacggtggcg agactcagac cgctcgtcgc ctgcacaccg acgtggcctt catcctggac 1680
cgtttcgtga agctgaccgc tcccaagaac atccagaccc tggacctgat gcagatcccc 1740
tcccacaccc tcgtgggcgc tctgctgcgt tccgctacct actacttctc cgacctggaa 1800
gtcgctctgg tccacaccgg tcccgtgacc tgggtgccca acggtgctcc caaggacgct 1860
ctgaacaacc agaccaaccc caccgcttac cagaagcagc ccatcacccg cctggctctg 1920
ccttacaccg ctccccaccg tgtcctggct actgtgtaca acggcaagac cgcttacggc 1980
gaaaccacct cccgtcgtgg cgacatggct gctctggctc agcgtctgtc cgctcgtctg 2040
cccacctcct tcaactacgg tgctgtgaag gctgacacca tcaccgagct gctgatccgt 2100
atgaagcgtg ctgagactta ctgcccccgt cccctgctgg ctctggacac cacccaggac 2160
cgtcgcaagc aagagatcat cgctcccgag aagcaggtcc tgaacttcga cctgctgaag 2220
ctggctggcg acgtcgagtc caaccccggt cccttcttct tcgctgacgt gcgttccaac 2280
ttctccaagc tggtggacac catcaaccag atgcaagagg acatgtccac caagcacggt 2340
cccgacttca accgtctggt gtccgctttc gaggaactgg ctaccggtgt caaggctatc 2400
cgtaccggcc tggacgaggc taagccctgg tacaagctga tcaagctgct gtcccgtctg 2460
tcctgcatgg ctgctgtcgc tgctcgttcc aaggaccccg tgctggtcgc tatcatgctg 2520
gccgacaccg gcttggagcg ccagcgtcct ctgaaggttc gcgctaagct gcctcagcaa 2580
gagggacctt acgctggtcc cctcgagcgt cagaagcccc tgaaggtcaa ggctaaggct 2640
cccgtggtca aagaaggccc ctacgagggt cccgtgaaga agcccgtcgc tctcaaggtc 2700
aaggccaaga acctgatcgt gaccgagtcc ggtgctcccc ccaccgacct gcaaaagatg 2760
gtcatgggca acaccaagcc cgtcgagctg atcctggacg gaaagaccgt ggctatctgc 2820
tgcgctaccg gcgtgttcgg aaccgcttac ctggtgcccc gtcacctgtt cgctgagaag 2880
tacgacaaga tcatgctgga cggtcgtgct atgaccgact ccgactaccg tgtgttcgag 2940
ttcgagatca aggtcaaggg ccaggacatg ctctccgacg ctgctctgat ggtgctgcac 3000
cgtggcaacc gtgtgcgtga catcaccaag cacttccgtg acaccgctcg tatgaagaag 3060
ggcacccccg tcgtcggtgt cgtgaacaac gctgacgtgg gtcgtctgat cttctccggc 3120
gaggctctga cctacaagga catcgtcgtg tgcatggacg gcgataccat gcctggcctg 3180
ttcgcttaca aggctgctac caaggctggt tactgcggtg gtgctgtgct ggccaaggac 3240
ggtgctgaca ccttcatcgt gggcacccac tccgctggtg gcaacggtgt cggttactgc 3300
tcctgcgtgt cccgttccat gctgctgcgt atgaaggctc acgtggaccc cgagccccag 3360
cacgag 3366

<210> 16
<211> 1184
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> FMDV capsid protein in adenovirus

<400> 16

Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15

Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30

Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser
35 40 45

Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln
50 55 60

Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu
85 90 95

Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr
100 105 110

Gln Ser Ser Val Gly Val Thr His Gly Tyr Ser Thr Glu Glu Asp His
115 120 125

Val Ala Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala
130 135 140

Glu Arg Phe Tyr Lys Lys Tyr Leu Phe Asp Trp Thr Thr Asp Lys Ala
145 150 155 160

Phe Gly His Leu Glu Lys Leu Glu Leu Pro Ser Asp His His Gly Val
165 170 175

Phe Gly Cys Leu Val Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp
180 185 190

Val Glu Val Ser Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu
195 200 205

Val Ala Met Val Pro Glu Trp Lys Glu Phe Asp Thr Arg Glu Lys Tyr
210 215 220

Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met
225 230 235 240

Thr Ala His Ile Thr Val Pro Tyr Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln
245 250 255

Tyr Lys Lys His Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ser Pro
260 265 270

Leu Thr Val Asn Asn Thr Ser Ala Ala Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn
275 280 285

Ile Ala Pro Thr Tyr Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
290 295 300

Gly Ile Phe Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr
305 310 315 320

Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ala Tyr Gly Lys Val Tyr Asn Pro
325 330 335

Pro Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg Phe Thr Asn Leu Leu Asp Val Ala
340 345 350

Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys Phe Asp Asp Gly Lys Pro Tyr Val
355 360 365

Thr Thr Arg Thr Asp Asp Thr Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Leu Ser

370 375 380
Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala Gln
385 390 395 400
Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr
405 410 415
Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Ile Pro Pro
420 425 430
Gly Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr Pro Glu Arg Ala Ala His Cys Ile
435 440 445
His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile
450 455 460
Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala
465 470 475 480
Glu Thr Ile Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His
485 490 495
Gly Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys
500 505 510
Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Gln Gln Thr Thr Ala
515 520 525
Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly
530 535 540
Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr Asp Ile Gly Phe Ile
545 550 555 560
Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Leu Ser Pro Thr His Val Ile
565 570 575
Asp Leu Met Gln Ala His Gln His Gly Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg
580 585 590
Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Ile Val Val Arg His Glu
595 600 605
Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ser Ala Leu Leu
610 615 620
Asn Thr Ser Asn Pro Thr Ala Tyr Asn Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu
625 630 635 640
Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn
645 650 655
Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met
660 665 670
Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn
675 680 685
Tyr Gly Ala Ile Lys Ala Asp Ala Ile His Glu Leu Leu Val Arg Met
690 695 700
Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Ile Glu Val
705 710 715 720
Ser Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln
725 730 735
Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
740 745 750
Pro Gly Pro Phe Phe Phe Ala Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu

755 760 765
Val Asp Thr Ile Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly
770 775 780
Pro Asp Phe Asn Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly
785 790 795 800
Val Lys Ala Ile Arg Thr Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys
805 810 815
Leu Ile Lys Leu Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala
820 825 830
Arg Ser Lys Asp Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly
835 840 845
Leu Glu Ile Leu Asp Ser Thr Phe Val Val Lys Lys Ile Ser Asp Ser
850 855 860
Leu Ser Ser Leu Phe His Val Pro Ala Pro Val Phe Ser Phe Gly Ala
865 870 875 880
Pro Ile Leu Leu Ala Gly Leu Val Lys Val Ala Ser Ser Phe Phe Arg
885 890 895
Ser Thr Pro Glu Asp Leu Glu Arg Ala Glu Lys Gln Arg Gln Arg Pro
900 905 910
Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala Gly
915 920 925
Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala Lys Ala Pro Val
930 935 940
Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val Ala Leu
945 950 955 960
Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr Glu Ser Gly Ala Pro Pro
965 970 975
Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn Thr Lys Pro Val Glu Leu
980 985 990
Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys Cys Ala Thr Gly Val Phe
995 1000 1005
Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu Phe Ala Glu Lys Tyr
1010 1015 1020
Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr Asp Ser Asp Tyr
1025 1030 1035
Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asp Met Leu
1040 1045 1050
Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg Val Arg
1055 1060 1065
Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly
1070 1075 1080
Thr Pro Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu
1085 1090 1095
Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Thr
1100 1105 1110
Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Ala Ala
1115 1120 1125
Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly

1130 1135 1140
Ala Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly
1145 1150 1155
Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Arg Met
1160 1165 1170
Lys Ala His Val Asp Pro Glu Pro Gln His Glu
1175 1180
<210> 17
<211> 3552
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Codon-optimized polynucleotide encoding FMDV capsid precursor
<400> 17
atgggggctg ggcagtcctc tcccgccaca ggctcacaga atcagtcagg caacacaggg 60
tctattatca acaattatta tatgcagcag taccagaact ccatggacac ccagctggga 120
gataacgcca tctccggcgg aagcaatgag gggtccacag acaccacaag cacccacacc 180
acaaacacac agaacaatga ttggttcagc aagctggcct ccagcgcttt taccggactc 240
ttcggggccc tgctcgctga caagaaaacc gaggaaacca cactgctcga ggatcgcatc 300
ctgaccacaa ggaacggcca caccacatcc accacacagt cttcagtggg agtcacccac 360
gggtacagca cagaggaaga ccatgtggcc ggcccaaata cctctggact ggaaacacgc 420
gtggtccagg ccgagcggtt ttacaagaaa tatctgttcg actggaccac agataaggcc 480
tttggccacc tggagaaact ggaactccct tcagatcacc atggcgtgtt cggatgtctg 540
gtcgactcct acgcctatat gcgcaacggc tgggatgtgg aagtctccgc cgtgggaaac 600
cagtttaatg gaggatgcct gctcgtggct atggtcccag agtggaagga attcgacacc 660
agggagaaat accagctgac actctttcct caccagttca tctcccccag aacaaacatg 720
accgcccata ttaccgtgcc atacctgggc gtcaatcgct acgaccagta taagaaacac 780
aagccttgga ccctggtggt catggtggtc tcacccctca cagtgaacaa tacctccgcc 840
gctcagatca aagtctacgc caacattgct cccacctatg tgcacgtcgc cggggaactg 900
ccatccaagg agggcatctt ccctgtggcc tgtgctgacg ggtacggagg gctggtcacc 960
acagacccca agaccgccga tccagcttac ggcaaagtgt ataacccccc aaggaccaat 1020
taccccggaa gattcacaaa cctgctcgat gtggccgagg cttgcccaac ctttctgtgt 1080
ttcgacgatg gaaagcctta cgtgaccaca agaacagacg atacccgact gctcgccaag 1140
ttcgacctga gcctcgccgc taaacacatg tctaacacct acctgtcagg gatcgcccag 1200
tactataccc agtattccgg cacaattaat ctgcatttta tgttcacagg atctaccgac 1260
tcaaaggcca gatacatggt ggcttatatc cctcccggag tcgaaacacc acctgacacc 1320
cctgagcgag ctgctcactg catccatgcc gaatgggata ccgggctgaa ctccaagttt 1380
acattcagca ttccctacgt gtctgccgct gactacgcct ataccgctag cgatacagcc 1440
gagaccatca acgtgcaggg gtgggtctgt atctaccaga ttacccacgg caaagccgaa 1500
aatgacacac tggtggtctc tgtgtcagcc gggaaggact tcgagctgcg actccccatc 1560
gatccacgac agcagaccac agctaccgga gagtccgctg accctgtgac cacaaccgtc 1620
gaaaactacg gcggagagac ccagattcag cgccggcacc atacagacat cggctttatt 1680
atggatcgct tcgtgaagat ccagtccctg agccccaccc acgtgattga cctcatgcag 1740
gctcaccagc atggactggt gggagctctg ctccgagctg ctacctacta tttctccgat 1800
ctggaaatcg tggtccggca tgagggaaac ctgacctggg tgcctaatgg ggcccccgag 1860
tcagctctgc tcaacacatc caatcccacc gcctacaaca aagctccatt caccagactg 1920
gccctcccat atacagctcc tcaccgagtg ctggctaccg tctacaatgg cacaagcaag 1980
tatgctgtgg gaggctctgg aaggagaggg gacatgggca gcctcgctgc tcgagtggtc 2040

aagcagctgc cagcttcttt caactacgga gccatcaaag ccgatgctat tcacgaactg 2100
ctcgtgcgaa tgaagcgcgc cgagctgtat tgccccaggc cactgctcgc catcgaggtg 2160
tccagccagg acagacataa gcagaaaatc attgccccag ctaagcagct gctcaacttt 2220
gacctgctca aactggccgg agatgtggaa agcaatcctg ggcccttctt tttcgccgac 2280
gtgaggtcca acttcagcaa actggtcgac accatcaatc agatgcagga ggatatgtca 2340
accaagcacg gccccgactt taaccggctg gtgtccgcct tcgaggaact cgctaccggc 2400
gtgaaggcca tcaggacagg actggacgag gccaaaccat ggtacaagct gatcaagctg 2460
ctctctcgcc tctcatgtat ggctgctgtg gctgctcgga gcaaggaccc cgtgctggtc 2520
gccatcatgc tcgctgacac cggcctggag attctcgatt ctacatttgt ggtcaagaaa 2580
atctctgact cactgtcttc actcttccac gtgccagccc ctgtcttttc cttcggagct 2640
ccaattctgc tcgctggact ggtgaaagtc gcctccagct ttttccggtc caccccagag 2700
gacctggaaa gggccgagaa gcagcgtcag agacctctga aagtgagagc taagctccca 2760
cagcaggaag gaccttacgc tggcccgttg gagagacaga aaccgctgaa agtgaaagca 2820
aaagccccgg tcgtcaagga aggaccttac gagggaccgg tgaagaagcc tgtcgctttg 2880
aaagtgaaag ctaagaactt gatagtcact gagagtggtg ccccaccgac cgacttgcaa 2940
aagatggtca tgggcaacac aaagcctgtt gagctcatcc ttgacgggaa gacagtagcc 3000
atctgttgtg ctactggagt gtttggcact gcttacctcg tgcctcgtca tcttttcgca 3060
gagaagtatg acaagatcat gctggatggc agagccatga cagacagtga ctacagagtg 3120
tttgagtttg agattaaagt aaaaggacag gacatgctct cagacgctgc gctcatggtg 3180
ctccaccgtg ggaaccgcgt gagagatatc acgaaacact ttcgtgatac agcaagaatg 3240
aagaaaggca cccccgtcgt cggtgtggtc aacaacgccg acgttgggag actgattttc 3300
tctggtgagg ccctcaccta caaggatatt gtagtgacca tggacggaga caccatgcct 3360
ggcctctttg cctacaaagc cgccaccaag gcaggctact gtggaggagc cgttctcgcc 3420
aaggacgggg ccgacacttt catcgtcggc actcactccg caggaggcaa tggagttgga 3480
tactgctcat gcgtttccag gtccatgctt ctcagaatga aggcacacgt tgaccctgaa 3540
ccacaacacg ag 3552

<210> 18
<211> 745
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> CMV promoter
<400> 18

tttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg 60
ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga 120
cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat 180
gggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa 240
gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca 300
tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca 360
tggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat 420
ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg 480
actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac 540
ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc tggagacgcc 600
atccacgctg ttttgacctc catagaagac accgggaccg atccagcctc cgcggccggg 660
aacggtgcat tggaacgcgg attccccgtg ccaagagtga cgtaagtacc gcctatagag 720
tctataggcc cacccccttg gcttc 745

