



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2002132832/13, 05.12.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.07.1997

(30) Конвенционный приоритет:
19.07.1996 (пп.1-6) FR 96 09337

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2005

(45) Опубликовано: 20.12.2007 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 9520660, 03.08.1995. FLYNN J.N. et
al. Involvement of gag- and env-specific
cytotoxic T lymphocytes in protective
immunity to feline immunodeficiency virus.
AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1995 Sep; 11(9):
1107-13.

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки, из
которой данная заявка выделена: 99103209
15.07.1997

Адрес для переписки:

129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ОДОННЕ Жан-Кристоф (FR),
БУШАРДОН Аннабелль (FR),
БОДЮ Филипп (FR),
РИВЬЕР Мишель (FR)

(73) Патентообладатель(и):

МЕРИАЛЬ (FR)

(54) ФОРМУЛА КОШАЧЬЕЙ ВАКЦИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области генной
инженерии, вирусологии и ветеринарии. Вакцина
для кошек содержит плазмиду, включающую ген
env, gag/pro или оба гена env и gag/pro вируса

иммунодефицита кошек. Вакцина обеспечивает
иммунизацию кошек против иммунодефицита
кошек. Изобретение может быть использовано в
ветеринарии. 5 з.п. ф-лы, 16 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 312 676** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 39/21 (2006.01)

C12N 15/48 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2002132832/13, 05.12.2002**

(24) Effective date for property rights: **15.07.1997**

(30) Priority:
19.07.1996 (cl.1-6) FR 96 09337

(43) Application published: **20.01.2005**

(45) Date of publication: **20.12.2007 Bull. 35**

(62) Number and date of filing of the initial application, from which the given application is allocated: **99103209 15.07.1997**

Mail address:
**129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**ODONNE Zhan-Kristof (FR),
BUSHARDON Annabell' (FR),
BODJu Filipp (FR),
RIV'ER Mishel' (FR)**

(73) Proprietor(s):

MERIAL' (FR)

(54) FORMULA OF FELINE VACCINE

(57) Abstract:

FIELD: gene engineering, virology, veterinary science.

SUBSTANCE: the suggested feline vaccine contains a plasmid that includes gene env,

gag/pro or both genes env and gag/pro of feline immunodeficiency virus. This vaccine provides feline immunization against feline immunodeficiency.

EFFECT: higher efficiency.

5 cl, 16 dwg, 22 ex

Настоящее изобретение относится к формуле вакцины для вакцинации кошек против определенного числа патологий. Оно также относится к соответствующей методике вакцинации.

В прошлом уже были предложены сочетания вакцин против некоторых собачьих вирусов.

Сочетания, разработанные до настоящего времени, были созданы на основе инаktivированных или живых вакцин и в некоторых случаях смесей таких вакцин. Их использование ставит проблемы совместимости валентности и стабильности.

Действительно, необходимо обеспечить одновременно совместимость различных валентностей вакцины как в отношении различных используемых антигенов, так и в отношении самих составов, в частности в случае сочетания инаktivированных вакцин и живых вакцин. Также возникает проблема хранения таких комбинированных вакцин и их безвредности, в частности в присутствии добавок. Эти вакцины в целом являются достаточно дорогими.

В заявках WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 и WO-A-95 20660 описана недавно разработанная технология полинуклеотидных вакцин. Известно, что в этих вакцинах используют плазмиду, способную обеспечивать в клетках хозяина экспрессию встроенного в плазмиду антигена. Были предложены все пути введения (внутрибрюшинный, внутривенный, внутримышечный, чрезкожный, внутрикожный, через слизистую и т.д.) Также могут быть использованы различные средства вакцинации, такие как ДНК, помещенная на поверхность частиц золота и распыляемая таким образом, что проникает в кожу животного (Tang и др., Nature 356, 152-154, 1992), и жидкоструйные впрыскиватели, позволяющие осуществить трансфекцию одновременно в кожу, мышцы, жировые ткани и ткани молочных желез (Furth и др. Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992).

В полинуклеотидных вакцинах можно использовать как неodeтые ДНК, так и ДНК внутри липосом или катионных липидов.

Задачей изобретения является, таким образом, разработка формулы поливалентной вакцины, позволяющей осуществить вакцинацию против определенного числа патогенных собачьих вирусов.

Другой целью изобретения является разработка формулы вакцины, сочетающей различные валентности при сохранении всех критериев совместимости и стабильности валентности.

Другой целью изобретения является разработка формулы вакцины, позволяющей сочетать различные валентности в одном и том же носителе.

Другой целью изобретения является разработка вакцины, которая была бы проста в применении и не являлась бы дорогостоящей.

Еще одной целью изобретения является разработка методики вакцинации кошек, позволяющей добиться высокоэффективной и долговременной защиты, в т.ч.

поливалентной, при хороших показателях безвредности.

Таким образом, объектом изобретения является формула вакцины для кошек, включающая, по меньшей мере, три валентности полинуклеотидной вакцины, каждая из которых включает плазмиду, содержащую ген (и обеспечивающую его экспрессию *in vivo* в клетках хозяина) валентности кошачьего патогена, причем эти валентности выбирают из группы, представленной вирусом лейкемии (FeLV), вирусом панлейкопении (FPV), вирусом инфекционного перитонита (FIPV), вирусом воспаления носовых пазух (FHV), вирусом калицивироза (FCV), вирусом кошачьего иммунодефицита (FIV) и, возможно, вирусом бешенства (rabdovirus), а плазмиды включают в себя для каждой валентности один или несколько генов, выбранных из группы, представленной *env* и *gag/pol* для лейкемии кошек, *VP2* для панлейкопении, измененным *S* (или *S**) и *M* для инфекционного перитонита, *gB* и *gD* для воспаления носовых пазух, капсидом для калицивироза, *env* и *gag/pro* для кошачьего иммунодефицита и *G* для бешенства.

Под валентностью в рамках настоящего изобретения понимают, по меньшей мере, один

антиген, обеспечивающий защиту против вируса определенного патогена, при этом валентность может содержать в качестве субвалентности один или несколько природных или измененных генов одного или нескольких штаммов данного патогена.

Под геном патогенного агента понимают не только полный ген, но и различные нуклеотидные последовательности, включая фрагменты, сохраняющие способность вызывать защитный ответ. В понятие гена входят нуклеотидные последовательности, эквивалентные в точности описанным в примерах, т.е. различные, но кодирующие один и тот же протеин, последовательности. В него также входят нуклеотидные последовательности других штаммов данного патогена, обеспечивающие перекрестную защиту или защиту, специфичную для штамма или группы штаммов. Также в него входят нуклеотидные последовательности, которые были изменены для облегчения экспрессии *in vivo* в организме животного-хозяина, но кодирующие тот же протеин.

Предпочтительно формула вакцины согласно изобретению включает валентности панлейкопении, воспаления носовых пазух и калицивируса.

Могут быть добавлены валентности лейкемии кошек, кошачьего иммунодефицита и/или инфекционного перитонита.

В отношении валентности воспаления носовых пазух предпочтительно используют оба гена, кодирующие gB и gD, в разных плаزمиде или в одной плазмиде, или один из этих генов.

Для валентности лейкемии кошек используют предпочтительно оба гена *env* и *gag/pol*, встроенные в две разные плазмиды или в одну плазмиду, или только ген *env*.

Для валентности кошачьего иммунодефицита используют, предпочтительно, оба гена *env* и *gag/pro*, в разных плазмиде или в одной плазмиде, или один из этих генов. Еще предпочтительнее использовать ген *env* вируса FeLV-A или гены *env* вирусов FeLV-A и FeLV-B.

Для валентности инфекционного перитонита используют, предпочтительно, оба измененных гена M и S, в двух разных плазмиде или в одной плазмиде, или один из этих генов. S изменяют для инактивации облегчающих мажорных эпитопов, предпочтительно так, как описано в заявке PCT/FR 95/01128.

Объем дозы формулы вакцины согласно изобретению может составлять от 0,1 до 3 мл, и в частности от 0,5 до 1 мл.

Доза составляет в целом от 10 нг до 1 мг, предпочтительно от 100 нг до 500 мкг, еще лучше - от 1 до 250 мкг на тип плазмиды.

Предпочтительно используют неодетые вакцины, помещенные в вакцинный носитель, которым может быть физиологический раствор (0,9% NaCl), ультрачистая вода, буфер TE и т.п. Можно, разумеется, использовать любые формы полинуклеотидных вакцин, описанные до настоящего времени.

Каждая плаزمида включает промотор, обеспечивающий экспрессию зависимого гена в клетках хозяина. Им является сильный эукариотический промотор и, в частности ранний промотор цитомегаловируса CMV-IE, происходящий от человека или мыши, или, возможно, от другого животного, такого как крыса, свинья, морская свинка.

В общем промотор может быть как вирусного, так и клеточного происхождения.

В качестве вирусного промотора можно назвать ранний или поздний промотор вируса SV 40 или промотор LTR вируса Саркомы Рауса. Это также может быть промотор вируса, от которого происходит ген, например собственный промотор данного гена.

В качестве клеточного промотора можно назвать промотор гена цитоскелета, например промотор десмина (Bolmont и др., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122 и ZHENLIN и др. Gene, 1989, 78, 243-254) или промотор актина.

Если несколько генов находятся в одной плазмиде, они могут находиться в одной и той же единице транскрипции или в двух разных единицах.

Комбинация различных валентностей вакцины согласно изобретению предпочтительно может быть получена смешиванием полинуклеотидных плазмид, осуществляющих экспрессию одного или нескольких антигенов каждой валентности, но можно также

обеспечить экспрессию антигенов нескольких валентностей с помощью одной плазмиды.

Также объектом изобретения являются формулы одновалентной вакцины, включающей в себя одну или несколько плазмид, кодирующих один или несколько генов одного из вышеназванных вирусов, причем эти гены эквивалентны описанным выше. Кроме их
 5 одновалентного характера, эти формулы могут обладать представленными выше характеристиками в том, что касается выбора генов, их комбинаций, композиции плазмид, объемов доз, доз и т.д.

Формулы одновалентной вакцины могут также использоваться

(i) для получения формулы поливалентной вакцины, как она описана выше,

10 (ii) в индивидуальном порядке против конкретной патологии,

(iii) в сочетании с вакциной другого типа (цельной живой или инактивированной, рекомбинантной, субъединичной) против другой патологии, или

(iv) в качестве вакцины для вторичной вакцинации после вакцины, описанной ниже.

Действительно, еще одним объектом настоящего изобретения является использование

15 одной или нескольких плазмид согласно изобретению для получения вакцины,

предназначенной для вакцинации кошек, первично вакцинированных с помощью первой классической вакцины (одновалентной или поливалентной) старого образца, выбранной, в частности, из группы, представленной цельной живой вакциной, цельной инактивированной вакциной, субъединичной вакциной, рекомбинантной вакциной, при этом данная, первая,
 20 вакцина несет (т.е. включает в себя или обеспечивает их экспрессию) один или несколько антигенов, кодируемых одной или несколькими используемыми плазмидами, или антигенов, обеспечивающих перекрестную защиту.

Замечательным фактором является то, что полинуклеотидная вакцина оказывает сильное действие в качестве второй вакцины, проявляющееся в усилении иммунного
 25 ответа и установлении длительного иммунитета.

В общем вакцины для первичной вакцинации могут быть выбраны из вакцин, выпускаемых на продажу различными производителями ветеринарных вакцин.

Объектом изобретения также является набор для вакцинации, в который входит вакцина для первичной вакцинации, как она описана выше, и формула вакцины согласно
 30 изобретению в качестве второй вакцины. Изобретение также относится к формуле вакцины согласно изобретению с приложенной к ней инструкцией, в которой описано использование этой формулы в качестве второй вакцины после первичной вакцинации, как она описана выше.

Также объектом настоящего изобретения является методика вакцинации кошек, включающая введение эффективной формулы вакцины, как она описана выше. Эта методика вакцинации включает в себя введение одной или нескольких доз формулы вакцины, причем эти дозы могут быть введены последовательно через короткие промежутки времени или последовательно через длительные промежутки времени.

Формулы вакцины согласно изобретению могут быть, в рамках данной методики
 40 вакцинации, введены различными путями введения, используемыми на практике для полинуклеотидной вакцинации, и с использованием любой известной техники введения.

