

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035320**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.27

(51) Int. Cl. **C07K 14/015** (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201500837

(22) Дата подачи заявки
2014.02.13

(54) ПАРВОВИРУС СВИНЕЙ 5В, СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ И ВАКЦИНА

(31) **61/765,204; 13/800,413**

(32) **2013.02.15; 2013.03.13**

(33) **US**

(43) **2016.02.29**

(86) **PCT/US2014/016165**

(87) **WO 2014/127084 2014.08.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ЭНИМАЛ ХЕЛС Ю-ЭС-ЭЙ ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Айер Арун В., Джордан Дайана М.
Мёрфи, Паттерсон Эбби Рей, Руф
Майкл Б., Вон Эрик Мартин,
Виктория Джозеф Гилберт, Вайзек
Калли Энн (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) DATABASE UniProt [Online] 9 January 2013 (2013-01-09), "SubName: Full=Capsid", XP002725408, retrieved from EBI accession no. UNIPROT: K4K2G7 Database accession no. K4K2G7 sequence

DATABASE UniProt [Online] 9 January 2013 (2013-01-09), "SubName: Full=Replicase", XP002725409, retrieved from EBI accession no. UNIPROT: K4K4H5 Database accession no. K4K4H5 sequence

DATABASE EMBL [Online] 23 October 2012 (2012-10-23), "Porcine parvovirus 5 isolate MI216, complete genome.", XP002725410, retrieved from EBI accession no. EM STD:JX896318 Database accession no. JX896318 sequence

JOZWIK A. ET AL.: "Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 90, no. 10, 17 June 2009 (2009-06-17), pages 2437-2441, XP55104196, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.012054-0 page 2437 abstract

(57) Изобретение обеспечивает новые нуклеотидные последовательности, белковые последовательности, иммуногенные композиции, вакцины и способы, которые относятся к созданию или применению нового парвовируса свиней 5В (PPV5В), который инфицирует, среди прочих, домашних свиней. Композиции и способы обеспечивают определение инфекций, вызванных указанным новым вирусом, мониторинг генетических изменений в вирусных последовательностях у диких и домашних животных и в стадах, а также создание и применение новых вакцин для защиты животных от инфекции этим вирусом.

B1**035320****035320 B1**

Список последовательностей

Заявка содержит список последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821-1.825. Список последовательностей, который сопровождает данную заявку, является введенным в нее в качестве ссылки. Указанная ASCII копия, созданная 21 марта 2013 г., имеет название 10-0153-WO-1-SEQ.txt и размер 34495 бит.

Предпосылки создания изобретения

А. Область, к которой относится изобретение

Изобретение является связанным с областью здоровья животных и относится к новым штаммам парвовируса свиней, которые включают аттенуированные штаммы для вакцинации, способам производства и способам лечения при использовании вакцин, полученных из указанных новых штаммов парвовируса.

В. Описание области техники

Парвовирусы инфицируют широкое разнообразие видов животных, и некоторые из них являются ответственными за тяжелые клинические заболевания, однако большинство этих вирусов вызывает только слабые или субклинические инфекции. Они принадлежат к семейству Parvoviridae и образуют два подсемейства: Densovirinae, члены которого инфицируют насекомых, и Parvovirinae, члены которого инфицируют позвоночных животных. Последнее подсемейство в настоящее время включает 5 родов: Dependovirus, Erythrovirus, Amdovirus, Bocavirus и Parvovirus (1).

Вирионы парвовируса не имеют оболочки и содержат одноцепочечные, линейные геномы на основе ДНК размером приблизительно 5-6 килобаз (кб). Геном состоит из двух основных открытых рамок считывания (ORF), которые кодируют неструктурные и капсидные белки. Недавно описанные Bocaviruses содержат третью ORF между двумя основными ORF (1).

Классические штаммы парвовируса свиней (PPV1) рода Parvovirus широко распространены во всем мире и являются ответственными за репродуктивные расстройства у свиней, в частности, в стадах, где протоколы вакцинации не соблюдаются правильно или эффективность вакцины снижается из-за иммуносупрессивных факторов. В течение последнего десятилетия ряд новых парвовирусов был обнаружен у свиней. Они включают в себя парвовирус свиней 2 (PPV2) (2) и родственные вирусы (3). Новая группа парвовирусов свиней и коров, а именно группа гоковирусов (PHoV, BHoV), была обнаружена в Гонконге (4), и эти вирусы были определены как такие, которые являются генетически сходными с человеческими PARV4 и 5. Несмотря на то, что они первоначально назывались гоковирусами в честь Гонконга, была предложена новая классификация PHoV как PPV3 (5). PPV4 демонстрирует наибольшее сходство с коровым парвовирусом 2, но кодирующая способность и организация генома являются аналогичными таковым бокавирусам, поскольку PPV4 кодирует дополнительную ORF3, как и бокавирусы, расположенную между ORF1 и ORF2. Однако кодируемый PPV4 путативный белок ORF3 существенно отличается от такого бокавируса (5).

Существует постоянная потребность в мониторинге свиней в отношении появления новых вирусов и для разработки вакцин, лечения и способов обнаружения новых вирусов.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к новым нуклеотидным последовательностям, последовательностям белка, иммуногенным композициям, вакцинам и способам, которые относятся к созданию и применению новых штаммов парвовируса, которые заражают, в частности, домашних свиней. Эти штаммы относятся к новым парвовирусам свиней, идентифицированным в образцах тканей, полученных от клинически больных домашних свиней; на основе гомологии последовательности с известными видами и штаммами парвовируса свиней новый вирус был обозначен как парвовирус свиней 5B или PPV5B.

Композиции и способы в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают обнаружение инфекций с помощью указанного нового вируса, мониторинг генетических изменений в вирусных последовательностях у диких и домашних животных и скота, а также создание и применение новых вакцин для защиты животных от инфекции вирусом.

Иммуногенные композиции и вакцины в соответствии с изобретением включают полипептидные последовательности, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, или их иммуногенные фрагменты, необязательно включающие адъюванты для индуцирования более мощного иммунного ответа.

Типичные композиции в соответствии с изобретением включают любую из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ NO: 4 или их фрагменты, которые являются иммунореактивными с антителами, специфичными для PPV5B. Предпочтительные полипептиды в соответствии с изобретением включают последовательность SEQ ID NO: 4. Предпочтительно такие полипептиды или их фрагменты являются иммунореактивными с антителами, специфичными для PPV5B.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют один или несколько полипептидов, конструкции антител или конъюгаты антител. Генные последовательности, кодирующие полипептиды, включают последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по крайней мере на 95, 90, 85 или даже 80% гомологичной и/или идентичной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1, в частности нуклеотидные последовательности

2861-5014 SEQ ID NO: 1 (белок капсида) или фрагменты SEQ ID NO: 1, кодирующие полипептид, который является иммунореактивным с антителами, специфичными для PPV5B. Примеры последовательностей нуклеиновых кислот в соответствии с изобретением включают любую из последовательностей нуклеотидов 935-2024 SEQ ID NO: 1, нуклеотиды 2161-2860 SEQ ID NO: 1 и нуклеотиды 2861-5014 SEQ ID NO: 1 и фрагменты, которые кодируют полипептид, который является иммунореактивным с антителами, специфичными для PPV5B. Предпочтительно, когда последовательности нуклеиновых кислот или гены представляют собой такие, которые кодируют полипептид или пептид, который является иммунореактивным с антителом, специфичным для PPV5B.

Кроме того, полипептид в соответствии с изобретением, как используется в данной заявке, включает, но без ограничения таковым, полипептид, который включает:

- i) полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4;
- ii) полипептид, который является по крайней мере на 80% гомологичным и/или идентичным с полипептидом i);
- iii) фрагмент полипептидов в соответствии с i) и/или ii);
- iv) фрагмент iii), который включает по крайней мере 13, предпочтительно 15, более предпочтительно 17, еще более предпочтительно 20 последовательных аминокислот, включенных в последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4;
- v) полипептид, который кодируется полинуклеотидом, который включает последовательность нуклеотидов 935-2024 SEQ ID NO: 1, нуклеотидов 2161-2860 SEQ ID NO: 1 или нуклеотидов 2861-5014 SEQ ID NO: 1;
- vi) полипептид, который кодируется полинуклеотидом, который является по крайней мере на 80% гомологичным или идентичным полинуклеотиду в соответствии с v);
- vii) фрагмент белка, который кодируется полинуклеотидом, который включает по крайней мере 39, предпочтительно 45, более предпочтительно 51, даже более предпочтительно 60 смежных нуклеотидов, которые включены в последовательности нуклеотидов 2161-2860 SEQ ID NO: 1 или нуклеотидов 2861-5014 SEQ ID NO: 1.

Иммуногенные композиции в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат по крайней мере один или более полипептидов PPV5B, как определено в данной заявке, могут дополнительно содержать физиологически приемлемый носитель, такой как фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинации.

Любой из полипептидов PPV5B, которые обеспечиваются в данной заявке, или любая из иммуногенных композиций, содержащих один или более полипептидов PPV5B, которые обеспечиваются в данной заявке, могут быть использованы в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины или иммуногенной композиции, предпочтительно для профилактики или для лечения субъекта от инфекции PPV5B.

Особенно предпочтительные PPV5B полипептиды включают такие с иммуногенными эпитопами, которые индуцируют иммунологический ответ, специфический для PPV5B. Предпочтительные PPV5B полипептиды включают те, которые имеют аминокислотные последовательности, прогнозируемые в родственных PPV1 в качестве поверхностных антигенов (Simpson и др. JMB 315, 2002) и включают, но не ограничиваются таковыми, остатки 289, 375-381 и 431-443 последовательности SEQ ID NO: 4.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что композиции, используемые в данной заявке, могут включать известные инъекционные, физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к применению раствора для парентерального введения или инфузии являются доступными водные изотонические растворы, например физиологический раствор или растворы белка плазмы крови. Кроме того, иммуногенные композиции и вакцины в соответствии с настоящим изобретением могут включать приемлемые для ветеринарии носители, разбавители, изотонические агенты, стабилизаторы или адъюванты.

Способы в соответствии с изобретением включают, но не ограничиваются таковыми, способ индукции иммунного ответа против PPV5B инфекции у субъекта, включающий стадию введения субъекту иммуногенной композиции, содержащей один или более PPV5B полипептидов, как определено в данной заявке.

Предпочтительно, когда иммунный ответ индуцируется против более чем одного серотипа или штамма PPV5B. Композиции в соответствии с изобретением могут быть использованы для лечения или в качестве альтернативы для предотвращения инфекции PPV5B. Предпочтительно такой иммунный ответ снижает частоту возникновения и тяжесть одного или более клинических симптомов, связанных с или вызванных инфекцией одним или более серотипами PPV5B.

В данной заявке подходящие субъекты и субъекты, которые в этом нуждаются и которым могут быть введены композиции в соответствии с изобретением, включают животных, нуждающихся в профилактике или лечении инфекции, заболевания или состояния, ассоциированного с вирусами, микробами, паразитами, простейшими, бактериями или грибами. Животные, у которых стимулируется иммунная реакция при использовании композиций или способов в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя домашний скот, например свиней, коров, птиц (например, кур, уток, гусей или индюков), коз

и овец, а также домашних животных, таких как мыши, кролики, собаки, кошки и лошади.

Предпочтительные животные включают свиней, муридовых, непарнокопытных, зайцеобразных и полорогих. Наиболее предпочтительным является, когда иммунная реакция стимулируется у свиней.