<210> 19
<211> 104

<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> Synthetic enhancer
<400> 19
cttgaggtgt ggcaggcttg agatctggcc atacacttga gtgacaatga catccacttt 60
gcctttctct ccacaggtgt ccactcccag gtccaactgc agcc 104
<210> 20
<211> 4579
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> CMV promoter -synthetic enhancer- codon optimized FMDV capsid gene - SV40 Poly
<400> 20
tttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg 60
ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga 120
cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat 180
gggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa 240
gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca 300
tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca 360
tggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat 420
ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg 480
actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac 540
ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc tggagacgcc 600
atccacgctg ttttgacctc catagaagac accgggaccg atccagcctc cgcggccggg 660
aacggtgcat tggaacgcgg attccccgtg ccaagagtga cgtaagtacc gcctatagag 720
tctataggcc cacccccttg gcttccttga ggtgtggcag gcttgagatc tggccataca 780
cttgagtgac aatgacatcc actttgcctt tctctccaca ggtgtccact cccaggtcca 840
actgcagccg cggccgcatg ggggctgggc agtcctctcc cgccacaggc tcacagaatc 900
agtcaggcaa cacagggtct attatcaaca attattatat gcagcagtac cagaactcca 960
tggacaccca gctgggagat aacgccatct ccggcggaag caatgagggg tccacagaca 1020
ccacaagcac ccacaccaca aacacacaga acaatgattg gttcagcaag ctggcctcca 1080
gcgcttttac cggactcttc ggggccctgc tcgctgacaa gaaaaccgag gaaaccacac 1140
tgctcgagga tcgcatcctg accacaagga acggccacac cacatccacc acacagtctt 1200
cagtgggagt cacccacggg tacagcacag aggaagacca tgtggccggc ccaaatacct 1260
ctggactgga aacacgcgtg gtccaggccg agcggtttta caagaaatat ctgttcgact 1320
ggaccacaga taaggccttt ggccacctgg agaaactgga actcccttca gatcaccatg 1380
gcgtgttcgg atgtctggtc gactcctacg cctatatgcg caacggctgg gatgtggaag 1440
tctccgccgt gggaaaccag tttaatggag gatgcctgct cgtggctatg gtcccagagt 1500
ggaaggaatt cgacaccagg gagaaatacc agctgacact ctttcctcac cagttcatct 1560
cccccagaac aaacatgacc gcccatatta ccgtgccata cctgggcgtc aatcgctacg 1620
accagtataa gaaacacaag ccttggaccc tggtggtcat ggtggtctca cccctcacag 1680
tgaacaatac ctccgccgct cagatcaaag tctacgccaa cattgctccc acctatgtgc 1740
acgtcgccgg ggaactgcca tccaaggagg gcatcttccc tgtggcctgt gctgacgggt 1800
acggagggct ggtcaccaca gaccccaaga ccgccgatcc agcttacggc aaagtgtata 1860
acccccccaag gaccaattac cccggaagat tcacaaacct gctcgatgtg gccgaggctt 1920
gcccaacctt tctgtgtttc gacgatggaa agccttacgt gaccacaaga acagacgata 1980
cccgactgct cgccaagttc gacctgagcc tcgccgctaa acacatgtct aacacctacc 2040

tgtcagggat cgcccagtac tatacccagt attccggcac aattaatctg cattttatgt 2100
tcacaggatc taccgactca aaggccagat acatggtggc ttatatccct cccggagtcg 2160
aaacaccacc tgacacccct gagcgagctg ctcactgcat ccatgccgaa tgggataccg 2220
ggctgaactc caagtttaca ttcagcattc cctacgtgtc tgccgctgac tacgcctata 2280
ccgctagcga tacagccgag accatcaacg tgcaggggtg ggtctgtatc taccagatta 2340
cccacggcaa agccgaaaat gacacactgg tggtctctgt gtcagccggg aaggacttcg 2400
agctgcgact ccccatcgat ccacgacagc agaccacagc taccggagag tccgctgacc 2460
ctgtgaccac aaccgtcgaa aactacggcg gagagaccca gattcagcgc cggcaccata 2520
cagacatcgg ctttattatg gatcgcttcg tgaagatcca gtccctgagc cccacccacg 2580
tgattgacct catgcaggct caccagcatg gactggtggg agctctgctc cgagctgcta 2640
cctactattt ctccgatctg gaaatcgtgg tccggcatga gggaaacctg acctgggtgc 2700
ctaatggggc ccccgagtca gctctgctca acacatccaa tcccaccgcc tacaacaaag 2760
ctccattcac cagactggcc ctcccatata cagctcctca ccgagtgctg gctaccgtct 2820
acaatggcac aagcaagtat gctgtgggag gctctggaag gagaggggac atgggcagcc 2880
tcgctgctcg agtggtcaag cagctgccag cttctttcaa ctacggagcc atcaaagccg 2940
atgctattca cgaactgctc gtgcgaatga agcgcgccga gctgtattgc cccaggccac 3000
tgctcgccat cgaggtgtcc agccaggaca gacataagca gaaaatcatt gccccagcta 3060
agcagctgct caactttgac ctgctcaaac tggccggaga tgtggaaagc aatcctgggc 3120
ccttcttttt cgccgacgtg aggtccaact tcagcaaact ggtcgacacc atcaatcaga 3180
tgcaggagga tatgtcaacc aagcacggcc ccgactttaa ccggctggtg tccgccttcg 3240
aggaactcgc taccggcgtg aaggccatca ggacaggact ggacgaggcc aaaccatggt 3300
acaagctgat caagctgctc tctcgcctct catgtatggc tgctgtggct gctcggagca 3360
aggaccccgt gctggtcgcc atcatgctcg ctgacaccgg cctggagatt ctcgattcta 3420
catttgtggt caagaaaatc tctgactcac tgtcttcact cttccacgtg ccagcccctg 3480
tcttttcctt cggagctcca attctgctcg ctggactggt gaaagtcgcc tccagctttt 3540
tccggtccac cccagaggac ctggaaaggg ccgagaagca gcgtcagaga cctctgaaag 3600
tgagagctaa gctcccacag caggaaggac cttacgctgg cccgttggag agacagaaac 3660
cgctgaaagt gaaagcaaaa gccccggtcg tcaaggaagg accttacgag ggaccggtga 3720
agaagcctgt cgctttgaaa gtgaaagcta agaacttgat agtcactgag agtggtgccc 3780
caccgaccga cttgcaaaag atggtcatgg gcaacacaaa gcctgttgag ctcatccttg 3840
acgggaagac agtagccatc tgttgtgcta ctggagtgtt tggcactgct tacctcgtgc 3900
ctcgtcatct tttcgcagag aagtatgaca agatcatgct ggatggcaga gccatgacag 3960
acagtgacta cagagtgttt gagtttgaga ttaaagtaaa aggacaggac atgctctcag 4020
acgctgcgct catggtgctc caccgtggga accgcgtgag agatatcacg aaacactttc 4080
gtgatacagc aagaatgaag aaaggcaccc ccgtcgtcgg tgtggtcaac aacgccgacg 4140
ttgggagact gattttctct ggtgaggccc tcacctacaa ggatattgta gtgaccatgg 4200
acggagacac catgcctggc ctctttgcct acaaagccgc caccaaggca ggctactgtg 4260
gaggagccgt tctcgccaag gacggggccg acactttcat cgtcggcact cactccgcag 4320
gaggcaatgg agttggatac tgctcatgcg tttccaggtc catgcttctc agaatgaagg 4380
cacacgttga ccctgaacca caacacgagt agtaggcggc cgctctagac tagctagaaa 4440
gatccgggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacaa 4500
atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca 4560
atgtatctta tcatgtctg 4579

(57) Формула изобретения

1. Рекомбинантный вирусный вектор, экспрессирующий антиген вируса ящура (FMDV), который образует вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV, отличающийся тем, что указанный антиген FMDV представляет собой

модифицированный полипептид P1, который образует дисульфидный мостик, что является следствием модификации полипептида P1 цистеиновой заменой в положении, соответствующем 179 аминокислоте в SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 или 16, и при этом указанные вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV обладают повышенной термо- и кислотоустойчивостью.

2. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, где антиген FMDV экспрессируется бакуловирусным вектором в клетках насекомого.

3. Рекомбинантный вирусный вектор по п. 1, где вирусный вектор представляет собой аденовирус.

4. Рекомбинантный вирусный вектор по любому из пп. 1-3, где антиген FMDV включает полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 или 16.

5. Рекомбинантный вирусный вектор по любому из пп. 1-3, где антиген FMDV кодируется полинуклеотидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 17 или 20.

6. Композиция для индукции иммунной реакции у животного против FMDV, содержащая рекомбинантный вирусный вектор по любому из пп. 1-5, фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или носитель.

7. Плазмида, экспрессирующая антиген FMDV, где антиген FMDV образует вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV, отличающаяся тем, что включает полинуклеотид, кодирующий антиген FMDV, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 или 16.

8. Плазмида по п. 7, где полинуклеотид, кодирующий антиген FMDV, имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 17 или 20.

9. Плазмида по п. 7 или 8, где полинуклеотид функционально соединен с промотором.

10. Клетка насекомого, стабильно трансформированная плазмидой по п. 7, причем указанная клетка экспрессирует вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV.

11. По существу очищенный пустой капсид FMDV или вирусоподобная частица FMDV, экспрессированные в стабильно трансфицированных клетках насекомого по п. 10, где вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV очищены по меньшей мере на 60%-98% и включают полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 или 16.

12. Пустой капсид FMDV или вирусоподобная частица FMDV по п. 11, где полипептид представляет собой модифицированный P1 FMDV, включающий цистеиновую замену в позиции, соответствующей аминокислоте 179 SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 или 16.

13. Способ индукции иммунной реакции у животного против FMDV, включающий по меньшей мере одно введение композиции по п. 6, или вирусного вектора по пп. 1-5, или вирусоподобных частиц или пустых капсидов FMDV по любому из пп. 11, 12.

14. Способ по п. 13, включающий введение по схеме прайм-буст.

15. Способ по п. 14, где схема прайм-буст включает прайм-введение композиции по п. 6 и буст-введение композиции, включающей рекомбинантный вирусный вектор, включающий полинуклеотид, для экспрессии in vivo антигена FMDV, для защиты животного от FMDV и/или для предотвращения развития заболевания у инфицированного животного.

16. Способ по п. 14, где схема прайм-буст включает прайм-введение композиции, включающей рекомбинантный вирусный вектор, включающий полинуклеотид, для экспрессии in vivo антигена FMDV, и буст-введение композиции по п. 6 для защиты

животного от FMDV и/или для предотвращения развития заболевания у инфицированного животного.

17. Способ по п. 13, дополнительно включающий по меньшей мере одно введение другой композиции, содержащей рекомбинантный вирусный вектор, содержащий полинуклеотид для экспрессии антигена FMDV in vivo.

18. Способ по п. 17, где указанная композиция FMDV включает вирусоподобные частицы или пустые капсиды FMDV, экспрессированные in vitro, и вирусный вектор, экспрессирующий антигены FMDV in vivo.

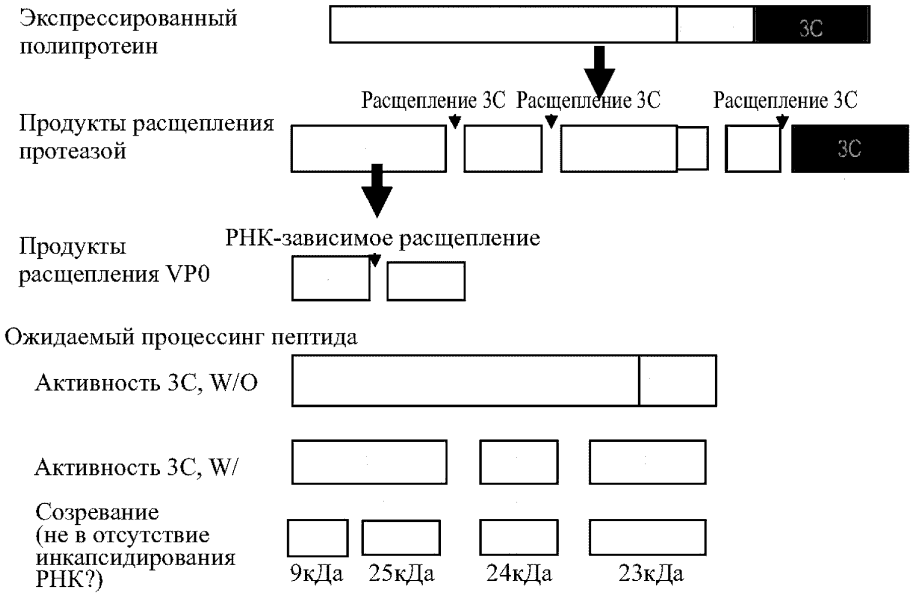
19. Способ по любому из пп. 13-18, где способ предназначен для защиты положительных на антитела материнского происхождения (MDA-положительных) животных от заражения FMDV.

1

SEQ ID NO:	Тип	Описание гена
1	Белок	Полипротеин дикого типа FMDV, штамм A24 Cruzeiro (GenBank AAT01711)
2	Белок	Модифицированный полипротеин штамма A24 Cruzeiro в VP2 (H93C) или P1 (H179C) (в pMEB097)
3	ДНК	Полинуклеотид, кодирующий модифицированный полипротеин FMDV A24 (в pMEB097)
4	Белок	Немодифицированный полипротеин штамма A24 Cruzeiro (в pMEB084)
5	Белок	Полипротеин дикого типа FMDV, штамм O1 manisa (GenBank AAT01766) (в pMEB095)
6	Белок	Модифицированный полипротеин штамма O1 manisa в VP2 (S93C) или P1 (S179C) (в pMEB099)
7	ДНК	Полинуклеотид, кодирующий модифицированный полипротеин FMDV штамма O1 manisa (в pMEB099)
8	Белок	Модифицированный полипротеин FMDV, штамм Iraq (в pMEB106)
9	ДНК	Полинуклеотид, кодирующий модифицированный полипротеин FMDV штамма Iraq (в pMEB106)
10	Белок	Модифицированный полипротеин FMDV, штамм Asia (в pMEB104)
11	ДНК	Полинуклеотид, кодирующий модифицированный полипротеин FMDV штамма Asia (в pMEB104)
12	Белок	Полипротеин дикого типа FMDV, штамм Iraq (в pMEB105)
13	Белок	Полипротеин дикого типа FMDV, штамм Asia (в pMEB102)
14	ДНК	Полинуклеотид, кодирующий полипротеин FMDV дикого типа, штамм Iraq (в pMEB105)
15	ДНК	Полинуклеотид, кодирующий полипротеин FMDV дикого типа, штамм Asia (в pMEB102)
16	Белок	Предшественник капсида FMDV (VP1, VP2 (с мутацией в сайте H93C), VP3, VP4, 2A и полный 2B кодоноптимизированный) и неоптимизированный неполный 3B и полноразмерная протеаза 3C с мутацией в сайте C142T (в vAD3027)
17	ДНК	Кодоноптимизированный полинуклеотид, кодирующий предшественника капсида FMDV (в vAD3027)
18	ДНК	Промотор CMV
19	ДНК	Синтетический энхансер
20	ДНК	Промотор CMV – синтетический энхансер – кодоноптимизированный ген капсида FMDV – SV40 полиA в vAD3027

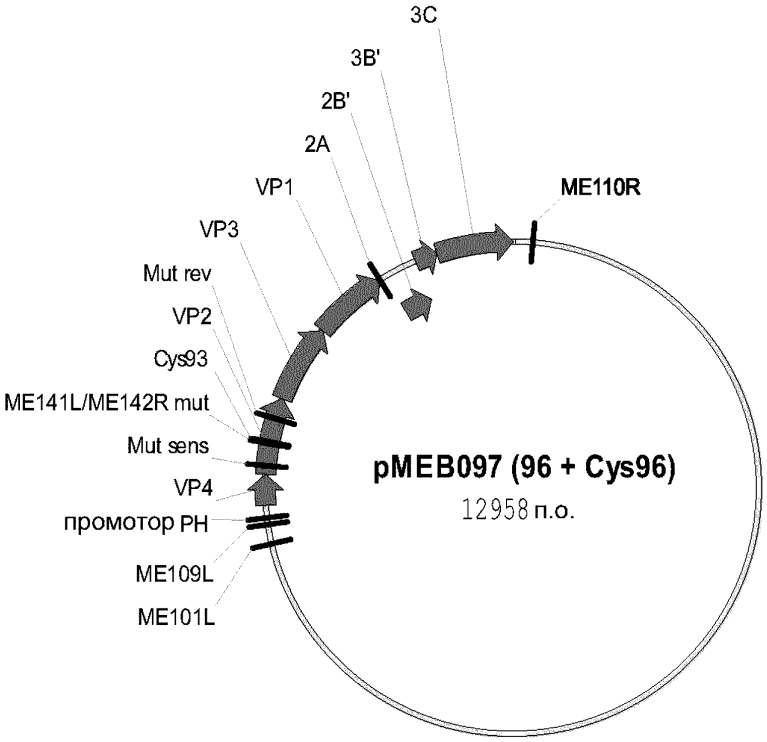
Фиг. 1

2


Экспрессированный полипротеин
3C
Расщепление 3C
Расщепление 3C
Расщепление 3C
Продукты расщепления протеазой
3C
РНК-зависимое расщепление
Продукты расщепления VP0
Ожидаемый процессинг пептида
Активность 3C, W/O
Активность 3C, W/
Созревание (не в отсутствие инкапсидирования РНК?)
9кДа
25кДа
24кДа
23кДа

Фиг. 2

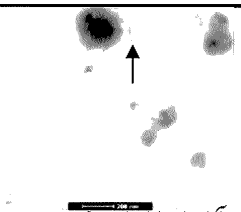
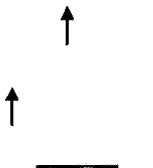
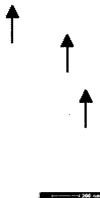
3


3C
3B'
2B'
2A
VP1
ME110R
VP3
Mut rev
VP2
Cys93
ME141L/ME142R mut
Mut sens
VP4
промотор PH
ME109L
ME101L
pMEB097 (96 + Cys96)
12958 п.о.