Также объектом изобретения является методика вакцинации, заключающаяся в том, что проводят первичную вакцинацию, как описано выше, и вторичную вакцинацию формулой вакцины согласно изобретению.

45 Согласно предпочтительной форме осуществления способа данного изобретения сначала животному вводят эффективную дозу вакцины классического типа, в частности инактивированную, живую, ослабленную или рекомбинантную, или субъединичную вакцину, таким образом, чтобы обеспечить первичную вакцинацию, и, предпочтительно, через 2-6 недель вводят поливалентную или одновалентную вакцину согласно изобретению.

50 Эффективность антигенов в иммунной системе зависит от конкретных тканей. В частности, слизистые оболочки дыхательных путей служат барьером для патогенов и сочетаются с лимфоидными тканями, осуществляющими местный иммунитет. Введение вакцины через контакт со слизистыми оболочками, в особенности слизистыми оболочками

ротовой полости, глотки и бронхиальной зоны, представляет большой интерес для вакцинации против респираторных патологий и патологий пищеварения.

Таким образом, введение через слизистые оболочки составляет часть предпочтительного способа введения согласно изобретению с использованием, в частности, пульверизации или спрея, или воды для питья. Формулы вакцины и методики вакцинации согласно изобретению могут быть применены в рамках этого способа.

Изобретение также относится к методике получения формул вакцины, а именно получения валентностей и их смесей, как следует из данного описания.

Далее изобретение описано более детально в виде способов осуществления изобретения с опорой на чертежи приложения.

СПИСОК ФИГУР

Фигура №1: Плазмида pVR1012

Фигура №2: Плазмида pPB179

Фигура №3: Последовательность гена env FeLV-B

Фигура №4: Плазмида pPB180

Фигура №5: Последовательность gag/pol вируса FeLV-A штамма Glasgow-1

Фигура №6: Плазмида pPB181

Фигура №7: Плазмида pAB009

Фигура №8: Плазмида pAB053

Фигура №9: Плазмида pAB052

Фигура №10: Плазмида pAB056

Фигура №11: Плазмида pAB028

Фигура №12: Плазмида pAB029

Фигура №13: Плазмида pAB010

Фигура №14: Плазмида pAB030

Фигура №15: Плазмида pAB083

Фигура №16: Плазмида pAB041

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ SEQ ID №

SEQ ID №1: Олигонуклеотид PB247

SEQ ID №2: Олигонуклеотид PB249

SEQ ID №3: Олигонуклеотид PB281

SEQ ID №4: Олигонуклеотид PB282

SEQ ID №5: Последовательность гена env вируса FeLV-B

SEQ ID №6: Олигонуклеотид PB283

SEQ ID №7: Олигонуклеотид PB284

SEQ ID №8: Последовательность гена gag/pol вируса FeLV-A (Glasgow-1)

SEQ ID №9: Олигонуклеотид AB021

SEQ ID №10: Олигонуклеотид AB024

SEQ ID №11: Олигонуклеотид AB103

SEQ ID №12: Олигонуклеотид AB112

SEQ ID №13: Олигонуклеотид AB113

SEQ ID №14: Олигонуклеотид AB104

SEQ ID №15: Олигонуклеотид AB101

SEQ ID №16: Олигонуклеотид AB102

SEQ ID №17: Олигонуклеотид AB106

SEQ ID №18: Олигонуклеотид AB107

SEQ ID №19: Олигонуклеотид AB061

SEQ ID №20: Олигонуклеотид AB064

SEQ ID №21: Олигонуклеотид AB065

SEQ ID №22: Олигонуклеотид AB066

SEQ ID №23: Олигонуклеотид AB025

SEQ ID №24: Олигонуклеотид AB026

SEQ ID №25: Олигонуклеотид AB067

SEQ ID №26: Олигонуклеотид AB070

SEQ ID №27: Олигонуклеотид AB154

SEQ ID №28: Олигонуклеотид AB155

5 SEQ ID №29: Олигонуклеотид AB011

SEQ ID №30: Олигонуклеотид AB012

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Культура вирусов

Вирусы культивируют на соответствующей системе клеток до проявления
10 цитопатического эффекта. Системы клеток, используемые для каждого вируса, хорошо известны специалистам. Говоря коротко, клетки, чувствительные к используемому вирусу, культивируемые в минимальной необходимой среде Игла (среда "MEM") или в другой подходящей среде, заражают исследуемым штаммом вируса, используя множественность заражения 1. Инфицированные клетки инкубируют при 37°C в течение времени,
15 необходимого для проявления полного цитопатического эффекта (в среднем 36 часов).

ПРИМЕР 2: Экстракция геномных вирусных ДНК

После культивации собирают разрушенные клетки и их плавающие на поверхности обломки и центрифугируют суспензию вируса при 1000 g при +4°C в течение 10 минут для удаления обломков клеток. Вирусные частицы затем осаждают ультрацентрифугированием
20 при 400000 g и +4°C в течение 1 часа. Осадок собирают в минимальном объеме буфера (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Эту концентрированную суспензию вируса обрабатывают протеиназой K (100 мкг/мл в конечной концентрации) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) (0,5% конечн.) в течение 2 часов при 37°C. Затем вирусную ДНК экстрагируют в смеси фенол/хлороформ, затем осаждают 2 объемами абсолютного этанола. Оставляют
25 на ночь при -20°C и центрифугируют при 10000 g и при +4°C в течение 15 минут. Осажденную ДНК высушивают и собирают в минимальном объеме стерильной ультрачистой воды. Затем она может быть расщеплена ферментами рестрикции.

ПРИМЕР 3: Выделение геномных вирусных РНК

РНК-содержащие вирусы были очищены в соответствии с хорошо известными
30 специалистам технологиями. Затем выделяли вирусную геномную РНК каждого вируса, используя технику экстракции "тиоцианат гуанидия/фенолхлороформ", описанную P.Chomczynski и N.Sacchi (Anal. Biochem. 1987. 162. 156-159).

ПРИМЕР 4: Технологии молекулярной биологии

Все плазмидные конструкции были получены с использованием стандартных технологий
35 молекулярной биологии, описанных J.Sambrook и др. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2-е издание. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Все рестрикционные фрагменты, использованные в настоящем изобретении, были выделены с помощью набора "Geneclean" (BIO 101 Inc. La Jolla, CA).

ПРИМЕР 5: Технология полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой

40 Специфические олигонуклеотиды (содержащие на 5'-концах сайты рестрикции для облегчения клонирования амплифицированных фрагментов) были синтезированы таким образом, что они полностью перекрывают кодирующие участки генов, которые должны быть амплифицированы (см. специфические примеры). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскриптазой (RT) и амплификацией проводили по стандартным
45 технологиям (Sambrook J. и др. 1989). Каждую реакцию RT-ПЦР проводили с парой специфических амплимеров, используя в качестве матрицы экстрагированную РНК вирусного генома. Амплифицированную комплементарную ДНК экстрагировали смесью фенола/хлороформа/изоамилового спирта (25:24:1) перед ее расщеплением рестриктазами.

50 ПРИМЕР 6: Плазида pVR1012

Плазида pVR1012 (фиг. №1) была получена при Vical Inc. San Diego, CA, USA. Ее конструирование описано в J.Hartikka и др. (Human Gene Therapy. 1996. 7. 1205-1217).

ПРИМЕР 7: Конструирование плазмиды pPB179 (ген env вируса FeLV-A)

По технологии из примера 5 провели реакцию RT-ПЦР и РНК генома вируса лейкемии, кошек (FeLV-A) (Штамм Glasgow-1) (M.Stewart и др. J.Virol. 1986.58. 825-834), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

PB247 (29 мер.) (SEQ ID №1)

5 5'-TTTGTGCGACCATGGAAAGTCCAACGCACC-3'

PB249 (28 мер.) (SEQ ID №2)

5'-TTTGGATCCTCATGGTCGGTCCGGATCG-3',

чтобы амплифицировать фрагмент из 1947 нп (нуклеотидных пар), содержащий ген, кодирующий гликопротеин Env вируса FeLV-A (штамм Glasgow-1), в виде фрагмента Sall-BamHI. После очистки продукт RT-ПЦР подвергали расщеплению с помощью Sall и BamHI, чтобы получить фрагмент Sall-BamHI (1935 нп).

Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью Sall и BamHI, и получали плазмиду pPB179 (6804 нп) (фиг. №2).

ПРИМЕР 8: Конструирование плазмиды pPB180 (ген env вируса FeLV-B)

15 По технологии из примера 5 провели реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса лейкемии кошек (подтип FeLV-B), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

PB281 (29 мер.) (SEQ ID №3)

5'-TTTGTGCGACATGGAAGGTCCAACGCACCC-3'

20 PB282 (32 мер.) (SEQ ID №4)

5'-TTGGATCCTCATGGTCGGTCCGGATCATATTG-3',

чтобы амплифицировать фрагмент (2005 нп), содержащий ген, кодирующий гликопротеин Env вируса FeLV-B (фиг. №3 и SEQ ID №5) в форме фрагмента Sall-BamHI. После очистки продукт RT-ПЦР расщепляли с помощью Sall и BamHI, чтобы получить фрагмент Sall и BamHI (1995 нп).

Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью Sall и BamHI, и получали плазмиду pPB180 (6863 нп) (фиг. №4).

ПРИМЕР 9: Конструирование плазмиды pPB181 (ген FeLV gag/pol)

По технологии из примера 5 провели реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса лейкемии кошек (подтип FeLV-A) (штамм Glasgow-1), полученной по методике из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

PB283 (33 мер.) (SEQ ID №6)

5'-TTGTGCGACATGTCTGGAGCCTCTAGTGGGACAG-3'

PB284 (40 мер.) (SEQ ID №7)

35 5'-TTGGATCCTTATTTAATTAAGTGCAGTTCCAAGGAAGTCTC-3',

чтобы амплифицировать фрагмент (3049 нп), содержащий последовательность, кодирующую протеин Gag, и часть 5'-последовательности, кодирующую протеин Pol вируса FeLV-A (штамм Glasgow-1) (фиг. №5 и SEQ ID №8) в форме фрагмента Sall-BamHI. После очистки продукт RT-ПЦР расщепляют с помощью Sall и BamHI, чтобы получить фрагмент Sall-BamHI (3039 нп).

Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью Sall и BamHI, и получали плазмиду pPB181 (7908 нп) (фиг. №6).

ПРИМЕР 10: Конструирование плазмиды pAB009 (ген FPV VP2)

Провели реакцию ПЦР с геномной ДНК вируса панлейкопении кошек (штамм 193) (J.Martyn и др. J.Gen. Virol. 1990. 71. 2747-2753), полученной по технологии из примера 2, и со следующими олигонуклеотидами:

AB021 (34 мер.) (SEQ ID №9)

5'-TGCTCTAGAGCAATGAGTGATGGAGCAGTTCAAC-3'

AB024 (33 мер.) (SEQ ID №10)

50 5'-CGCGGATCCATTAATATAATTTTCTAGGTGCTA-3'

для амплификации фрагмента (1776 нп), содержащего ген, кодирующий протеин капсида VP2 вируса FPV. После очистки продукт ПЦР расщепляли с помощью XbaI и BamHI, чтобы получить фрагмент XbaI-BamHI (1764 нп).

Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью XbaI и BamHI, и получали плазмиду pAB009 (6664 нп) (фиг. №7).

ПРИМЕР 11: Конструирование плазмиды pAB053 (ген FeLV S*)

По технологии из примера 5 проводили реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса инфекционного перитонита кошек (PIF) (штамм 79-1146) (R.de Groot и др. J.Gen. Virol. 1987. 68. 2639-2646), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

AB103 (38 мер.) (SEQ ID №11)

5'-ATAAGAATGCGGCCGCGCATGATTGTGCTCGTAACTTGCC-3'

AB112 (25 мер.) (SEQ ID №12)

5'-CGTACATGTGGAATTCCACTGGTTG-3',

чтобы амплифицировать последовательность на 5'-конце гена, кодирующего гликопротеин S вируса, в форме фрагмента NotI-EcoRI. После очистки продукт RT-ПЦР (492 нп) расщепляли с помощью NotI и EcoRI, чтобы освободить фрагмент NotI-EcoRI (467 нп) (фрагмент А).