Изобретение также обеспечивает способ снижения частоты или тяжести одного или более симптомов, ассоциированных с или вызванных PPV5B инфекцией, включающий стадию введения иммуногенной композиции в соответствии с изобретением, которая включает один или более пептидов PPV5B в соответствии с данной заявкой и предпочтительно молекулу носителя, например, так, что частота или тяжесть клинического признака PPV5B инфекции уменьшается по крайней мере на 10%, предпочтительно по крайней мере на 20%, еще более предпочтительно по крайней мере на 30%, даже более предпочтительно по крайней мере на 50%, даже более предпочтительно по крайней мере на 70%, наиболее предпочтительно по крайней мере на 100% по сравнению с субъектом, который не получает иммуногенную композицию, как это предусмотрено в настоящей заявке. Такие признаки включают виремию и иммуносупрессию как результат инфекции PPV5B. Такие клинические признаки могут включать неврологические симптомы (депрессия, атаксия, вялость), диарею, одышку, ухудшение состояния организма, отек суставов (который приводит к хромоте и лежачему положению), снижение среднего прироста веса за сутки, смертность и полисерозит в результате сочетанной инфекции другим организмом, например *Mycoplasma hyorhinis*.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение также относится к способу профилактики инфекции PPV5B, в котором указанные PPV5B инфекции могут быть вызваны PPV5B, имеющим 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1, имеющим по крайней мере 95% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1, имеющим по крайней мере 90% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1, или имеющим по крайней мере 85% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1, включающий стадию введения иммуногенной композиции в соответствии с изобретением, которая включает один или более пептидов PPV5B, как это предусмотрено в соответствии с данной заявкой, т.е. по крайней мере один полипептид, который имеет по крайней мере 100%, по крайней мере 95%, по крайней мере 85% идентичности последовательности, соответственно, с полипептидными последовательностями SEQ ID NO: 3 и/или SEQ ID NO: 4, или фрагменты, включающие по крайней мере 12, предпочтительно 15, более предпочтительно 17, даже более предпочтительно 20 последовательных аминокислот, которые являются включенными в последовательности SEQ ID NO: 3 и/или SEQ ID NO: 4.

Настоящее изобретение также относится к способу получения любой из иммуногенных композиций, которые обеспечиваются в данной заявке, который включает смешивание одного или более пептидов PPV5B, как это предусмотрено настоящим изобретением, с молекулой носителя предпочтительно таким образом, что один или более пептидов PPV5B и молекула носителя являются ковалентно связанными или конъюгированными друг с другом. Такие конъюгаты могут быть поливалентными или одновалентными. Поливалентные композиции или вакцины включают иммунную конъюгацию нескольких пептидов PPV5B с молекулой носителя. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения одного или более пептидов PPV5B, где способ включает трансформацию клетки-хозяина, предпочтительно прокариотической клетки, такой как *E. coli*, с помощью молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует любой из пептидов PPV5B в соответствии с данной заявкой. Альтернативно, клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, такой как клетка животного, клетка насекомого, клетка простейшего, растительная клетка или клетка грибов. Предпочтительно эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка CHO, BHK или COS, или клетку грибов, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, или клетку насекомых, такую как Sf9. Также предпочтительной является бакуловирусная экспрессия нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения одного или более пептидов PPV5B, которые индуцируют иммунный ответ против по крайней мере одного генетического варианта PPV5B и более предпочтительно двух или более генетических вариантов PPV5B. Этот способ включает культивирование трансформированного экспрессионного вектора, кодирующего и экспрессирующего один или более пептидов PPV5B, раскрытых в данной заявке. Экспрессированные белки либо удерживаются организмом, в котором они были экспрессированы, либо секретируются в культуральную среду. Экспрессию проводят в условиях, достаточных для получения PPV5B пептида, способного индуцировать иммунный ответ на PPV5B. PPV5B серотипы, к которым PPV5B пептиды индуцируют иммунный ответ, включают, но не ограничиваются таковыми, как последовательности, которые имеют по крайней мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91 или 90% идентичности.

Способы получения композиций в соответствии с настоящим изобретением могут дополнительно включать смешивание конъюгата одного или более пептидов PPV5B и молекулы носителя с физиологически приемлемым носителем, таким как фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинации. Специалистам в данной области техники будет понятно, что выбор носителя, адъюванта или комбинации будет зависеть от пути доставки, личных предпочтений и видов животных среди прочих.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики инфекции PPV5B у субъекта. Этот способ включает введение одного или более пептидов PPV5B; приведение в контакт одного или более пептидов PPV5B с образцом, полученным от субъекта; и идентификацию субъекта как такого, который имеет PPV5B инфекцию, если в образце обнаружено антитело, которое способно связываться с одним или более пептидов PPV5B.

В другом аспекте изобретение относится к способу установления факта того, что субъект ранее подвергался PPV5B инфекции и способен формировать иммунный ответ на PPV5B. Этот способ включает введение одного или более пептидов PPV5B; приведение в контакт одного или более пептидов PPV5B с образцом, полученным от субъекта; и идентификацию субъекта как такого, который имеет PPV5B инфекцию, если в образце обнаружено антитело, которое способно связываться с одним или более пептидом PPV5B.

Изобретение также относится к наборам, которые включают иммуногенную композицию, которая содержит один или более пептидов PPV5B предпочтительно вместе с молекулой носителя; контейнер для упаковки иммуногенной композиции; набор напечатанных инструкций и дозатор, способный к введению иммуногенной композиции животному. Необязательно, один или более PPV5B пептидов и молекула носителя могут быть упакованы в виде конъюгата или в виде отдельных соединений. При отдельной поставке также обеспечиваются средства конъюгации одного или более пептидов PPV5B и молекулы носителя, а также соответствующие напечатанные инструкции.

Изобретение также относится к наборам для вакцинации животного, включающим набор распечатанных инструкций; дозатор, способный к введению иммуногенной композиции, как обеспечивается в данной заявке, включающей один или более PPV5B пептидов животного; и где по крайней мере один из пептидов PPV5B эффективно иммунизирует животных против по крайней мере одного заболевания, связанного с инфекцией PPV5B. Предпочтительно один или более PPV5B пептидов выбирают из тех, которые предусмотрены в соответствии с настоящим изобретением. Наборы в соответствии с настоящим изобретением могут дополнительно содержать ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинацию.

Дозатор в наборе в соответствии с изобретением способен выделять свое содержимое в виде капель; а содержащаяся в наборе иммуногенная композиция, которая включает в себя PPV5B пептиды, как это предусмотрено настоящим изобретением, способна уменьшать выраженность по крайней мере одного клинического признака при PPV5B инфекции при введении интраназально, перорально, подкожно или внутримышечно в организм животного. Предпочтительно тяжесть клинических симптомов уменьшается по крайней мере на 10%, предпочтительно по крайней мере на 20%, еще более предпочтительно по крайней мере на 30%, даже более предпочтительно по крайней мере на 50%, даже более предпочтительно по крайней мере на 70%, наиболее предпочтительно по крайней мере на 100% по сравнению с зараженными животными, не подвергшимися лечению.

Также раскрываются способы лечения или профилактики инфекций, вызванных PPV5B. Способ включает введение эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением субъекту, который отличается тем, что лечение или профилактику выбирают из группы, которая состоит из снижения симптомов PPV5B инфекции, снижение тяжести или частоты клинических симптомов инфекции PPV5B, уменьшения смертности субъектов в результате PPV5B инфекции и их комбинации.

Композиции в соответствии с изобретением дополнительно содержат ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинации. Такие композиции могут использоваться в качестве вакцины и включать одну или более дополнительные аттенуированные вакцины, инаktivированные вакцины или их комбинации. Такие вакцины вызывают протективный иммунный ответ по крайней мере против одного заболевания, связанного с вирусами, выбранными из группы, состоящей из свинных парвовирусов 1, 2, 3, 4, 5A, 5B, других видов парвовирусов свиней, других патогенных вирусов и бактерий свиньи и их комбинации. Другие типы вакцин, которые могут быть совместно введены в комбинации с вакциной к PPV5B, включают, но не ограничиваются таковыми, как цирковир свиней типа 2 (например, Ingelvac® CircoFLEX, Ingelvac® CircoFLEX-Mycoflex), вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (например, Ingelvac® PPCC ATH, Ingelvac® PPCC MLV), парвовирус свиней (например, ReproCyc® PPCC-PLE), микоплазму (например, Ingelvac® Mycoflex) и т.д.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что композиции, используемые в данной заявке, могут включать известные инъекционные, физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к использованию раствора для парентерального введения или инфузии водные изотонические растворы, например физиологические растворы или растворы белка плазмы крови, являются легко доступными. Кроме того, иммуногенные композиции и вакцины в соответствии с настоящим изобретением могут включать в себя фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители, разбавители, изотонические агенты, стабилизаторы или адъюванты.

Способы в соответствии с изобретением могут также включать смешивание композиции в соответствии с изобретением с ветеринарно приемлемым носителем, адъювантом или их комбинацией. Специа-

листам в данной области техники будет понятно, что выбор основы, адъюванта или комбинации будет зависеть от способа доставки, личных предпочтений, видов животных и других факторов.

Изобретение также относится к способу снижения тяжести существующей PPV5B инфекции у животного путем введения композиции животному. Композиция может включать аттенуированную культуру вируса или один или более пептидов PPV5B в сочетании с приемлемым в ветеринарии носителем.

Предпочтительные способы введения включают назальный, пероральный (например, в питьевой воде), внутрикожный и внутримышечный. Внутримышечное введение, наиболее предпочтительно в виде единичной дозы, является предпочтительным. Специалисту в данной области будет понятно, что композиции в соответствии с изобретением могут также быть введены в виде двух или более доз, а также при использовании других путей введения. Например, такие другие способы включают подкожное, внутрикожное, внутривенное, интраваскулярное, интритериальное, интраперитонеальное, интратекальное, интритрахеальное, внутрикожное, интракардиальное, интралобальное, интрамедуллярное, интритлегочное или интритвагинальное введение. В зависимости от желаемой продолжительности и эффективности лечения композиции в соответствии с изобретением могут быть введены один или несколько раз, а также могут вводиться периодически, например на ежедневной основе в течение нескольких дней, недель или месяцев и в различных дозировках.

Изобретение также относится к наборам для вакцинации животного, включающим комплект напечатанных инструкций; дозатор, способный к введению вакцины для животного; и по крайней мере один изолят из клеточной культуры, в том числе, но не ограничиваясь таковым, из культуры клеток бактерий, грибов, насекомых или млекопитающих, который эффективно иммунизирует животных против по крайней мере одного заболевания, ассоциированного с PPV5B, другие штаммы парвовируса, другие патогены и/или их комбинацию. Наборы в соответствии с настоящим изобретением могут дополнительно включать ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинацию.

Устройство для дозированного введения в набор в соответствии с изобретением является способным высвобождать свое содержимое в виде капель; а изолят, который входит в состав набора, способен уменьшать выраженность по крайней мере одного клинического симптома инфекции PPV5B при введении интраназально, перорально, подкожно или внутримышечно в организм животного. В некоторых наборах изолят также является способным снижать тяжесть по крайней мере одного клинического симптома инфекции PPV5B. Предпочтительно тяжесть клинического симптома уменьшается по крайней мере на 10% по сравнению с необработанным инфицированным животным.

Другие объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидными из приведенного ниже подробного описания. Следует понимать, однако, что подробное описание и конкретные примеры, показывающие предпочтительные варианты осуществления изобретения, приводятся только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения будут очевидными для специалистов в данной области техники из этого подробного описания.

Краткое описание фигур

Следующие чертежи являются частью настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может быть более понятным со ссылкой на одну или более из этих фигур в сочетании с подробным описанием специфических вариантов осуществления изобретения, представленных в данной заявке. Заявка содержит по крайней мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии публикации этой патентной заявки с цветным(и) чертежом(ами) будет(ут) предоставлена(ы) Ведомству по запросу и после оплаты необходимой пошлины.