Фиг. 3

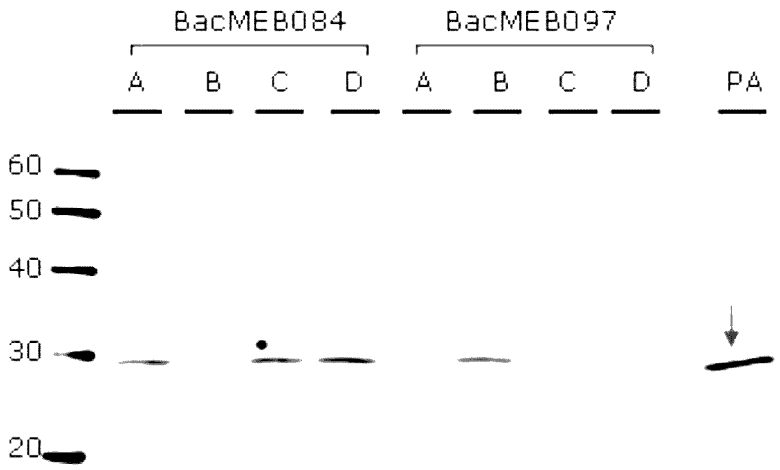
4

Результаты электронной микроскопии BacMEB097

Рекомбинантная бакуловирусная конструкция	**A** Обработка W/O	**B** 1 час при 56°C	**C** Подкисление: pH=5
«классический A24» =**BacMEB084** образцы [ ] 4X	10^8 вирусоподобные частицы /мл	Обнаружено только несколько частиц	Нет вирусоподобных частиц
«классический A24» =**BacMEB097** образцы [ ] 3,3X	 5.10^8 вирусоподобные частицы /мл	 10^9 вирусоподобные частицы /мл	 2.10^9 вирусоподобные частицы /мл

Фиг. 4

Детекция вестерн-блоттингом капсидного белка FMDV (серотип A24)



A: без обработки (pH=6.1)
B: 4.7<pH<5
C: 1 час при 56°C
D: pH отрегулирован до 6,5
PA: инактивированный FMDV A24

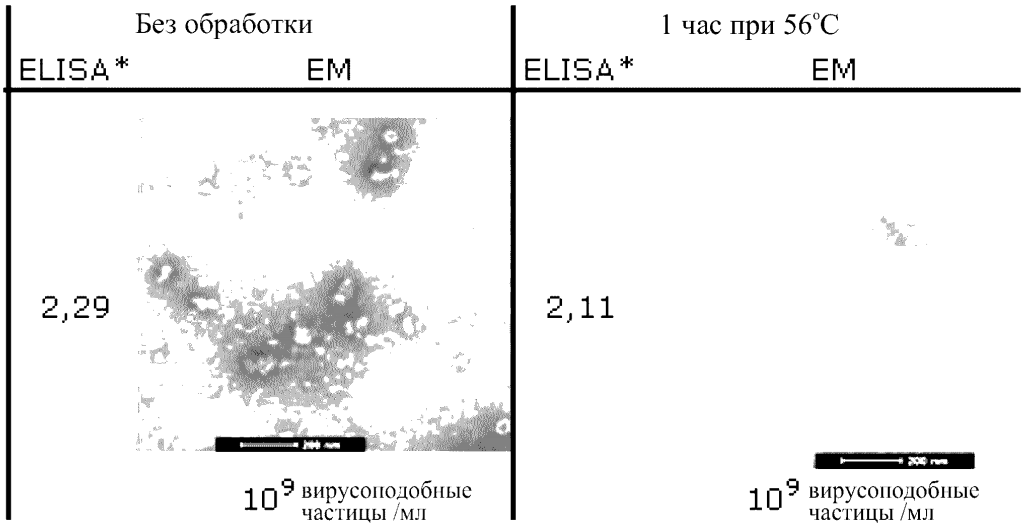
Фиг. 5

6

Электронная микроскопия и специфический ELISA BacMEB099

Фиг. 6A

			Сбор в день 4		
Конструкция	Клон	MOI	Число	Жизнеспособность []	
BacMEB099	4	0,45	2,80E+05	16,9%	12x

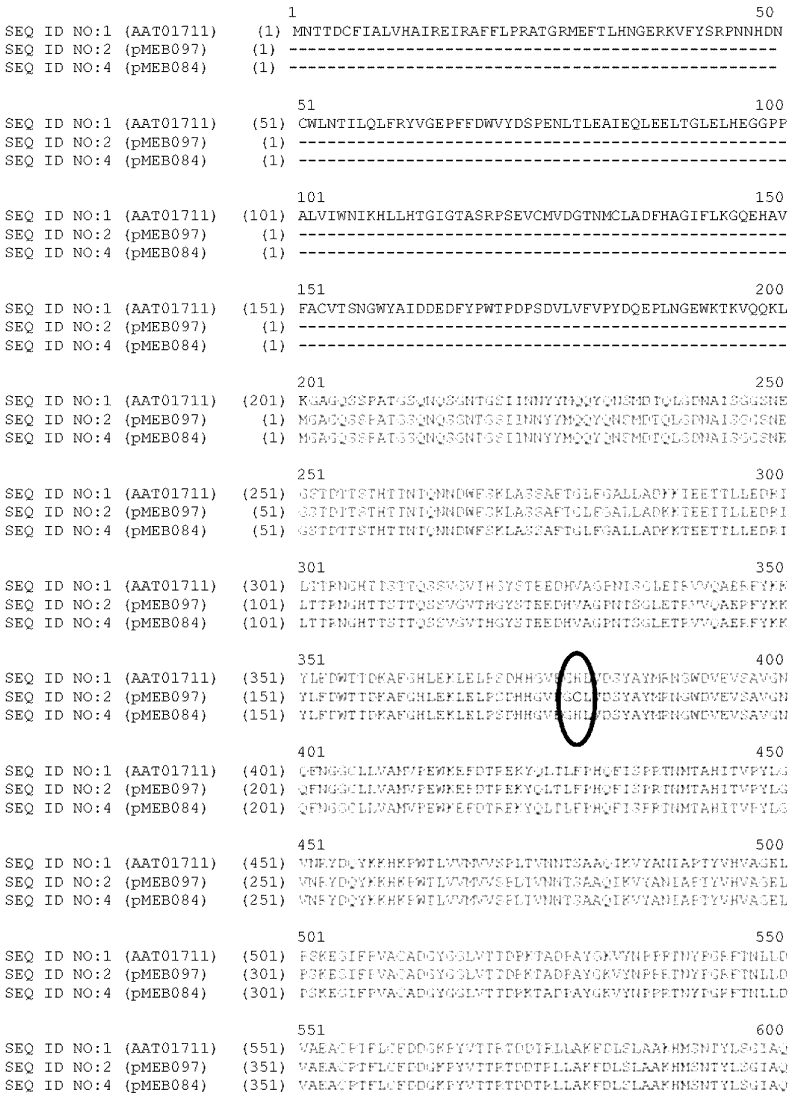


Фиг. 6B

7

Фиг. 7A

Выравнивание аминокислотных последовательностей рекомбинантного полипротеина в pMEB097 и эталонной последовательности (FMDV, серотип A/ GenBank AAT01711) с использованием программы вектор-NTI



Фиг. 7A (продолжение)

```
                                    601                                 650
SEQ ID NO:1 (AAT01711)   (601) YYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPEPAAHCIHA
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (401) YYTQYSGTINLHFMFTGSIDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPEPAAHCIHA
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (401) YYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPEPAAHCIHA

                                    651                                 700
SEQ ID NO:1 (AAT01711)   (651) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDTAETINVQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDTAETINVQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDTAETINVQGWVCIYQITHGKAE

                                    701                                 750
SEQ ID NO:1 (AAT01711)   (701) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPRQQTTATGESADPVTTTVENYGGETQIQ
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (501) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPRQQTTATGESADPVTTTVENYGGETQIQ
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (501) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPRQQTTATGESADPVTTTVENYGGETQIQ

                                    751                                 800
SEQ ID NO:1 (AAT01711)   (751) RRHHTDIGFIMDFFVKIQSLSPTHVIDLMQ HQHGLVGALLRAATYYFSD
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (551) RRHHTDIGFIMDFFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGALLRAATYYFSD
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (551) RRHHTDIGFIMDFFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGALLRAATYYFSD

                                    801                                 850
SEQ ID NO:1 (AAT01711)   (801) LEIVVVRHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (601) LEIVVVRHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (601) LEIVVVRHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRV

                                    851                                 900
SEQ ID NO:1 (AAT01711)   (851) LATVYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASFNYGAIKADAIHEL
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (651) LATVYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASFNYGAIKADAIHEL
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (651) LATVYNGTSKYAVGGSGRPGDMGSLAARVVKQLPASFNYGAIKADAIHEL

                                    901                                 950
SEQ ID NO:1 (AAT01711)   (901) LVRMKRAELYCPRPLLAIEVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (701) LVRMKRAELYCPRPLLAIEVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (701) LVRMKRAELYCPRPLLAIEVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE

                                    951                                1000
SEQ ID NO:1 (AAT01711)   (951) SNPGPFFFSDVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG

                                   1001                                1050
SEQ ID NO:1 (AAT01711)  (1001) VKAIPTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSGMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (801) VKAIPTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSGMAAVAARSKDPVLVAIMLADT---
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (801) VKAIPTGLDEAKPWYPLIKLLSRLSGMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE

                                   1051                                1100
SEQ ID NO:1 (AAT01711)  (1051) ILDSTFVVKKISDSLSSLFHVPAPVFSFGAPILLAGLVKVASSFFRSTPE
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (848) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (851) --------------------------------------------------

                                   1101                                1150
SEQ ID NO:1 (AAT01711)  (1101) DLERAEKQLKARDINDIFAILKNGEWLVKLILAIRDWIKAWIASEEKFVT
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (848) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (851) --------------------------------------------------

                                   1151                                1200
SEQ ID NO:1 (AAT01711)  (1151) TTDLVPGILEKQRDLNDPSKYKEAKEWLDNARQACLKSGNVHIANLCKVV
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (848) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (851) --------------------------------------------------

                                   1201                                1250
SEQ ID NO:1 (AAT01711)  (1201) APAPSRSRPEPVVVCLRGKSGQGKSFLANVLAQAISTHFTGRTDSVWYCP
SEQ ID NO:2 (pMEB097)    (848) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)    (851) --------------------------------------------------
```

Фиг. 7A (продолжение)

```
                                    1251                                                1300
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1251) PDPDHFDGYNQQTVVVMDDLGQNPDGKDFKYFAQMVSTTGFIPPMASLED
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (848) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (851) --------------------------------------------------

                                    1301                                                1350
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1301) KGKPFNSKVIIATTNLYSGFTPRTMVCPDALNRRFHFDIDVSAKDGYKIN
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (848) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (851) --------------------------------------------------

                                    1351                                                1400
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1351) NKLDIIKALEDTHTNPVAMFQYDCALLNGMAVEMKRMQQDMFKPQPPLQN
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (848) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (851) --------------------------------------------------

                                    1401                                                1450
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1401) VYQLVQEVIERVELHEKVSSHPIFKQISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIE
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (848) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (851) --------------------------------------------------

                                    1451                                                1500
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1451) FFEGMVHDSIK ELRPLIQQTSFVKRAFKRLKENFEIVALCLTLLANIVI
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (848) ------G--LEPQR----------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (851) ---------RQPPL----------------------------------

                                    1501                                                1550
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1501) MIRETRKRQKMVDDAVSEYIERANITTDDKTLDEAEKNPLETSGASTVGF
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (854) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (856) --------------------------------------------------

                                    1551                                                1600
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1551) RERPLPGQKARNDENSEPAQPAEEQPQAEGPYAGPLERQKPLKVRAKLPQ
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (854) ----------------------------------------PLKVRAKLPQ
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (856) ----------------------------------------KVRAKLPQ

                                    1601                                                1650
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1601) QEGPYAGPMEPQKPLKVKAKAPVVKEGPYEGPVKPVALKVKAKNLIVTE
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (864) QEGPYAGPLEPQKPLKVKAKAPVVKEGPYEGPVKPVALKVKAKNLIVTE
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (864) QEGPYAGPLEPQKPLKVKAKAPVVKEGPYEGPVKPVALKVKAKNLIVTE

                                    1651                                                1700
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1651) SGAPPTDLQKLVMGNTKPVELILDGKTVAICCATGVFGTAYLVPRHLFAE
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (914) SGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVAICCATGVFGTAYLVPRHLFAE
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (914) SGAPPIDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVAICCATGVFGTAYLVPRHLFAE

                                    1701                                                1750
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1701) KYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQDMLSDAALMVLHRGNRVRDIT
SEQ ID NO:2 (pMEB097)   (964) KYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQDMLSDAALMVLHRGNRVRDIT
SEQ ID NO:4 (pMEB084)   (964) KYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQDMLSDAALMVLHRGNRVRDIT

                                    1751                                                1800
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1751) KHFRDTARMKKGTPVVGVINNADVGRLIFSGEALTYKDIVVCMDGDTMPG
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1014) KHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIFSGEALTYKDIVVCMDGDTMPG
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1014) KHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIFSGEALTYKDIVVCMDGDTMPG

                                    1801                                                1850
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1801) LFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVGTHSAGGNGVGYCSCVSESMLL
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1064) LFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVGTHSAGGNGVGYCSCVSESMLL
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1064) LFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVGTHSAGGNGVGYCSCVSESMLL

                                    1851                                                1900
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1851) KMKAHVDPEP HEGLIVDTRDVEERVHVMRKTKLAPTVAHGVFNPEFGPA
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1114) KMKAHVDPEPQHE----------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1114) KMKAHVDPEPQHE----------------------------------
```

Фиг. 7A (продолжение)

```
                                 1901                                          1950
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1901) ALSNKDPRLNDGVVLDEVIFSKHKGDTKMSEEDKALFRRCAADYASRLHS
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) --------------------------------------------------

                                 1951                                          2000
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (1951) VLGTANAPLSIYEAIKGVDGLDAMEPDTAPGLPWALQGKRRGALIDFENG
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) --------------------------------------------------

                                 2001                                          2050
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (2001) TVGPEVEAALKLMEKREYKFACQTFLKDEIRPMEKVRAGKTRIVDVLPVE
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) --------------------------------------------------

                                2051                                           2100
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (2051) HILYTRMMIGRFCAQMHSNNGPQIGSAVGCNPDVDWQRFGTHFAQYRNVW
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) --------------------------------------------------

                                 2101                                          2150
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (2101) DVDYSAFDANHCSDAMNIMFEEVFRTEFGFHPNAEWILKTLVNTEHAYEN
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) --------------------------------------------------

                                 2151                                          2200
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (2151) KRITVEGGMPSGCSATSIINTILNNIYVLYALRRHYEGVELDTYTMISYG
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) --------------------------------------------------

                                 2201                                          2250
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (2201) DDIVVASDYDLDFEALKPHFKSLGQTITPADKSDKGFVLGHSITDVTFLK
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) --------------------------------------------------

                                 2251                                          2300
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (2251) RHFHMDYGTGFYKPVMASKTLEAILSFARRGTIQEKLISVAGLAVHSGPD
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) --------------------------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) --------------------------------------------------

                                 2301                       2333
SEQ ID NO:1 (AAT01711) (2301) EYRRLFEPFQGLFEIPSYRSLYLRWVNAVCGDA
SEQ ID NO:2 (pMEB097)  (1127) ---------------------------------
SEQ ID NO:4 (pMEB084)  (1127) ---------------------------------
```