Плазмиду pJCA089 (заявка PCT/FR 95/01128) расщепляли с помощью EcoRI и SpeI, чтобы высвободить фрагмент (3378 нп), содержащий центральную часть гена, кодирующего измененный гликопротеин S вируса PIF (фрагмент В).

По технологии из примера 5 провели реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса PIF (штамм 79-1146), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

AB113 (25 мер.) (SEQ ID №13)

5'-AGAGTTGCACTAGTTCTGATTTTG-3'

AB104 (37 мер.) (SEQ ID №14)

5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTGGACATGCACTTTTTC-3',

чтобы амплифицировать последовательность части 3'-гена, кодирующего гликопротеин S вируса PIF, в форме фрагмента SpeI-NotI. После очистки продукт RT-ПЦР (543 нп) расщепляли с помощью SpeI и NotI, чтобы высвободить фрагмент SpeI-NotI (519 нп) (фрагмент С).

Фрагменты А, В, С вместе сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью NotI, и получали плазмиду pAB053 (9282 нп), содержащую измененный ген S в нужной ориентации по отношению к промотору (фиг. №8).

ПРИМЕР 12: Конструирование плазмиды pAB052 (ген FIPV M)

По технологии из примера 5 проводили реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса инфекционного перитонита кошек (PIF) (штамм 79-1146) (H.Vennema и др. Virology. 1991. 181. 327-335), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

AB101 (37 мер.) (SEQ ID №15)

5'-ACGCGTCGACCCACCATGAAGTACATTTTGCTAATAC-3'

AB102 (36 мер.) (SEQ ID №16)

5'-CGCGGATCCTTACACCATATGTAATAATTTTTCATG-3',

чтобы точно выделить ген, кодирующий гликопротеин М вируса PIF, в форме фрагмента SalI-BamHI. После очистки продукт RT-ПЦР (812 нп) расщепляли с помощью SalI и BamHI, чтобы высвободить фрагмент SalI-BamHI (799 нп). Затем этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью SalI и BamHI, и получали плазмиду pAB052 (5668 нп) (фиг. №9).

ПРИМЕР 13: Конструирование плазмиды pAB056 (ген FIPV N)

По технологии из примера 5 провели реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса инфекционного перитонита кошек (PIF) (штамм 79-1146) (H.Vennema и др. Virology. 1991. 181. 327-335), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

AB106 (35 мер.) (SEQ ID №17)

5'-ACGCGTCGACGCCATGGCCACACAGGGACAACGCG-3'

AB107 (36 мер.) (SEQ-ID №18)

5'-CGCGGATCCTTAGTTCGTAACCTCATCAATCATCTC-3',

чтобы точно выделить ген, кодирующий протеин N вируса PIF в форме фрагмента Sall-BamHI. После очистки продукт RT-ПЦР (1156 нп) расщепляли с помощью Sall и BamHI, чтобы высвободить фрагмент Sall-BamHI (1143 нп). Затем этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью Sall и BamHI, и получали плазмиду pAB056 (6011 нп) (фиг. №10).

ПРИМЕР 14: Конструирование плазмиды pAB028 (ген FHV gB)

Проводили реакцию ПЦР с геномной ДНК кошачьего вируса герпеса (FHV-1) (штамм C27) (S.Spatz и др. Virology. 1993. 197. 125-36), полученной по технологии из примера 2, и со следующими олигонуклеотидами:

AB061 (36 мер.) (SEQ ID №19)

5'-AAAACCTGCAGAATCATGTCCACTCGTGGCGATCTTG-3'

AB064 (40 мер.) (SEQ ID №20)

5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAGACAAGATTTGTTTCAGTATC-3',

чтобы амплифицировать фрагмент (2856 нп), содержащий ген, кодирующий гликопротеин gB вируса FHV-1, в форме фрагмента PstI-NotI. После очистки продукт ПЦР был расщеплен с помощью PstI и NotI, чтобы получить фрагмент PstI-NotI (2823 нп).

Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью PstI и NotI, и получали плазмиду pAB028 (7720 нп) (фиг. №11).

ПРИМЕР 15: Конструирование плазмиды pAB029 (ген FHV gD)

Проводили реакцию ПЦР с геномной ДНК кошачьего вируса герпеса (FHV-1) (штамм C-27) (S.Spatz и др. J.Gen. Virol. 1994. 75. 1235-1244), полученной по технологии из примера 2, и со следующими олигонуклеотидами:

AB065 (36 мер.) (SEQ ID №21)

5'-AAAACCTGCAGCCAATGATGACACGTCTACATTTTTTG-3'

AB066 (33 мер.) (SEQ ID №22)

5'-GGAAGATCTTTAAGGATGGTGAGTTGTATGTAT-3',

чтобы амплифицировать ген, кодирующий гликопротеин gD вируса FHV-1, в форме фрагмента PstI-BglII. После очистки продукт ПЦР (1147 нп) расщепляли с помощью PstI и BglII, чтобы изолировать фрагмент PstI-BglII (1129 нп). Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью PstI и BglII, и получали плазмиду pAB029 (5982 нп) (фиг. №12).

ПРИМЕР 16: Конструирование плазмиды pAB010 (ген FCV C)

По технологии из примера 5 провели реакцию RT-ПЦР с геномной РНК кошачьего калицивируса (FCV) (штамм F9) (M.Carter и др. Virology. 1992. 190. 443-448), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

AB025 (33 мер.) (SEQ ID №23)

5'-ACGCGTCGACGCATGTGCTCAACCTGCGCTAAC-3'

AB026 (31 мер.) (SEQ ID №24)

5'-CGCGGATCCTCATAACTTAGTCATGGGACTC-3',

чтобы выделить ген, кодирующий протеин капсида вируса FCV, в форме фрагмента Sall-BamHI. После очистки продукт RT-ПЦР (2042 нп) расщепили с помощью Sall и BamHI, чтобы изолировать фрагмент Sall-BamHI (2029 нп). Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью Sall и BamHI, и получали плазмиду pAB010 (6892 нп) (фиг. №13).

ПРИМЕР 17: Конструирование плазмиды pAB030 (ген FIV env)

По технологии из примера 5 проводили реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса кошачьего иммунодефицита (FIV) (штамм Petaluma) (R.Olmsted и др. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989. 86. 8088-8096), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

AB067 (36 мер.) (SEQ ID №25)

5'-AAAACCTGCAGAAGGAATGGCAGAAGGATTTGCAGCC-3'

AB070 (36 мер.) (SEQ ID №26)

5'-CGCGGATCCTCATTCTCTCTTTTCAGACATGCC-3',

чтобы амплифицировать фрагмент (2592 нп), содержащий ген, кодирующий гликопротеин Env вируса FIV (штамм Petaluma), в форме фрагмента PstI-BamHI. После
5 очистки продукт RT-ПЦР расщепляли с помощью PstI и BamHI, чтобы получить фрагмент PstI-BamHI (2572 нп). Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью PstI и BamHI, и получали плазмиду pAB030 (7436 нп) (фиг. №14).

ПРИМЕР 18: Конструирование плазмиды pAB083 (ген FIV gag/pro)

10 По технологии из примера 5 провели реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса кошачьего иммунодефицита (FIV) (штамм Petaluma) (R.Olmsted и др. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. 86. 8088-8096), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

AB154 (32 мер.) (SEQ ID №27)

15 5'-ACGCGTCGACATGGGGAATGGACAGGGGCGAG-3'

AB155 (33 мер.) (SEQ ID №28)

5'-TGAAGATCTTCACTCATCCCCCTTCAGGAAGAGC-3',

чтобы амплифицировать фрагмент (4635 нп), содержащий ген, кодирующий протеины Gag и Pro вируса FIV (штамм Petaluma), в форме фрагмента Sall-BglII. После очистки
20 продукт RT-ПЦР расщепляли с помощью Sall и BglII, чтобы получить фрагмент Sall-BglII (4622 нп). Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью Sall и BglII, и получали плазмиду pAB083 (7436 нп) (фиг. №15).

ПРИМЕР 19: Конструирование плазмиды pAB041 (ген G вируса бешенства)

По технологии из примера 5 проводили реакцию RT-ПЦР с геномной РНК вируса
25 бешенства (штамм ERA) (A.Anilionis и др. Nature. 1981. 294. 275-278), полученной по технологии из примера 3, и со следующими олигонуклеотидами:

AB011 (33 мер.) (SEQ ID №29)

5'-AAAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG-3'

AB012 (34 мер.) (SEQ ID №30)

30 5'-CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTC-3',

чтобы амплифицировать фрагмент (1589 нп), содержащий ген, кодирующий гликопротеин G вируса бешенства. После очистки продукт RT-ПЦР расщепляли с помощью
PstI и BamHI, чтобы получить фрагмент PstI-BamHI (1578 нп). Этот фрагмент сшивали с вектором pVR1012 (пример 6), предварительно расщепленным с помощью PstI и BamHI, и
35 получали плазмиду pAB041 (6437 нп) (фиг. №16).

ПРИМЕР 20: Получение и очистка плазмид

Для получения плазмид, предназначенных для вакцинации животных, можно применять любую технологию, позволяющую получить суспензию очищенных плазмид по большей
40 части в сверхскрученной форме. Такие технологии хорошо известны специалистам. Можно назвать, в частности, технику щелочного лизиса с последующим двукратным центрифугированием в градиенте хлорида цезия в присутствии бромида этидия, как описано в J.Sambrook и др. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2-е издание. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Можно также обратиться к материалам заявок PCT WO 95/21250 и PCT WO 96/02658, в которых описаны методы
45 получения в промышленном масштабе плазмид для вакцинации. Для получения вакцин (см.пример 17) очищенные плазмиды помещают в суспензию таким образом, чтобы получить высококонцентрированные растворы (>2 мг/мл), пригодные для хранения. Для этого готовят суспензии плазмид в ультраочищенной воде или в буфере TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

50 ПРИМЕР 21: Получение ассоциированных вакцин

Различные плазмиды, необходимые для получения ассоциированной вакцины, смешивают в их концентрированных растворах (пример 16). Смеси готовят таким образом, что конечная концентрация каждой плазмиды соответствует эффективной дозе каждой

плазмиды. Для точной доводки конечной концентрации вакцины используют такие растворы, как раствор NaCl (0,9%) или буфер PBS.

Такие особые компоненты, как липосомы, катионные липиды, также могут использоваться для получения вакцин.

5 ПРИМЕР 22: Вакцинация кошек

Кошек вакцинируют дозами 10, 50 или 250 мкг на каждую плазмиду.

Инъекции проводят внутримышечно с помощью иглы. В этом случае вакцинные дозы вводят в объеме 1 мл.

10 Инъекции можно также проводить внутрикожно с помощью иглы. В этом случае вакцинные дозы вводят в общем объеме 1 мл в 10 местах (по 0,1 мл) или в 20 местах (по 0,05 мл). Перед внутрикожной инъекцией выбривают на коже соответствующий участок (обычно боковую часть грудной клетки) или осуществляют инъекцию в относительно безволосый участок, например, на внутренней поверхности бедра.

15 Для внутрикожных инъекций можно также использовать жидкоструйный инъекционный аппарат (без иглы).

Формула изобретения

1. Кошачья вакцина для индукции в организме хозяина, представляющего собой кошку, защитного ответа против вируса иммунодефицита кошек (FIV), содержащая плазмиду, включающую ген env, gag/pro или оба гена env и gag/pro вируса иммунодефицита кошек.

2. Вакцина по п.1, отличающаяся тем, что указанная плазида включает ген env и вакцина содержит вторую плазмиду, включающую ген gag/pro.

3. Вакцина по п.1 или 2, отличающаяся тем, что плазида включает ранний промотор цитомегаловируса CMV-IE.

25 4. Вакцина по п.1 или 2, отличающаяся тем, что плазида включает промотор, выбранный из раннего промотора вируса SV40, позднего промотора вируса SV40, промотора LTR вируса саркомы Рауса, промотора гена цитоскелета.

5. Вакцина по одному из пп.1-4, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит плазмиду, включающую ген патогена кошек, отличного от вируса иммунодефицита кошек.