Фиг. 1 показывает последовательность нуклеиновой кислоты PPV5B (SEQ ID NO: 1);

фиг. 2 - последовательность белка репликазы PPV5B (SEQ ID NO: 2);

фиг. 3 - последовательность открытой рамки считывания (ORF) белка PPV5B (SEQ ID NO: 3);

фиг. 4 - белковую последовательность капсидного белка PPV5B (SEQ ID NO: 4);

фиг. 5 - попарное сравнение идентичности аминокислот белковых последовательностей капсидного белка PPV5B и многочисленных других вирусных последовательностей. Ссылки на вирусные последовательности являются приведенными в табл. 1.

Таблица 1

Последовательность	Идентифик. номер GenBank	Информация о журнале	Авторы
[1] Крупный рогатый скот	DQ_335247	J. Virol. 81 (21), 12080-12085 (2007)	Qiu,J., Cheng,F., Johnson,F.B. и Pintel,D
[2] Мелкие собачьи	NP_758521	Virology 302 (2), 219-223 (2002)	Schwartz,D., Green,B., Carmichael,L.E. и Parrish,C.R.
[3] GboV	NC_014358	PLoS ONE 5 (7), E11948 (2010)	Kapoor,A., Mehta,N., Esper,F., Poljsak-Prijatelj,M., Quan,P.L., Qaisar,N., Delwart,E. и Lipkin,W.I
[4] PBoV1a	HM_053693	PLoS ONE 5 (10), E13583 (2010)	Cheng,W.X., Li,J.S., Huang,C.P., Yao,D.P., Liu,N., Cui,S.X., Jin,Y. и Duan,Z.J.
[5] PBoV1b	HM_053694	PLoS ONE 5 (10), E13583 (2010)	Cheng,W.X., Li,J.S., Huang,C.P., Yao,D.P., Liu,N., Cui,S.X., Jin,Y. и Duan,Z.J.
[6] HuBoca	NC_007455	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (36), 12891-12896 (2005)	Allander,T., Tammi,M.T., Eriksson,M., Bjerkner,A., Tiveljung-Lindell,A. и Andersson,B.
[7] HuBoca2	NC_012042	J. Infect. Dis. 199 (2), 196-200 (2009)	Kapoor,A., Slikas,E., Simmonds,P., Chieochansin,T., Naem,A., Shaukat,S., Alam,M.M., Sharif,S., Angez,M., Zaidi,S. и Delwart,E.
[8] HuBoca3	NC_012564	PLoS Pathog. 5 (4), E1000391 (2009)	Arthur,J.L., Higgins,G.D., Davidson,G.P., Givney,R.C. и Ratcliff,R.M.
[9] HuBoca4	NC_012729	J. Infect. Dis. 201 (11), 1633-1643 (2010)	Kapoor,A., Simmonds,P., Slikas,E., Li,L., Bodhidatta,L., Sethabutr,O., Triki,H., Bahri,O., Oderinde,B.S., Baba,M.M., Bukbuk,D.N., Besser,J., Bartkus,J. и Delwart,E.
[10] Densovirus	NC_004287	DIRECT SUBMISSION TO GENBANK	Nonaka,K., Chiba,T., Nakahara,S., Kajiura,Z. и Nakagaki,M.
[11] Hokovirus_a	GQ_869543	Virol. J. 7, 171 (2010)	Adlhoch,C., Kaiser,M., Ellerbrok,H. и Pauli,G.
[12] Hokovirus_b	EU_200677	J. Gen. Virol. 89 (PT 8), 1840-1848 (2008)	Lau,S.K., Woo,P.C., Tse,H., Fu,C.T., Au,W.K., Chen,X.C., Tsoi,H.W., Tsang,T.H., Chan,J.S., Tsang,D.N., Li,K.S., Tse,C.W., Ng,T.K., Tsang,O.T., Zheng,B.J., Tam,S., Chan,K.H., Zhou,B. и Yuen,K.Y.
[13] PPV4a	HM_031135	Virol. J. 7 (1), 333 (2010)	Huang,L., Zhai,S.L., Cheung,A.K., Zhang,H.B., Long,J.X. и Yuan,S.S
[14] PPV4b	GQ_387499	Arch. Virol. 155 (5), 801-806 (2010)	Cheung,A.K., Wu,G., Wang,D., Bayles,D.O., Lager,K.M. и Vincent,A.L.
[15] PPV5B			
[16] PPV1	NC_001718	Virology 197 (1), 86-98 (1993)	Bergeron,J., Menezes,J. и Tijssen,P.

Фиг. 6 показывает филогенетический анализ участка VP1/CAP PPV5B по сравнению с вирусным VP1 и капсидными белками, приведенными в табл. 1;

фиг. 7 - идентичность капсидного белка PPV5B (остатки 184-851 последовательности SEQ ID NO: 4) по отношению к самому близкому родственному белку PPV4 (номер доступа GenBank AFM73881 (SEQ ID NO: 5)), который демонстрирует идентичность последовательности на уровне 53% (367/690);

фиг. 8 - идентичность белка репликазы PPV5B (остатки 1-594 последовательности SEQ ID NO: 2) по отношению к самому близкому родственному белку PPV4 (номер доступа GenBank ADF59557 (SEQ ID NO: 11)), который демонстрирует идентичность последовательности на уровне 87% (517/597).

Подробное описание

Изобретение обеспечивает нуклеиновые кислоты и их фрагменты, полипептиды и их иммунологически эффективные фрагменты, вакцины, иммунологически эффективные препараты, антитела, диагностические анализы и наборы, а также способы получения и использования указанных составов и препаратов, связанных с раскрытым в данной заявке новым парвовирусом свиней 5B и его вариантами.

Осуществление настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК, химии белка и иммунологии, которые являются известными специалистам в данной области техники. Такие методики являются подробно описанными в литературе. См., например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Labo-

ratory Manual, Vols. I, II и III, 2-е изд. (1989); DNA Cloning, Vols. I и II (D. N. Glover ред. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ред. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins ред. 1984); Animal Cell Culture (R.K. ред., 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL изд., 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); серии, Methods In Enzymology (S. Colowick и N. Kaplan ред., Academic Press, Inc.); Protein purification methods - a practical approach (E.L.V. Harris и S. Angal ред., IRL Press at Oxford University Press); и Handbook of Experimental Immunology, тт. I-IV (D.M. Weir и C.C. Blackwell ред., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Перед описанием настоящего изобретения более подробно следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной ДНК, полипептидом или последовательностями или параметрами процессов, которые, конечно, могут варьировать. Также следует понимать, что используемая в данной заявке терминология предназначена только для цели описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения. Следует отметить, что, как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа "любой" или "этот" включают ссылки на множественное число, если из содержания явно не следует иное. Так, например, ссылка на "любой антиген" включает в себя смесь двух или более антигенов, ссылка на "любой наполнитель" включает смеси двух или более наполнителей и т.п.

А. Определения.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют то же значение, как обычно это понимается специалистом в данной области техники, к которой относится это изобретение, на момент подачи заявки. Смысл и объем терминов должен быть ясен; однако в случае какой-либо скрытой двусмысленности, определения, представленные в данной заявке, главенствуют над любым словарем или внешним определением. Кроме того, если иное не предусмотрено контекстом, то особые условия должны включать множества, а множественные термины будут включать единственное число. При этом использование союза "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включающий", а также других форм, таких как "включает" и "включенный" не является ограничивающим. Все патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, являются введенными в данную заявку в качестве ссылки.

"Защита от болезни", "протективный иммунитет", "функциональный иммунитет" и подобные фразы означают ответ, направленный против заболевания или состояния, который вызывается путем введения одной или более терапевтических композиций в соответствии с изобретением, или их комбинации, что приводит к более сниженным вредным эффектам, чем можно было бы ожидать у неиммунизированного субъекта, который подвергся заболеванию или инфекции. То есть тяжесть вредных эффектов инфекции уменьшается у вакцинированного субъекта. Заражение может быть снижено, замедлено или, возможно, полностью предотвращено у вакцинированного субъекта. При этом, когда подразумевается полное предотвращение инфекции, то это специально указывается. Если полное предотвращение не указано, то термин включает в себя частичное предотвращение.

В данной заявке "снижение частоты возникновения заболевания и/или клинических признаков" или "снижение клинических симптомов" означает, но не ограничивается таковыми, уменьшение количества инфицированных субъектов в группе, уменьшение или устранение количества субъектов, которые проявляют клинические признаки инфекции, или уменьшение тяжести каких-либо клинических симптомов, которые присутствуют у одного или более субъектов, по сравнению с инфекцией дикого типа. Например, следует упомянуть любое снижение нагрузки патогена, выделения патогена, снижение передачи патогена или уменьшение любого клинического признака симптоматической инфекции PPV5B. Предпочтительно, когда эти клинические признаки снижаются у одного или более субъектов, получающих терапевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением, по крайней мере на 10% по сравнению с субъектами, не получающими композицию, и которые являются инфицированными. Более предпочтительно, когда клинические признаки уменьшаются у субъектов, получающих композицию в соответствии с настоящим изобретением, по крайней мере на 20%, предпочтительно по крайней мере на 30%, более предпочтительно по крайней мере на 40% и даже более предпочтительно по крайней мере на 50%.

Термин "повышенная защита" в данном документе означает, но не ограничивается таковыми, как значительное снижение одного или более клинических симптомов, которые связаны с инфицированием с помощью инфекционного агента, предпочтительно PPV5B, в группе вакцинированных субъектов против невакцинированной контрольной группы испытуемых. Термин "значительное снижение клинических симптомов" означает, но без ограничения таковым, частоту возникновения по крайней мере одного клинического симптома в группе вакцинированных субъектов, которая является по крайней мере на 10%, предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, еще более предпочтительно на 50% и даже более предпочтительно на 70% ниже, чем в невакцинированной контрольной группе после заражения инфекционным агентом.

"Длительная защита" относится к "улучшению эффективности", которая сохраняется в течение не менее 3 недель, но более предпочтительно по крайней мере 3 месяца, еще более предпочтительно по крайней мере 6 месяцев. У крупного рогатого скота наиболее предпочтительно, когда длительная защита будет сохраняться до достижения среднего возраста, при котором животные продаются на мясо.

"Иммуногенная или иммунологическая композиция" относится к композиции вещества, которая содержит по крайней мере один белок или полипептид PPV5B или его иммуногенную часть, которая вызывает у хозяина опосредованный клетками или антителами иммунный ответ на композицию. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция вызывает иммунный ответ и более предпочтительно обеспечивает протективный иммунитет в отношении одного или более из клинических признаков инфекции PPV5B.

Термин "иммуногенный" PPV5B полипептид или "антиген", используемый в данной заявке, относится к полипептиду или белку, который вызывает иммунный ответ, как описано в настоящем описании. "Иммуногенный" белок или полипептид PPV5B содержит полноразмерную последовательность любой из кодируемых последовательностей, указанных в настоящем документе, или их аналоги или их иммуногенные фрагменты. Термин "иммуногенный фрагмент" или "иммуногенная часть" относится к фрагменту или усеченной и/или замещенной форме аминокислотной последовательности PPV5B белка, которая включает один или более эпитопов и, таким образом, вызывает иммунный ответ, описанный в данной заявке. В общем случае, такие усеченные и/или замещенные формы или фрагменты будут содержать или кодировать по крайней мере 13 последовательных аминокислот из полноразмерного белка, например белка капсида. Более предпочтительно, когда усеченные или замещенные формы или фрагменты будут содержать по крайней мере 15, более предпочтительно по крайней мере 17 и еще более предпочтительно по крайней мере 20 и даже более предпочтительно 30 смежных аминокислот из полноразмерного белка, например белка капсида.

Термин "эпитоп" означает сегмент или фрагмент композиции вещества, например белка или полипептида, который распознается иммунной системой, в частности антителами, В-клетками или Т-клетками. В настоящем изобретении, как правило, эпитоп в общем случае представляет собой фрагмент или фрагменты полипептидной последовательности вирусного белка.

