



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2002132833/13, 15.07.1997

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.07.1997(30) Конвенционный приоритет:
19.07.1996 (пп.1-24) FR 96 09401

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2005

(45) Опубликовано: 20.03.2008 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: XIANG Z.Q. et al. "Vaccination with a
plasmid vector carrying the rabies virus
glycoprotein gene induces protective immunity
against rabies virus". Virology. 1994 Feb 15;
199(1):132-40. WO 9520660, 03.08.1995.(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки, из
которой данная заявка выделена: 99103298
15.07.1997Адрес 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 Аннабель (FR),
РИВЬЕР Мишель (FR)(73) Патентообладатель(и):
МЕРИАЛЬ (FR)(54) ВАКЦИНА СОБАК ПРОТИВ БЕШЕНСТВА (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ВАКЦИНАЦИИ
(ВАРИАНТЫ), НАБОР ДЛЯ ВАКЦИНАЦИИ (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области вирусологии и
биотехнологии. Вакцина против бешенства собак
содержит плазмиду, содержащую нуклеиновую
кислоту, кодирующую белок G вируса бешенства.
Вакцина обеспечивает полную защиту противбешенства в течение одного года после
единственного введения этой вакцины.
Предложены также способ вакцинации с помощью
такой вакцины и набор, ее включающий.
Изобретение может быть использовано в
ветеринарии. 6 н.п. и 18 з.п. ф-лы, 10 ил.

RU 2 319 504 C2

RU 2 319 504 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 39/205 (2006.01)*C12N 15/47* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2002132833/13, 15.07.1997**(24) Effective date for property rights: **15.07.1997**(30) Priority:
19.07.1996 (cl.1-24) FR 96 09401(43) Application published: **20.01.2005**(45) Date of publication: **20.03.2008 Bull. 8**(62) Number and date of filing of the initial application, from which the given application is allocated: **99103298 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),
RIV'ER Mishel' (FR)**

(73) Proprietor(s):

MERIAL' (FR)

(54) **CANINE RABIES VACCINE (VARIANTS), METHOD FOR VACCINATION (VARIANTS), A KIT FOR VACCINATION (VARIANTS)**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary science, virology, biotechnology.

SUBSTANCE: the suggested canine rabies vaccine contains a plasmid that contains a nucleic acid that codes rabies virus protein G. The vaccine provides complete protection against rabies for the period of 1 yr after a single injection of

the vaccine suggested. It has been, also, suggested the method for vaccination with the help of such a vaccine and a kit that includes this vaccine.

EFFECT: higher efficiency of vaccination.

24 cl, 10 dwg, 19 ex

Настоящее изобретение относится к формуле вакцины для вакцинации собак против большого числа инфекционных патологий, в частности респираторных патологий и патологий пищеварения. Оно также относится к соответствующей методике вакцинации.

5 Инфекционные патологии собак крайне разнообразны и зачастую с трудом поддаются контролю в силу обстоятельств, имеющих место на конкретной территории.

Уже существует ряд вакцин, в частности, против болезни Каре (вирус CDV), парвовируса (вирус CPV), коронавируса (вирус CCV), респираторного комплекса или собачьего кашля (вирус P12) и бешенства (рабдовирус). Эти вакцины являются, в целом, живыми вакцинами ослабленных штаммов. Таков, в частности, случай вакцин болезней 10 Каре, вакцин против собачьих аденовириозов, вакцин против парвовируса и вакцин против коронавируса собак.

В некоторых случаях предлагались также инактивированные вакцины, например, в отношении бешенства и коронавируса.

15 Эти разнообразные вакцины продаются как по отдельности, т.е. в виде одновалентных вакцин, так и в виде ассоциированных вакцин, т.е. поливалентных.

Поливалентные ассоциации, разработанные до настоящего времени, всегда вызывали проблемы совместимости валентностей и стабильности. Так, необходимо одновременно 20 обеспечить совместимость различных валентностей вакцины, как в плане различных используемых антигенов, так и в плане самих составов, в частности, если используют одновременно инактивированные вакцины и живые вакцины. Также возникает проблема хранения таких комбинированных вакцин и их безвредности, в частности, в присутствии 25 добавок. Эти вакцины являются, в целом, достаточно дорогими.

Степень защиты и длительность этой защиты могут, кроме этого, быть очень разными, и на них влияют местные особенности. Это особенно справедливо в отношении вакцинации 25 щенков, у которых антитела материнского происхождения противостоят иммунизации инактивированными вакцинами и даже живыми вакцинами.

Таким образом, желательно усовершенствовать подход к вакцинации псовых, и в частности собак, учитывая требования экономии, не позволяющие использовать 30 дорогостоящие вакцины или сложные способы.

Исследования по вакцинации против болезни Каре очищенными препаратами антигенов сплавления F и эквивалентов гемагглютинина H в полной добавке Фройнда показали, что 35 антиген F может представлять интерес в качестве иммуногена для защиты против вируса CDV (E.Norrby и др., J. Of Virol. Mai 1986: 536-541) в субъединичной вакцине.

Другая статья (P. De Vries и др., J. Gen. Virol. 1988, 69: 2071-2083) показывает, 40 что протеины F и HA вируса CDV могут представлять интерес для вакцинации по технологии иммуностимулирующих комплексов (ISKOMS).

Мыши, иммунизированные рекомбинантной вакциной, содержащей ген протеина F вируса CDV, проявляли устойчивость к этому вирусу.

45 Эти результаты являются, однако, лабораторными, которые трудно интерпретировать, особенно в условиях конкретной местности.

В отношении парвовириозов исследования субъединичных вакцин, содержащих мажорный протеин капсида VP2 вируса CPV, полученного генной рекомбинацией в бакуловирусе, позволили показать, что у иммунизированных таким образом собак 50 вырабатывалась защита против вируса CPV.

В отношении собачьих герпесвирусов CHV были проведены исследования по использованию гликопротеинов в качестве составляющих субъединичных вакцин. Эти 55 исследования показали наличие индукции перекрестных ответов с другими герпесвирусами, такими как FHV, но не позволили сделать вывод о возможности получения защитных вакцин.

В отношении болезни Лима, OspA и OspB в сочетании друг с другом устанавливают 60 защиту у мыши и у собаки, а OspA в отдельности - у мыши, хомяка и собаки.

В заявках WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 и WO-A-95 20660 описано использование недавно разработанной технологии полинуклеотидных вакцин. Известно,

что в этих вакцинах используют плазмиду, способную осуществлять в клетках хозяина экспрессию встроенного в плазмиду антигена. Были предложены все пути введения (внутрибрюшинный, внутривенный, внутримышечный, чрескожный, 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, чтобы она проникала в кожу животного (Tang и др., *Nature* 356, 152-154, 1992), и жидкоструйные впрыскиватели, позволяющие осуществить трансфекцию одновременно в кожу, в мышцы, в жировые ткани и в ткани молочной железы (Furth и др., *Analytical Biochemistry*, 205, 365-368, 1992).

В полинуклеотидных вакцинах могут быть использованы как неодетые ДНК, так и ДНК в составе, например, липосом или катионных липидов.

В практике прошлого не отмечено никаких результатов в плане установления у собак защиты методом полинуклеотидной вакцинации против этих болезней. Еще меньше известно о собачих коронавирусах CCV и агентах, вызывающих респираторный комплекс.

В отношении бешенства было показано наличие защиты у мышей после обработки полинуклеотидной вакциной, несущей ген протеина G под контролем раннего промотора вируса SV 40 (Xiang и др., *Virology* 199, 1994: 132-140); сходный результат был получен и с промотором IE вируса CMV.

Задачей изобретения является разработка формулы поливалентной вакцины для вакцинации собак против определенного числа патогенных агентов.

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

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

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

Еще одной целью изобретения является разработка методики вакцинации, которая позволила бы существенно повысить эффективность вакцины по изобретению или сильно сократить необходимое количество вакцины и которая являлась бы безвредной.