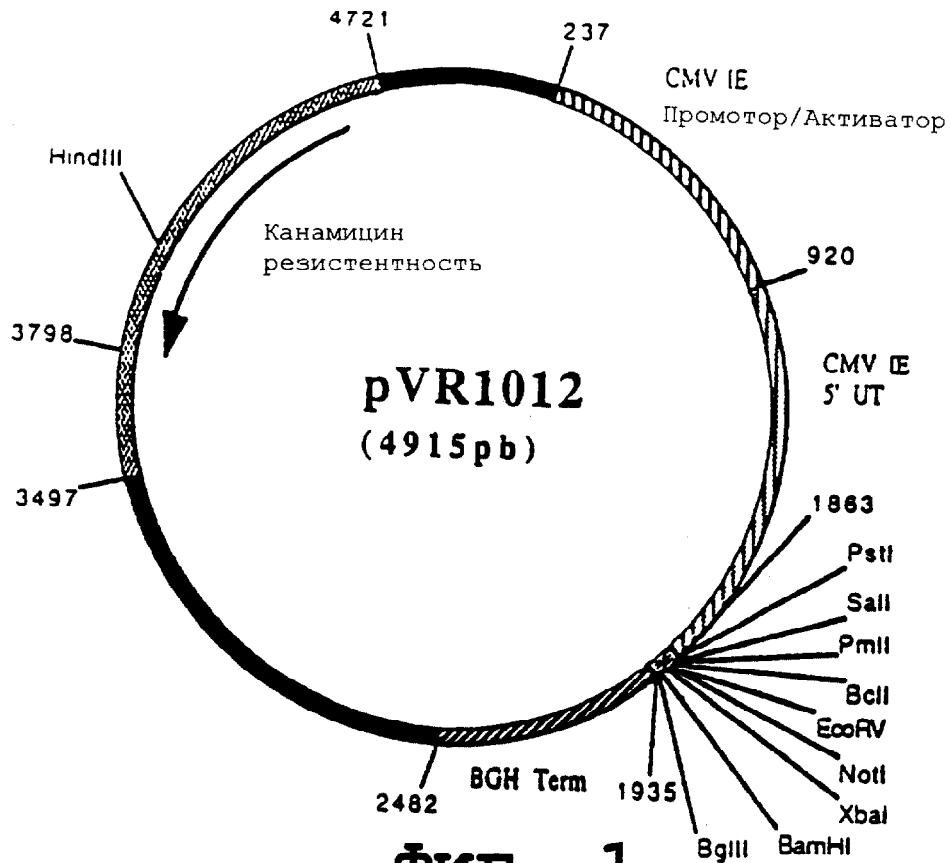
30 6. Вакцина по п.5, отличающаяся тем, что указанный ген выбирают из генов env и gag/pro лейкемии кошек, VP2 панлейкопении, измененного S и M инфекционного перитонита, gB и gD острого ринита, капсидного гена калицивируса и G бешенства.

35

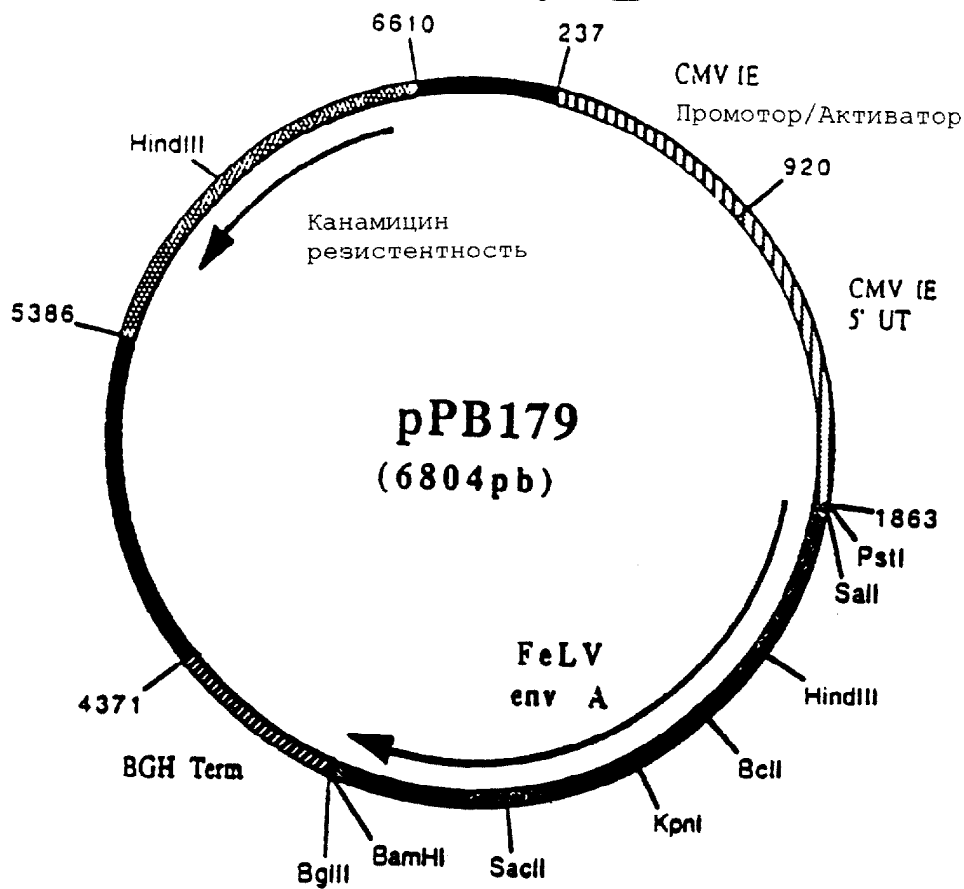
40

45

50



ФИГ. 1



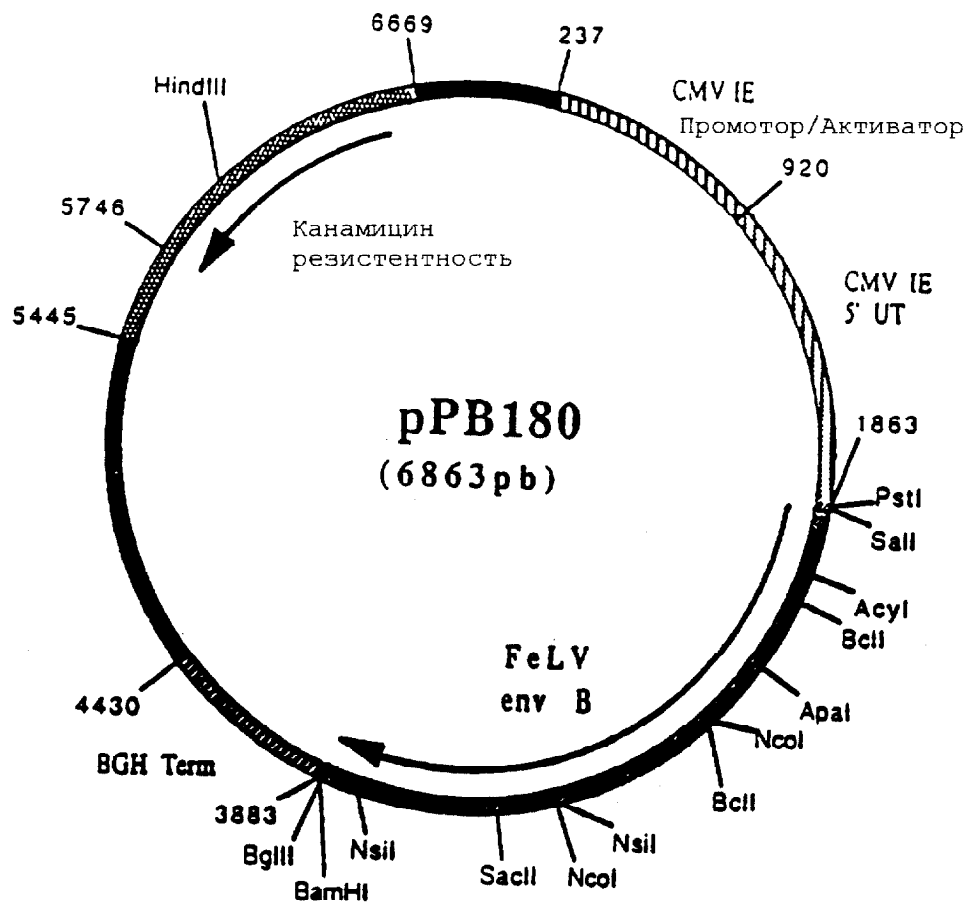
ФИГ. 2

1 ATGGAAGGTCCAACGCACCCAAAACCCCTCTAAAGATAAGACTTTCTCGTGGGACCTAATGATT
 1▶ MetGlyGlyProThrHisProLysProSerLysAspLysThrPheSerTrpAspLeuMetIle
 64 CTGCTGGGGGTCTTACTAAGACTGGACGTGGGAATGGCCAATCCTAGTCCGCACCAAATATAT
 22▶ LeuValGlyValLeuLeuArgLeuAspValGlyMetAlaAsnProSerProHisGlnIleTyr
 127 AATGTAACCTGGACAATAACCAACCTTGTAACCTGGAACAAAGGCTAATGCCACCTCCATGTTG
 43▶ AsnValThrTrpThrIleThrAsnLeuValThrGlyThrLysAlaAsnAlaThrSerMetLeu
 190 GGAACCCTGACAGACGCCTTCCCTACCATGTATTTTGACTTATGTGATATAATAGGAAATACA
 64▶ GlyThrLeuThrAspAlaPheProThrMetTyrPheAspLeuCysAspIleIleGlyAsnThr
 253 TGGAAACCCCTCAGATCAAGAACCATTCCCAGGGTATGGATGTGATCAGCCTATGAGGAGGTGG
 85▶ TrpAsnProSerAspGlnGluProPheProGlyTyrGlyCysAspGlnProMetArgArgTrp
 316 CGACAGAGAAACACACCCCTTTTATGTCTGTCCAGGACATGCCAACCGGAAGCAATGTGGGGGG
 106▶ ArgGlnArgAsnThrProPheTyrValCysProGlyHisAlaAsnArgLysGlnCysGlyGly
 379 CCACAGGATGGGTTCTGCGCTGTATGGGGTTGCGAGACCACCGGGGAAACCTATTGGAGACCC
 127▶ ProGlnAspGlyPheCysAlaValTrpGlyCysGluThrThrGlyGluThrTyrTrpArgPro
 442 ACCTCCTCATGGGACTACATCACAGTAAAAAAGGGGTACTCAGGGAATATATCAATGTAGT
 148▶ ThrSerSerTrpAspTyrIleThrValLysLysGlyValThrGlnGlyIleTyrGlnCysSer
 505 GGAGGTGGTTGGTGTGGGCCCTGTTACGATAAAGCTGTTCACTCCTCGACAACGGGAGCTAGT
 169▶ GlyGlyGlyTrpCysGlyProCysTyrAspLysAlaValHisSerSerThrThrGlyAlaSer
 568 GAAGGGGGCCGGTGCAACCCCTTGATCTTGCAATTTACCCAAAAGGGAAGACAAACATCTTGG
 190▶ GluGlyGlyArgCysAsnProLeuIleLeuGlnPheThrGlnLysGlyArgGlnThrSerTrp
 631 GATGGACCTAAGTCATGGGGGCTACGACTATACCGTTCAGGATATGACCCTATAGCCCTGTTC
 211▶ AspGlyProLysSerTrpGlyLeuArgLeuTyrArgSerGlyTyrAspProIleAlaLeuPhe
 694 TCGGTATCCCGGCAAGTAATGACCATTACGCCGCCTCAGGCCATGGGACCAAATCTAGTCCTG
 232▶ SerValSerArgGlnValMetThrIleThrProProGlnAlaMetGlyProAsnLeuValLeu
 757 CCTGATCAAAAACCCCATCCAGGCAATCTCAATAGAGTCCCGAGTAACACCTCACCATTCC
 253▶ ProAspGlnLysProProSerArgGlnSerGlnIleGluSerArgValThrProHisHisSer
 820 CAAGGCAACGGAGGCACCCAGGTGTAACCTTTGTTAATGCCTCCATTGCCCTCTACGTACC
 274▶ GlnGlyAsnGlyGlyThrProGlyValThrLeuValAsnAlaSerIleAlaProLeuArgThr
 883 CCTGTCACCCCGCAAGTCCCAAACGTATAGGGACCGGAAATAGGTTAATAAATTTAGTGCAA
 295▶ ProValThrProAlaSerProLysArgIleGlyThrGlyAsnArgLeuIleAsnLeuValGln
 946 GGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAAACTAAAGACTGTTGGCTCTGCCTG
 316▶ GlyThrTyrLeuAlaLeuAsnAlaThrAspProAsnLysThrLysAspCysTrpLeuCysLeu
 1009 GTTCTCGACCACCTTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACACAGCAACCAACAAAC
 337▶ ValSerArgProProTyrTyrGluGlyIleAlaIleLeuGlyAsnTyrSerAsnGlnThrAsn
 1072 CCCTCCCCATCCTGCCTATCTACTCCGCAACATAAGCTAACTATATCTGAGGTGTCAGGGCAA
 358▶ ProSerProSerCysLeuSerThrProGlnHisLysLeuThrIleSerGluValSerGlyGln
 1135 GGA CTGTGCATAGGGACTGTTCCCTAAGACCCACCAGGCTTTGTGCAATAAGACACAACAGGGA
 379▶ GlyLeuCysIleGlyThrValProLysThrHisGlnAlaLeuCysAsnLysThrGlnGlnGly
 1198 CATACAGGGGCTCACTATCTAGCCGCCCCCAATGGCACCTATTGGGCCTGTAACACTGGACTC
 400▶ HisThrGlyAlaHisTyrLeuAlaAlaProAsnGlyThrTyrTrpAlaCysAsnThrGlyLeu