Фиг. 7B

Выравнивание аминокислотных последовательностей участка P1 рекомбинантного полипротеина в pMEB099 и эталонной последовательности (GenBank AAT01766) с использованием программы вектор-NTI

```
                    1                                                  50
P1 AAT01766     (1) -GAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNATSGGSNE
 p1 pMEB099     (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNATSGGSNE

                    51                                                 100
P1 AAT01766    (50) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFSGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
 p1 pMEB099    (51) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFSGLFGALLADKKTEETTLLEDRI

                   101                                                 150
P1 AAT01766   (100) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTYGYATAEDFVSGPNTSGLETRVAQAERFFKT
 p1 pMEB099   (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTYGYATAEDFVSGPNTSGLETRVAQAERFFKT

                   151                                                 200
P1 AAT01766   (150) HLFDWVTSDPFGRCHLLELPTDHKGVYGSLTDSYAYMRNGWDVEVTAVGN
 p1 pMEB099   (151) HLFDWVTSDPFGRCHLLELPTDHKGVYGCLTDSYAYMRNGWDVEVTAVGN

                   201                                                 250
P1 AAT01766   (200) QFNGGCLLVAMVPELCSIQKRELYQLTLFPHQFINPRTNMTAHITVPFVG
 p1 pMEB099   (201) QFNGGCLLVAMVPELCSIQKRELYQLTLFPHQFINPRTNMTAHITVPFVG

                   251                                                 300
P1 AAT01766   (250) VNRYDQYKVHKPWTLVVMVVAPLTVNSEGAPQIKVYANIAPTNVHVAGEF
 p1 pMEB099   (251) VNRYDQYKVHKPWTLVVMVVAPLTVNSEGAPQIKVYANIAPTNVHVAGEF

                   301                                                 350
P1 AAT01766   (300) PSKEGIFPVACSDGYGGLVTTDPKTADPAYGKVFNPPRNMLPGRFTNFLD
 p1 pMEB099   (301) PSKEGIFPVACSDGYGGLVTTDPKTADPAYGKVFNPPRNMLPGRFTNFLD

                   351                                                 400
P1 AAT01766   (350) VAEACPTFLHFEGDVPYVTTKTDSDRVLAQFDLSLAAKHMSNTFLAGLAQ
 p1 pMEB099   (351) VAEACPTFLHFEGDVPYVTTKTDSDRVLAQFDLSLAAKHMSNTFLAGLAQ

                   401                                                 450
P1 AAT01766   (400) YYTQYSGTINLHFMFTGPTDAKARYMIAYAPPGMEPPKTPEAAAHCIHAE
 p1 pMEB099   (401) YYTQYSGTINLHFMFTGPTDAKARYMIAYAPPGMEPPKTPEAAAHCIHAE

                   451                                                 500
P1 AAT01766   (450) WDTGLNSKFTFSIPYLSAADYAYTASDTAETTNVQGWVCLFQITHGKADG
 p1 pMEB099   (451) WDTGLNSKFTFSIPYLSAADYAYTASDTAETTNVQGWVCLFQITHGKADG

                   501                                                 550
P1 AAT01766   (500) DALVVLASAGKDFELRLPVDARTQTTSAGESADPVTATVENYGGETQVQR
 p1 pMEB099   (501) DALVVLASAGKDFELRLPVDARTQTTSAGESADPVTATVENYGGETQVQR

                   551                                                 600
P1 AAT01766   (550) FQHTDVSFILDRFVKVTPKDQINVLDLMQTPAHTLVGALLRTATYYFADL
 p1 pMEB099   (551) FQHTDVSFILDRFVKVTPKDQINVLDLMQTPAHTLVGALLRTATYYFADL
```

Фиг. 7B (продолжение)

```
                    601                                                 650
P1 AAT01766   (600) EVAVKHEGNLTWVPNGAPEAALDNTTNPTAYHKAPLTRLALPYTAPHRVL
 p1 pMEB099   (601) EVAVKHEGNLTWVPNGAPEAALDNTTNPTAYHKAPLTRLALPYTAPHRVL

                    651                                                 700
P1 AAT01766   (650) ATVYNGNSKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARALPTSFNYGAIKATRVTEL
 p1 pMEB099   (651) ATVYNGNSKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARALPTSFNYGAIKATRVTEL

                    701                                 737
P1 AAT01766   (700) LYRMKRAETYCPRPLLAIHPDQARHKQKIVAPVKQLL
 p1 pMEB099   (701) LYRMKRAETYCPRPLLAIHPDQARHKQKIVAPVKQLL


P1 AAT01766:   SEQ ID NO:5;    p1 pMEB099:  part of SEQ ID NO:6
```

Фиг. 7C

Выравнивание аминокислотных последовательностей участка P1 рекомбинантного полипротеина с использованием программы вектор-NTI

```
                          1                                                  50
SEQ ID NO:10      (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE
SEQ ID NO:12      (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE
SEQ ID NO:13      (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE
SEQ ID NO:16      (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE
SEQ ID NO:2       (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE
SEQ ID NO:4       (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE
SEQ ID NO:8       (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE

                         51                                                 100
SEQ ID NO:10     (51) GSTDTTSTHT NTQNNDWFSRLASSAFSGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
SEQ ID NO:12     (51) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFSGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
SEQ ID NO:13     (51) GSTDTTSTHT NTQNNDWFSRLASSAFSGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
SEQ ID NO:16     (51) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFTGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
SEQ ID NO:2      (51) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFTGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
SEQ ID NO:4      (51) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFTGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
SEQ ID NO:8      (51) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFSGLFGALLADKKTEETTLLEDRI

                        101                                                 150
SEQ ID NO:10    (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTYGYA AEDAVSGPNTSGLETRVQQAERFFKK
SEQ ID NO:12    (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTYGYSTQEDHVSGPNTSGLETRVVQAERFFKK
SEQ ID NO:13    (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTYGYA AEDAVSGPNTSGLETRVQQAERFFKK
SEQ ID NO:16    (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTHGYSTEEDHVAGPNTSGLETRVVQAERFYKK
SEQ ID NO:2     (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTHGYSTEEDHVAGPNTSGLETRVVQAERFYKK
SEQ ID NO:4     (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTHGYSTEEDHVAGPNTSGLETRVVQAERFYKK
SEQ ID NO:8     (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTYGYSTQEDHVSGPNTSGLETRVVQAERFFKK

                        151                                                 200
SEQ ID NO:10    (151) HLFDWTP LAFGHCYYLELPTEHKGVYGCLM SYAYMRNGWDIEVTAVGN
SEQ ID NO:12    (151) HLFDWTPDKAFGHLEKLELPTDHKGVYGHLVDSFAYMRNGWDVEVSAVGN
SEQ ID NO:13    (151) HLFDWTP LAFGHCYYLELPTEHKGVYG LM SYAYMRNGWDIEVTAVGN
SEQ ID NO:16    (151) YLFDWT DKAFGHLEKLELPSDH GVFGCLVDSYAYMRNGWDVEVSAVGN
SEQ ID NO:2     (151) YLFDWT DKAFGHLEKLELPSDH GVFGCLVDSYAYMRNGWDVEVSAVGN
SEQ ID NO:4     (151) YLFDWT DKAFGHLEKLELPSDH GVFGHLVDSYAYMRNGWDVEVSAVGN
SEQ ID NO:8     (151) HLFDWTPDKAFGHLEKLELPTDHKGVYGCLVDSFAYMRNGWDVEVSAVGN

                        201                                                 250
SEQ ID NO:10    (201) QFNGGCLLVALVPELKE DTR KYQLTLFPHQFI PRTNMTAHINVPYVG
SEQ ID NO:12    (201) QFNGGCLLVAMVPEWKEFT REKYQLTLFPHQFISPRTNMTAHIVVPYLG
SEQ ID NO:13    (201) QFNGGCLLVALVPELKE DTR KYQLTLFPHQFI PRTNMTAHINVPYVG
SEQ ID NO:16    (201) QFNGGCLLVAMVPEWKEFDTREKYQLTLFPHQFISPRTNMTAHITVPYLG
SEQ ID NO:2     (201) QFNGGCLLVAMVPEWKEFDTREKYQLTLFPHQFISPRTNMTAHITVPYLG
SEQ ID NO:4     (201) QFNGGCLLVAMVPEWKEFDTREKYQLTLFPHQFISPRTNMTAHITVPYLG
SEQ ID NO:8     (201) QFNGGCLLVAMVPEWKEFT REKYQLTLFPHQFISPRTNMTAHIVVPYLG
```

Фиг. 7C (продолжение)

```
                        251                                                 300
SEQ ID NO:10    (251) INRYDQYALHKPWTLVVMVVAPLTV TG SEQIKVYMNAAPTYVHVAGEL
SEQ ID NO:12    (251) VNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLT NTVSAGQIKVYANIAPTHVHVAGEL
SEQ ID NO:13    (251) INRYDQYALHKPWTLVVMVVAPLTV TG SEQIKVYMNAAPTYVHVAGEL
SEQ ID NO:16    (251) VNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLTVN TSAAQIKVYANIAPTYVHVAGEL
SEQ ID NO:2     (251) VNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLTVN TSAAQIKVYANIAPTYVHVAGEL
SEQ ID NO:4     (251) VNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLTVN TSAAQIKVYANIAPTYVHVAGEL
SEQ ID NO:8     (251) VNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLT NTVSAGQIKVYANIAPTHVHVAGEL

                        301                                                 350
SEQ ID NO:10    (301) PSKEGIVPVACADGYG MVTTDPKTADPVYGKVFNPPRTNLPGRFTN LD
SEQ ID NO:12    (301) PSKEGIVPVACSDGYGGLVTTDPKTADPVYGMVYNPPRTNYPGRFTNLLD
SEQ ID NO:13    (301) PSKEGIVPVACADGYG MVTTDPKTADPVYGKVFNPPRTNLPGRFTN LD
SEQ ID NO:16    (301) PSKEGIFPVACADGYGGLVTTDPKTADP YGKVYNPPRTNYPGRFTNLLD
SEQ ID NO:2     (301) PSKEGIFPVACADGYGGLVTTDPKTADP YGKVYNPPRTNYPGRFTNLLD
SEQ ID NO:4     (301) PSKEGIFPVACADGYGGLVTTDPKTADP YGKVYNPPRTNYPGRFTNLLD
SEQ ID NO:8     (301) PSKEGIVPVACSDGYGGLVTTDPKTADPVYGMVYNPPRTNYPGRFTNLLD

                        351                                                 400
SEQ ID NO:10    (351) VAEACPTFLRF -EVPFVKTV   DRLLAKFDVSLAAGHMSNTYLAGLAQ
SEQ ID NO:12    (351) VAEACPTFLCFDEGKPYVVTRTDEQRLLAKFDVSLAAKHMSNTYLSGIAQ
SEQ ID NO:13    (351) VAEACPTFLRF -EVPFVKTV   DRLLAKFDVSLAAGHMSNTYLAGLAQ
SEQ ID NO:16    (351) VAEACPTFLCFDDGKPYVTTRTDDTRLLAKFDLSLAAKHMSNTYLSGIAQ
SEQ ID NO:2     (351) VAEACPTFLCFDDGKPYVTTRTDDTRLLAKFDLSLAAKHMSNTYLSGIAQ
SEQ ID NO:4     (351) VAEACPTFLCFDDGKPYVTTRTDDTRLLAKFDLSLAAKHMSNTYLSGIAQ
SEQ ID NO:8     (351) VAEACPTFLCFDEGKPYVVTRTDEQRLLAKFDVSLAAKHMSNTYLSGIAQ

                        401                                                 450
SEQ ID NO:10    (400) YYTQYSGTMNVHFMFTG TDAKARYMVAYVPP-GMTPPTDPE AAHCIHS
SEQ ID NO:12    (401) YY QYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYVPPGVETPPDTPEKAAHCIHA
SEQ ID NO:13    (400) YYTQYSGTMNVHFMFTG TDAKARYMVAYVPP-GMTPPTDPE AAHCIHS
SEQ ID NO:16    (401) YYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPERAAHCIHA
SEQ ID NO:2     (401) YYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPERAAHCIHA
SEQ ID NO:4     (401) YYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPERAAHCIHA
SEQ ID NO:8     (401) YY QYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYVPPGVETPPDTPEKAAHCIHA

                        451                                                 500
SEQ ID NO:10    (449) EWDTGLNSKFTFSIPYLSAADYAYTASDVAETT VQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:12    (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDVAETTNVQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:13    (449) EWDTGLNSKFTFSIPYLSAADYAYTASDVAETT VQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:16    (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASD AETINVQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:2     (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASD AETINVQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:4     (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASD AETINVQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:8     (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDVAETTNVQGWVCIYQITHGKAE

                        501                                                 550
SEQ ID NO:10    (499)  D LVVSVSAGKDFE RLPVDARQQTTTTGESADPVTTTVENYGGETQ A
SEQ ID NO:12    (501) QDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPR QTTTTGESADPVTTTVENYGGETQVQ
SEQ ID NO:13    (499)  D LVVSVSAGKDFE RLPVDARQQTTTTGESADPVTTTVENYGGETQ A
SEQ ID NO:16    (501) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPRQQTT TGESADPVTTTVENYGGETQIQ
SEQ ID NO:2     (501) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPRQQTT TGESADPVTTTVENYGGETQIQ
SEQ ID NO:4     (501) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPRQQTT TGESADPVTTTVENYGGETQIQ
SEQ ID NO:8     (501) QDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPR QTTTTGESADPVTTTVENYGGETQVQ
```