Таким образом, объектом настоящего изобретения является формула вакцины против патологий псовых, включающая по меньшей мере две валентности вакцины, каждая из которых включает в себя плазмиду, содержащую (и обеспечивающую его экспрессию *in vivo* в клетках хозяина из семейства псовых) ген одной валентности собачьего патогена, а именно, валентность вируса болезни Каре CDV и валентность собачьего парвовируса CPV, а плазмиды содержат, для каждой валентности, один или несколько генов, выбранных из группы, представленной HA и F для вируса болезни Каре и геном VP2 для собачьего парвовируса.

Предпочтительно для валентности болезни Каре одна или несколько плазмид содержат гены HA и F, встроенные в одну плазмиду или в разные плазмиды.

Поливалентная вакцина по изобретению может также включать в себя валентность собачьего коронавируса CCV с одной или несколькими плазмидами, содержащими один или несколько генов, выбранных из группы генов S и M, предпочтительно ген S или S и M. В этом случае также гены могут быть встроены в разные плазмиды или собраны в одной плазмиде так, чтобы была возможна их экспрессия. Двух- или трехвалентная вакцина по изобретению может также включать в себя, кроме этого, одну эффективную валентность для предупреждения респираторного комплекса, а именно валентность P12, включающую одну или несколько плазмид, содержащих по меньшей мере один из генов HA и F.

Предпочтительно, используют одновременно оба гена HA и F.

Другие валентности, представляющие интерес для настоящего изобретения, могут, таким образом, быть введены в состав вакцин по изобретению; в частности, это может быть одна или несколько валентностей, выбранных из группы, представленной герпесвирусом CHV, болезнью Лима и бешенством, при этом плазмиды содержат для

каждой валентности, один или несколько генов, выбранных из группы, представленной генами gB, gD для вируса CHV, генами OspA, OspB и p100 для B. Burgdorferi (болезнь Лима) и геном G для бешенства.

Предпочтительно в отношении герпесвируса сочетают в двух разных плаزمиды или в одной плазмиде оба гена gB и gD. В отношении болезни Лима предпочтение отдают гену OspA.

Предпочтительно вакцина по изобретению, включающая в себя валентность болезни Каре и парвовируса, включает в качестве другой валентности валентность коронавируса или, менее предпочтительно, валентность респираторного комплекса, или обе эти валентности, при этом само собой разумеется, что любая комбинация, включающая в себя одну, несколько или все из таких валентностей как коронавирус, респираторный комплекс, герпесвирус, болезнь Лима и бешенство, может сочетаться с обеими валентностями - болезни Каре и парвовируса.

Предпочтительно формула вакцины по изобретению находится в составе носителя, подходящего для введения, желательно, внутримышечным путем; объем дозы составляет при этом от 0,1 до 5 мл, предпочтительно от 0,5 до 2 мл.

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

Используют предпочтительно неодетые плазмиды, просто помещенные в вакцинирующий носитель, которым является обычно физиологический раствор (0,9% NaCl), ультрачистая вода, буфер TE и т.п. Можно, разумеется, использовать все описанные в практике формы полинуклеотидных вакцин.

Каждая плазида содержит промотор, способный обеспечивать экспрессию зависящего от него гена в клетках хозяина. Им обычно является сильный эукариотический промотор, в частности, ранний протомотор цитомегаловируса CMV-IE, происходящий от человека или мыши, или, возможно, от другого животного, такого как крыса, свинья, морская свинка.

В общем, промотор может иметь как вирусное, так и клеточное происхождение. В качестве вирусного промотора, кроме CMV-IE, можно назвать ранний или поздний промотор вируса SV40 или промотор LTR вируса Саркомы Руса. Это также может быть промотор вируса, от которого получен 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 одна плазида содержит несколько генов, они могут находиться в одной единице транскрипции или в двух разных единицах транскрипции.

Комбинация различных валентностей вакцины по изобретению может быть получена, предпочтительно, смешиванием полинуклеотидных плазмид, обеспечивающих экспрессию одного или нескольких антигенов каждой валентности, но также можно осуществить экспрессию антигенов нескольких валентностей через одну и ту же плазмиду.

Также объектом настоящего изобретения является методика вакцинации собак, включающая введение эффективной дозы формулы вакцины, как она описана выше. Эта методика вакцинации включает введение одной или нескольких формул вакцины, причем эти дозы могут быть введены последовательно через короткие промежутки времени и/или последовательно через большие промежутки времени.

Формулы вакцины по изобретению могут быть введены, в рамках этой методики вакцинации, различными путями введения, используемыми в практике при полинуклеотидной вакцинации, и с использованием известной техники введения, при этом предпочтение отдают внутримышечному введению.

Эффективность взаимодействия антигенов с иммунной системой находится в зависимости от тканей. В частности, слизистые оболочки дыхательных путей служат барьером на пути патогенов и связаны с лимфоидными тканями, обеспечивающими местный иммунитет. Введение вакцины через контакт со слизистыми, в частности слизистыми ротовой полости, глотки и бронхиальной области, представляет большой

интерес для вакцинации против респираторных патологий и патологий пищеварения.

Таким образом, путь введения через слизистые составляет часть способа введения по изобретению, причем используют, в частности, распыление, или спрэй, или воду для питья.

При этом могут применяться формулы вакцины и методики вакцинации по изобретению.

5 Еще одним объектом изобретения являются формулы одновалентной вакцины, включающие одну или несколько плазмид, кодирующих один или несколько генов одного из вышеназванных вирусов, причем эти гены соответствуют перечисленным выше. За исключением их одновалентного характера, эти формулы могут обладать вышеуказанными характеристиками в отношении выбора генов, их комбинаций, состава плазмид, объемов
10 доз, доз и т.п.

Формулы одновалентной вакцины могут быть использованы (i) для получения формулы поливалентной вакцины, как она описана выше, (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
15 качестве вторичной вакцины для введения после вакцины, описанной ниже.

Действительно, еще одним объектом настоящего изобретения является использование одной или нескольких плазмид по изобретению для получения собачьей вакцины, предназначенной для вакцинации животных, первично вакцинированных при помощи первой, обычной, вакцины (одновалентной или поливалентной), из таких, которые
20 использовались в практике прошлого, выбранной, в частности, из группы, представленной цельной живой вакциной, цельной инактивированной вакциной, субъединичной вакциной, рекомбинантной вакциной, причем эта первая вакцина несет (т.е. содержит или обеспечивает их экспрессию) один или несколько антигенов, кодируемых одной или несколькими используемыми плазмидами, или антигенов, обеспечивающих перекрестную
25 защиту.

Представляет интерес тот факт, что полинуклеотидная вакцина оказывает сильное действие в качестве вторичной вакцины, проявляющееся в усилении иммунного ответа и в установлении длительного иммунитета.

В целом, вакцины для первичной вакцинации могут быть выбраны из числа вакцин,
30 предлагаемых к продаже различными производителями ветеринарных вакцин.

Еще одним объектом изобретения является методика вакцинации, заключающаяся в том, что проводят первичную вакцинацию, как она описана выше, и вторичную вакцинацию формулой вакцины по изобретению.

Согласно предпочтительной форме осуществления способа по изобретению сначала
35 животному вводят эффективную дозу вакцины классического типа, в частности инактивированной, живой, ослабленной или рекомбинантной, или субъединичной вакцины, таким образом, чтобы обеспечить первичную вакцинацию и через 2-6 недель вводят поливалентную или одновалентную вакцину по изобретению.

Объектом настоящего изобретения является также набор для вакцинации, в который
40 входят вакцина для первичной вакцинации, как она описана выше, и, в качестве вторичной вакцины, формула вакцины по изобретению. Изобретение также относится к формуле вакцины по изобретению с приложенной к ней инструкцией, в которой указывается на использование этой формулы в качестве вторичной вакцины после первичной вакцинации, как она описана выше.

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

Далее следует детальное описание изобретения с помощью способов осуществления изобретения с опорой на рисунки приложения.

Список фигур.