ФИГ. 3

1261 ACCCCATGCATTTCCATGGCAGTGCTCAATTGGACCTCTGATTTTTGTGTCTTAATCGAATTA
 421▶ ThrProCysIleSerMetAlaValLeuAsnTrpThrSerAspPheCysValLeuIleGluLeu
 1324 TGGCCCAGAGTGACCTACCATCAACCCGAATACATTTACACACATTTCCGACAAAGCTGTCAGG
 442▶ TrpProArgValThrTyrHisGlnProGluTyrIleTyrThrHisPheAspLysAlaValArg
 1387 TTCCGAAGAGAACCAATATCACTAACCGTTGCCCTTATAATGGGAGGACTCACTGTAGGGGGC
 463▶ PheArgArgGluProIleSerLeuThrValAlaLeuIleMetGlyGlyLeuThrValGlyGly
 1450 ATAGCCGCGGGGGCTCGGAACAGGGACTAAAGCCCTCCTTGAAACAGCCCAGTTCAGACAACATA
 484▶ IleAlaAlaGlyValGlyThrGlyThrLysAlaLeuLeuGluThrAlaGlnPheArgGlnLeu
 1513 CAAATGGCTATGCACGCAGACATCCAGGCCCTAGAAGAGTCAATTAGTGCCTTAGAAAAATCC
 505▶ GlnMetAlaMetHisAlaAspIleGlnAlaLeuGluGluSerIleSerAlaLeuGluLysSer
 1576 CTGACCTCCCTCTCCGAGGTAGTCTTACAAAATAGACGGGGCCCTAGATATTCTGTTCTTACAA
 526▶ LeuThrSerLeuSerGluValValLeuGlnAsnArgArgGlyLeuAspIleLeuPheLeuGln
 1639 AAGGGAGGGCTCTGTGCCGCCTTAAAGGAAGAATGCTGCTTCTATGCAGATCACACCGGACTC
 547▶ LysGlyGlyLeuCysAlaAlaLeuLysGluGluCysCysPheTyrAlaAspHisThrGlyLeu
 1702 GTCAGAGACAATATGGCTAAATTAAGAGAAAGACTGAAACAGCGACAACAACCTGTTTGACTCC
 568▶ ValArgAspAsnMetAlaLysLeuArgGluArgLeuLysGlnArgGlnGlnLeuPheAspSer
 1765 CAACAGGGATGGTTTGAAGGATGGTTCAACAAGTCCCCCTGGTTTACAACCCTAATTTCTCTCC
 589▶ GlnGlnGlyTrpPheGluGlyTrpPheAsnLysSerProTrpPheThrThrLeuIleSerSer
 1828 ATTATAGGCCCTTACTAATCCTACTCCTAATTCTCCTCTTCGGCCCATGCATCCTTAACCGA
 610▶ IleIleGlyProLeuLeuIleLeuLeuLeuIleLeuLeuPheGlyProCysIleLeuAsnArg
 1891 TTAGTGCAATTCGTAAAAGACAGAATATCTGTGGTACAAGCCTTAATTTTAACCCAACAGTAC
 631▶ LeuValGlnPheValLysAspArgIleSerValValGlnAlaLeuIleLeuThrGlnGlnTyr
 1954 CAACAGATACAGCAATATGATCCGGACCGACCATGA
 652▶ GlnGlnIleGlnGlnTyrAspProAspArgPro...

ФИГ. 3 (продолжение)



ФИГ. 4

1 ATGCTCTGGAGCCTCTAGTGGGACAGCCATTGSGGCTCATCTGTTTGGGGTCTCACCTGAATAC
 1▶ MetSerGlyAlaSerSerGlyThrAlaIleGlyAlaHisLeuPheGlyValSerProGluTyr
 64 AAGCTGTTGATCGGAGACGAGCGGACCGGACCCTCAAGGTCTCTTTCTGAGGTTTCATTTTCG
 22▶ ArgValLeuIleGlyAspGluGlyAlaGlyProSerArgSerLeuSerGluValSerPheSer
 127 GTTGGTACCAAAGACGCGCGGCACGTCTTGTCAATTTTTTGTCTGGTTGCGTCTTTTCTTGTC
 43▶ ValTrpTyrGlnArgArgAlaAlaArgLeuValIlePheCysLeuValAlaSerPheLeuVal
 190 CCTTGCTAACCTTTTTTAATTGCAGAAACCGTCATGGGCCAACTATAACTACCCCTTAAGC
 64▶ ProCysLeuThrPheLeuIleAlaGluThrValMetGlyGlnThrIleThrThrProLeuSer
 253 CTCACCCTTGATCACTGGTCTGAAGTCCGGGCACGAGCCCATATCAAGGTGTCGAGGTCCGG
 85▶ LeuThrLeuAspHisTrpSerGluValArgAlaArgAlaHisAsnGlnGlyValGluValArg
 316 AAAAAGAAATGGATTACCTTATGTGAGGCCGAATGGGTGATGATGAATGTGGGCTGGCCCCGA
 106▶ LysLysLysTrpIleThrLeuCysGluAlaGluTrpValMetMetAsnValGlyTrpProArg
 379 GAAGGAACTTTTTCTCTTGATAGCATTTCCCAGGTTGAAAAGAAGATCTTCGCCCCGGGACCA
 127▶ GluGlyThrPheSerLeuAspSerIleSerGlnValGluLysLysIlePheAlaProGlyPro
 442 TATGGACACCCCGACCAAGTTCCTTACATTACTACATGGAGATCCTTAGCCACAGACCCCCCT
 148▶ TyrGlyHisProAspGlnValProTyrIleThrThrTrpArgSerLeuAlaThrAspProPro
 505 TCGTGGGTTTCGTCCGTTCCCTACCCCTCCCAAACCTCCACACCCCTCCCTCAACCTCTTTTCG
 169▶ SerTrpValArgProPheLeuProProProLysProProThrProLeuProGlnProLeuSer
 568 CCGCAGCCCTCCGCCCCCTCTTACCTCTTCCCTCTACCCCGTTCTCCCCAAGCCAGACCCCCC
 190▶ ProGlnProSerAlaProLeuThrSerSerLeuTyrProValLeuProLysProAspProPro
 631 AAACCGCCTGTGTTACCGCCTGATCCTTCTTCCCCTTTAATTGATCTCTTAACAGAAGAGCCA
 211▶ LysProProValLeuProProAspProSerSerProLeuIleAspLeuLeuThrGluGluPro
 694 CCTCCCTATCCGGGGGGTCACGGGCCACCGCCATCAGGTCTAGGACCCCAACCGCTTCCCCG
 232▶ ProProTyrProGlyGlyHisGlyProProProSerGlyProArgThrProThrAlaSerPro
 757 ATTGCAAGCCGGCTAAGGGAACGACGAGAAAACCCTGCTGAAGAATCGCAAGCCCTCCCTTG
 253▶ IleAlaSerArgLeuArgGluArgArgGluAsnProAlaGluGluSerGlnAlaLeuProLeu
 820 AGGGAAGGCCCAACAACCGACCCCAAGTATTGGCCATTCTCAGCTTCAGACTTGATAACTGG
 274▶ ArgGluGlyProAsnAsnArgProGlnTyrTrpProPheSerAlaSerAspLeuTyrAsnTrp
 883 AAGTCGCATAACCCCCCTTTCTCCCAAGATCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATT
 295▶ LysSerHisAsnProProPheSerGlnAspProValAlaLeuThrAsnLeuIleGluSerIle
 946 TTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGACGACTGCCAGCAGCTCTTGCAGGCACTCCTGACAGGC
 316▶ LeuValThrHisGlnProThrTrpAspAspCysGlnGlnLeuLeuGlnAlaLeuLeuThrGly
 1009 GAAGAAAGGCAAAGGGTCCTTCTTGAGGCCCCGAAAGCAGGTTCAGGCGAGGACGGACGGCCA
 337▶ GluGluArgGlnArgValLeuLeuGluAlaArgLysGlnValProGlyGluAspGlyArgPro
 1072 ACCCAACTACCCAATGTCATTGACGAGACTTTCCCCTTGACCCGTCCCAACTGGGATTTTGCT
 358▶ ThrGlnLeuProAsnValIleAspGluThrPheProLeuThrArgProAsnTrpAspPheAla
 1135 ACCCCGGCAGGTAGGGAGCACCTACGCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCCGGTCTCCCGGGG
 379▶ ThrProAlaGlyArgGluHisLeuArgLeuTyrArgGlnLeuLeuLeuAlaGlyLeuArgGly