Фиг. 7C (продолжение)

```
                          551                                                600
SEQ ID NO:10    (549) RRLHTDVAFILDRFVKLTAPKNI  LDLMQIP HTLVGALLRSATYYFSD
SEQ ID NO:12    (551) RRQHTDV FIMDRFVKIQ LNPTHVIDLMQTHQHGLVGALLRAATYYFSD
SEQ ID NO:13    (549) RRLHTDVAFILDRFVKLTAPKNI  LDLMQIP HTLVGALLRSATYYFSD
SEQ ID NO:16    (551) RRHHTDIGFIMDRFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGALLRAATYYFSD
SEQ ID NO:2     (551) RRHHTDIGFIMDRFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGALLRAATYYFSD
SEQ ID NO:4     (551) RRHHTDIGFIMDRFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGALLRAATYYFSD
SEQ ID NO:8     (551) RRQHTDV FIMDRFVKIQ LNPTHVIDLMQTHQHGLVGALLRAATYYFSD

                          601                                                650
SEQ ID NO:10    (599) LEV LVHTGPVTWVPNGAP  ALNNQTNPTAYQKQP TRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:12    (601) LEIVVPHDGNLTWVPNGAPEAALSNT NPTAYLKAPFTRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:13    (599) LEV LVHTGPVTWVPNGAP  ALNNQTNPTAYQKQP TRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:16    (601) LEIVVPHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:2     (601) LEIVVPHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:4     (601) LEIVVPHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:8     (601) LEIVVPHDGNLTWVPNGAPEAALSNT NPTAYLKAPFTRLALPYTAPHRV

                          651                                                700
SEQ ID NO:10    (649) LATVYNG TAY ETTS-RRGDMAALAQRLSA LP SFNYGAVKADTITEL
SEQ ID NO:12    (651) LATVYNGTSKYSAGGTGRRGDLG LAARVAAQLPASFNFGAI ATTIHEL
SEQ ID NO:13    (649) LATVYNG TAY ETTS-RRGDMAALAQRLSA LP SFNYGAVKADTITEL
SEQ ID NO:16    (651) LATVYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARV KQLPASFNYGAIKAD IHEL
SEQ ID NO:2     (651) LATVYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARV KQLPASFNYGAIKAD IHEL
SEQ ID NO:4     (651) LATVYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARV KQLPASFNYGAIKAD IHEL
SEQ ID NO:8     (651) LATVYNGTSKYSAGGTGRRGDLG LAARVAAQLPASFNFGAI ATTIHEL

                          701                                                750
SEQ ID NO:10    (698) LIRMKRAETYCPRPLLALD T-QDR KQ IIAPEKQVLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:12    (701) LVRMKRAELYCPRPLLAVFVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:13    (698) LIRMKRAETYCPRPLLALD T-QDR KQ IIAPEKQVLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:16    (701) LVRMKRAELYCPRPLLAIFVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:2     (701) LVRMKRAELYCPRPLLAIFVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:4     (701) LVRMKRAELYCPRPLLAIFVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:8     (701) LVRMKRAELYCPRPLLAVFVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE

                          751                                                800
SEQ ID NO:10    (747) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:12    (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:13    (747) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:16    (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:2     (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:4     (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:8     (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG

                          801                                                850
SEQ ID NO:10    (797) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:12    (801) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:13    (797) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:16    (801) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:2     (801) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:4     (801) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:8     (801) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSRLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
```

16

Фиг. 7C (продолжение)

```
                        851                                                 900
SEQ ID NO:10    (847) ------------------------------------------------------
SEQ ID NO:12    (851) ------------------------------------------------------
SEQ ID NO:13    (847) ------------------------------------------------------
SEQ ID NO:16    (851) ILDSTFVVKKISDSLSSLFHVPAPVFSFGAPILLAGLVKVASSFFRSTPE
SEQ ID NO:2     (851) ------------------------------------------------------
SEQ ID NO:4     (851) ------------------------------------------------------
SEQ ID NO:8     (851) ------------------------------------------------------

                        901                                                 950
SEQ ID NO:10    (847) --------RQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY
SEQ ID NO:12    (851) --------RQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY
SEQ ID NO:13    (847) --------RQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY
SEQ ID NO:16    (901) DLERAEKQRQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY
SEQ ID NO:2     (851) --------RQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY
SEQ ID NO:4     (851) --------RQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY
SEQ ID NO:8     (851) --------RQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY

                        951                                                1000
SEQ ID NO:10    (889) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVA
SEQ ID NO:12    (893) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVA
SEQ ID NO:13    (889) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVA
SEQ ID NO:16    (951) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVA
SEQ ID NO:2     (893) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVA
SEQ ID NO:4     (893) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVA
SEQ ID NO:8     (893) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVA

                       1001                                                1050
SEQ ID NO:10    (939) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQ
SEQ ID NO:12    (943) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQ
SEQ ID NO:13    (939) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQ
SEQ ID NO:16   (1001) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQ
SEQ ID NO:2     (943) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQ
SEQ ID NO:4     (943) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQ
SEQ ID NO:8     (943) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGRAMTDSDYRVFEFEIKVKGQ

                       1051                                                1100
SEQ ID NO:10    (989) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF
SEQ ID NO:12    (993) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF
SEQ ID NO:13    (989) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF
SEQ ID NO:16   (1051) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF
SEQ ID NO:2     (993) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF
SEQ ID NO:4     (993) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF
SEQ ID NO:8     (993) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF

                       1101                                                1150
SEQ ID NO:10   (1039) SGEALTYKDIVVCMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVG
SEQ ID NO:12   (1043) SGEALTYKDIVVCMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVG
SEQ ID NO:13   (1039) SGEALTYKDIVVCMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVG
SEQ ID NO:16   (1101) SGEALTYKDIVVTMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVG
SEQ ID NO:2    (1043) SGEALTYKDIVVCMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVG
SEQ ID NO:4    (1043) SGEALTYKDIVVCMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVG
SEQ ID NO:8    (1043) SGEALTYKDIVVCMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVG
```

Фиг. 7C (продолжение)

```
                        1151                                1184
SEQ ID NO:10   (1089) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
SEQ ID NO:12   (1093) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
SEQ ID NO:13   (1089) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
SEQ ID NO:16   (1151) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
SEQ ID NO:2    (1093) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
SEQ ID NO:4    (1093) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
SEQ ID NO:8    (1093) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
```

Фиг. 7D

```
                    1                                                  50
SEQ ID NO:16      (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE
SEQ ID NO:2       (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE
SEQ ID NO:4       (1) MGAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNE

                    51                                                 100
SEQ ID NO:16     (51) GSIDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFTGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
SEQ ID NO:2      (51) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFTGLFGALLADKKTEETTLLEDRI
SEQ ID NO:4      (51) GSTDTTSTHTTNTQNNDWFSKLASSAFTGLFGALLADKKTEETTLLEDRI

                   101                                                 150
SEQ ID NO:16    (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTHGYSTEEDHVAGPNTSGLETPVVQAERFYKK
SEQ ID NO:2     (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTHGYSTEEDHVAGPNTSGLETPVVQAERFYKK
SEQ ID NO:4     (101) LTTRNGHTTSTTQSSVGVTHGYSTEEDHVAGPNTSGLETPVVQAERFYKK

                   151                                                 200
SEQ ID NO:16    (151) YLFDWTTDKAFGHLEKLELPSDHHGVFGCLVDSYAYMRNGWDVEVSAVGN
SEQ ID NO:2     (151) YLFDWTTDKAFGHLEKLELPSDHHGVFGCLVDSYAYMRNGWDVEVSAVGN
SEQ ID NO:4     (151) YLFDWTTDKAFGHLEKLELPSDHHGVFGHLVDSYAYMRNGWDVEVSAVGN

                   201                                                 250
SEQ ID NO:16    (201) QFNGGCLLVAMVPEWKEFDTREKYQLTLFPHQFISPRTNMTAHITVPYLG
SEQ ID NO:2     (201) QFNGGCLLVAMVPEWKEFDTREKYQLILFPHQFISPRTNMTAHITVPYLG
SEQ ID NO:4     (201) QFNGGCLLVAMVPEWKEFDTREKYQLTLFPHQFISPRTNMTAHITVPYLG

                   251                                                 300
SEQ ID NO:16    (251) VNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLTVNNTSAAQIKVYANIAPTYVHVAGEL
SEQ ID NO:2     (251) VNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLTVNNTSAAQIKVYANIAPTYVHVAGEL
SEQ ID NO:4     (251) VNRYDQYKKHKPWTLVVMVVSPLTVNNTSAAQIKVYANIAPTYVHVAGEL

                   301                                                 350
SEQ ID NO:16    (301) PSKEGIFPVACADGYGGLVTTDPKTADPAYGKVYNPPRTNYPGRFTNLLD
SEQ ID NO:2     (301) PSKEGIFPVACADGYGGLVTTDPKTADPAYGKVYNPPPTNYPGRFTNLLD
SEQ ID NO:4     (301) PSKEGIFPVACADGYGGLVTTDPKTADPAYGKVYNPPRTNYPGRFTNLLD

                   351                                                 400
SEQ ID NO:16    (351) VAEACPTFLCFDDGKPYVTTRTDDTRLLAKFDLSLAAKHMSNTYLSGIAQ
SEQ ID NO:2     (351) VAEACPTFLCFDDGKPYVTTRTDDTRLLAKFDLSLAAKHMSNTYLSGIAQ
SEQ ID NO:4     (351) VAEACPTFLCFDDGKPYVTTRTDDTRLLAKFDLSLAAKHMSNTYLSGIAQ

                   401                                                 450
SEQ ID NO:16    (401) YYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPERAAHCIHA
SEQ ID NO:2     (401) YYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPERAAHCIHA
SEQ ID NO:4     (401) YYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKARYMVAYIPPGVETPPDTPERAAHCIHA

                   451                                                 500
SEQ ID NO:16    (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDTAETINVQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:2     (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDTAETINVQGWVCIYQITHGKAE
SEQ ID NO:4     (451) EWDTGLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDTAETINVQGWVCIYQITHGKAE

                   501                                                 550
SEQ ID NO:16    (501) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPRQQTTATGESADPVTTTVENYGGETQIQ
SEQ ID NO:2     (501) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPRQQTTATGESADPVTTTVENYGGETQIQ
SEQ ID NO:4     (501) NDTLVVSVSAGKDFELRLPIDPPQQTTATGESADPVTTTVENYGGETQIQ

                   551                                                 600
SEQ ID NO:16    (551) RRHHTDIGFIMDRFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGALLRAATYYFSD
SEQ ID NO:2     (551) RRHHTDIGFIMDRFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGALLRAATYYFSD
SEQ ID NO:4     (551) RRHHTDIGFIMDRFVKIQSLSPTHVIDLMQAHQHGLVGALLRAATYYFSD

                   601                                                 650
SEQ ID NO:16    (601) LEIVVRHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:2     (601) LEIVVRHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHRV
SEQ ID NO:4     (601) LEIVVRHEGNLTWVPNGAPESALLNTSNPTAYNKAPFTRLALPYTAPHPV
```

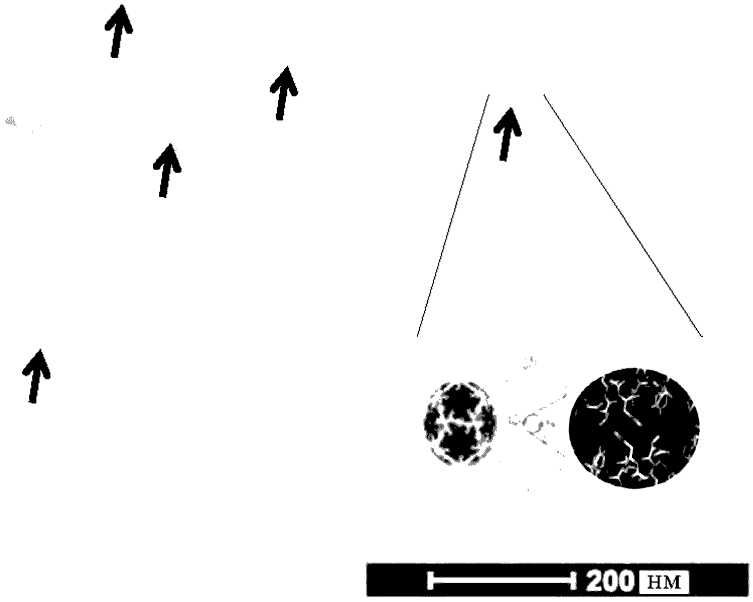
19

Фиг. 7D (продолжение)

```
                    651                                                 700
SEQ ID NO:16    (651) LATVYNGTSFYAVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASFNYGAIKADAIHEL
SEQ ID NO:2     (651) LATVYNGTSFYAVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASFNYGAIKADAIHEL
SEQ ID NO:4     (651) LATVYNGTSFYAVGGSGRRGDNGSLAARVVKQLPASFNYGAIKADAIHEL

                    701                                                 750
SEQ ID NO:16    (701) LVRMKRAELYCPRPLLAIEVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:2     (701) LVPMKRAELYCPRPLLAIEVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE
SEQ ID NO:4     (701) LVPMKRAELYCPRPLLAIEVSSQDRHKQKIIAPAKQLLNFDLLKLAGDVE

                    751                                                 800
SEQ ID NO:16    (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVPTINQMQEDMSTKHGPDFNRLVSAFEELATG
SEQ ID NO:2     (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVPTINQMQEDMSTKHGPDFNPLVSAFEELATG
SEQ ID NO:4     (751) SNPGPFFFADVRSNFSKLVDTINQMQEDMSTKHGPDFNPLVSAFEELATG

                    801                                                 850
SEQ ID NO:16    (801) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSPLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:2     (801) VPAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSPLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE
SEQ ID NO:4     (801) VKAIRTGLDEAKPWYKLIKLLSPLSCMAAVAARSKDPVLVAIMLADTGLE

                    851                                                 900
SEQ ID NO:16    (851) ILDSTFVVKKISDSLSSLFHVPAPVFSFGAPILLAGLVKVASSFFRSTPE
SEQ ID NO:2     (851) ----------------------------------------------------
SEQ ID NO:4     (851) ----------------------------------------------------

                    901                                                 950
SEQ ID NO:16    (901) DLERAEKQRQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY
SEQ ID NO:2     (851) --------RQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY
SEQ ID NO:4     (851) --------RQRPLKVRAKLPQQEGPYAGPLERQKPLKVKAKAPVVKEGPY

                    951                                                1000
SEQ ID NO:16    (951) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNIKPVELILDGKTVA
SEQ ID NO:2     (893) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNTKPVELILDGKTVA
SEQ ID NO:4     (893) EGPVKKPVALKVKAKNLIVTESGAPPTDLQKMVMGNIKPVELILDGKTVA

                   1001                                                1050
SEQ ID NO:16   (1001) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGAMTDSDYRVFEFEIKVKGQ
SEQ ID NO:2     (943) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGAMIDSDYRVFEFEIKVKGQ
SEQ ID NO:4     (943) ICCATGVFGTAYLVPRHLFAEKYDKIMLDGAMIDSDYRVFEFEIKVKGQ

                   1051                                                1100
SEQ ID NO:16   (1051) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF
SEQ ID NO:2     (993) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF
SEQ ID NO:4     (993) DMLSDAALMVLHRGNRVRDITKHFRDTARMKKGTPVVGVVNNADVGRLIF

                   1101                                                1150
SEQ ID NO:16   (1101) SGEALTYKDIVVTMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVS
SEQ ID NO:2    (1043) SGEALTYKDIVVCMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVS
SEQ ID NO:4    (1043) SGEALTYKDIVVCMDGDTMPGLFAYKAATKAGYCGGAVLAKDGADTFIVG

                   1151                        1184
SEQ ID NO:16   (1151) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
SEQ ID NO:2    (1093) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
SEQ ID NO:4    (1093) THSAGGNGVGYCSCVSRSMLLRMKAHVDPEPQHE
```