50 Фигура № 1: Плазида pVR1012
Фигура № 2: Плазида pAB044
Фигура № 3: Плазида pAB036
Фигура № 4: Плазида pAB024

Фигура № 5: Плазмида pAB021

Фигура № 6: Плазмида pAB022

Фигура № 7: Плазмида pAB037

Фигура № 8: Плазмида pAB038

5 Фигура № 9: Плазмида pAB017

Фигура № 10: Плазмида pAB041

Список последовательностей SEQ ID №.

SEQ ID № 1: Олигонуклеотид AB017

SEQ ID № 2: Олигонуклеотид AB018

10 SEQ ID № 3: Олигонуклеотид AB085

SEQ ID № 4: Олигонуклеотид AB086

SEQ ID № 5: Олигонуклеотид AB053

SEQ ID № 6: Олигонуклеотид AB054

SEQ ID № 7: Олигонуклеотид AB045

15 SEQ ID № 8: Олигонуклеотид AB048

SEQ ID № 9: Олигонуклеотид AB049

SEQ ID № 10: Олигонуклеотид AB050

SEQ ID № 11: Олигонуклеотид AB087

SEQ ID № 12: Олигонуклеотид AB088

20 SEQ ID № 13: Олигонуклеотид AB089

SEQ ID № 14: Олигонуклеотид AB090

SEQ ID № 15: Олигонуклеотид AB038

SEQ ID № 16: Олигонуклеотид AB039

SEQ ID № 17: Олигонуклеотид AB011

25 SEQ ID № 18: Олигонуклеотид AB012

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Культура вирусов

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

35 Пример 2. Культура бактерий

Штаммы *Borrelia burgdorferi* культивируют в соответствующих средах в известных условиях. Эти условия и среды описаны, в частности, A.Barbour (J. Biol. Med. 1984. 57. 71-75). Экстракцию бактериальной ДНК проводили в условиях, описанных W.Simpson и др. (Infect. Immun. 1990. 58. 847-853). Технологии, описанные J.Sambrook и др.
40 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2-е Изд. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989), также могут быть использованы при этом.

Пример 3. Экстракция геномных вирусных ДНК

После культивирования собирают разрушенные клетки и их плавающие на поверхности обломки, а вирусную суспензию центрифугируют при 1000 g и при +4°C в течение 10

45 минут, чтобы удалить обломки клеток. Затем осаждают вирионы

ультрацентрифугированием при 400000 g и при +4°C в течение 1 часа. Осадок собирают в минимальном объеме буфера (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Эту концентрированную вирусную суспензию обрабатывают протеиназой К (100 мкг/мл конечн.) в присутствии

натрийдодецилсульфата (SDS) (0,5% конечн.) в течение 2 часов при 37°C. Затем вирусную
50 ДНК экстрагируют при помощи смеси фенол/хлороформ, потом преципитируют 2 объемами абсолютного этанола. По прошествии ночи при -20°C ДНК центрифугируют при 10000 g и

при +4°C в течение 15 минут. Осадок ДНК высушивают, затем собирают в минимальном объеме стерильной ультрачистой воды. После этого она может быть расщеплена

ферментами рестрикции.

Пример 4. Изолирование геномных вирусных РНК

РНК-содержащие вирусы очищали по известным специалистам технологиям. РНК генома каждого вируса изолировали, используя технологию экстракции "тиоцианат гуанидия/фенолхлороформ", описанную P.Chomczynski и N.Sacchi (Anal. Biochem. 1987. 162. 156-159).

Пример 5. Технологии молекулярной биологии

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

Пример 6. Технология RT-PCR

Специфические олигонуклеотиды (несущие на 5'-концах сайты рестрикции для облегчения клонирования расширенных фрагментов) были синтезированы таким образом, что они полностью закрывают кодирующие участки генов, которые должны быть расширены (см. Специфические примеры). Реакция обратной транскрипции (RT) и расширение в цепи полимеразой (PCR) были осуществлены по стандартным технологиям (Sambrook и др. 1989). Каждая реакция RT-PCR была проведена с парой специфических амплимеров с использованием в качестве матрицы экстрагированной геномной вирусной РНК. Расширенную комплементарную ДНК экстрагировали фенолом/хлороформом/изоамиловым спиртом (25:24:1) перед расщеплением рестрикционными ферментами.

Пример 7. Плазмида pVR1012

Плазмида pVR1012 (фигура №1) была получена при Vical Ink., San Diego, CA, USA. Ее конструкция была описана J.Hartikka и др. (Human Gene Therapy. 1996. 7. 1205-1217).

Пример 8. Конструирование плазмиды pAB044 (ген CDV HA)

По технологии из примера 6 провели реакцию RT-PCR с РНК генома вируса болезни Каре (CDV) (штамм Onderstepoort) (M.Sidhu и др. Virology. 1993. 193. 66-72), полученной по технологии из примера 4, и следующими олигонуклеотидами:

AB017 (35 mer) (SEQ ID №1)

5'AAAAGTGCAGAATGCTCCCCTACCAAGACAAGGTG3'

AB018 (37 mer) (SEQ ID №2)

5'CGCGGATCCTTAACGGTTACATGAGAATCTTATACGG3'

чтобы изолировать ген, кодирующий гликопротеин HA вируса CDV, в форме фрагмента PstI-BamHI. После очистки продукт RT-PCR (1835 pb) расщепили с помощью PstI и BamHI, чтобы изолировать фрагмент PstI-BamHI (1817 pb). Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью PstI и BamHI, и получили плазмиду pAB044 (6676 pb) (Фигура №2).

Пример 9. Конструирование плазмиды pAB036 (ген CDV F)

По технологии из примера 6 провели реакцию RT-PCR с РНК генома вируса болезни Каре (CDV) (штамм Onderstepoort) (R.Driellen № доступа последовательности в Genebank= X65509), полученной по технологии из примера 4, и следующими олигонуклеотидами:

AB085 (40 mer) (SEQ ID №3)

5'ATAAGAAGCGGCCGCACATGCACAAGGGAATCCCCAAAAG3'

AB086 (32 mer) (SEQ ID №4)

5'CGCGGATCCTCACTTCAGTGTGATCTCACATAGG3'

чтобы изолировать ген, кодирующий гликопротеин F вируса CDV, в форме фрагмента NotI-BamHI. После очистки продукт RT-PCR (2018 pb) расщепили с помощью NotI и BamHI, чтобы изолировать фрагмент NotI-BamHI (2000 pb). Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью NotI и BamHI, и получили плазмиду pAB036 (6893 pb) (Фигура № 3).

Пример 10. Конструирование плазмиды pAB024 (ген собачьего парвовируса VP2)

Провели реакцию PCR с ДНК генома собачьего парвовируса (CPV) (штамм CPV-b) (С.Parrish № доступа последовательности в Genebank=M19296), полученной по технологии из примера 3, и следующими олигонуклеотидами:

AB053 (33 mer) (SEQ ID №5)

5'ACGCGTCGACATGAGTGATGGAGCAGTTCAACC3'

AB054 (33 mer) (SEQ ID №6)

5'CGCGGATCCTTAATATAATTTTCTAGGTGCTAG3'

чтобы изолировать ген, кодирующий протеин капсида VP2 (CPV VP2), в форме фрагмента Sall-BamHI. После очистки продукт RT-PCR (1773 pb) расщепили с помощью Sall и BamHI, чтобы изолировать фрагмент Sall-BamHI (1760 pb). Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью Sall и BamHI, и получили плазмиду pAB024 (6629 pb) (Фигура № 4).