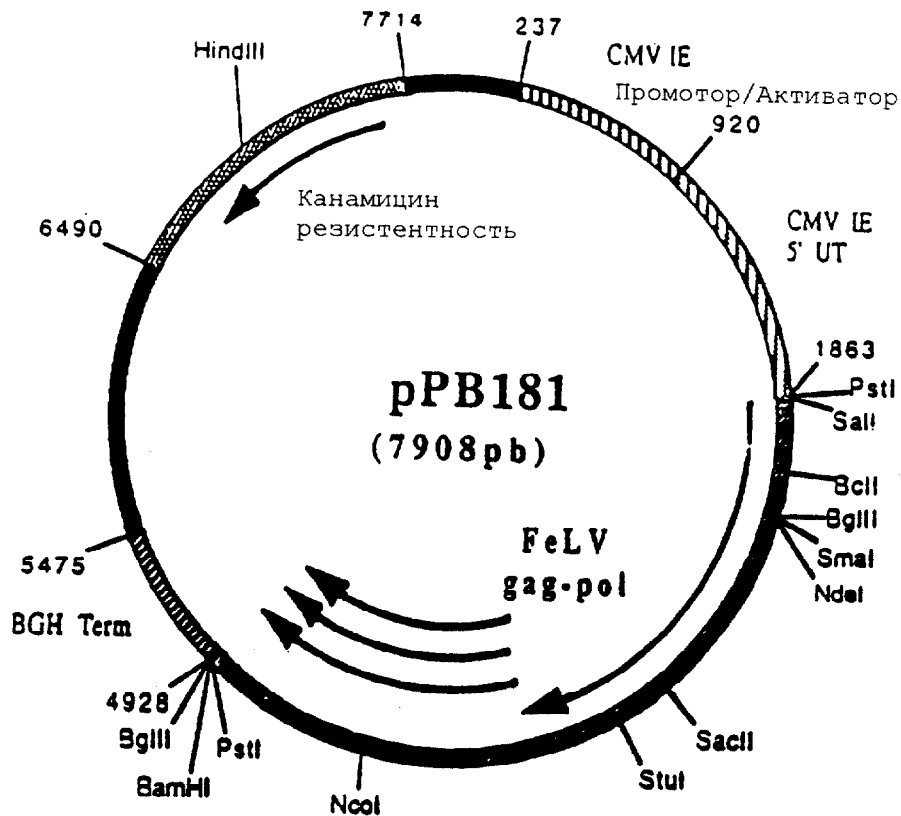
Фиг. 5

1196 CCTCCAAGACGCCCCACTAATTTGGCACAGGTAAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAGAGGAAACG
 400▶ AlaAlaArgArgProThrAsnLeuAlaGlnValLysGlnValValGlnGlyLysGluGluThr
 1261 CCACCAGCATTTTTAGAAAGATTAAAAGAGGCTTATAGAATGTACACTCCCTATGACCCTGAG
 421▶ ProAlaAlaPheLeuGluArgLeuLysGluAlaTyrArgMetTyrThrProTyrAspProGlu
 1324 GACCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTTATCCTATCCTTTATATACCAGTCTAGCCCAGATATAAGA
 442▶ AspProGlyGlnAlaAlaSerValIleLeuSerPheIleTyrGlnSerSerProAspIleArg
 1387 AATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCTACAAGGGTTCCACCCTATCTGATCTGCTAAAAGAGGCA
 463▶ AsnLysLeuGlnArgLeuGluGlyLeuGlnGlyPheThrLeuSerAspLeuLeuLysGluAla
 1450 GAAAAGATATACAACAAAAGGGAGACCCCAGAGGAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGACAG
 484▶ GluLysIleTyrAsnLysArgGluThrProGluGluArgGluGluArgLeuTrpGlnArgGln
 1513 GAAGAAAGAGATAAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAGTTCTGGCCACAGTAGTTGCTCAG
 505▶ GluGluArgAspLysLysArgHisLysGluMetThrLysValLeuAlaThrValValAlaGln
 1576 AATAGAGATAAGGATAGAGAAGAAAGTAACTGGGGGATCAAAGGAAAATACCTCTGGGGAAA
 526▶ AsnArgAspLysAspArgGluGluSerLysLeuGlyAspGlnArgLysIleProLeuGlyLys
 1639 GACCAGTGTGCCTATTGCAAGGAAAAGGGGCATTGGGTTCCGCGATTGCCCCAAACGACCCAGG
 547▶ AspGlnCysAlaTyrCysLysGluLysGlyHisTrpValArgAspCysProLysArgProArg
 1702 AAGAAACCCGCCAACTCCACTCTCCTCAACTTAGGAGATTAGGAGAGTCAGGGCCAGGACCCC
 568▶ LysLysProAlaAsnSerThrLeuLeuAsnLeuGlyAsp...
 1▶ GluIleArgArgValArgAlaArgThrPr
 1765 CCCCCCTGAGCCCAAGGATAACCTTAAAAATAGGGGGGCAACCGGTGACTTTTCTGGTGGAC
 10▶ oProProGluProArgIleThrLeuLysIleGlyGlyGlnProValThrPheLeuValAspTh
 1828 GGGAGCCCAGCACTCAGTACTGACTCGACCAGATGGACCTCTCAGTGACCGCACAGCCCTGGT
 31▶ rGlyAlaGlnHisSerValLeuThrArgProAspGlyProLeuSerAspArgThrAlaLeuVa
 1891 GCAAGGAGCCACGGGAAGCAAAAACCTACCGGTGGACCACCGACAGGAGGGTACAACCTGGCAAC
 52▶ lGlnGlyAlaThrGlySerLysAsnTyrArgTrpThrThrAspArgArgValGlnLeuAlaTh
 1954 CGGTAAGGTGACTCATTCTTTTTATATGTACCTGAATGTCCCTACCCGTTATTAGGGAGAGA
 73▶ rGlyLysValThrHisSerPheLeuTyrValProGluCysProTyrProLeuLeuGlyArgAs
 2017 CCTATTAACTAACTTAAGGCCCAAATCCATTTTACCGGAGAAGGGGCTAATGTTGTTGGGCC
 94▶ pLeuLeuThrLysLeuLysAlaGlnIleHisPheThrGlyGluGlyAlaAsnValValGlyPr
 2080 CAGGGGTTTACCCCTACAAGTCCTTACTTTACAATTAGAAGAGGAGTATCGGCTATTTGAGCC
 115▶ oArgGlyLeuProLeuGlnValLeuThrLeuGlnLeuGluGluGluTyrArgLeuPheGluPr
 2143 AGAAAGTACACAAAACAGGAGATGGACACTTGGCTTAAAACTTTCCCAGGCGTGGGCAGA
 136▶ oGluSerThrGlnLysGlnGluMetAspThrTrpLeuLysAsnPheProGlnAlaTrpAlaGl

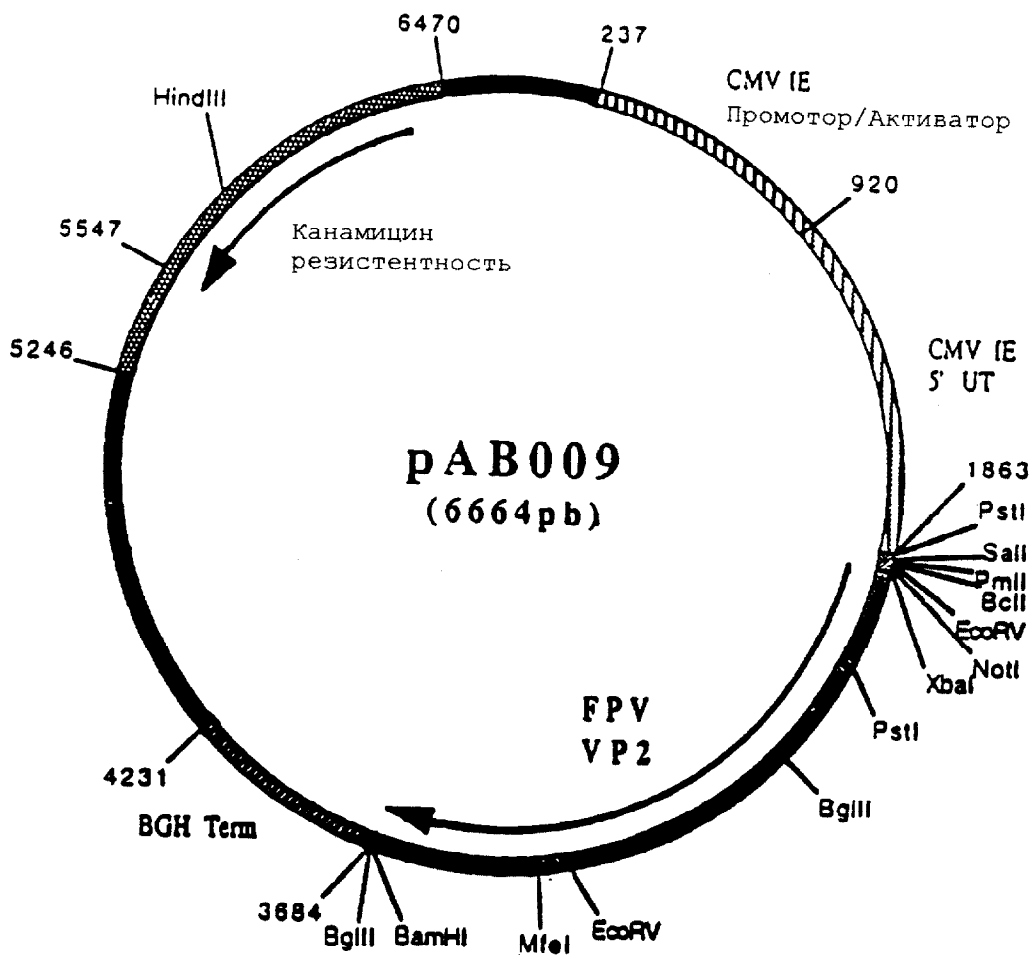
ФИГ. 5 (продолжение)

2266 AACAGGAGGTATGGGAATGGCTCATTGTCAAGCCCCCGTTCTCATTCAACTTAAGGCTACTGC
 157▶ uThrGlyGlyMetGlyMetAlaHisCysGlnAlaProValLeuIleGlnLeuLysAlaThrAl
 2269 CACTCCAATCTCCATCCGACAGTATCCTATGCCCCATGAAGCGTACCAGGGAATTAAGCCTCA
 178▶ aThrProIleSerIleArgGlnTyrProMetProHisGluAlaTyrGlnGlyIleLysProHi
 2332 TATAAGAAGAATGCTAGATCAAGGCATCCTCAAGCCCTGCCAGTCCCCATGGAATACACCCTT
 199▶ sIleArgArgMetLeuAspGlnGlyIleLeuLysProCysGlnSerProTrpAsnThrProLe
 2395 ATTACCTGTTAAGAAGCCAGGGACCGAGGATTACAGACCAGTGCAGGACTTAAGAGAAGTAAA
 220▶ uLeuProValLysLysProGlyThrGluAspTyrArgProValGlnAspLeuArgGluValAs
 2458 CAAAGAGTAGAAGACATCCATCCTACTGTGCCAAATCCATATAACCTCCTTAGCACCCCTCCC
 241▶ nLysArgValGluAspIleHisProThrValProAsnProTyrAsnLeuLeuSerThrLeuPr
 2521 GCCGTCTCACCCCTTGGTACACTGTCCTAGATTAAAGGACGCTTTTTTCTGCCTGCGACTACA
 262▶ oProSerHisProTrpTyrThrValLeuAspLeuLysAspAlaPhePheCysLeuArgLeuHi
 2584 CTCTGAGAGTCAGTTACTTTTTGCATTTGAATGGAGAGATCCAGAAATAGGACTGTCAGGGCA
 283▶ sSerGluSerGlnLeuLeuPheAlaPheGluTrpArgAspProGluIleGlyLeuSerGlyGl
 2647 ACTAACCTGGACACGCCTTCCTCAGGGGTTCAAGAATAGCCCCACCCTATTTGATGAGGCCCT
 304▶ nLeuThrTrpThrArgLeuProGlnGlyPheLysAsnSerProThrLeuPheAspGluAlaLe
 2710 GCACTCAGACCTGGCCGATTTACAGGGTAAGGTACCCGGCTCTAGTCCTCCTACAATATGTAGA
 325▶ uHisSerAspLeuAlaAspPheArgValArgTyrProAlaLeuValLeuLeuGlnTyrValAs
 2773 TGACCTCTTGCTGGCTGCGGCAACCAGGACTGAATGCCTGGAAGGGACTAAGGCACCTCCTTGA
 346▶ pAspLeuLeuLeuAlaAlaAlaThrArgThrGluCysLeuGluGlyThrLysAlaLeuLeuGl
 2836 GACTTTGGGCAATAAGGGGTACCGAGCCTCTGGAAAGAAGGCCCAAATTTGCCTGCAAGAAGT
 367▶ uThrLeuGlyAsnLysGlyTyrArgAlaSerGlyLysLysAlaGlnIleCysLeuGlnGluVa
 2899 CACATACCTGGGGTACTCTTTAAAAGATGGCCAAAGGTGGCTTACCAAAGCTCGGAAAGAAGC
 388▶ lThrTyrLeuGlyTyrSerLeuLysAspGlyGlnArgTrpLeuThrLysAlaArgLysGluAl
 2962 CATCCTATCCATCCCTGTGCCTAAAAACCCACGACAAGTGAGAGAGTTCTTGGAACTGCAG
 409▶ aIleLeuSerIleProValProLysAsnProArgGlnValArgGluPheLeuGlyThrAla