Такие фрагменты могут быть идентифицированы при использовании любой из ряда методик, которые используются для картирования эпитопов и которые являются хорошо известными в данной области техники. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, ред., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены с помощью одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, определения пептидов, соответствующих частям белковой молекулы и взаимодействия пептидов с антителами, в то время как пептиды все еще остаются присоединенными к подложкам. Такие методики известны и описаны в данной области техники, см., например, патент США № 4708871; Geysen и др. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; и Geysen и др. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. Аналогично, конформационные эпитопы легко идентифицируются с помощью определения пространственной конформации аминокислот, например, путем рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См., *Epitope Mapping Protocols*, как описано выше. Синтетические антигены также являются включенными в определение, например полиэпитопы, фланкирующие эпитопы и другие рекомбинантные или синтетические полученные антигены. См., например, Bergmann и др. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777-2781; Bergmann и др. (1996), *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. и Cell Biol.* 75:402-408; и Gardner и др., (1998) 12 всемирная конференция по СПИДу, Женева, Швейцария, 28 июля 1998 г. (раскрытие и содержание которых являются включенными в данную заявку в качестве ссылки).

"Иммунный ответ" или "иммунологический ответ" означает, но не ограничивается таковыми, развитие клеточного и/или опосредованного антителами иммунного ответа на композиции или вакцины, представляющие интерес. Как правило, иммунный или иммунологический ответ включает в себя, но не ограничивается таковыми, один или более из следующих эффектов: продукция или активация антител, В-клеток, Т-хелперов, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток непосредственно направлены на антиген или антигены, включенные в композиции или вакцины, представляющие интерес. Предпочтительно хозяин будет демонстрировать либо терапевтический, либо защитный иммунологический (иммунологическая память) ответ так, что сопротивление новой инфекции будет усиливаться и/или клиническая тяжесть заболевания будет снижаться. Такая защита будет демонстрироваться либо сокращением количества симптомов, тяжести симптомов, либо отсутствием одного или более симптомов, связанных с инфекцией патогеном, задержкой наступления вирусемии, снижением вирусной персистенции, снижением общей вирусной нагрузки и/или уменьшением экскреции вируса.

В данной заявке "специфически иммунореактивный" относится к иммунореактивному белку или полипептиду, который распознает антиген, характерный для PPV5B инфекции, но не реагирует с антигеном строгого иммуногенного контроля. Для того чтобы определить специфичность потенциального PPV5B иммунореактивного белка или полипептида или другого полипептида, можно использовать различные иммунологические анализы (ELISA, IFA, вестерн-блоттинг анализ) для исследования белка, направленного против сыворотки животного, содержащей генетически подобные вирусы. Белок будет также подвергаться анализу в различных иммунологических анализах против материала, содержащего белки, связанные со способом экспрессии (бакуловирус, клетки Sf9 и т.д.).

Как используется в данной заявке, термин "фармацевтический или ветеринарно приемлемый носитель" или "наполнитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, адью-

ванты, стабилизирующие агенты, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты, замедляющие адсорбцию, и подобные им. В некоторых предпочтительных вариантах реализации и особенно в тех, которые включают лиофилизированные иммуногенные композиции, стабилизирующие агенты для использования в настоящем изобретении, включают стабилизаторы для лиофилизации или сушки вымораживанием.

В некоторых воплощениях иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит адъювант. "Адъюванты", как используется в данной заявке, могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию вода-в-масле, масло-в-воде, вода-в-масле-в-воде. Эмульсия может основываться, в частности, на легком вазелиновом масле (в соответствии с европейской фармакопеей); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном в результате олигомеризации алкенов, в частности изобутена или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, в частности растительное масло, этилолеат, пропиленгликоль ди-(каприлат/капрат), глицерил три-(каприлат/капрат) или пропиленгликоль диолеат; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности сложных эфирах изостеариновой кислоты. Масло используют в комбинации с эмульгаторами с образованием эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности сложные эфиры сорбитана, маннита (например, олеат ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блоки сополимера полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности продукты Pluronic, в частности L121. См. Hunter и др., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D.E.S.), John Wiley and Sons, NY, стр. 51-94 (1995) и Todd и др., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Типичные адъюванты представляют собой SPT эмульсию, описанную на стр. 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под ред. M. Powell и M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсию MF59, описанную на стр. 183 этого же источника.

Еще одним примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильных производных. Предпочтительные адъювантные соединения представляют собой полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые являются перекрестно связанными, в частности, с полиалкениловыми этерами сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения являются известными под термином карбомер (Фармакопея т. 8, № 2, июнь 1996 г.). Специалисты в данной области техники могут также сослаться на патент США № 2909462, который описывает такие акриловые полимеры, перекрестно-сшитые с полигидроксильрованным соединением, имеющим по крайней мере, 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, при этом атомы водорода по крайней мере трех гидроксильных групп заменяются ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по крайней мере 2 атома углерода.

Предпочтительные радикалы представляют собой такие, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например винилы, аллилы и другие этилен-ненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы сами по себе могут содержать другие заместители, такие как метил. Продукты, которые продаются под названием Carbopol (BF Goodrich, штат Огайо, США), являются особенно приемлемыми. Они являются перекрестно-сшитыми с аллилсахарозой или пентаэритритолом. Среди них могут быть упомянуты Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является использование Carbopol 971P. Среди сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила следует упомянуть сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к получению кислотного раствора, который будет нейтрализован предпочтительно до физиологического значения pH, для того, чтобы ввести раствор адъювантов, в который будет включена иммуногенная или иммунологическая вакцина.

Другие подходящие вспомогательные вещества представляют собой, но не ограничиваются такими, адъювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блок-сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, адъювант Avridine на основе липид-амин, термолабильный энтеротоксин из E.coli (рекомбинантный или иной), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид, либо природные, либо рекомбинантные цитокинины или их аналоги или стимуляторы высвобождения эндогенных цитокинов среди прочих.

Ожидается, что адъювант может быть добавлен в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве от примерно 500 мкг до примерно 5 мг на дозу, более предпочтительно в количестве от примерно 750 мкг до примерно 2,5 мг на дозу, а большинство предпочтительно в количестве приблизительно 1 мг на дозу. Кроме того, адъювант может находиться в концентрации приблизительно от 0,01 до 50%, предпочтительно в концентрации приблизительно от 2 до 30%, более предпочтительно в концентрации приблизительно от 5 до 25%, еще более предпочтительно в концентрации приблизительно от 7 до 22% и наиболее предпочтительно в концентрации от 10 до 20% от объема конечного продукта.

"Разбавители" могут включать воду, солевой раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Изотонические агенты могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу среди прочих. Стаби-

лизаторы включают альбумин и щелочные соли этилендиаминтетрауксусной кислоты среди прочих.

"Изолированный" означает "измененный рукой человека" по сравнению с его естественным состоянием, т.е. если это происходит в природе, то он был изменен или удален из своей первоначальной окружающей среды или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, который естественным образом присутствует в живом организме не является "изолированным", но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от сосуществующих с ним материалов в его естественном состоянии, является "изолированным" в том значении, как этот термин используется в данном документе.

"Безопасность" относится к отсутствию побочных эффектов у вакцинированных животных после вакцинации, в том числе, но не ограничиваясь таковыми, потенциальное превращение живой вирусной вакцины в вирулентную, клинически значимые побочные эффекты, такие как стойкие, системные болезни или неприемлемое воспаление в сайте введения вакцины.

Термины "вакцинация" или "вакцинирующий" или их варианты, как они используются в данной заявке, означают, но не ограничиваются такими, как процесс, который включает в себя введение иммуногенной композиции в соответствии с изобретением, которая при введении в организм животного вызывает или может вызывать - непосредственно или опосредовано - иммунный ответ у животного против PPV5B.

"Смертность" в контексте настоящего изобретения относится к смерти, вызванной инфекцией PPV5B и/или сопутствующими инфекциями другими организмами, которые усиливаются PPV5B инфекцией, и включает ситуацию, когда инфекция является настолько тяжелой, что животное подвергают эвтаназии, чтобы предотвратить страдания и обеспечить гуманное окончание его жизни.

"Аттенуирование" означает снижение вирулентности возбудителя. В настоящем изобретении "аттенуирование" является синонимом "авирулентности." В настоящем изобретении аттенуированный вирус представляет собой такой, в котором вирулентность была уменьшена так, что он не вызывает клинических признаков инфекции PPV5B, но способен индуцировать иммунный ответ у целевого млекопитающего, а также может означать, что клинические признаки снижаются в отношении частоты возникновения заболевания или тяжести у животных, зараженных ослабленным PPV5B, по сравнению с "контрольной группой" животных, инфицированных с помощью неаттенуированного PPV5B, и тех, которые не получают аттенуированный вирус. В этом контексте термин "снижение/сниженный" означает уменьшение по крайней мере на 10%, предпочтительно на 25%, еще более предпочтительно на 50%, еще более предпочтительно на 60%, даже более предпочтительно на 70%, еще более предпочтительно на 80%, еще более предпочтительно на 90% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с контрольной группой, как определено выше. Таким образом, аттенуированный авирулентный штамм PPV5B представляет собой такой, который является приемлемым для включения в состав иммуногенной композиции, содержащей модифицированный живой вирус PPV5B.

"Убитый" или "инактивированный" означает обработанный с помощью физического или химического агента, который приводит к тому, что вирус PPV5B становится мертвым и/или иным неспособным к размножению. PPV5B может быть убит с помощью обычных средств, таких как, например, воздействие тепла, радиации или псоралена в присутствии ультрафиолетового света. PPV5B можно инактивировать с помощью обычных средств, таких как, например, с помощью химической инактивации с использованием одного или более химических агентов для инактивации, включая, но не ограничиваясь таковыми, один или более из бинарного этиленмина (BEI), пропиолактона, формалина, глутаральдегида и/или додецилсульфата натрия. Способы ослабления вирулентных штаммов этих вирусов и способы получения инактивированного вирусного препарата являются известными в данной области и описаны, например, в патентах США №№ 4567042 и 4567043. Антигены из PPV5B для использования в вакцинных композициях в соответствии с настоящим изобретением могут, таким образом, быть в виде цельного вируса, который представляет собой модифицированный и/или аттенуированный живой вирусный препарат, или убитый, или инактивированный вирусный препарат среди прочих.

Термин "антитела", как используется в данной заявке, включает в себя анти-PPV5B антитела, например моноклональные и поликлональные антитела, одноцепочечные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, свиньи и CDR-привитые антитела, в том числе соединения, которые включают CDR последовательности, которые специфически распознают полипептид PPV5B в соответствии с изобретением. Термин "специфические для" указывает на то, что вариабельные области антител в соответствии с изобретением узнают и связывают исключительно PPV5B полипептид (т.е. являются в состоянии отличить единственный PPV5B полипептид от родственных полипептидов, несмотря на идентичность последовательностей, гомологию или сходство, которое обнаруживается в семействе полипептидов), и которые могут (не обязательно) взаимодействовать с другими белками (например, белком A S. aureus или другими стафилококковыми антителами в методах ELISA) посредством взаимодействия с последовательностями за пределами вариабельного участка антител и, в частности, в константном участке молекулы антитела. Анализ скрининга для определения специфичности связывания антитела в соответствии с изобретением являются хорошо известными и обычно практикуется в данной области техники. Для всестороннего обсуждения таких анализов см. Harlow и др. (ред.), Antibodies A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), гл. 6. Антитела, которые

распознают и связывают фрагменты PPV5B полипептидов в соответствии с настоящим изобретением, также рассматриваются при условии, что антитела являются, в первую очередь, специфичными для PPV5B полипептида в соответствии с изобретением, как определено выше, из которого этот фрагмент получен. Для целей ясности следует уточнить, что "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, которая может связываться со специфическим антигеном в результате иммунного ответа на этот антиген. Иммуноглобулины представляют собой сывороточные белки, состоящие из "легких" и "тяжелых" полипептидных цепей, имеющих "константные" и "вариабельные" участки и делятся на классы (например, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) на основе состава константного участка. Антитела могут существовать в различных формах, включая такие формы, как Fv, Fab', F(ab')₂, а также в виде одиночных цепей, и включают синтетические полипептиды, которые содержат все или часть одной или более полипептидных последовательностей одиночной цепи антитела.