Пример 11. Конструирование плазмиды pAB021 (ген CCV S)

По технологии из примера 6 провели реакцию RT-PCR с РНК генома собачьего коронавируса (CCV) (B.Horshburgh и др. J. Gen. Virol. 1992.73. 2849-2862), полученной по технологии из примера 4, и следующими олигонуклеотидами:

AB045 (32 mer) (SEQ ID №7)

5'ACGCGTCGACATGATTGTGCTTACATTGTGCC3'

AB048 (35 mer) (SEQ ID №8)

5'CGCGGATCCTCAGTGAACATGAACTTTTTCAATAG3'

чтобы расширить фрагмент (4374 pb), содержащий ген, кодирующий гликопротеин S вируса CCV, в форме фрагмента Sall-BamHI. После очистки продукт RT-PCR расщепили с помощью Sall и BamHI, чтобы изолировать фрагмент Sall-BamHI (4361 pb). Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью Sall и BamHI, и получили плазмиду pAB021 (9230 pb) (Фигура № 5).

Пример 12. Конструирование плазмиды pAB022 (ген CCV M)

По технологии из примера 6 провели реакцию RT-PCR с РНК генома собачьего коронавируса CCV (B.Horshburgh и др. J. Gen. Virol. 1992. 73. 2849-2862), полученной по технологии из примера 4, и следующими олигонуклеотидами:

AB049 (34 mer) (SEQ ID №9)

5'AAAAGTGCAGAAATGAAGAAAATTTTGTTTTAC3'

AB050 (33 mer) (SEQ ID №10)

5'CGCGGATCCTTATACCATATGTAATAATTTTTC3'

чтобы изолировать ген, кодирующий гликопротеин M (CCV M), в форме фрагмента PstI-BamHI. После очистки продукт RT-PCR (809 pb) расщепили с помощью PstI и BamHI, чтобы изолировать фрагмент PstI-BamHI (792 pb). Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью PstI и BamHI, и получили плазмиду pAB022 (5651 pb) (Фигура № 6).

Пример 13. Конструирование плазмиды pAB037 (ген CHV gB)

Провели реакцию PCR с ДНК генома собачьего герпесвируса (CHV0 (штамм Carmichael) (K.Limbach и др. J. Gen. Virol 1994. 75. 2029-2039), полученной по технологии из примера 3, и следующими олигонуклеотидами:

AB087 (34 mer) (SEQ ID № 11)

5'AAAAGTGCAGAAGTATGTTTTTCATTGTATCTATA3'

AB088 (34 mer) (SEQ ID № 12)

5'CTAGTCTAGATTATTAACSTTTTACTTTTCATTTTC3'

чтобы изолировать ген, кодирующий гликопротеин gB вируса CHV, в форме фрагмента PstI-XbaI. После очистки продукт RT-PCR (2667 pb) расщепили с помощью PstI и XbaI, чтобы изолировать фрагмент PstI-XbaI (2648 pb). Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью PstI и XbaI, и получили плазмиду pAB037 (7523 pb) (Фигура № 7).

Пример 14. Конструирование плазмиды pAB036 (ген CHV gD)

Провели реакцию PCR с ДНК генома собачьего герпесвируса (CHV) (штамм Carmichael)

(K.Limbach и др. J. Gen. Virol 1994. 75. 2029-2039), полученной по технологии из примера 3, и следующими олигонуклеотидами:

AB089 (34 mer) (SEQ ID №13)
5'AAAАCTGCAGAAAATGATTAAACTTCTATTTATC3'

5 AB090 (35 mer) (SEQ ID №14)
5'ATAAGAATGCGGCCGCAAAGGCTAAACATTTGTTG3'

чтобы изолировать ген, кодирующий гликопротеин gВ вируса CHV, в форме фрагмента PstI-NotI. После очистки продукт PCR (1072 pb) расщепили с помощью PstI и NotI, чтобы изолировать фрагмент PstI-NotI (1049 pb). Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью PstI и NotI, и получили плазмиду pAB038 (5930 pb) (фигура №8).

Пример 15. Конструирование плазмиды pAB017 (ген *Borrelia burgdorferi ospA*)

Провели реакцию PCR с ДНК генома *Borrelia burgdorferi* (штамм В31) (S.Bergstrom и др. Mol. Microbiol. 1989. 3. 479-486), полученной по технологии из примера 2, и

15 следующими олигонуклеотидами:

AB038 (37 mer) (SEQ ID №15)
5'ACGCGTCTGACTATGAAAAAATATTTATTGGGAATAGG3'

AB039 (34 mer) (SEQ ID №16)
5'CGCGGATCCCTTATTTTAAAGCGTTTTTAATTTTC3'

20 чтобы изолировать ген, кодирующий мембранный протеин OspA, в форме фрагмента Sall-BamHI. После очистки продукт PCR (842 pb) расщепили с помощью Sall и BamHI, чтобы изолировать фрагмент Sall-BamHI. Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью Sall и BamHI, и получили плазмиду pAB017 (5698 pb) (Фигура № 9).

25 Пример 16. Конструирование плазмиды pAB041 (ген G вируса бешенства)

По технологии из примера 6 провели реакцию RT-PCR с РНК генома вируса бешенства (штамм ERA) (A.Anilionis и др. Nature. 1981. 294. 275-278), полученной по технологии из примера 4, и следующими олигонуклеотидами:

AB011 (33 mer) (SEQ ID № 17)
30 5'AAAАCTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG3'

AB012 (34 mer) (SEQ ID №18)
5'CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTC3'

35 чтобы расширить фрагмент (1589 pb), содержащий ген, кодирующий гликопротеин G вируса бешенства. После очистки продукт RT-PCR расщепили с помощью PstI и BamHI, чтобы получить фрагмент PstI-BamHI (1578 pb). Этот фрагмент сшили с вектором pVR1012 (пример 7), предварительно расщепленным с помощью PstI и BamHI, и получили плазмиду pAB041 (6437 pb) (Фигура № 10).

Пример 17. Получение и очистка плазмид

40 Для получения плазмид, предназначенных для вакцинации животных, можно использовать любую технологию, позволяющую получить суспензию очищенных плазмид, по большей части в сверхскрученной форме. Такие технологии хорошо известны специалистам. Можно назвать, в частности, технику щелочного лизиса с последующим двукратным ультрацентрифугированием в градиенте хлорида цезия и в присутствии бромида этидия, как описано J.Sambrook и др. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 45 2-е изд. 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 методики получения в промышленном масштабе плазмид для вакцинации. Для получения вакцин (см. Пример 17), готовят суспензию очищенных плазмид таким образом, чтобы получить высококонцентрированные растворы (>2 мг/мл), пригодные для хранения. 50 Для этого готовят суспензию плазмид или в ультрачистой воде, или в буфере TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

Пример 18. Получение ассоциированных вакцин

Различные плазмиды, необходимые для получения ассоциированной вакцины,

смешивают в их концентрированных растворах (пример 16). Смеси готовят таким образом, чтобы конечная концентрация каждой плазмиды соответствовала эффективной дозе каждой плазмиды. В качестве растворов для доводки конечной концентрации вакцины можно использовать раствор 0,9% NaCl или буфер PBS.

5 Особые составы, такие как липосомы, катионные липиды, могут также быть использованы для получения вакцин.

Пример 19. Вакцинация собак

Собак вакцинируют дозами 10 мкг, 50 мкг или 250 мкг на каждый тип плазмиды.

10 Инъекции можно проводить с помощью иглы внутримышечно. В этом случае вакцинные дозы вводят в объемах 1 или 2 мл. Инъекции можно проводить с помощью иглы внутривожно. В этом случае вакцинные дозы вводят в общем объеме 1 мл, вводимом в 10 точках по 0,1 мл или в 20 точках по 0,05 мл. Перед внутривожным введением выбривают кожу (обычно бок грудной клетки) или их проводят на уровне относительно безволосых анатомических областей, таких как, например, внутренняя поверхность бедра. Также
15 можно использовать жидкоструйный инъекционный аппарат для внутривожных инъекций.

Формула изобретения

1. Вакцина собак, содержащая эффективное для индукции защитного иммунного ответа против бешенства у Canidae количество плазмиды, которая содержит и экспрессирует в
20 клетке-хозяине Canidae молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок G вируса бешенства, и фармацевтически приемлемый носитель.