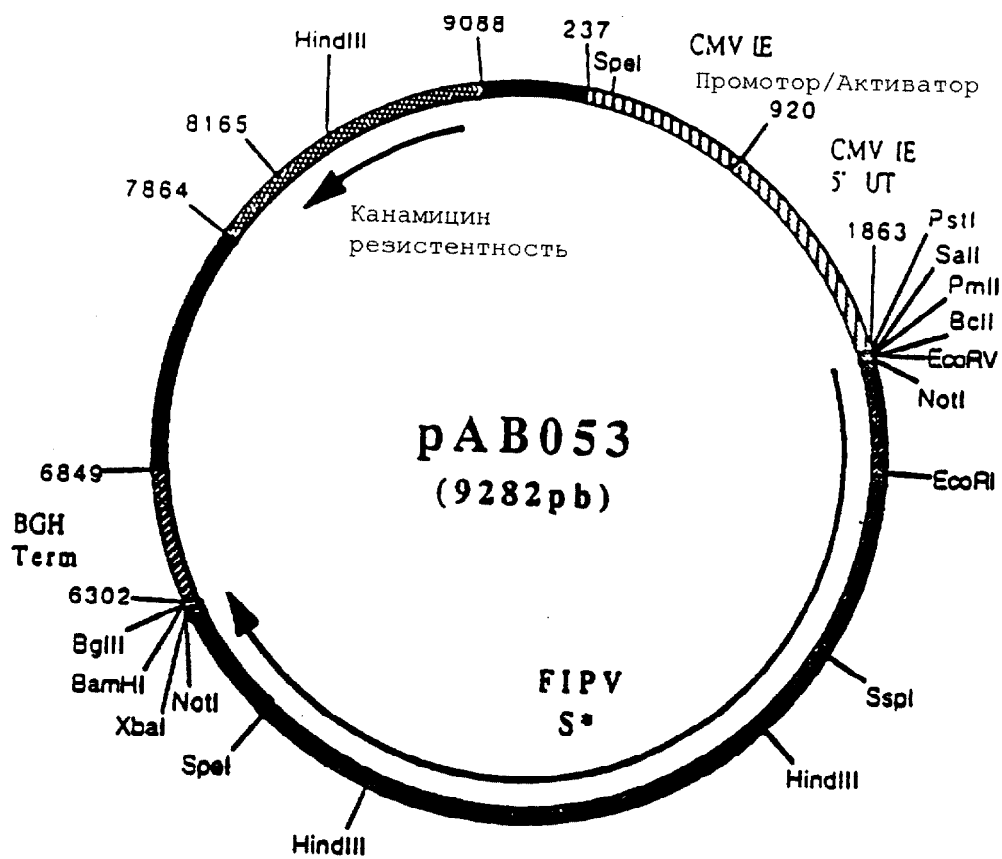
Фиг. 5 (продолжение)