Фиг. 8

Вирусоподобные частицы FMDV

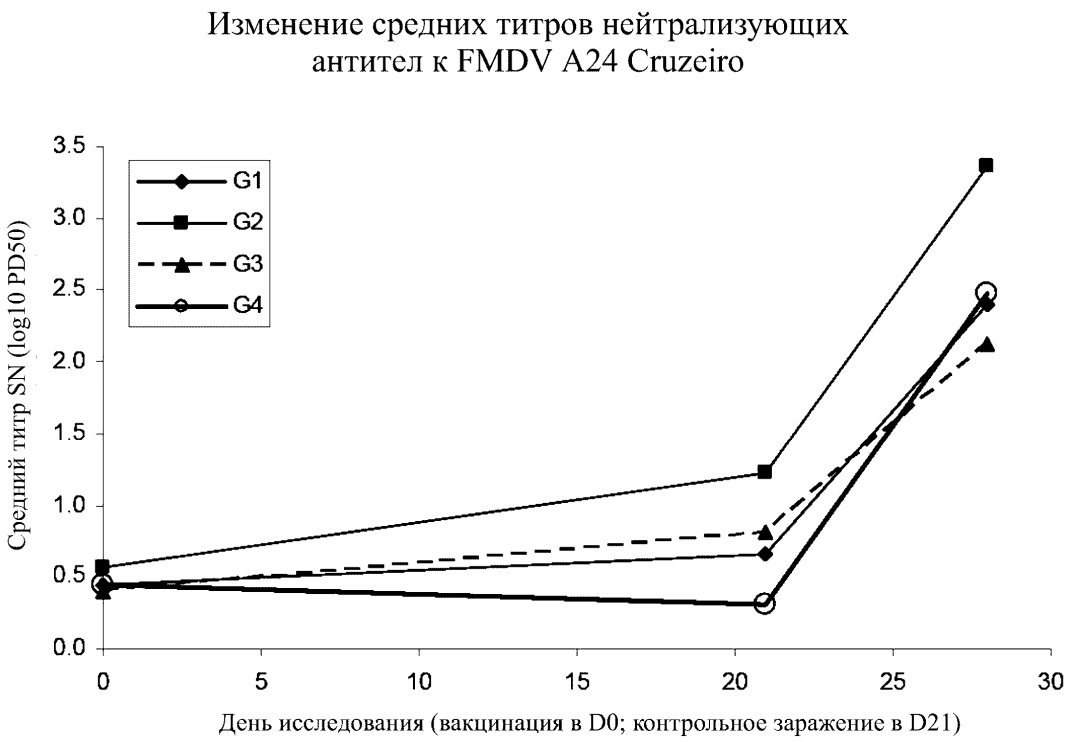


Партия Объем	Титр (Log10CCID$_{50}$/)	ELISA M326/M326→146S[b] (Log10CCID$_{50}$/мл)	(EM) вирусоподобные частицы/мл
150л	7.14	2.19; *2.14 (нагретый)*	5 x 10^{9} [c]
4л	7.17	2.09; *1.89 (нагретый)*	2 x 10^{9} [d]

a: супернатант D3 1xC
b: супернатант D5 1xC
c: супернатант D5, концентрированный 12,8 x g (пробирка CENTRICON)
d: супернатант D5, концентрированный 9,5 x g (VIVAFLOW)

21

Фиг. 9



G1: Лемна G2: бакуловирус;
G3: vCP2186; G4 контроль

Фиг. 10

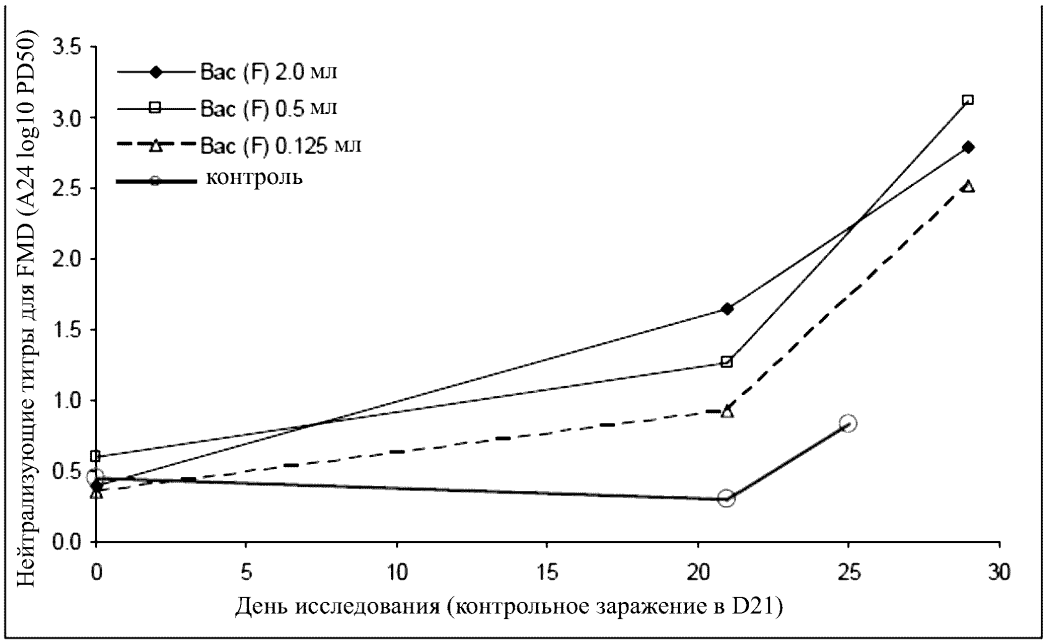
Титры нейтрализующих антител к FMDV A24 Cruzeiro

Группа	Скот	Нейтрализующий титр для FMD A24 Cruzeiro (log10 PD50)			
		D0	**D21**	**D25***	**D28***
1 (Лемна-**FMDV PE 5X**)	3953	0.60	0.60	1.95	-
	3954	0.75	0.75	1.80	-
	3955	<=0.30	0.75	-	2.85
	3956	<=0.30	0.90	-	>=3.45
	3957	0.30	<=0.30	1.95	-
	Среднее	**<= 0.45**	**<=0.66**	**1.90**	**>= 3.15**
	S.d.	*0.21*	*0.23*	*0.09*	*0.42*
2 (Партия №4, бакуловирус, 14,4xC)	3958	1.05	1.35	-	>=3.45
	3959	0.30	1.05	-	3.30
	3960	0.45	1.50	-	3.30
	3961	0.60	1.05	-	3.30
	3962	0.45	1.20	-	>=3.45
	Среднее	**0.57**	**1.23**	-	**>=3.36**
	S.d.	*0.29*	*0.20*	-	*0.08*
3 (Партия №1, vCP 2186-1)	3963	0.30	0.75	2.70	-
	3964	0.30	0.90	2.25	-
	3965	0.60	1.20	2.25	-
	3966	<=0.30	0.90	1.80	-
	3967	0.45	<=0.30	1.65	-
	Среднее	**<=0.39**	**<=0.81**	**2.13**	-
	S.d.	*0.13*	*0.33*	*0.42*	-
4 контроль	3932	0.45	<=0.30	-	2.10
	3933	0.45	<=0.30	-	2.85
	Среднее	**0.45**	**<=0.30**	-	**2.48**
	S.d.	*0.00*	*0.00*	-	*0.53*

G1: Ряска G2:бакуловирус;
G3: vCP2186; G4 контроль

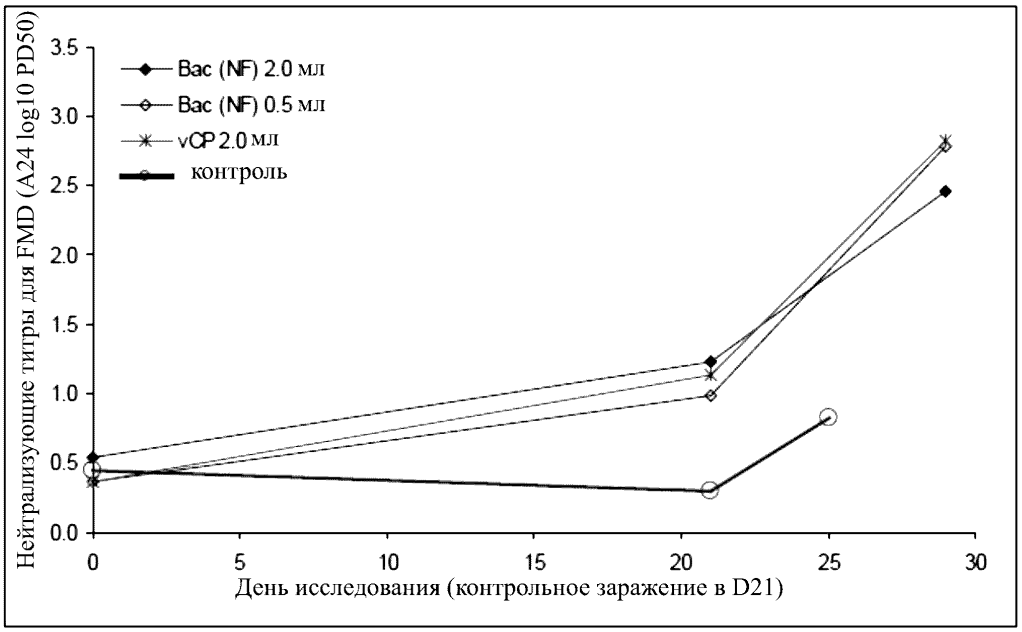
Фиг. 11A

Изменение средних титров нейтрализующих антител к FMDV A24 Cruzeiro



G1: фильтрованный бакуловирус 2,0 мл
G2: фильтрованный бакуловирус 0,5 мл
G3: фильтрованный бакуловирус 0,125 мл
G4: контроль

Фиг. 11B

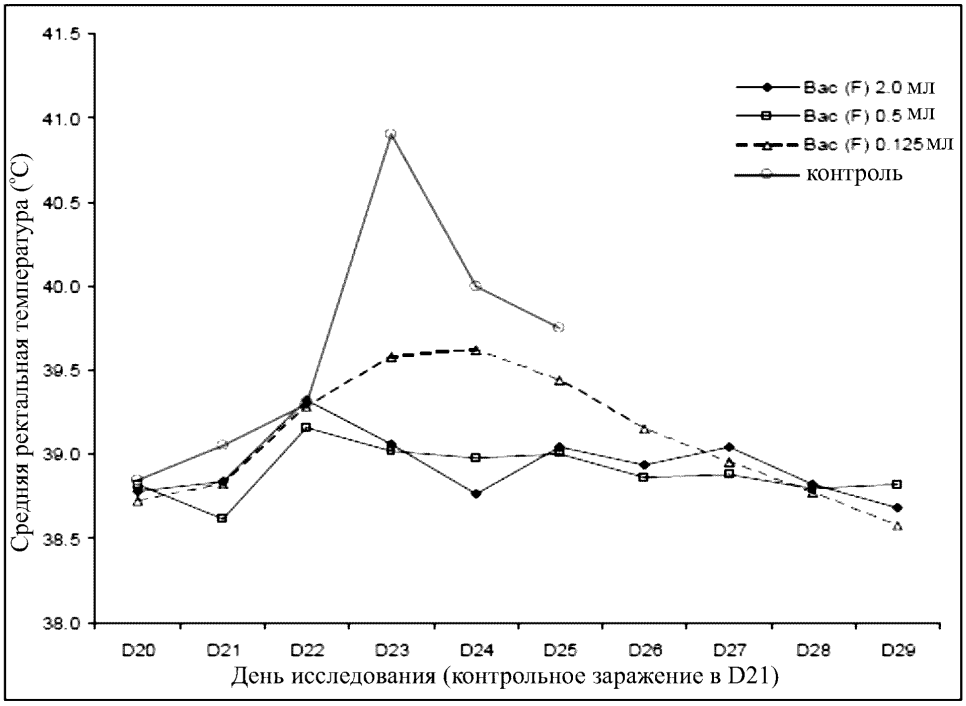


G4: контроль
G5: нефильтрованный бакуловирус 2,0 мл
G6: нефильтрованный бакуловирус 0,5 мл
G7: vCP 2.0

25

Фиг. 12A

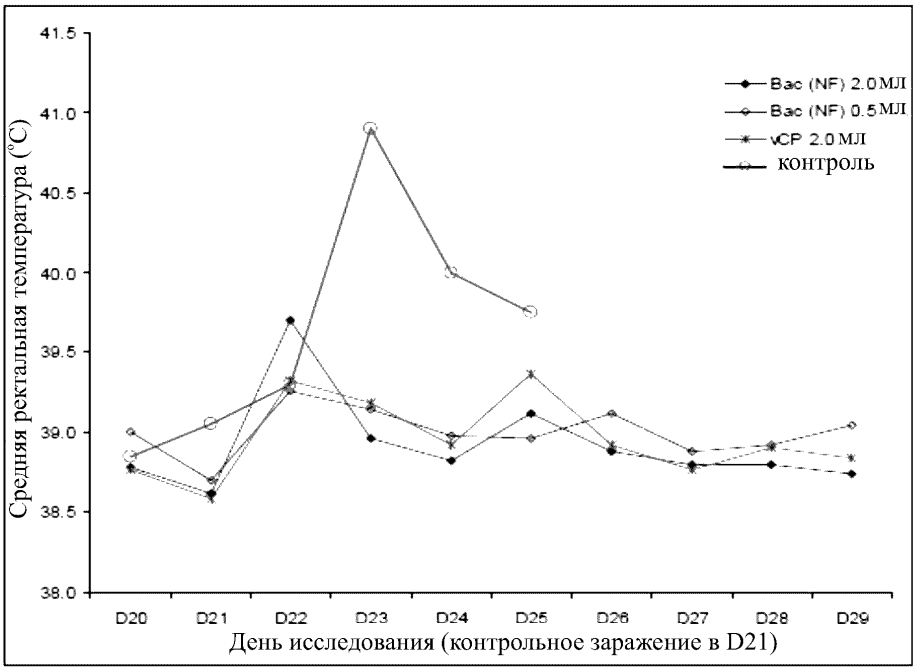
Изменение средней ректальной температуры после заражения



G1: фильтрованный бакуловирус 2,0 мл **G2** фильтрованный бакуловирус 0,5 мл
G3: фильтрованный бакуловирус 0,125 мл **G4**: контроль

Фиг. 12B

Изменение средней ректальной температуры после заражения



G5 фильтрованный бакуловирус 2,0 мл **G6**: фильтрованный бакуловирус 0,5 мл **G7: vCP 2.0** мл

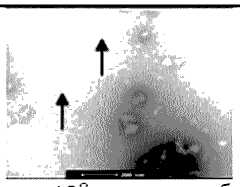
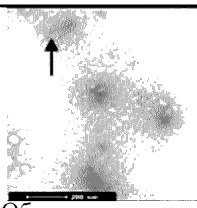
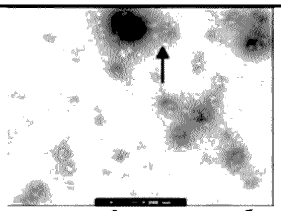
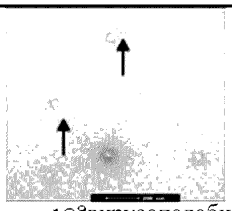
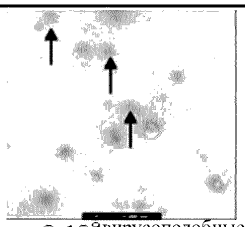
Фиг. 12C

Результаты испытаний на серонейтрализацию

Группа	Скот	Нейтрализующий титр для FMD A24 Cruzeiro (log10 PD50)		
		D0	D21	D29*
1 Фильторованный Вас, 2 мл	4869	0.75	1.65	3.30
	4870	< 0.30	1.35	3.15
	4871	< 0.30	1.95	2.10
	4872	< 0.30	1.35	3.15
	4873	< 0.30	1.95	2.25
	Среднее	**< 0.39**	**1.65**	**2.79**
	Sd	*0.20*	*0.30*	*0.57*
2 Фильторованный Вас, 0,5 мл	4874	< 0.30	0.90	3.30
	4875	< 0.30	1.65	3.30
	4876	1.20	1.20	3.30
	4877	0.60	1.35	3.00
	4878	0.60	1.20	2.70
	Среднее	**< 0.60**	**1.26**	**3.12**
	Sd	*0.37*	*0.27*	*0.27*
3 Фильторованный Вас, 0,125 мл	4879	< 0.30	0.75	3.00
	4880	< 0.30	1.05	2.70
	4881	0.60	0.75	3.30
	4882	< 0.30	0.75	* 1.80
	4883	< 0.30	1.35	1.80
	Среднее	**< 0.36**	**0.93**	**2.52**
	Sd	*0.13*	*0.27*	*0.69*
4 контроль	4884	< 0.30	< 0.30	* 0.90
	4885	0.60	< 0.30	* 0.75
	Среднее	**< 0.45**	**< 0.30**	**0.83**
	Sd	*0.21*	*0.00*	*0.11*
5 Нефильторованный Вас, 2 мл	4886	0.75	1.05	3.30
	4887	0.60	1.05	3.30
	4888	< 0.30	1.50	2.10
	4889	0.75	1.05	1.50
	4890	< 0.30	1.50	2.10
	Среднее	**< 0.54**	**1.23**	**2.46**
	Sd	*0.23*	*0.25*	*0.80*
6 Нефильторованный Вас, 0,5 мл	4891	< 0.30	1.05	2.70
	4892	0.60	1.05	3.00
	4893	< 0.30	1.05	3.15
	4894	< 0.30	0.75	2.70
	4895	< 0.30	1.05	2.40
	Среднее	**< 0.36**	**0.99**	**2.79**
	Sd	*0.13*	*0.13*	*0.29*
7 vCP 2 мл	4896	< 0.30	1.20	2.70
	4897	< 0.30	1.05	2.40
	4898	< 0.30	1.05	3.00
	4899	< 0.30	1.20	3.00
	4900	0.60	1.20	3.00
	Среднее	**< 0.36**	**1.14**	**2.82**