2. Вакцина по п.1, где экспрессия этой последовательности нуклеиновой кислоты находится под контролем промотора, выбранного из группы, состоящей из промотора CMV-
25 IE, раннего промотора вируса SV40, позднего промотора вируса SV40, промотора LTR вируса саркомы Рауса и промотора гена цитоскелета.

3. Вакцина по п.2, где промотором является промотор CMV-IE.

4. Вакцина по п.1 в объеме дозы 0,1-5 мл.

5. Вакцина по п.4 в объеме дозы 0,5-2 мл.

30 6. Вакцина по п.1, которая содержит 10 нг - 1 мг плазмиды.

7. Вакцина по п.6, которая содержит 100 нг - 500 мкг плазмиды.

8. Вакцина по п.6, которая содержит 1 мкг - 250 мкг плазмиды.

9. Вакцина по любому из пп.1-4, где эта вакцина обеспечивает полную защиту против бешенства в течение по меньшей мере одного года после единственного введения этой
35 вакцины.

10. Вакцина по любому из пп.1-4, для применения в качестве бустер-иммунизации для первой вакцины против бешенства, предназначенной для собак, выбранной из группы, состоящей из живой цельной вакцины, инактивированной цельной вакцины, субъединичной вакцины, рекомбинантной вакцины, причем эта первая вакцина имеет антиген G.

40 11. Вакцина собак, содержащая эффективное для индукции защитного иммунного ответа против бешенства у собак количество плазмиды, которая содержит и экспрессирует в клетке-хозяине собак молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок G вируса бешенства, и фармацевтически приемлемый носитель, где эта плазида дополнительно содержит и экспрессирует in vivo
45 в клетке-хозяине собак молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты другого патогена собак.

12. Способ вакцинации собак, включающий введение указанной собаке эффективного для придания защитного иммунитета у собак количества вакцины собак, содержащей эффективное для индукции защитного иммунного ответа у собак количество плазмиды,
50 которая содержит и экспрессирует в клетке-хозяине собак молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок G вируса бешенства, и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Способ вакцинации собак по п.12, где экспрессия плазмидой этой

последовательности нуклеиновой кислоты находится под контролем промотора, выбранного из группы, состоящей из промотора CMV-IE, раннего промотора вируса SV40, позднего промотора вируса SV40, промотора LTR вируса саркомы Рауса и промотора гена цитоскелета.

5 14. Способ вакцинации собак по п.13, где промотором является промотор CMV-IE.

15. Способ вакцинации собак по п.13, где вакцина находится в объеме дозы 0,1-5 мл.

16. Способ вакцинации собак по п.15, где вакцина находится в объеме дозы 0,5-2 мл.

17. Способ вакцинации собак по п.16, где вакцина содержит 10 нг - 1 мг плазмиды.

18. Способ вакцинации собак по п.17, где вакцина содержит 100 нг - 500 мкг плазмиды.

10 19. Способ вакцинации собак по п.17, где вакцина содержит 1 - 250 мкг плазмиды.

20. Способ вакцинации собак по любому из пп.12-14, где способ обеспечивает полную защиту против бешенства в течение по меньшей мере одного года после единственного введения этой вакцины.

15 21. Способ вакцинации собак по п.12, где эта плазида дополнительно содержит и экспрессирует *in vivo* в клетке-хозяине собак молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты другого патогенна собак.

20 22. Способ вакцинации хозяина, представляющего собой собаку, против бешенства, включающий введение указанной собаке вакцины, выбранной из группы, состоящей из живой цельной вакцины, инактивированной цельной вакцины, субъединичной вакцины, рекомбинантной вакцины и после этого введение вакцины собак, содержащей эффективное для индукции защитного иммунного ответа у собак количество плазмиды, которая содержит и экспрессирует в клетке-хозяине собак молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок G вируса бешенства, и фармацевтически приемлемый носитель.

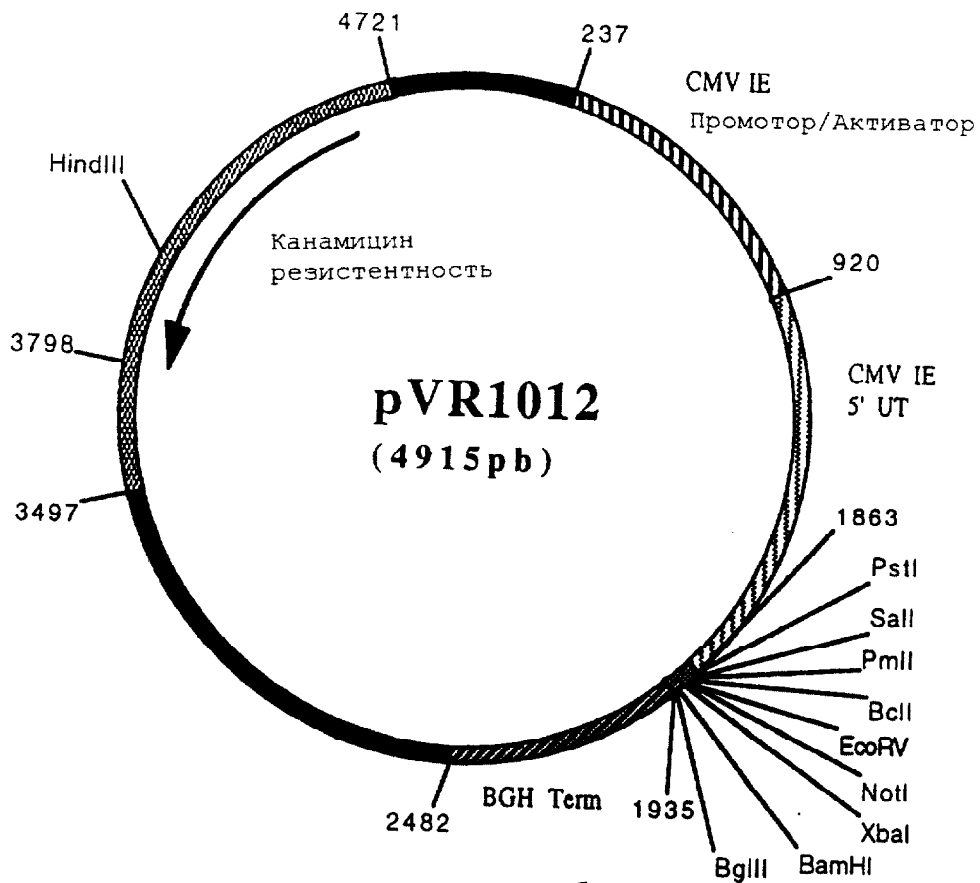
25 23. Набор, содержащий (i) вакцину собак, содержащую эффективное для индукции защитного иммунного ответа против бешенства у собак количество плазмиды, которая содержит и экспрессирует в клетке-хозяине собак молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок G вируса бешенства, и фармацевтически приемлемый носитель, и (ii) вакцину собак, выбранную из
30 группы, состоящей из живой цельной вакцины, инактивированной цельной вакцины, субъединичной вакцины и рекомбинантной вакцины.

24. Набор для вакцинации против бешенства, содержащий в качестве первой вакцины вакцину, предназначенную для собак, выбранную из группы, состоящей из живой цельной вакцины, инактивированной цельной вакцины, субъединичной вакцины и рекомбинантной
35 вакцины, и в качестве второй вакцины плазмидную вакцину по любому из пп.1-4, где эта первая вакцина содержит или экспрессирует антиген G, для введения в первичной вакцинации, а плазмидная вакцина предназначена для введения во вторичной (бустер) - вакцинации.