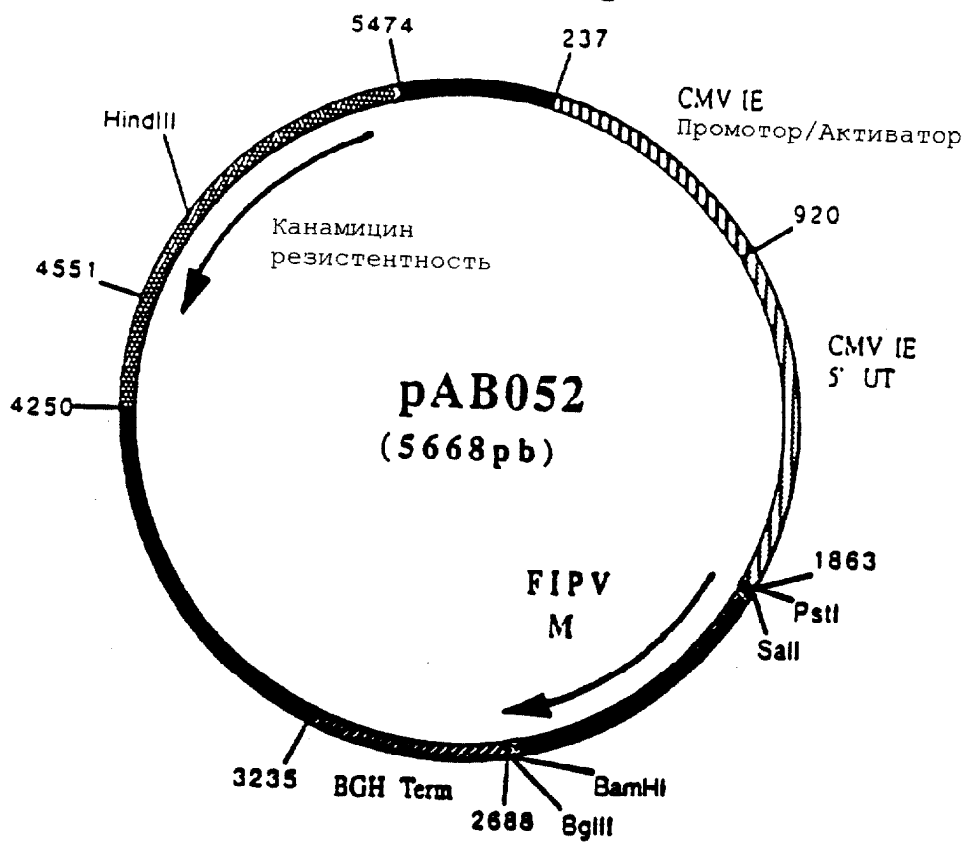
ФИГ. 6



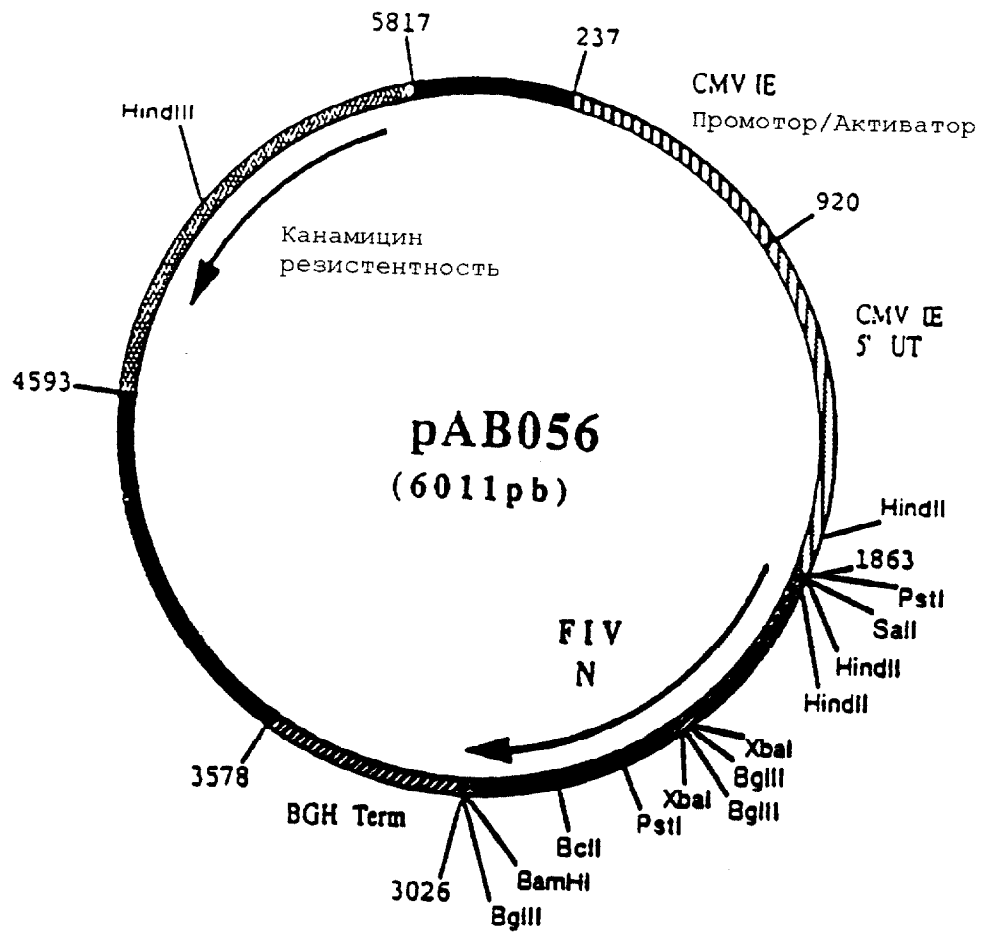
ФИГ. 7



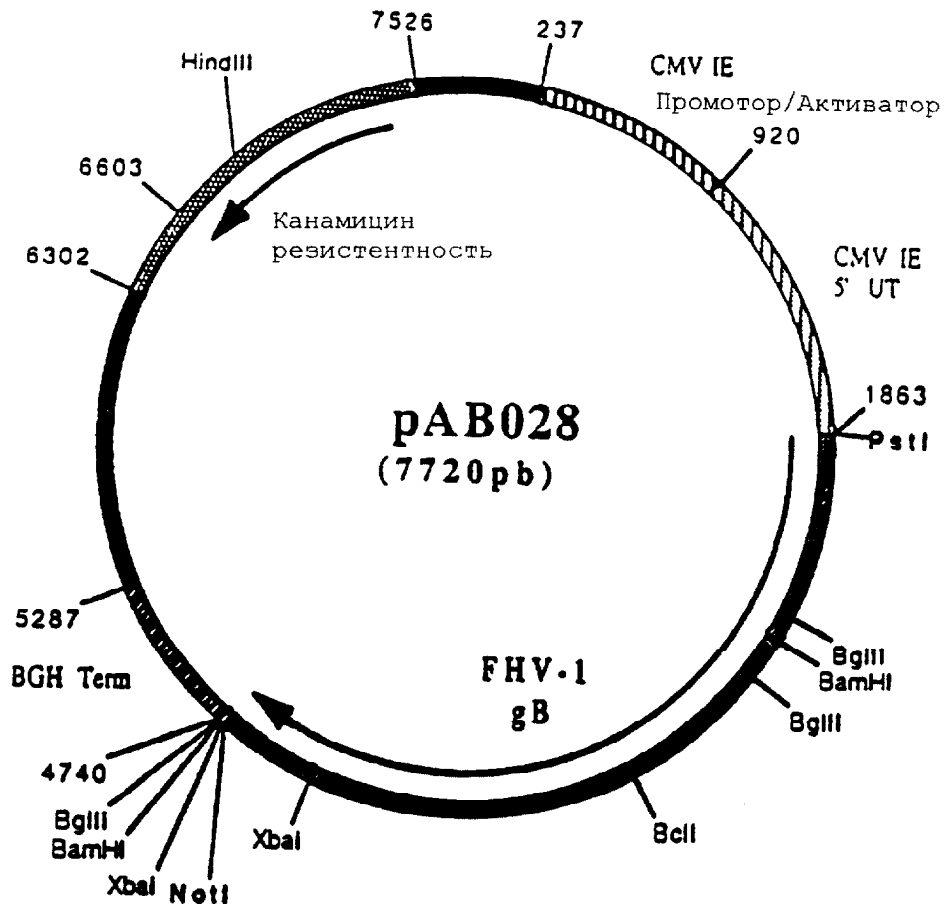
ФИГ. 8



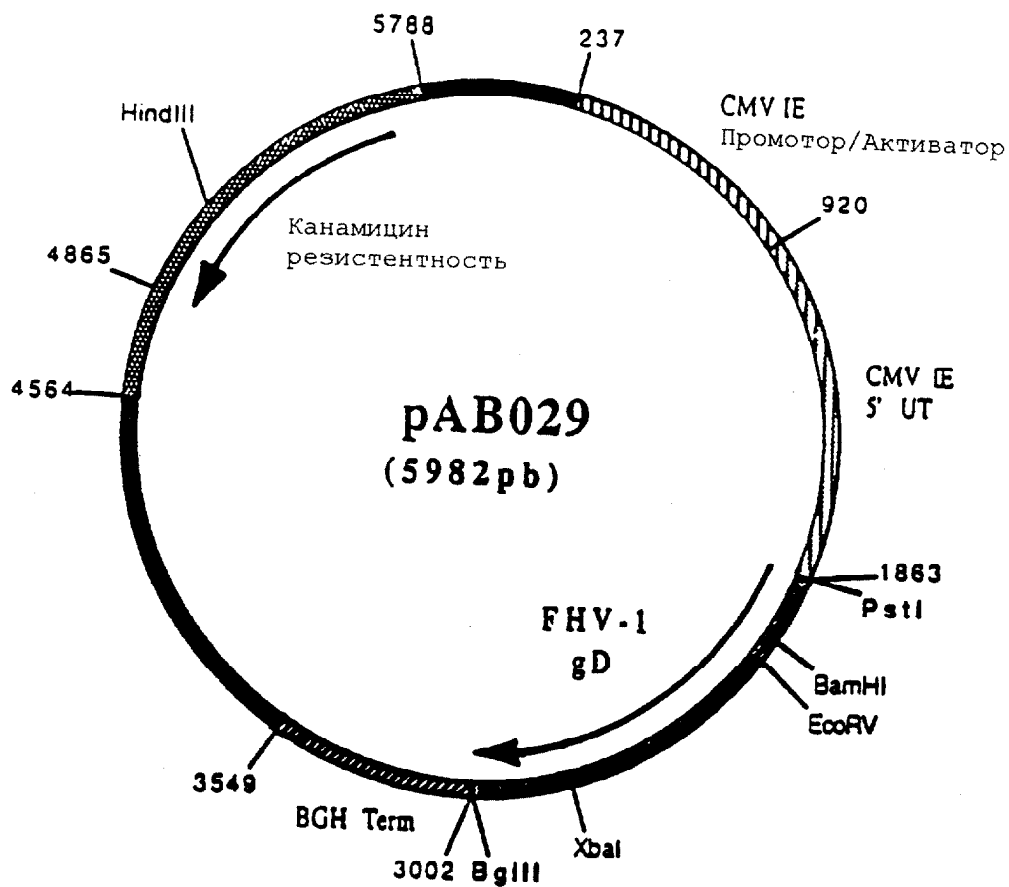
ФИГ. 9



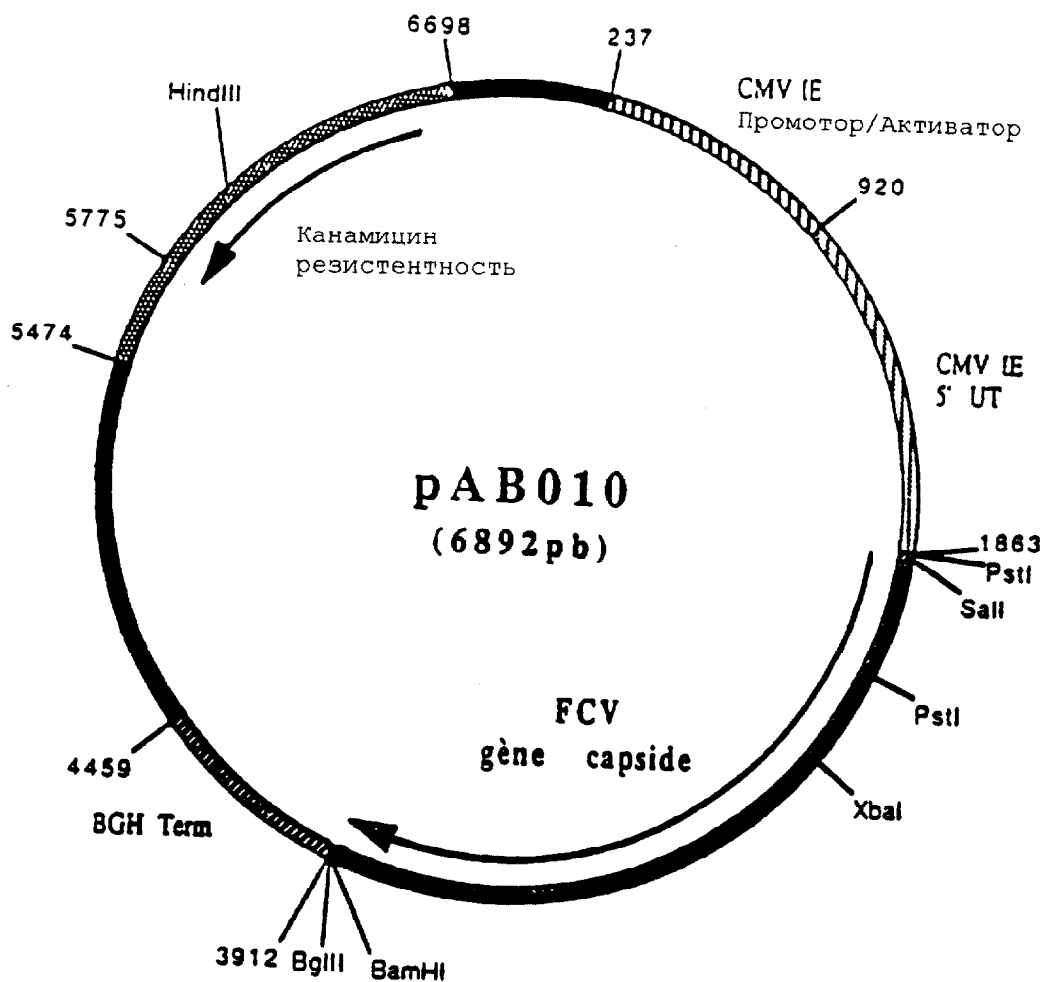
ФИГ. 10



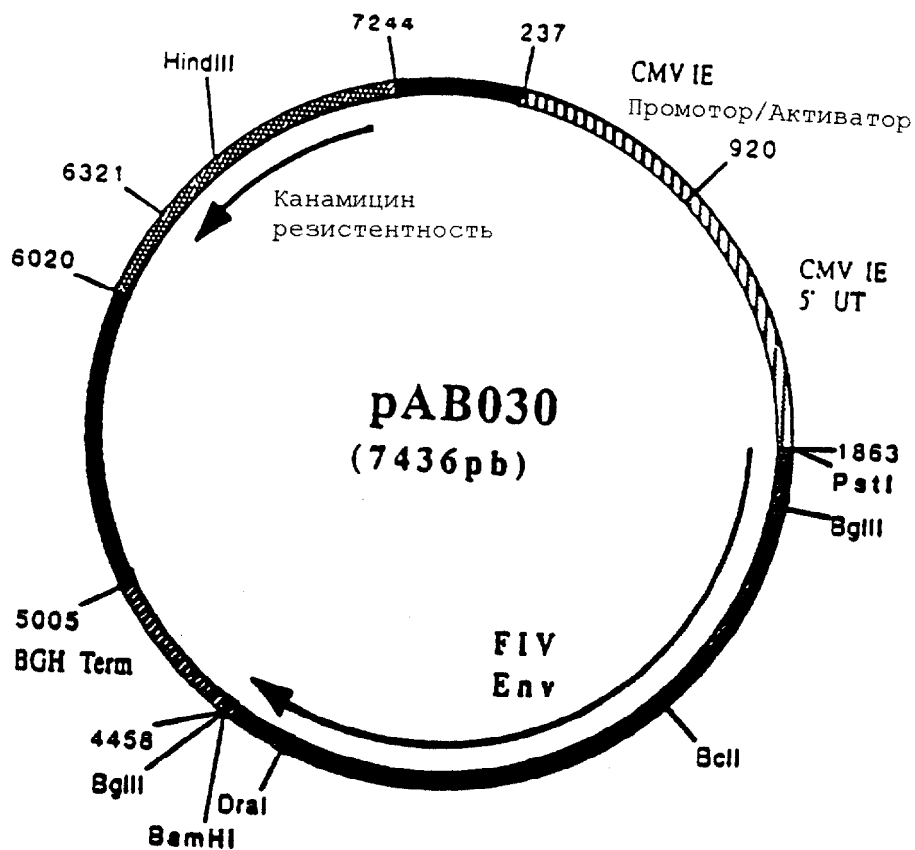
ФИГ. 11



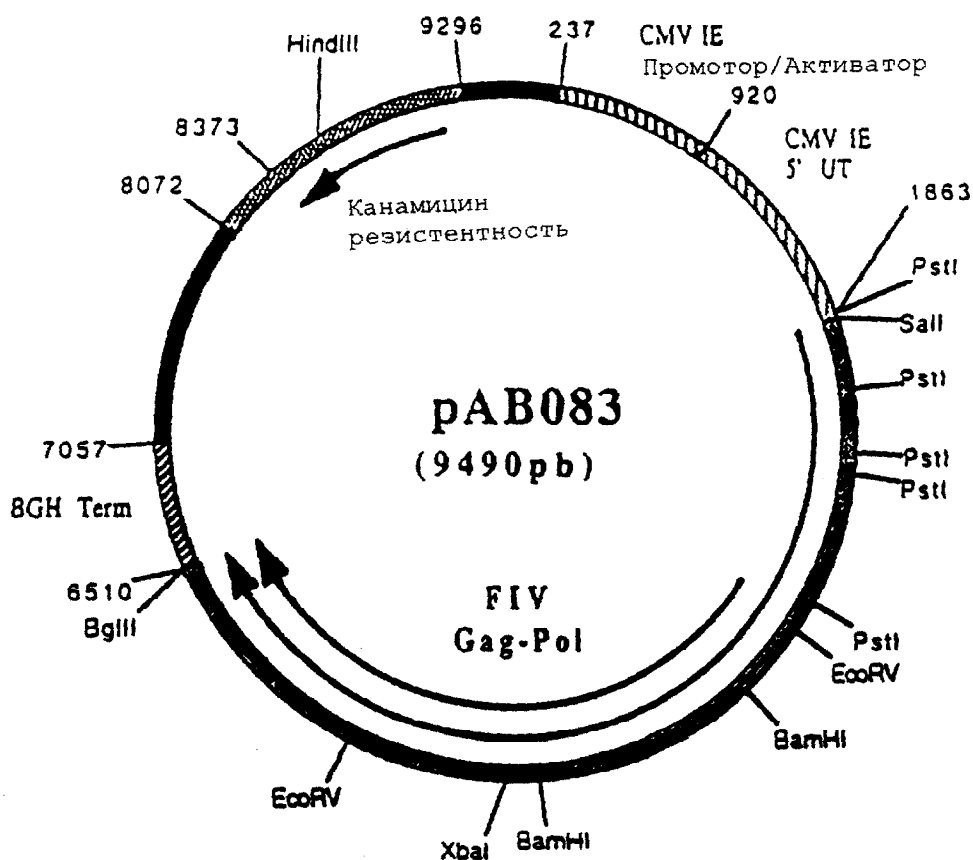
ФИГ. 12



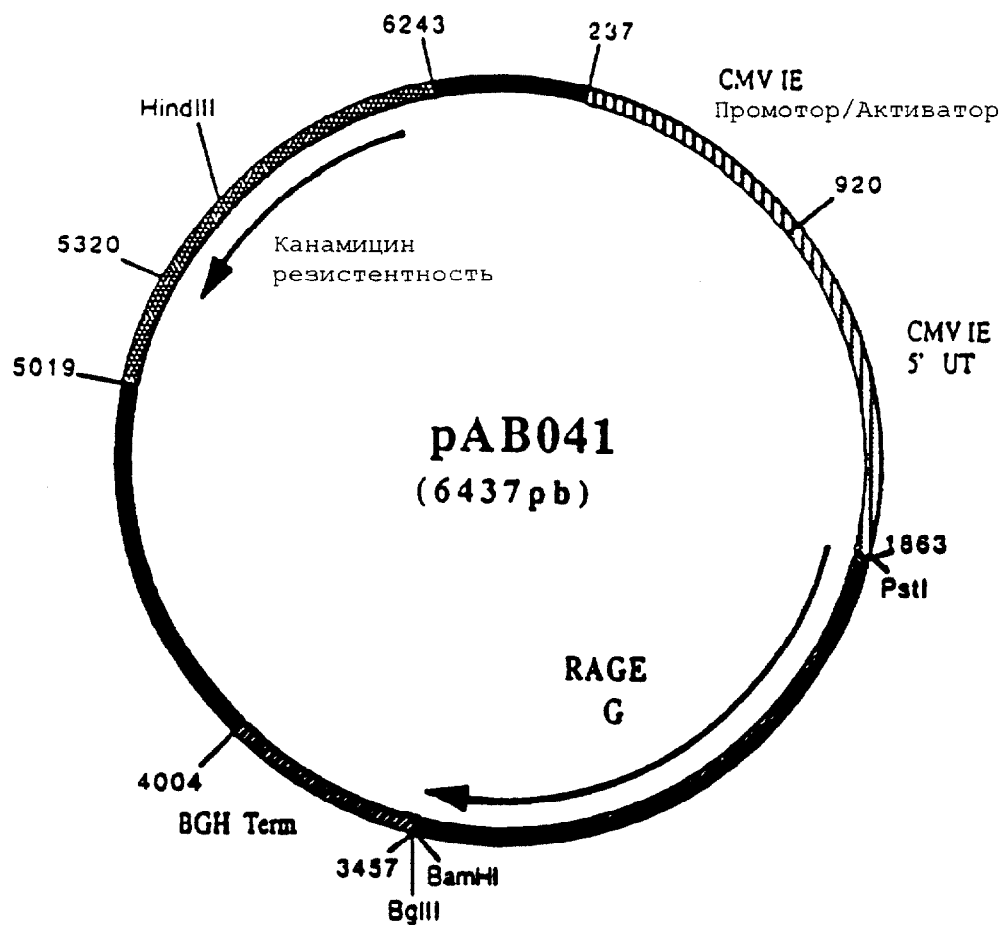
ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15



Фиг. 16