В данной заявке "эффективная доза" означает, но не ограничивается таковыми, как количество антигена, которое вызывает или способно вызывать иммунный ответ, который обеспечивает уменьшение клинических симптомов у животного, которому вводят антиген.

Как используется в данной заявке, термин "эффективное количество" означает в контексте композиции количество иммуногенной композиции, способной индуцировать иммунный ответ, который уменьшает частоту или тяжесть инфекции, или частоту возникновения заболевания у животного. В частности, эффективное количество препарата живого аттенуированного вируса, как измеряется количеством бляшкообразующих единиц (БОЕ) на дозу или в эквивалентной мере, подвергается мониторингу при использовании средней инфекционной дозы культуры ткани (TCID₅₀), т.е. количества патогенного агента, который будет вызывать патологические изменения в 50% инокулированных и чувствительных клеток культуры. Для убитой вакцины или антигенной субъединицы эффективное количество относится к относительному содержанию антигена (RAC), т.е. к уровню включения антигена на эффективную дозу. Кроме того, в контексте терапии термин "эффективное количество" относится к количеству терапии, которое является достаточным для того, чтобы снизить или ослабить тяжесть или продолжительность заболевания или расстройства или их одного или более симптомов, предотвратить развитие заболевания или расстройства, вызвать регрессию заболевания или расстройства, предотвратить рецидив, развитие, начало или прогрессирование одного или более симптомов, связанных с заболеванием или расстройством, или усиливать, или улучшить профилактику или лечение другой терапии или терапевтического агента.

"Идентичность последовательности", как это является известным в данной области техники, относится к отношениям между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, в частности референтной последовательности и заданной последовательности, для того, чтобы сравнить ее с референтной последовательностью. Идентичность последовательности определяется посредством сравнения данной последовательности и референтной последовательности после того, как последовательности были оптимально выровнены для получения самой высокой степени сходства последовательности, как определяется путем сравнения цепочек таких последовательностей, при использовании пробелов, введенных в случае необходимости. После такого выравнивания идентичность последовательности определяется на основе положение-к-положению, например, последовательности являются "идентичными" в определенном положении, если в этом положении нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. Общее количество таких идентичных положений затем делится на общее число нуклеотидов или остатков в референтной последовательности, чтобы получить % идентичности последовательности. Идентичность последовательностей может быть легко вычислена с помощью известных способов, включая, но не ограничиваясь таковыми, как те, что описаны в Computational Molecular Biology, Lesk, A.N., ред., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ред., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, часть I, Griffin, A.M., и Griffin, H.G., ред., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. и Devereux, J., ред., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., и Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988); раскрытие которых является введенным в данную заявку в качестве ссылки.

Предпочтительные способы определения идентичности последовательностей разработаны для того, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей кодифицированы в общедоступных компьютерных программах, определяющих идентичность между данными последовательностями. Примеры таких программ включают, но не ограничиваются таковыми, пакет программ GCG (Devereux, J., и др., Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и BLASTX (Altschul, S.F. и др., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). Программа BLASTX является доступной от NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. и др., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S.F. и др., J. Biol Molec, 215:..... 403-410 (1990)), содержание которых является включенным в настоящее описание в качестве ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности при использовании штрафов за открытие гэпа по умолчанию для того, чтобы получить самый высокий уровень идентичности при сравнении рассматриваемой и референтной последовательностей. В качестве иллюстрации под полинуклеотидом, который имеет по-

следовательность нуклеотидов, являющуюся по крайней мере например на 85%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% идентичной с референтной нуклеотидной последовательностью, понимают тот факт, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида является идентичной референтной последовательности за исключением того, что данная полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов референтной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде с последовательностью нуклеотидов, имеющей по крайней мере 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности по сравнению с референтной нуклеотидной последовательностью, вплоть до 15%, предпочтительно 10%, даже более предпочтительно 5% нуклеотидов в референтной последовательности может быть удалено или заменено другим нуклеотидом или несколькими нуклеотидами или вплоть до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% от общего объема нуклеотидов в референтной последовательности может быть встроено в референтную последовательность. Эти мутации референтной последовательности могут иметь место в 5' или 3' концевых положениях референтной нуклеотидной последовательности или где-нибудь между этими концевыми положениями, при этом они могут перемежаться либо индивидуально среди нуклеотидов в референтной последовательности, либо в одной или более смежных группах референтной последовательности. Аналогично, под полипептидом, характеризующимся заданной аминокислотной последовательностью, имеющим по крайней мере например 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности по отношению к референтной аминокислотной последовательности, понимают тот факт, что данная аминокислотная последовательность полипептида является идентичной референтной последовательности за исключением того, что данная последовательность полипептида может включать в себя вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот референтной аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения данной полипептидной последовательности, которая имеет по крайней мере 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности последовательности с референтной аминокислотной последовательностью вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% остатков аминокислот в референтной последовательности может быть удалено или замещено другой аминокислотой или количество аминокислот вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в референтной последовательности может быть встроено в референтную последовательность. Эти изменения референтной последовательности могут иметь место в аминокислотных терминальных положениях референтной аминокислотной последовательности, перемежаясь либо индивидуально между остатками в референтной последовательности, либо в одной или более смежных групп в пределах референтной последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Тем не менее, консервативные замены не включены как совпадения при определении идентичности последовательности.

"Гомология последовательности", как используется в данной заявке, относится к способу определения родства двух последовательностей. Для того чтобы определить гомологию последовательности две или более последовательности подвергаются оптимальному выравниванию, и, при необходимости, вводятся пробелы. Тем не менее, в отличие от "идентичности последовательности", консервативные замены аминокислот, также считаются как совпадения при определении гомологии последовательности. Другими словами, для получения полипептида, имеющего 95% гомологии последовательности с референтной последовательностью 85%, предпочтительно 90%, даже более предпочтительно 95% остатков аминокислот в референтной последовательности должны совпадать или содержат консервативную замену другой аминокислотой, или количество аминокислот вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков, в том числе неконсервативных замен, в референтной последовательности может быть встроено в референтную последовательность. Предпочтительно гомологичная последовательность включает, по крайней мере, участок из 50, даже более предпочтительно из 100, даже более предпочтительно из 250, даже более предпочтительно из 500 нуклеотидов, кодирующих гомологичные аминокислоты.

Термин "консервативная замена" относится к замене аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток, который имеет аналогичные характеристики или свойства, включая размер, гидрофобность и т.д., таким образом, что общая функциональность существенно не изменяется. Это также может означать нуклеотидную замену, которая приводит к консервативной аминокислотной замене.

В. Молекулы носителя.

Молекулы носителя, с которыми могут быть конъюгированы или ковалентно связаны PPV5B белки или пептиды в соответствии с изобретением, предпочтительно представляют собой те, которые описаны выше.

Предпочтительные носители для использования у животных представляют собой бычий сывороточный альбумин и гемоцианин лимфы улитки. Предпочтительно, когда сам белок носителя представляет собой иммуноген.

PPV5B белки или пептиды в соответствии с изобретением могут быть ковалентно связаны с носи-

телем любым удобным способом, известным в данной области техники. Несмотря на то, что использование симметричного линкера, такого как дигидразид адипиновой кислоты, как описано Schneerson и др., *J. Experimental Medicine*, 152, 361-376 (1980), или гетеробифункционального линкера, такого как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, как описано Fattom и др., *Infection and Immunity*, 56, 2292-2298 (1988), находится в пределах объема настоящего изобретения, является предпочтительным избежать использования какого-либо линкера, но вместо этого соединять PPV5B пептид в соответствии с изобретением непосредственно с молекулой носителя. Такое соединение может быть получено посредством восстановительного аминирования, как описано Landi и др., *J. Immunology*, 127, 1011-1019 (1981).

Размер иммуногенной композиции, как определяется средним молекулярным весом, является переменной величиной и зависит от выбранного(ых) PPV5B белка(ов) или пептида(ов) и способа слияния PPV5B белка(ов) или пептида(ов) с носителем. Таким образом, он может быть таким малым, как 1000 Да (10^3) или большим чем 10^6 Да. При использовании способа слияния путем восстановительного аминирования молекулярная масса PPV5B белка(ов) или пептида(ов), как правило, находится в диапазоне от 5000 до 500000 Да или более; например, для капсидного белка последовательности SEQ ID NO: 4, молекулярная масса, как ожидается, составит примерно 101000 Да, что, как предполагают, обеспечивает образование вирусоподобных частиц (VLP), состоящих из 60 мономерных белков.

Молекулы носителя, т.е. пептиды, их производные и аналоги, а также пептидные миметики, которые специфически связываются с белком PPV5B или пептидом в соответствии с изобретением, могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь таковыми, как твердофазный синтез или при использовании раствора (Nakanishi и др., 1993, *Gene* 137: 51-56; Merrifield, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 15: 2149-2154; Neurath, H. и др., ред., *The Proteins*, т. II, 3 ред., стр. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976), указанные источники являются введенными в данное описание в качестве ссылки).

PPV5B белки или пептиды в соответствии с изобретением, или антитела, или их связывающие части в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены при использовании инъеклируемых дозированных форм в виде раствора или суспензии в разбавителе с фармацевтическим или ветеринарным носителем.

Безопасность и эффективность таких молекул определяется с помощью стандартных процедур на клеточных культурах или на экспериментальных животных, как описано и регулируется Центром ветеринарной медицины (CVB). Токсичность и терапевтическая эффективность таких молекул может быть определена с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD_{50} (дозы, которая является летальной для 50% популяции).

Вакцины в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой поливалентные или одновалентные. Поливалентные вакцины получают путем иммуноконъюгации множественных белков или пептидов PPV5B с молекулой носителя.

В одном из аспектов белок или пептидные композиции PPV5B содержат эффективное иммунизирующее количество иммуногенного конъюгата предпочтительно в комбинации с иммуностимулятором и физиологически приемлемый носитель. Как используется в данном контексте, "иммуностимулятор" охватывает любое соединение или композицию, которая обладает способностью усиливать активность иммунной системы, будь-то специфический эффект потенцирования в комбинации со специфическим антигеном, или просто независимое влияние на активность одного или более элементов иммунного ответа. Иммуностимуляторные соединения включают, но не ограничиваются таковыми, как минеральные гели, например гидроксид алюминия; поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы Pluronic; полианионы; пептиды; масляные эмульсии; квасцы и MDP. Способы с использованием этих материалов являются хорошо известными в данной области техники, и в пределах компетенции специалиста в данной области является определить оптимальное количество стимулятора для данной вакцины. В данной композиции может использоваться более чем один иммуностимулятор. Иммуноген может также быть включен в липосомы или конъюгирован с полисахаридами и/или другими полимерами для использования в композиции вакцины.

Композиции, если это является желательным, могут быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, содержать металлическую или пластиковую упаковку, такую как блистерная упаковка. Упаковка или устройство дозатора может сопровождаться инструкциями в отношении введения, предпочтительно для введения млекопитающему, в частности, свинье.

С. Адьюванты.

Для дополнительного повышения иммуногенности иммуногенные композиции, которые обеспечиваются в данной заявке и которые содержат один или более PPV5B белков или пептидов, могут также содержать один или более адьювантов.

Адьювант может быть очищен с помощью любого из способов, описанных ранее или известных в данной области техники. Предпочтительным способом очистки является хроматография на силикагеле, в частности "флэш" (быстрый) хроматографический способ, как описано W. Clark и др., *J. Organic Chemis-*

ту, 43, 2923-2925 (1978). Тем не менее, другие хроматографические способы, в том числе ВЭЖХ, могут быть использованы для очистки адьюванта. Кристаллизация также может использоваться для очистки адьюванта. В некоторых случаях никакой очистки не требуется, поскольку продукт с аналитической степенью чистоты получают непосредственно путем синтеза.