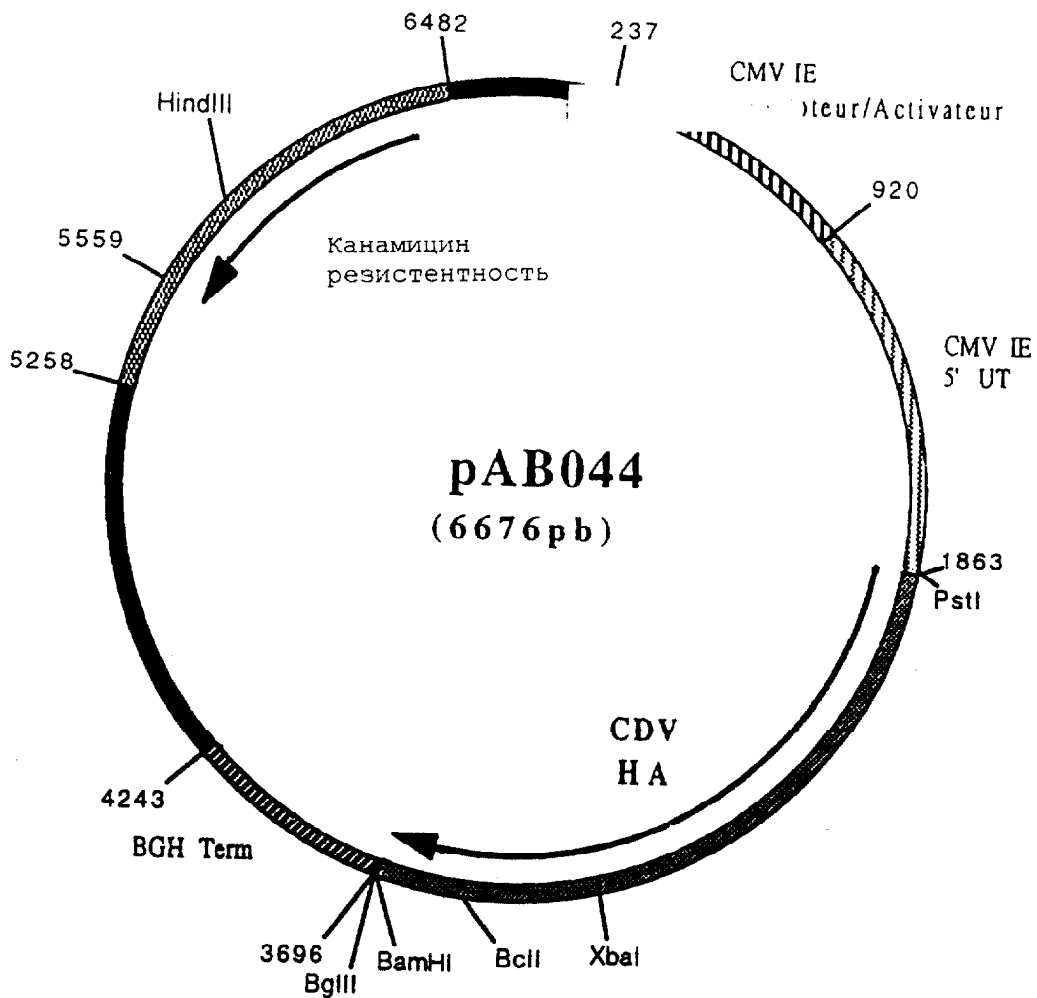
40

45

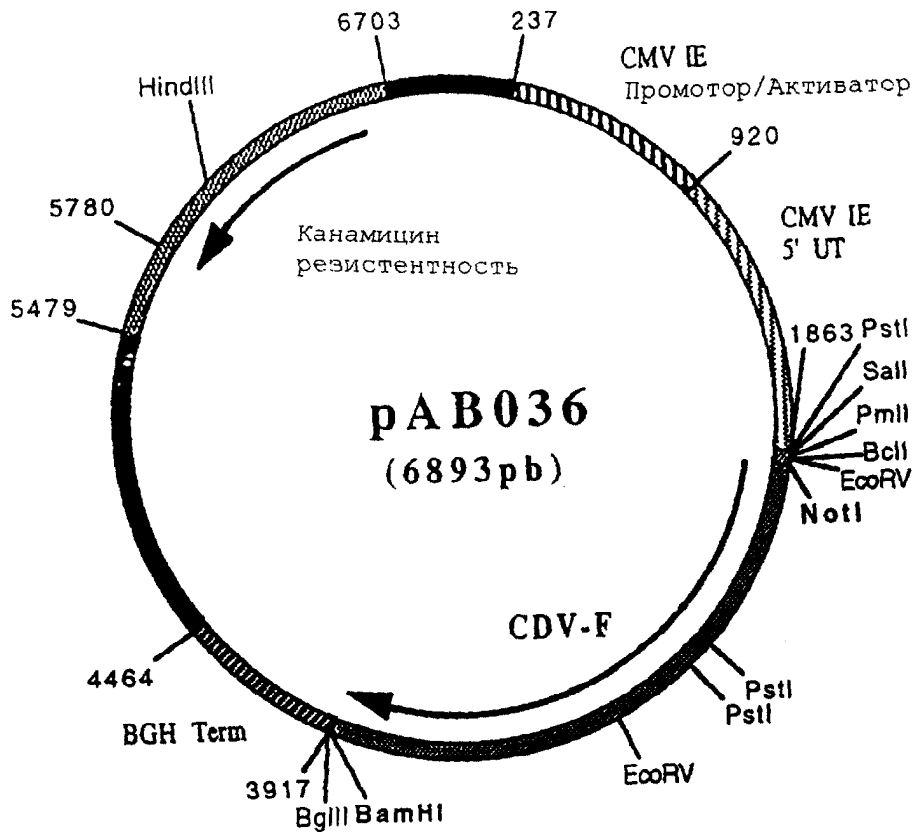
50



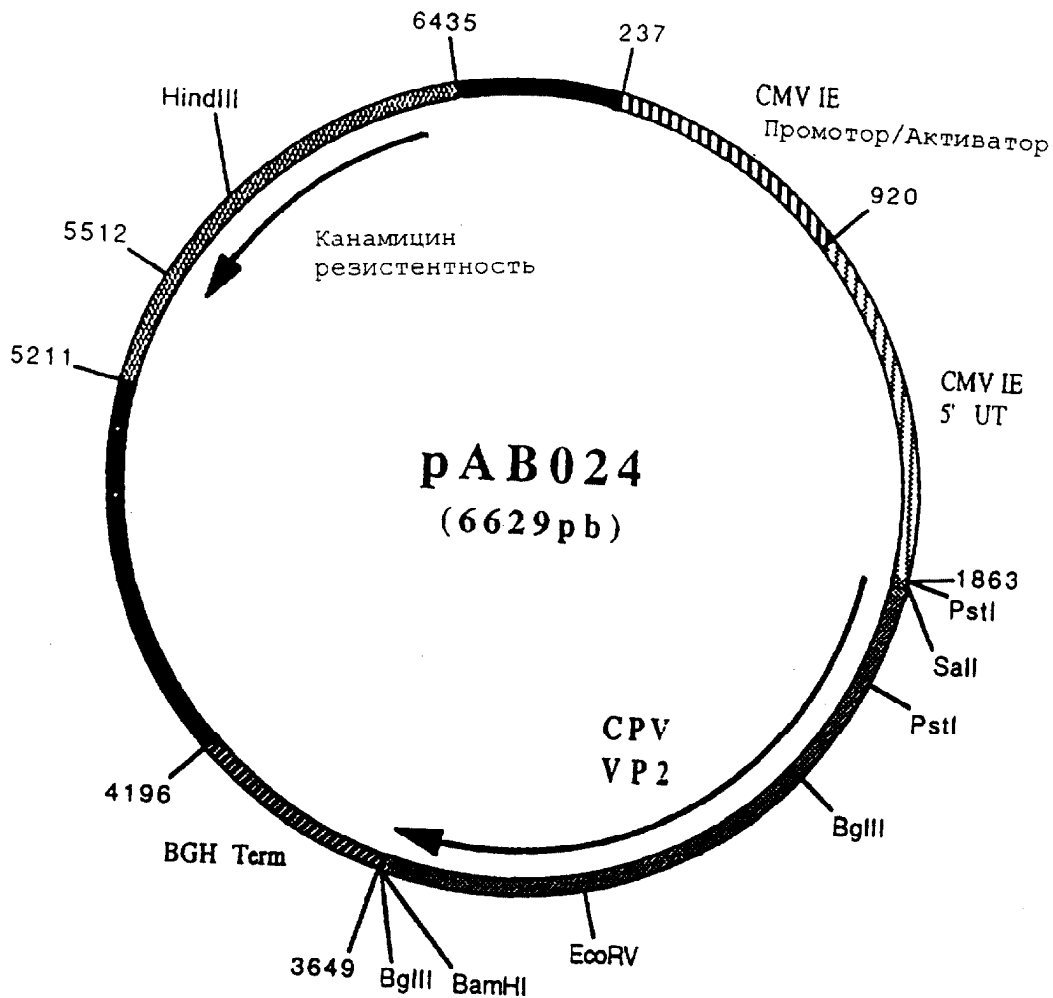
ФИГ. 1