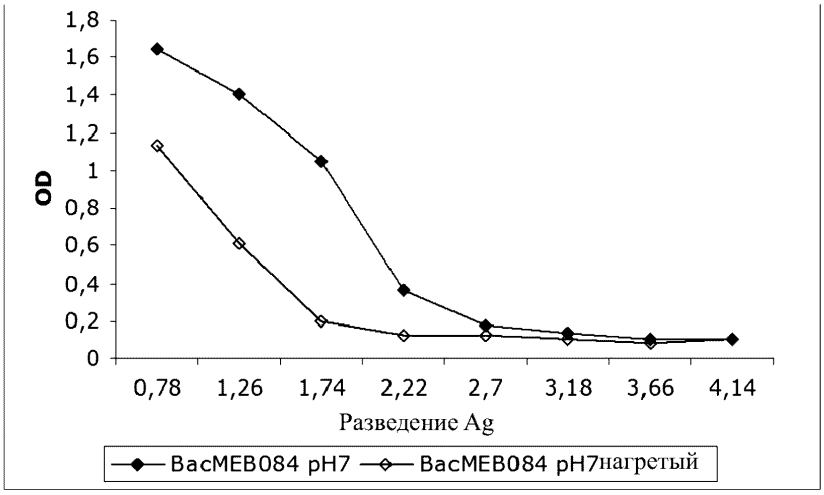
Фиг. 13

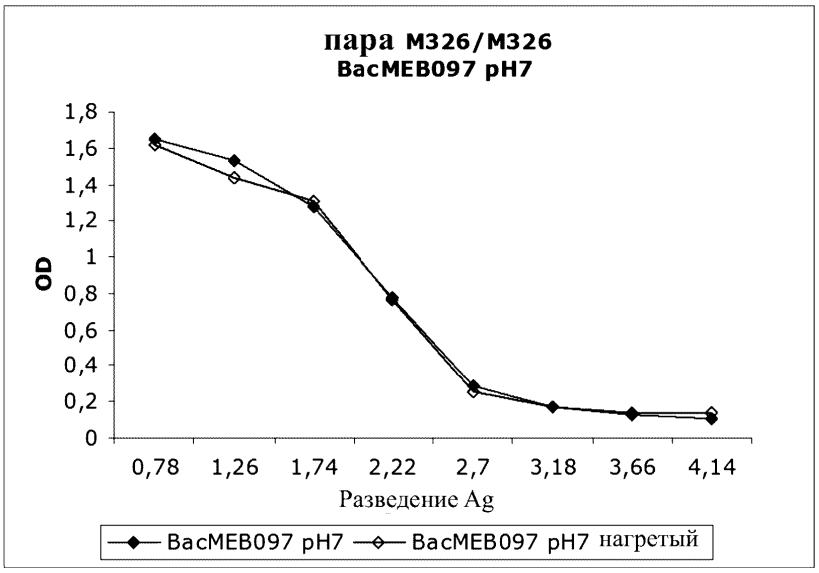
ЭМ анализ вирусоподобные частицы A24 Cruzeiro с (MEB097) или без (MEB084) ковалентной запирающей мутации в присутствии или в отсутствие нагревания или кислоты

Рекомбинантная бакуловирусная конструкция	A Обработка W/O	B 1 час при 56°C	C Подкисление: pH=5
«классический A24» =BacMEB084 образцы [ ] 4X	 10^8 вирусоподобные частицы /мл	 Обнаружено только несколько частиц	Нет вирусоподобных частиц
«стабилизированный A24» =BacMEB097 образцы [ ] 3,3X	 5.10^8 вирусоподобные частицы /мл	 10^9 вирусоподобные частицы /мл	 2.10^9 вирусоподобные частицы /мл

Фиг. 14

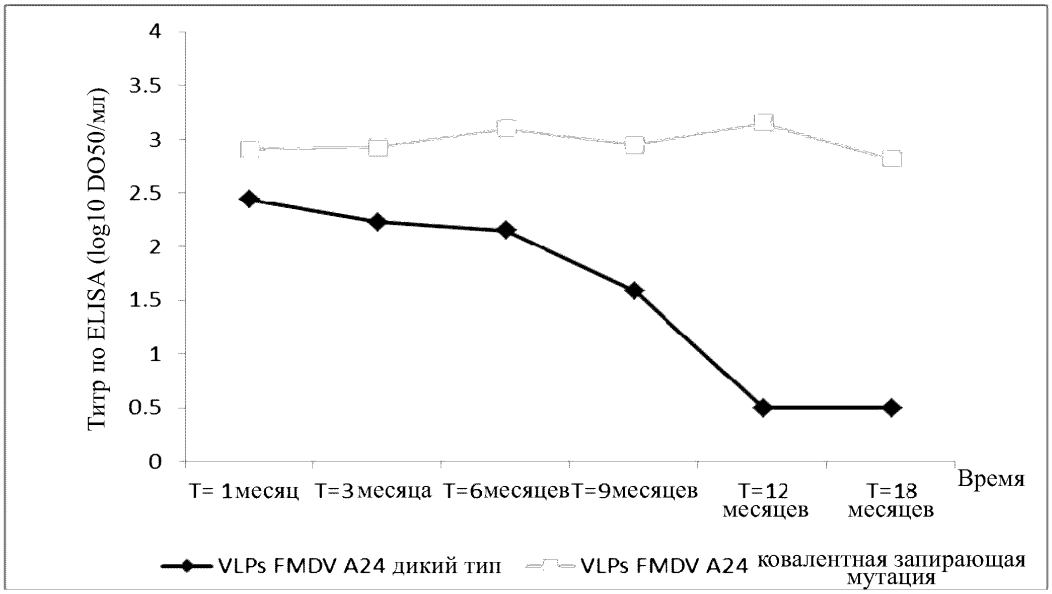
Анализ ELISA вирусоподобные частицы с (MEB097) или без (MEB084) ковалентной запирающей мутации для серотипа A24 Cruzeiro после нагревания





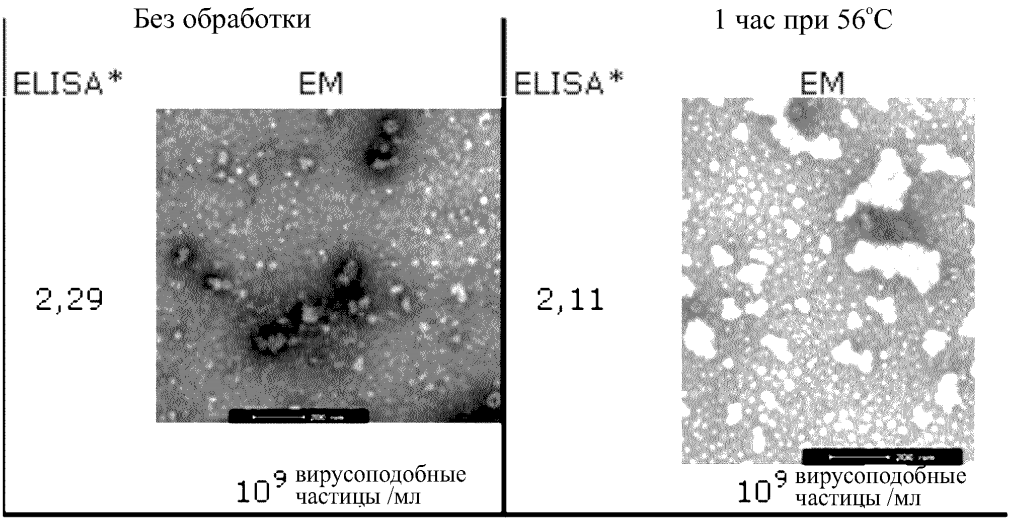
Фиг. 15

Анализ ELISA A24 Cruzeiro вирусоподобные частицы с (MEB097, ковалентная запирающая мутация) или без (MEB084, дикий тип) ковалентной запирающей мутации при хранении при 5°C со временем



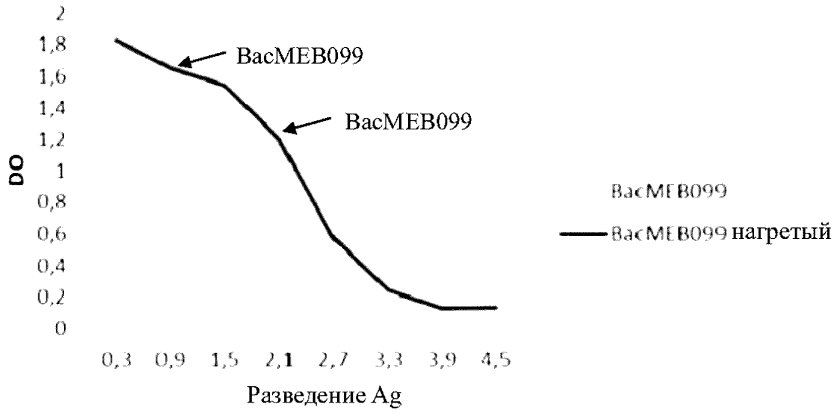
Фиг. 16

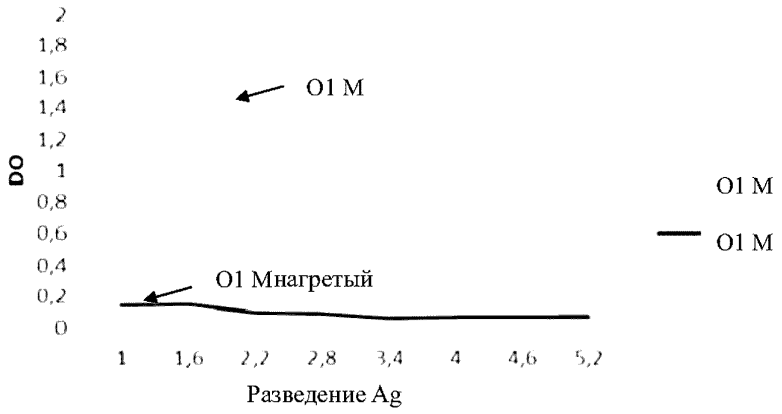
Результаты ELISA и картины ЭМ, показывающие, что вирусоподобные частицы O1 manisa с ковалентной запирающей мутацией устойчивы при нагревании



Фиг. 17

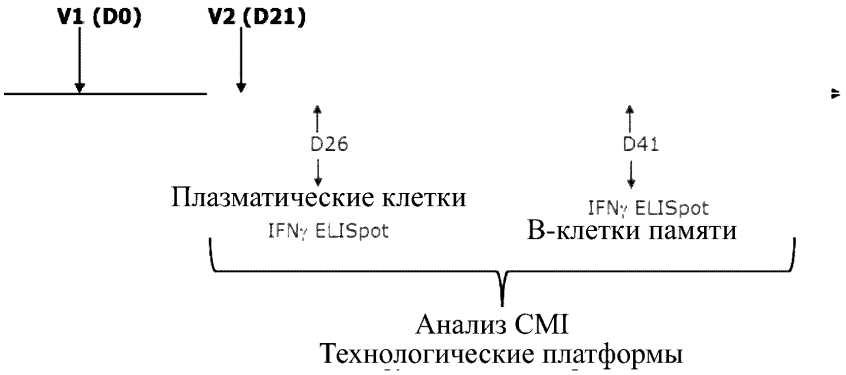
Результаты ELISA, показывающие устойчивость вирусоподобных частиц O1 manisa с ковалентной запирающей мутацией при нагревании