Вакцинные композиции в соответствии с настоящим изобретением получают путем физического смешивания адьюванта с PPV5B белком(ами) или пептидом(ами) в соответствующих стерильных условиях в соответствии с известными методами для получения композиции с адьювантом. Комплексообразование PPV5B белка(ов) или пептида(ов) и адьюванта облегчается наличием суммарного отрицательного заряда на конъюгате, который электростатически притягивается к положительному заряду, присутствующему на длинноцепочечных алкильных соединениях адьюванта.

D. Физиологически приемлемые носители.

Вакцинные композиции в соответствии с данным изобретением могут быть приготовлены с использованием способов, аналогичных тем, которые используются для других фармацевтических полипептидных композиций. Таким образом, адьювант и PPV5B белок(белки) или пептид(ы), предпочтительно конъюгированный(е) с молекулой носителя и/или смешанный(е) с адьювантом, могут храниться в лиофилизированной форме и могут восстанавливаться в физиологически приемлемом носителе с образованием суспензии перед введением. Кроме того, конъюгат и адьювант могут храниться в носителе. Предпочтительные носители представляют собой стерильные растворы, в частности стерильные буферные растворы, такие как фосфатно-солевой буфер. Любой способ сочетания адьюванта и конъюгата в носителе, таким образом, что улучшается иммунологическая эффективность иммуногенной композиции, является приемлемым.

Объем единичной дозы вакцины в соответствии с данным изобретением может варьировать, но будет в общем случае находиться в пределах диапазонов, которые обычно используются в обычных вакцинах. Объем единичной дозы предпочтительно составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 3 мл, предпочтительно от приблизительно 0,2 до 1,5 мл, более предпочтительно приблизительно 1,0 мл при концентрации конъюгата и адьюванта, указанных выше.

Вакцинные композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены с помощью любого удобного средства.

E. Композиция.

Иммуногенные конъюгаты, включающие PPV5B белок(белки) или пептид(ы), слитый(е) с молекулой носителя, могут быть использованы в качестве вакцины для иммунизации против одного или более серотипов PPV5B. Вакцины, содержащие иммуногенный конъюгат в физиологически приемлемом носителе, являются пригодными в способе иммунизации животных, предпочтительно свиней, для лечения или профилактики инфекций, вызванных PPV5B.

Антитела, полученные против иммуногенных конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением путем иммунизации при использовании иммуногенного конъюгата, могут быть использованы в пассивной иммунотерапии и для получения антиидиотипических антител для лечения или профилактики инфекции PPV5B.

Субъект, которому вводится композиция, предпочтительно представляет собой животных, в том числе, но не ограничиваясь таковыми, как коровы, лошади, овцы, свиньи, домашняя птица (например, куры), козы, кошки, собаки, хомяки, мыши и крысы; наиболее предпочтительными являются свиньи.

Композиции в соответствии с изобретением содержат эффективное иммунизирующее количество одной или более иммуногенных композиций или антитела к ним и физиологически приемлемый носитель. Вакцины содержат эффективное иммунизирующее количество одной или более иммуногенных композиций и физиологически приемлемый носитель. Композиция должна быть приемлемой для способа введения.

Иммуногенная композиция, если это является желательным, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH буферирующих агентов. Иммуногенная композиция может представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетки, пилюли, капсулы, композицию замедленного высвобождения или порошок. Пероральные препараты могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.п.

F. Эффективная доза.

Соединения, описанные в данной заявке, могут быть введены субъекту в терапевтически эффективных дозах для лечения ассоциированных с PPV5B заболеваний. Дозировка будет зависеть от хозяина, который получает вакцину, а также от таких факторов, как размер, вес и возраст хозяина.

Точное количество иммуногенного конъюгата или антитела в соответствии с изобретением, которое используется в композиции, будет зависеть от пути введения и природы субъекта (например, вид, возраст, размер, стадия/уровень развития заболевания), и этот вопрос должен быть решен в соответствии с заключением лечащего врача и обстоятельствами для каждого субъекта в соответствии со стандартными клиническими методиками. Эффективное иммунизирующее количество представляет собой количество, достаточное для лечения или профилактики PPV5B инфекционного заболевания у субъекта. Эффектив-

ные дозы могут также быть выведены из кривых зависимости ответа от дозы, полученных из тест-систем для животных моделей, и могут изменяться от 0,1 до 20 мг/кг, предпочтительно от 1 до 10 мг/кг.

Иммуногенность композиции может быть определена с помощью мониторинга иммунного ответа исследуемых субъектов после иммунизации при использовании композиции с помощью любого иммуноанализа, известного в данной области техники. Получение гуморального (антитела) ответа и/или опосредованного клетками иммунитета может быть принято в качестве показателя иммунного ответа. Исследуемые субъекты могут включать в себя животных, таких как свиньи, мыши, хомяки, собаки, кошки, кролики, коровы, лошади, овцы и птицы (например, куры, утки, гуси, индюки).

Иммунный ответ исследуемых субъектов может быть проанализирован с помощью различных подходов, таких как: реактивность полученной иммунной сыворотки по отношению к иммуногенному конъюгату, как оценивается с помощью известных методов, например твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммуноблоттинга, иммунопреципитации и т.д.; или путем защиты иммунизированных хозяев от инфекции патогеном и/или ослабления симптомов, вызванных инфекцией патогеном, у иммунизированных хозяев, как определяется в соответствии с любым из способов, известных в данной области техники для количественной оценки уровня агента инфекционного заболевания, например количественной ПЦР, выделения вируса или другого способа, известного в данной области техники. Уровни агента инфекционного заболевания также могут быть определены путем измерения уровней антигена, против которого направлен иммуноглобулин. Снижение уровней агента инфекционного заболевания или облегчение симптомов инфекционной болезни показывает, что композиция является эффективной.

Терапевтические средства в соответствии с изобретением могут быть проанализированы *in vitro* на желаемую терапевтическую или профилактическую активность перед использованием в условиях *in vivo* у животных. Например, анализы *in vitro*, которые могут использоваться для того, чтобы определить, является ли показанным введение конкретного терапевтического агента, включают анализы *in vitro* в культуре клеток, в которых соответствующие клетки из клеточной линии или культивируемые клетки субъекта, имеющего конкретное заболевание или расстройство, подвергаются воздействию или иным образом вводятся терапевтически, и наблюдается эффект терапевтического агента на клетки.

Альтернативно, терапевтический агент может быть определен путем контактирования терапевтического агента с клетками (либо поученных от субъекта, либо клеток культивируемой линии), которые являются восприимчивыми к инфекции, вызванной агентом инфекционного заболевания, и последующего определения, является ли показатель инфекции клеток, контактировавших с терапевтическим агентом, ниже, чем показатель инфекции клеток, не контактировавших с терапевтическим агентом. Заражение клеток агентом инфекционного заболевания может быть определено с помощью любого способа, известного в данной области техники.

Кроме того, терапевтический агент может быть оценен путем измерения уровня молекулы, против которой направлено антитело, у субъекта в модели животного при приемлемых интервалах времени до, во время или после лечения. Любое изменение или отсутствие изменений в количестве молекулы может быть идентифицировано и коррелирует с эффектом лечения субъекта. Уровень молекулы может быть определен любым способом, известным в данной области техники.

После вакцинации животного против PPV5B при использовании способов и композиций в соответствии с настоящим изобретением для оценки связывания полученного антитела и конкретной молекулы может быть использован любой анализ связывания, известный в данной области техники. Такие анализы могут быть также проведены для отбора антител, которые проявляют более высокое сродство или специфичность в отношении конкретного антигена.

G. Определение и диагностические способы.

Антитела или их связывающие части, полученные в результате применения нативного PPV5B, аттенуированных вирусов, белков или пептидов в соответствии с настоящим изобретением, могут использоваться для обнаружения в образце присутствия PPV5B. Этот способ обнаружения включает следующие этапы: обеспечение изолированного антитела или его связывающих частей, образовавшихся против нативного PPV5B, аттенуированного вируса, белка или пептида в соответствии с изобретением, прибавление к изолированному антителу или его связывающим частям образца, предположительно содержащего некоторое количество вируса PPV5B, и обнаружение присутствия комплекса, содержащего изолированное антитело или его связывающие части, связанного с вирусом PPV5B.

Антитела или их связывающие части в соответствии с настоящим изобретением также являются полезными для обнаружения в образце наличия белка или пептида PPV5B. Этот способ обнаружения включает следующие этапы: обеспечение изолированного антитела или его связывающих частей, индуцированных против нативного PPV5B, ослабленного вируса, белка или пептида, прибавление к изолированному антителу или его связывающей части образца, предположительно содержащего некоторое количество белка или пептида PPV5B, и обнаружение присутствия комплекса, содержащего выделенное антитело или его связывающие части, связанного с белком или пептидом PPV5B.

Иммуноглобулины, в частности антитела (и функционально активные фрагменты), которые связываются со специфической молекулой, которая является членом связывающей пары, могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических агентов, как описано в данной заявке. В различ-

ных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает измерение члена пары связывания и использование таких измерений в клинической практике.

Иммуноглобулины в соответствии с настоящим изобретением могут использоваться, например, при обнаружении антигена в биологическом образце, посредством чего субъекты могут подвергаться анализу на aberrантные уровни молекулы, с которой связывается иммуноглобулин, и/или на присутствие аномальных форм таких молекул. Под термином "аномальный уровень" подразумевается увеличенное или уменьшенное по сравнению с присутствующим или стандартным уровнем, который присутствует в аналогичном образце из субъекта или из части тела субъекта, не имеющего этого заболевания. Антитела в соответствии с данным изобретением могут быть также включены в качестве реагента в виде набора для применения в диагностической или прогностической методике.

В одном аспекте антитело в соответствии с изобретением, которое иммуноспецифически связывается с PPV5B нативного или аттенуированного вируса, белком или пептидом, может использоваться для диагностики, прогнозирования или скрининга на PPV5B инфекцию.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики или скрининга на наличие PPV5B инфекции или иммунитета к ней, включающему измерение у субъекта уровня иммуноспецифического связывания антитела с образцом, полученным от субъекта, у которого антитело иммуноспецифически связывает белок или пептид PPV5B, в котором увеличение уровня связывания указанного иммуноспецифического связывания по отношению к уровню иммуноспецифического связывания в аналогичном образце от субъекта, не имеющего агента инфекционного заболевания, указывает на наличие PPV5B.

Примеры подходящих анализов для обнаружения присутствия пептидов или антагонистов PPV5B включают, но не ограничиваются таковыми, как ELISA, радиоиммуноанализ, анализ на основе геледиффузионной реакции преципитации, иммунодиффузия, анализ агглютинации, реакция флуоресцентного иммуноанализа, иммуноанализ на основе белка А или иммуноэлектрофоретический анализ.

Иммуноанализы для конкретной молекулы будут типично включать инкубацию образца, такого как биологическая жидкость, экстракт ткани, свежесобранные клетки или лизаты культивируемых клеток, в присутствии антитела с меткой и обнаружение связанного антитела с помощью любого из ряда способов, хорошо известных в данной области техники.

Связывающая активность данного антитела может быть определена в соответствии с хорошо известными способами. Специалисты в данной области техники смогут определить рабочие и оптимальные условия анализа для каждого определения с использованием обычного экспериментирования.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к диагностическим наборам для обнаружения или измерения PPV5B. Обеспечиваются наборы для диагностики, которые содержат в одном или более контейнерах антитела против PPV5B и, необязательно, меченый партнер связывания для антитела. Кроме того, антитела против PPV5B могут подвергаться мечению (со способным к выявлению маркером, например хемилюминесцентным, ферментативным, флуоресцентным или радиоактивным фрагментом). Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает диагностический набор, включающий анти-PPV5B антитела и контрольный иммуноглобулин. В конкретном варианте осуществления одно из указанных выше соединений контейнера можно пометить с помощью способной к обнаружению метки. Комплект может дополнительно содержать в контейнере предварительно определенное количество вируса, белка или пептида PPV5B, распознаваемого антителом набора, для использования в качестве стандарта или контроля.