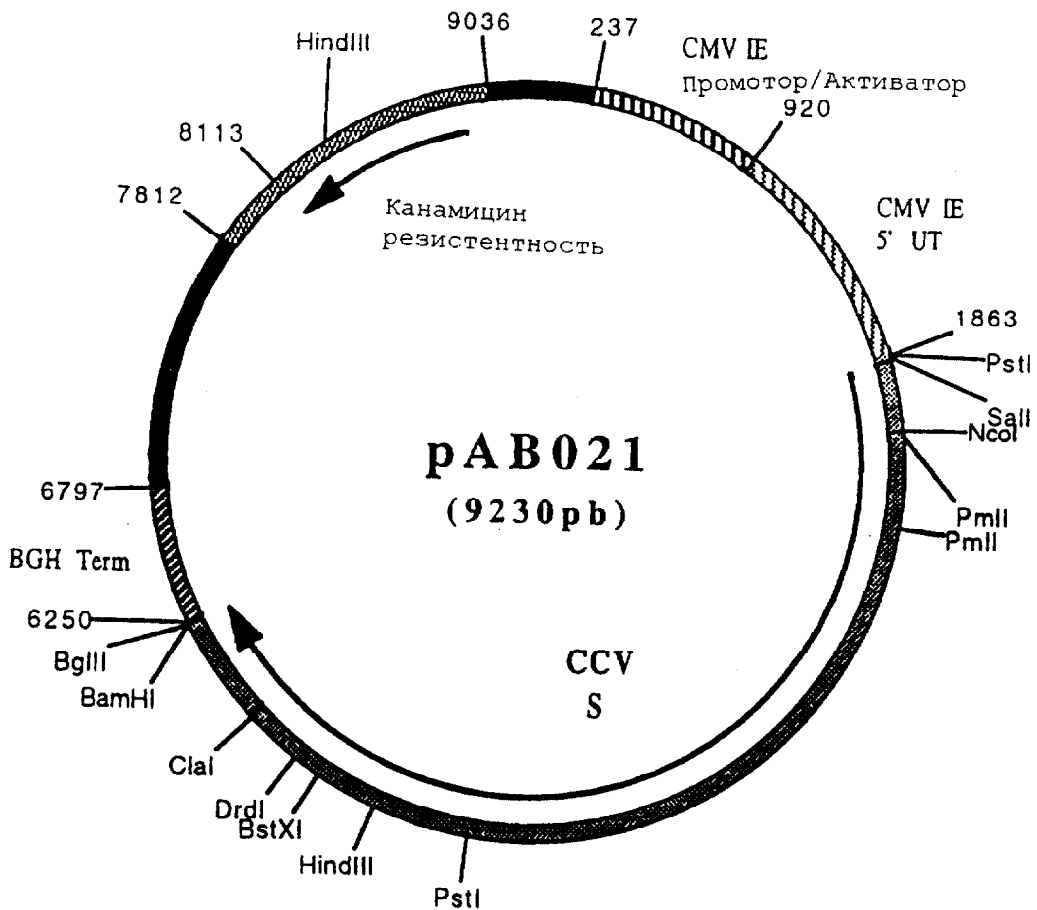
ФИГ. 2



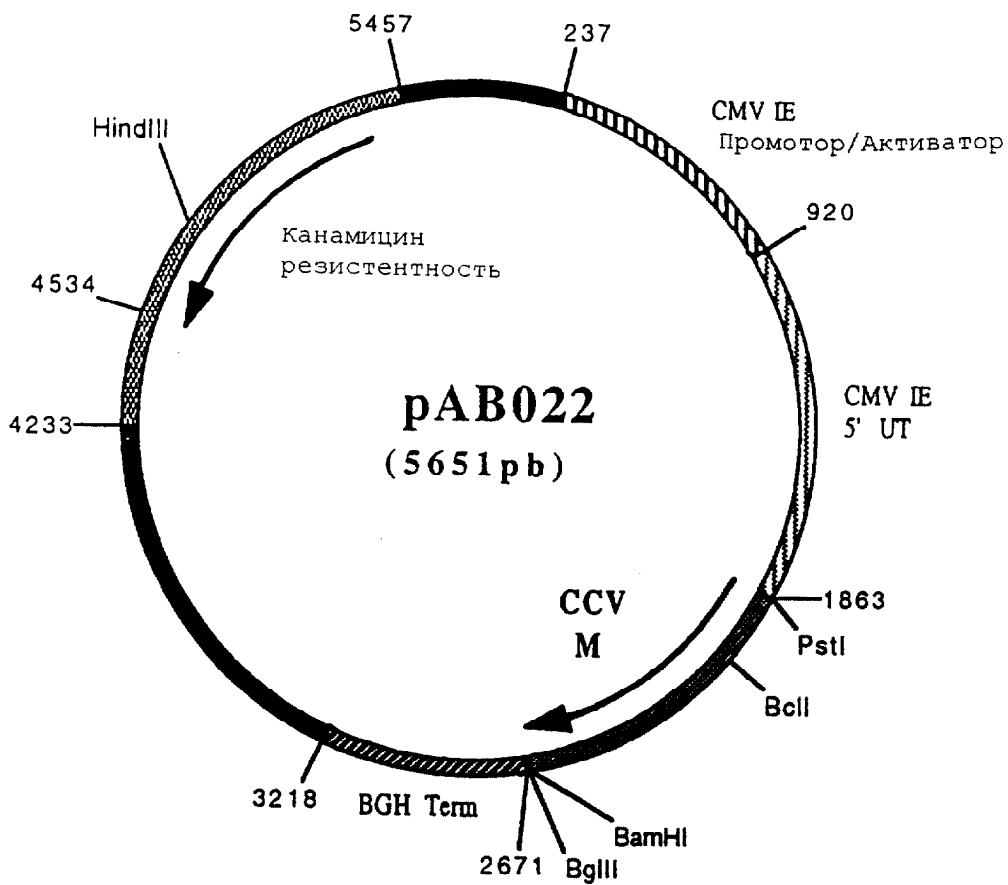
ФИГ. 3



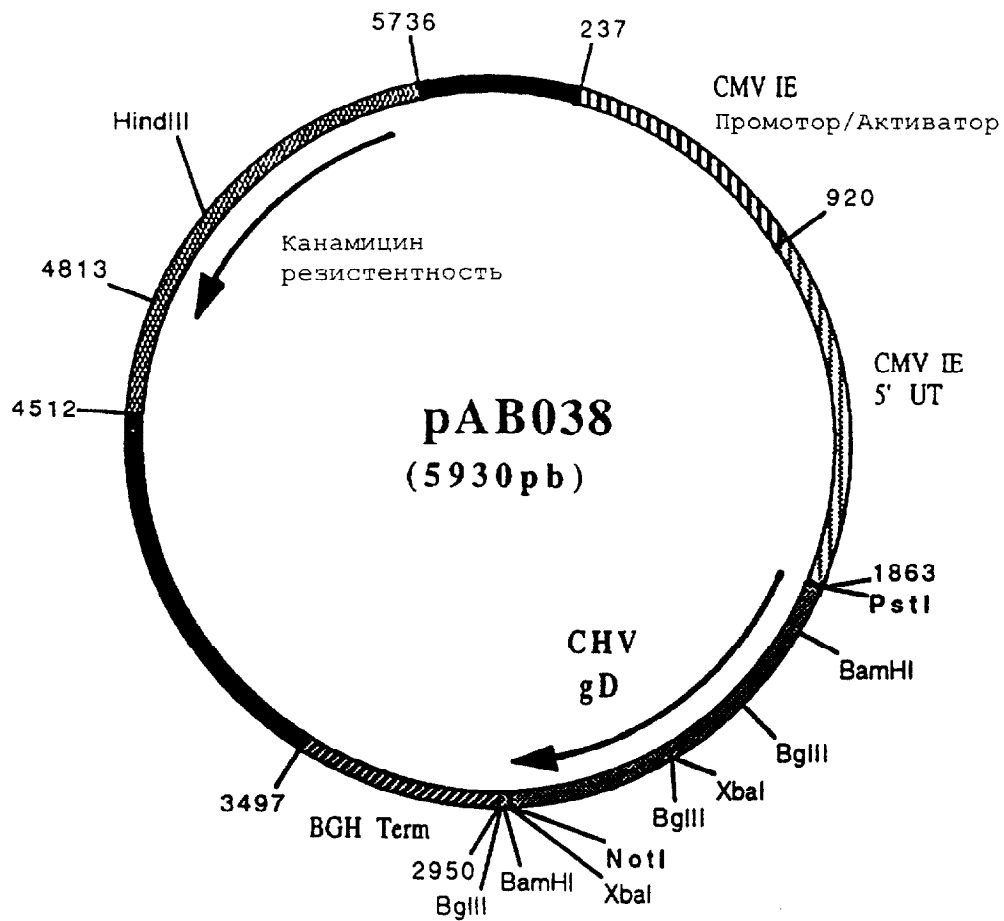
ФИГ. 4