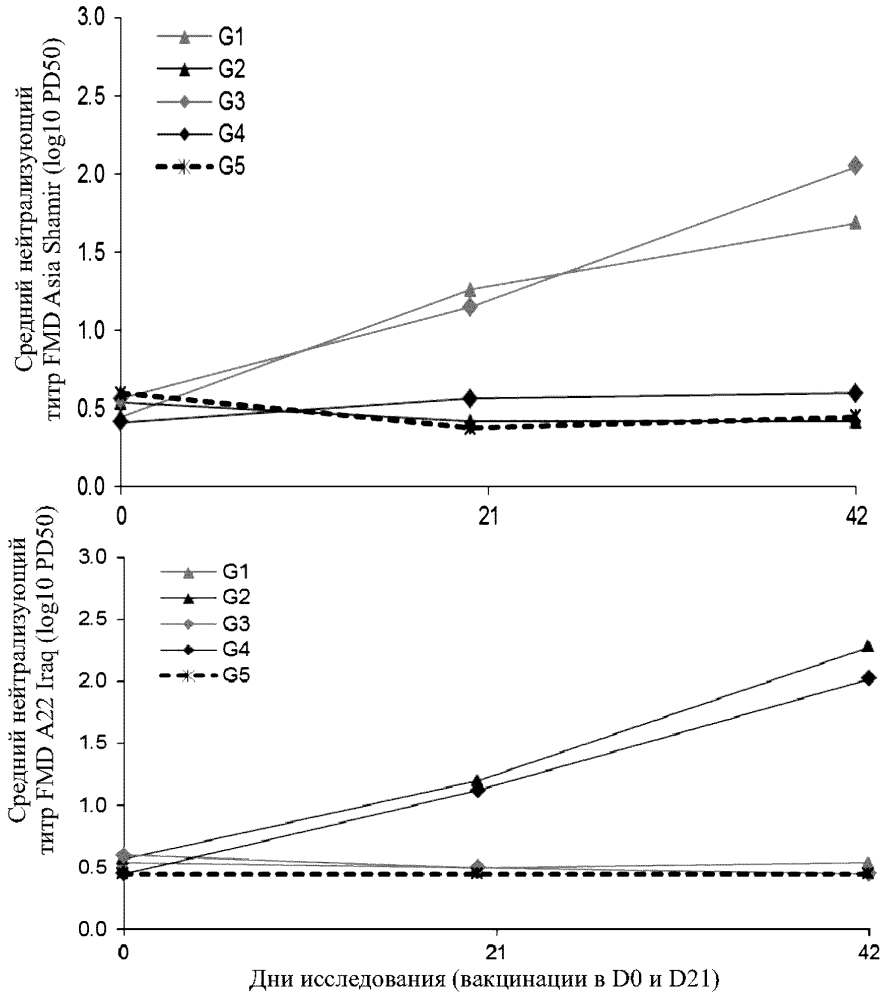
Фиг. 18A

Схема вакцинации и анализа



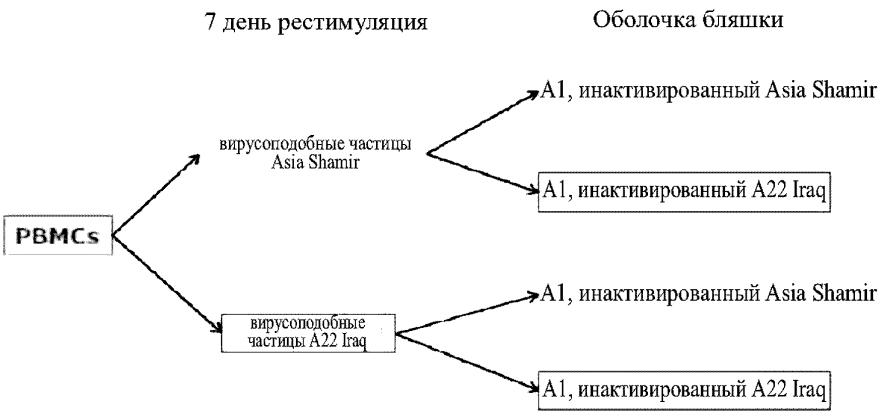
Фиг. 18B

Изменение титров нейтрализующих антител против FMD Asia Shamir и FMD A22 Iraq



Фиг. 19A

Гуморальная реакция – детекция B-клеток памяти



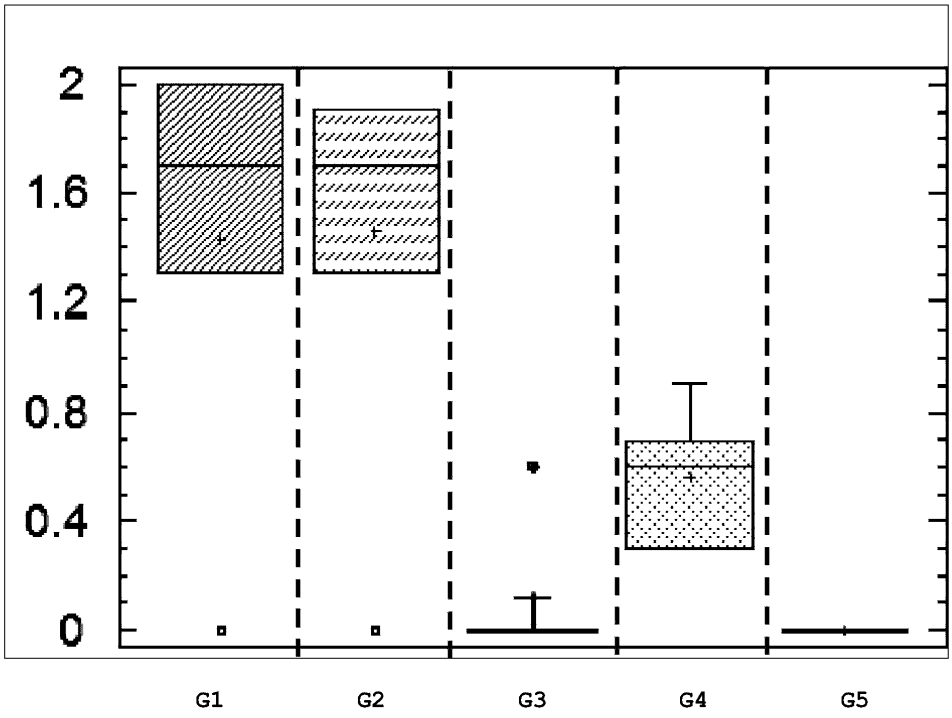
Фиг. 19B

Результаты серологии Asia Shamir с ковалентной запирающей мутацией и A22 Iraq с ковалентной запирающей мутацией

		Антигенспецифические реакции			
		Asia 1 Shamir		A22 Iraq	
Анализ	Группа ⟶	Asia Shamir вирусоподобные+TS6 частицы	A22 Iraq вирусоподобные+Ts6 частицы	Asia Shamir вирусоподобные+Ts6 частицы	A22 Iraq вирусоподобные+Ts6 частицы
Клетки, секретирующие IFNγ	Пептидный пул	+	-	+	+
Плазматические клетки, секретирующие IgG	Инактивированный A1	++	-	+	+
B-клетки памяти, секретирующие IgG	Оболочка Asia1 shamir AI	++	+	+	+/-
	Оболочка A22 Iraq AI	+	+	+	++

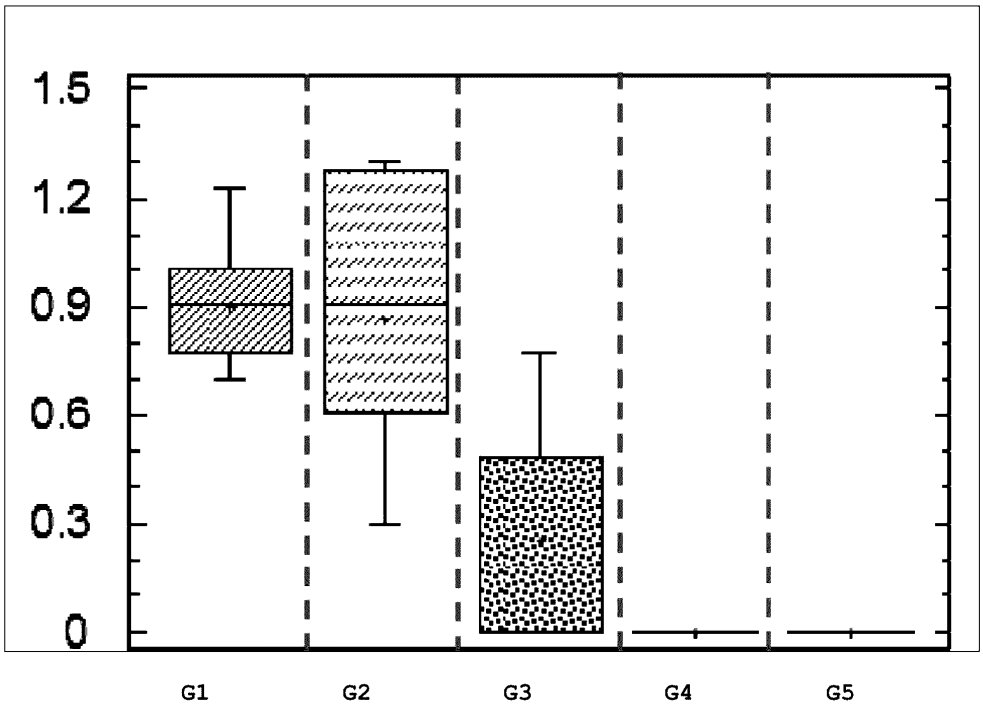
Фиг. 20

Специфические плазматические клетки, секретирующие IgG



Фиг. 21

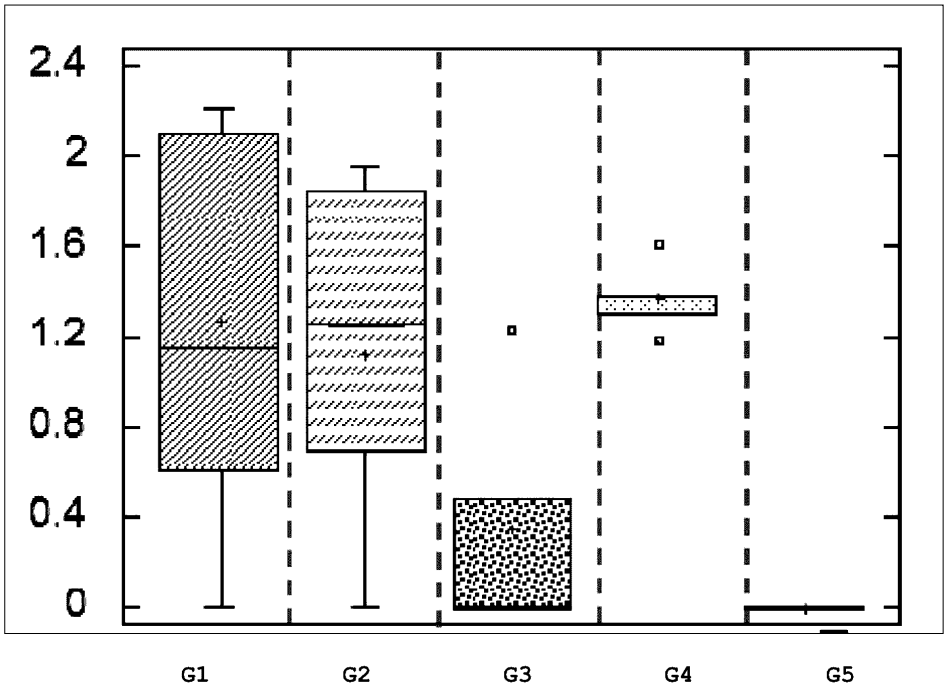
Специфические B-клетки памяти, секретирующие IgG



39

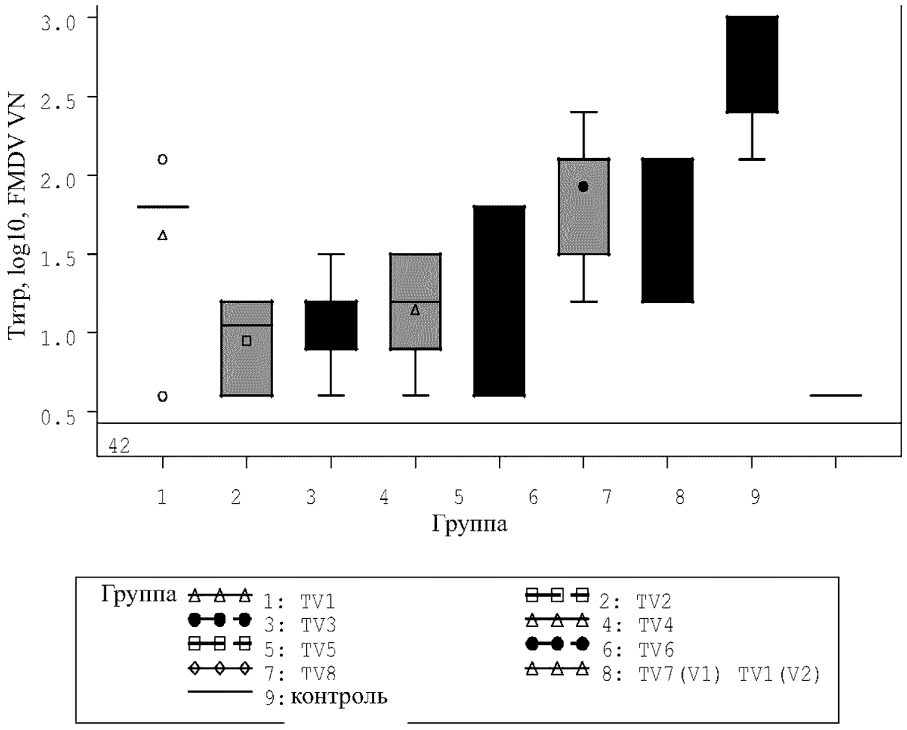
Фиг. 22

Специфические клетки, секретирующие IFNγ

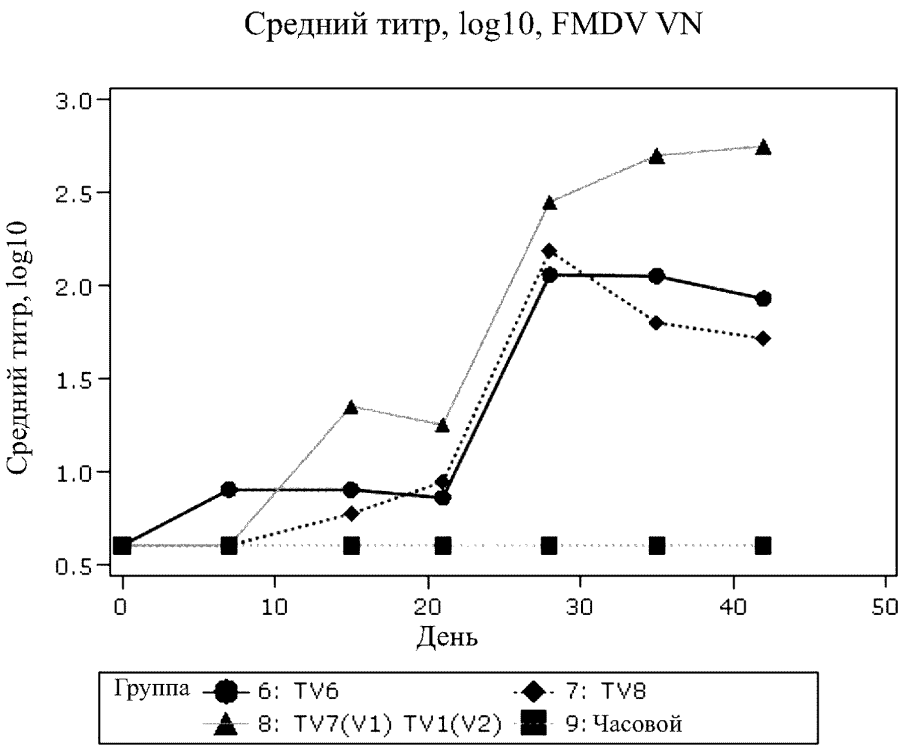


Фиг. 23

Титр, log10, FMDV SVN по группам на день 42

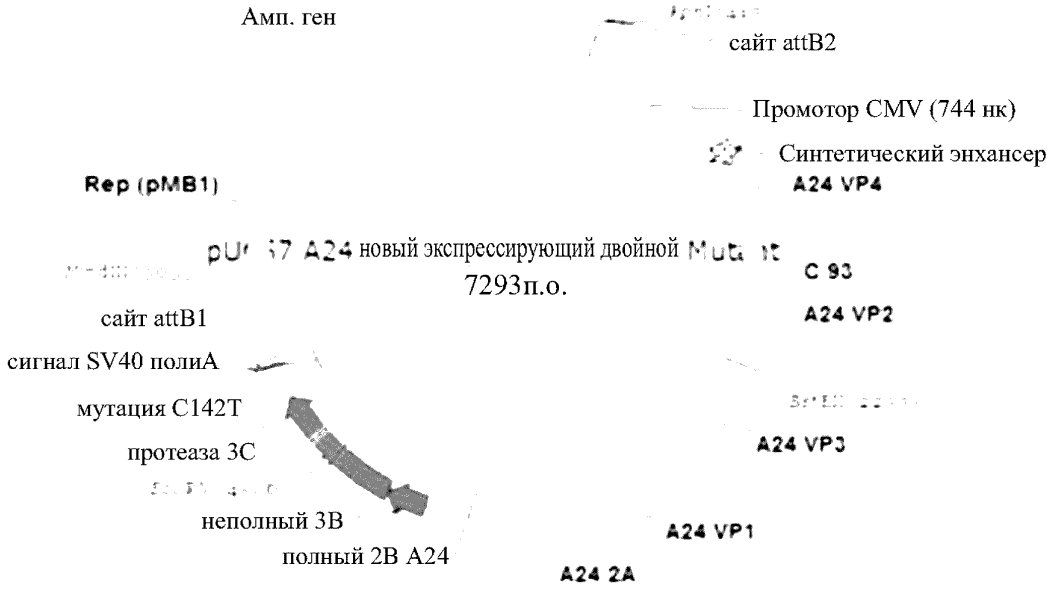


Фиг. 24


Средний титр, log10, FMDV VN
Средний титр, log10
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
10
20
30
40
50
День
Группа
6: TV6
7: TV8
8: TV7(V1) TV1(V2)
9: Часовой

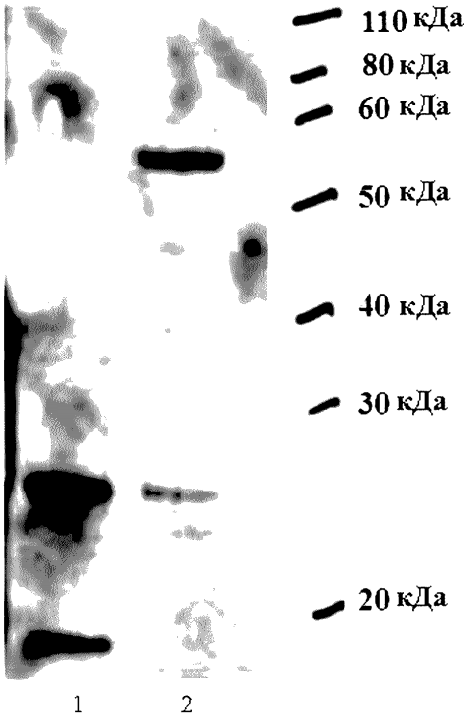
Фиг. 25

Карта плазмиды pAD3027



Фиг. 26

Вестерн-блоттинг vAD3027



Линия 1: контроль, показывающий VP2 (полностью процессирован)
Линия 2: vAD3027