Н. Введение субъекту.

Способы введения включают, но не ограничиваются таковыми, как интраназальное, пероральное (например, в питьевой воде), внутрикожное и внутримышечное введение. Внутримышечное введение является особенно предпочтительным. Специалисту в данной области техники будет понятно, что композиции в соответствии с изобретением могут также быть введены в виде одной, двух или более доз, а также при использовании других путей введения. Например, такие способы включают также подкожное, внутрикожное, внутривенное, интраваскулярное, внутриартериальное, интраперитонеальное, интраклеточное, интритрахеальное, внутрисердечное, интралобулярное, интрамедуллярное, внутрилегочное и интравагинальное введение. В зависимости от желаемой продолжительности и эффективности лечения композиции в соответствии с изобретением могут быть введены один или несколько раз, а также периодически, например на ежедневной основе в течение нескольких дней, недель или месяцев и в разных дозировках.

Следующие ниже примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятным, что способы, раскрытые в примерах, представляют собой методы, раскрытые изобретателями для нормального осуществления настоящего изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы его практического применения. Тем не менее, специалистам в данной области техники должно быть очевидным в свете настоящего описания, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных вариантах, которые раскрыты, и при этом также удастся получить похожий или аналогичный результат без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

Данная заявка является связанной с заявкой, поданной 17 декабря 2012 г. под названием "Парвовирус свиней 5А, способы применения и вакцины," регистрационный номер 61/738110, содержание которой является включенным в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте.

Примеры

Материалы и методы.

Источник материалов. Гомогенаты ткани от трех свиней были получены в результате нестандартной вспышки заболевания. Клиническая история на ферме представляла собой свиней весом 200 фунтов с мышечным тремором всего тела, который присутствовал в состоянии покоя, но усиливался во время движения.

После тщательного исследования в ветеринарной диагностической лаборатории, которая предположила наличие вирусного агента (на основе микроскопических повреждений), но приводила только к идентификации агента X (неклассическая чума свиней, ассоциированная с пестивирусом), образцы были предоставлены изобретателям, чтобы помочь определить основную причину симптомов со стороны ЦНС у этих животных.

Анализ ДНК и белка. Анализ ДНК образцов, полученных от заболевших свиней, был проведен при использовании высокоэффективного секвенирования от 454 Life Sciences (Branford CT) ("454 технология"), которое осуществляли при использовании Operon (Huntsville AL). Образцы были обогащены вирусными последовательностями благодаря обработке нуклеазой защищенных нуклеиновых кислот вирусной частицы с последующей экстракцией, случайной амплификацией и высокоэффективным секвенированием; которые осуществляли так, как описано у Victoria и др. PLoS pathogen 2008 Sep 26;4(9): e1000163.

Полученные последовательности изначально характеризовали при использовании BLASTX анализа как девергентные члены семейства Parvoviridae. Последовательности собирали с использованием программного обеспечения Sequencher, и результаты этих анализов ДНК сочетали с нацеленным секвенированием, что обеспечивало получение последовательности ДНК SEQ ID NO: 1, которая представляла собой путативную полную кодирующую последовательность вируса, который обозначается как PPV5B. Дальнейший анализ последовательности ДНК при использовании программного обеспечения Sequencher приводил к идентификации трех путативных кодирующих участков, соответствующих тем, которые встречаются у других видов парвовируса, включая вирусную репликазу (SEQ ID NO: 2), открытую рамку считывания "ORF3" (SEQ ID NO: 3) и белок вирусного капсида (SEQ ID NO: 4).

Пример 1. Идентификация нового вируса.

Последовательности ДНК были определены с помощью 454 технологии (вирусная метагеномика) в образцах гомогенатов легких двух неродственных свиней из различных штатов. BLASTN и BLASTX анализ показал тесную идентичность с парвовирусом свиней 4, максимум 67% идентичности нуклеотидов в консервативных участках гена репликазы (REP), в то время как кодирующие участки капсида (CAP) не проявляли заметного совпадения на уровне нуклеотидов.

На уровне белка определяли, что белок путативной репликазы продемонстрировал ~60% идентичности аминокислот, а капсидный белок показал ~50% идентичности.

Вирус был определен в качестве нового вида, парвовируса свиней (PPV5B).

Специфические праймеры были разработаны на основе кодирующей последовательности капсида и скрининга гомогенатов на основе ПЦР, которые были подобными в отношении тканевых и патологических/клинических характеристик, что выявило присутствие агента в ~16% образцов. На основании проведенных клинических симптомов и вирусологических данных, ассоциированных с тканями, которые подвергали скринингу, наблюдали статистически значимую связь с некоторыми другими вирусными агентами и клинической патологией/гистопатологией.

Пример 2. Идентификация PPV5B в качестве нового парвовируса и филогенетический анализ.

Попарная идентичность аминокислот как для путативной репликазы (REP), так и белков капсида (VP1/CAP), для различных известных видов вирусов является представленной на фиг. 5. Идентичность последовательности PPV5B с таковой PPV4, ближайшим родственным организмом в отношении как REP, так и CAP (~90%/65% соответственно) поддерживали определение PPV5B в качестве нового вида.

Филогенетический анализ (фиг. 6) выявил, что вирус относится к новому виду парвовируса в рамках семейства Parvoviridae на основе консервативного участка белка CAP. Подобные результаты получали при использовании более консервативной белковой последовательности REP (не показано).

Пример 3. Подтверждение PPV5B в качестве агента, который вызывает заболевание.

Гомогенаты мозга, полученные от инфицированных PPV5B CDCD свиней, использовали для инокуляции полученных путем кесарева сечения, не получающих молозива (CDCD) животных для амплификации вируса и определения, приводила ли совместная инфекция новыми парвовирусами и PRRSV к увеличению клинических респираторных симптомов. В этом исследовании неожиданно получали большое количество случаев смертности (20-22%) в группах, инокулированных при использовании гомогената ткани, содержащего новые парвовирусы, и высокие титры PPV5B были определены в сыворотке с помощью специфического для PPV5B ПЦР нацеливания на кодирующую область капсида.

Ткани из одного животного в этом исследовании затем использовали для индукции CDCD свиней

для воспроизведения клинических признаков. В этом исследовании были показаны системные инфекции с высокими титрами вирусемии у большинства зараженных животных. В группах, которые получали инокуляты, содержащие PPV5B, было высокое значение смертности (20%), хромота, снижался среднесуточный прирост, наблюдалась гипертермия, а также макро- и микроскопические повреждения.

Пример 4. Культивирование, изоляция и очистка PPV5B.

Небольшие участки ПЦР положительных тканей (например, селезенки, головного мозга, легких, кишечника и т.д.) измельчали при использовании стерильной ступки и пестика. Измельченную ткань ресуспендировали в 5-10 мл модифицированной среды ЕМЕМ, содержащей HEPES буфер и антибиотики, и осветляли для устранения больших кусочков ткани. Супернатанты собирали и последовательно пропускали через различные фильтры, чтобы устранить большинство крупных частиц, включая бактерии. Кроме того, образцы суспензии фекалий и сыворотку положительных по ПЦР животных также обрабатывали путем последовательной фильтрации для выделения вируса.

Разведения фильтрата обрабатывали трипсином или оставляли без обработки и адсорбировали на стабильных первичных клеточных культурах (перечисленных ниже) в планшетах на 6 ячеек при определенных температурах. Отсасывали жидкость из инокулята и заменяли 2 мл свежей поддерживающей среды. Затем планшеты инкубировали при 33-37°C в атмосфере 5% CO₂ и ежедневно наблюдали за появлением цитопатического эффекта, такого как округление клеток, клеточное слияние, некротизация клеток, клеточная кластеризация и т.д., по сравнению с контрольной обычной средой (среда без агента). Потенциальные положительные ячейки подвергали скринингу на рост вируса/изоляцию с помощью ПЦР.

Стабильные клеточные линии, используемые для изоляции вируса, включали ST (свинные яйца), SK6 (почка свиньи), BHK-21 (почка хомячка), VIDO R1 (сетчатка плода свиньи), PK-15 NADC (почка свиньи), PK/WRL (почка свиньи), HRT-180 (колоректальная аденокарцинома человека), Hep2 (человеческие эпителиальные клетки), Vero (почка африканской зеленой обезьяны) и RK-13 (почка кролика) и другие.

Первичные культуры клеток, используемые в способе, включали эмбриональные ткани легкого свиньи, почки, семенники, трахеи и культуру кишечника, среди прочих.

Поскольку вирус изолировали, то его подвергали очистке при использовании нескольких циклов очистки бляшек или предельного разведения и размножали в больших количествах для получения маточных культур для экспериментов на животных.

Пример 5. Получение инактивированного вируса и вакцины.

Инактивацию осуществляли при температурах приблизительно 35-39°C и в присутствии от 2 до 15 мМ BEI, еще более предпочтительно в присутствии примерно 10 мМ BEI. Инактивацию осуществляли в течение по крайней мере 24 ч, вплоть до 24-72 ч. Затем добавляли эквивалентное количество агента, который нейтрализует агент инактивации в растворе; например тиосульфата натрия. Инактивированный препарат вируса готовили в соответствии со способами, известными в данной области техники, например, как описано у Preuss, T., и др., Comparison of Two Different Methods for Inactivation of Viruses in Serum, CLINICAL and DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, (1997), 504-508 или Bahnemann, H.G., Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine, VACCINE, (1990), 299-303. После получения инактивированного вируса материал соединяли с препаратом носителя для рецептирования заключительной вакцины.

Пример 6. Получение аттенуированного вируса и вакцины.

Препарат аттенуированного вируса получали в соответствии с методами, известными в данной области техники, например, как раскрыто в Vaccine Protocols, 2-е изд.; Robinson, Husdon, Cranage, ред., Humana Press 2003. Например, "... вирусы дикого типа экстенсивно пассируют в тканевой культуре/животных-хозяевах до тех пор, пока не будет достигнут приемлемый баланс между потерей вирулентности и сохранением иммуногенности ...".

Аттенуированный вирус очищали при использовании множества циклов очистки бляшек или путем предельных разведений. ПЦР-анализы, глубокое секвенирование или иммунофлюоресцентные анализы использовали для определения специфичности культурального материала.

Аттенуированную вирусную вакцину получали путем соединения препарата очищенного аттенуированного вируса с препаратом носителя.

Пример 7. Получение субъединичной вакцины, включающей капсидный белок.

Капсидный белок последовательности SEQ ID NO: 4 получали путем экспрессии клонированной последовательности SEQ ID NO: 4 или ее фрагментов в различных системах экспрессии белка.

Бакуловирусная экспрессия. Капсидный белок PPV5B последовательности SEQ ID NO: 4 экспрессировали в бакуловирусной системе экспрессии, как правило, в соответствии со способами, описанными у Kost и др. (6), 2012. Этот белок был обнаружен в незначительном количестве в нерастворимой фракции после начальной очистки. Способы для повышения выхода и растворимости включали, но не ограничивались таковыми, как использование альтернативных буферных условий (например, гидрохлорида гуанидина или мочевины), альтернативное связывание и условия очистки (например, кобальтовые или никелевые аффинные колонки, анионо- или катионообменные колонки) или альтернативные условия экспрессии (например, температура, время, альтернативные линии клеток).