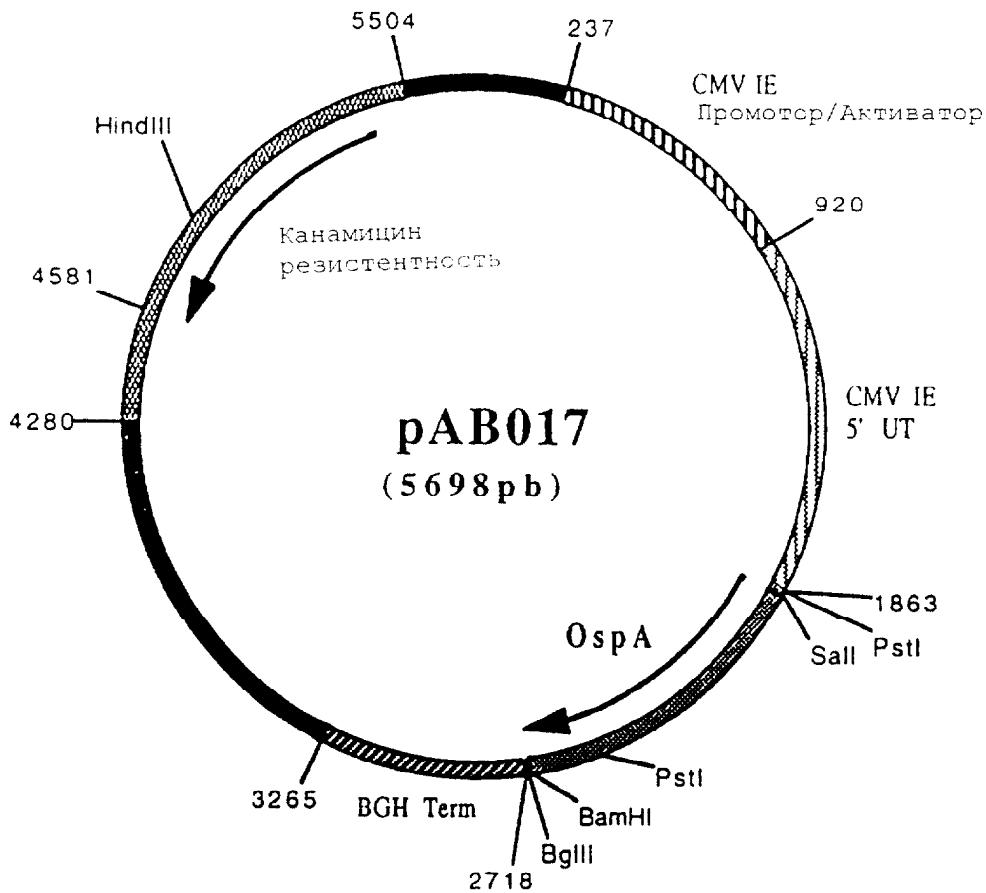
ФИГ. 5



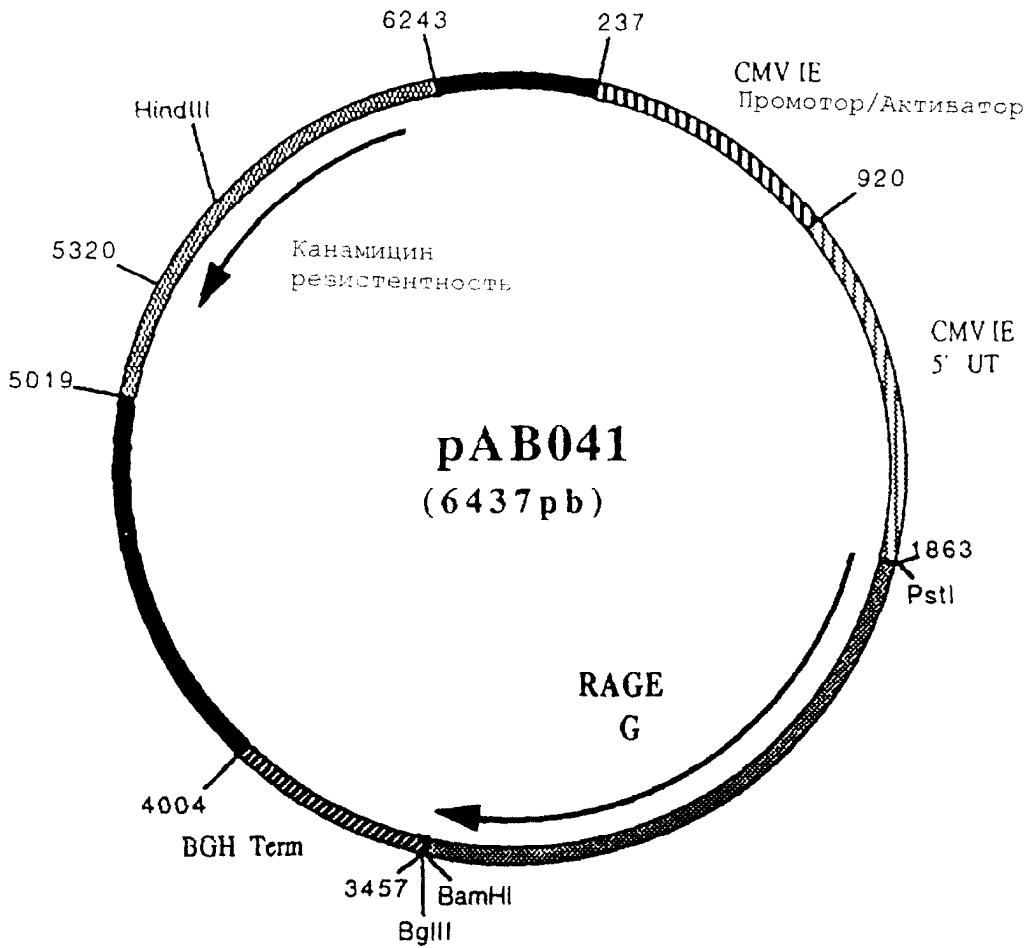
ФИГ. 6



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10