Бактериальная экспрессия. Капсидный белок PPV5B последовательности SEQ ID NO: 4 экспрессировали в бактериальной системе экспрессии, как правило, в соответствии со способами, описанными в EMD Chemicals Inc. Novagen User Protocol TB184. Этот способ включал добавление присущей His-метки, содержащейся в бактериальном векторе (EMD Chemicals Inc., 2011 (7)), чтобы способствовать очистке полученного белка. Экспрессированный в бактериях меченый капсидный белок очищали, как правило, в соответствии со способами, описанными в GE Healthcare, 2012 (8), и полученные продукты использовали для получения специфических антител к PPV5B, как описано в примере 8.

Аттенуированную субъединичную вакцину получали путем соединения препарата очищенного капсидного белка с препаратом носителя.

Пример 8. Получение антител, которые специфически связываются с PPV5B.

Антитела, которые специфически связываются с PPV5B, получали путем иммунизации кроликов с помощью антигенных препаратов вируса PPV5B или субъединичных препаратов белков капсида (SEQ ID NO: 4) или их фрагментов. Образцы сыворотки, полученные от инокулированных кроликов, подвергали скринингу на поликлональные антитела, которые связываются с антигенами PPV5B. Селезенки, полученные из инокулированных мышей, которые были определены для получения антител к антигену, сливали с клетками миеломы для получения гибридом. Гибридомы затем подвергали скринингу на связывание с антигеном PPV5B.

Поликлональные антитела. Меченный с помощью HIS экспрессированный в бактериях капсидный белок, полученный в соответствии с примером 7, использовали при иммунизации двух новозеландских белых кроликов в службе производства антител на заказ (Rockland Antibodies and Assays; Gilbertsville, PA). Кроликов иммунизировали при использовании приблизительно 100 мкг антигена/кролик в D0, D7, D14 и D28. Для инокуляции в D0 и D7 животных инокулировали интрадермально; инокуляции, которые проводили в D14 и D28, осуществляли подкожно. Полный адъювант Фрейнда использовали в первой инокуляции; неполный адъювант Фрейнда использовали для последующих прививок. Образцы сыворотки от обоих кроликов собирали до иммунизации и через 38 и 45 дней после иммунизации.

Препараты поликлональных антител подвергали скринингу на анти-PPV5B специфичность в соответствии с Rockland Antibodies and Assays. Были получены антитела, имеющие специфичность связывания с очищенным или частично очищенным белком PPV5B, с помощью иммунофлуоресцентного анализа (ИФА), вестерн-блоттинга и твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Параметры для специфичности каждого анализа были следующими: специфичность в вестерн-блоттинге измеряли с помощью обнаружения прогнозируемого белка весом 79,0 кДа, ИФА специфичность измеряли по сравнению с неинфицированными клетками, а ELISA специфичность определяли путем покрытия планшетов при использовании нерелевантного белка.

Моноклональные антитела. Меченный с помощью HIS экспрессированный в бакуловирусах капсидный белок, полученный в соответствии с примером 7, использовали для создания моноклональных антител у Balb/c мышей в службе производства антител на заказ (Rockland Antibodies and Assays; Gilbertsville, PA). Мышей иммунизировали при использовании различных антигенных препаратов PPV5B в соответствии со стандартными прописями, разработанными на службе производства антител на заказ. Иммунный ответ после инокуляции подвергали мониторингу в службе по производству антител. Стандартные прописи для получения моноклональных антител являются хорошо известными специалистам в данной области техники, например, как раскрывается у Gabriele и др. (9), стр. 117-135.

Гибридомы получали путем слияния опухолевых В-клеток, культивируемых в среде для выращивания гибридомы до фазы пролиферации, с клетками селезенки, полученными от инокулированных мышей, которых определяли как таких, которые вырабатывают антитела к антигенам PPV5B в соответствии со стандартными прописями, как описано у Gabriele и др. (9), стр. 117-135. После слияния и культивирования гибридомы подвергали скринингу на связывание с PPV5B антигенами, и отбирали анти-PPV5B антитела, которые вырабатываются гибридомами. Моноклональные антитела, которые вырабатываются гибридомами, очищали при использовании аффинной хроматографии в соответствии со стандартными прописями, как описано у Gabriele и др. (9), стр. 209-232.

Высокоаффинные антитела, специфические для PPV5B, идентифицировали и дополнительно характеризовали, включая определение эпитопов, с которыми они связываются, специфичности антитела в отношении родственных видов вирусов, и отбирали приемлемые высокоаффинные антитела с высокой специфичностью для PPV5B вирусного(ых) антигена(ов), при использовании иммунологических методов, хорошо известных в данной области техники, например ELISA, вестерн-блоттинг анализ и картирование эпитопов (Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, том 66 (Glenn E. Morris, ред., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey).

Пример 9. Диагностические анализы для PPV5B.

Анализ ELISA. Антитела, полученные в соответствии с примером 8, использовали для измерения PPV5B в биологическом образце с применением ELISA процедур. Анализ осуществляли так, как описано ниже:

Антиген для покрытия, выбранный из капсидного белка последовательности SEQ ID NO: 4, разводили в буфере для покрытия (0,05М карбонат-бикарбонатный буфер; pH 9,6) для получения заключи-

тельной концентрации 0,25 нг/мкл. Планшеты (планшеты для высокоэффективного связывания ELISA на 96 ячеек Phenix каталожный номер MPG-655061) покрывали при использовании 50 мкг/ячейка антигена для покрытия. Планшеты закрывали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C или в течение ночи при 4°C. Удаляли раствор для покрытия и планшеты промывали три раза с помощью 200 мкл/ячейка PBST (1X PBS + 0,05% Твин-20). Планшет покрывали при использовании 300 мкл/ячейка блокирующего раствора (0,5% вес./об. обезжиренного сухого молока в PBS), закрывали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Блокирующий раствор удаляли и планшет три раза промывали с помощью 200 мкл/ячейка PBST. Образцы разводили 1:100 в блокирующем растворе; прибавляли к планшету 100 мкл/ячейка образцов крови. Планшеты закрывали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Удаляли образцы сыворотки и планшеты трижды промывали с помощью 200 мкл/ячейка PBST. Вторичное антитело (конъюгированный с пероксидазой хрена козий антисвиной IgG (H+L); Jackson Immuno-Research 114-035-003) разводили до 1:10000 в блокирующем растворе и использовали для покрытия планшета из расчета 100 мкл/ячейка. Планшеты закрывали и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Вторичное антитело удаляли и планшет три раза промывали с помощью 200 мкл/ячейка PBST. Планшеты покрывали при использовании 50 мкл/ячейка TMB (3,5,3',5'-тетраметилбензидин; KPL каталожный номер 53-00-01). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в темноте приблизительно в течение 10 мин. Планшеты покрывали при использовании стоп-раствора из расчета 50 мкл/ячейка (2M H₂SO₄; KPL каталожный номер 50-85-04). Считывали оптическую плотность при 450 нм.

ПЦР анализы. Оптимизировали анализы ПЦР в геле и количественную ПЦР для PPV5B. Эти анализы осуществляли так, как описано ниже. Для количественного анализа ПЦР каждую реакцию осуществляли при прибавлении следующих реагентов: 10 мкл/реакция 2X SsoFast Probe Supermix (BioRad, каталожный номер 172-5233), 5 мкл/реакция обработанной DEPC воды, 1 мкл/реакция прямого праймера при концентрации 6 мкМ (ACC AGA GAA CAG GCG ACA T: SEQ ID NO: 6), 1 мкл/реакция обратного праймера при концентрации 6 мкМ (AAA CAC ATG ATG GGA CCA TAA T: SEQ ID NO: 7), 1 мкл/реакция зонда при концентрации 4 мкМ (6-FAM/TC ACT CAA CAG CCA GGA CCG AGA ACA CAG GAA /BHQ 1: SEQ ID NO: 8) и 2 мкл/реакция экстрагированной ДНК. Реакцию осуществляли на T100 термоблоке для проведения реакций (Bio-Rad) в течение одного цикла при 95°C на протяжении 2 мин, после чего осуществляли сорок циклов при следующих температурах: 95°C в течение 5 с, а потом 60°C в течение 5 с. Данные считывали при использовании системы для формирования изображений (Bio-Rad). Для гелевого анализа каждую реакцию осуществляли путем прибавления следующих реагентов: 12,5 мкл/реакция 2X AmpliTaq Gold Mastermix (Applied Biosystems, каталожный номер 4302758), 8,0 мкл/реакция обработанной DEPC воды, 1,25 мкл/реакция прямого праймера (GAT TTA CAT TTT GAG CAG CTA ACA CAG TAC: SEQ ID NO: 9) при концентрации 10 мкМ, 1,25 мкл/реакция обратного праймера (TTAT AAG CCC AAA TCT GAC ACT CTA G: SEQ ID NO: 10) при концентрации 10 мкМ и 2 мкл/реакция экстрагированной ДНК. Реакцию осуществляли на T100 термоблоке для проведения реакций (Bio-Rad) в течение одного цикла при 95°C на протяжении 5 мин, после чего осуществляли сорок циклов при следующих температурах: 95°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 с и 72°C в течение 45 с, далее проводили заключительное удлинение при 72°C в течение 10 мин.

Пример 10. Оценка эффективности PPV5B вакцины у свиней.

Для оценки эффективности композиции вещества, которое содержит по крайней мере один белок или полипептид PPV5B (прототипная вакцина PPV5B) у свиней, осуществляли рандомизированное исследование при использовании полученных путем кесарева сечения животных в возрасте пяти недель, которые не получали молозива (CDCD), рандомизированных в три группы (см. табл. 2). Животные были вакцинированы с помощью композиции или плацебо (физиологический раствор с фосфатным буфером; PBS) в день исследования 0 (D0) и D14. Животным в D28 вводили материал, который содержал PPV5B. Осуществляли клинические наблюдения, измеряли ректальные температуры, вес и брали анализы крови. В D56 животных забивали и осуществляли вскрытие для оценки макроскопических повреждений. Эффективность вакцины PPV5B определялась статистически путем сравнения процента смертности, виремии (титры и длительность), сероконверсии (титры и длительность) и клинических признаков вакцинированных и невакцинированных животных.

Таблица 2

Номер группы	Группа	Кол-во	Клетка	Вакцинация	Стимуляция антигеном
1	PPV5B-V _x	10	1 и 2	PPV5B прототип	Да
2	PBS-V _x	10	1 и 2	PBS	Да
3	Строгий контроль	5	3	Отсутствует	Нет

Все композиции и способы, раскрытые и заявленные в данной заявке, могут быть получены и осуществлены без излишних экспериментов в свете настоящего описания. Хотя композиции и способы в соответствии с данным изобретением были описаны в контексте предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что в композиции и способы могут быть

внесены изменения, а также в этапы или в последовательности этапов описанного в данной заявке способа без отступления от концепции и объема настоящего изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные агенты, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены на агенты, описанные в данной заявке, в то время как будут достигнуты те же или аналогичные результаты. Все такие подобные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, подразумеваются как такие, которые соответствуют объему и концепции изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Ссылки

Следующие ссылки в той степени, в которой они обеспечивают иллюстративные или другие детали, дополнительные к тем, которые изложены в данном описании, специально включены в данную заявку в качестве ссылки.

- (1) Cságola A, и др., Detection, prevalence and analysis of emerging parvovirus swine infections. Arch Virol. Jun; 157(6):1003-10 (2012).
- (2) Hijikata M, и др., Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. Jpn J Infect Dis 54:244–245 (2001).
- (3) Wang F, и др., Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. Virus Genes 41:305–308 (2010).
- (4) Lau SK, и др., Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. J Gen Virol 89:1840–1848 (2008).
- (5) Cheung AK, и др., Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. Arch Virol 155(5):801–806 (2010).
- (6) Kost и др., Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors, Trends in Biotechnology, 20, 173-180, Apr. 2002. цитируются другими .
- (7) EMD Chemicals Inc. 2011. *Xa/LIC Kits, User Protocol TB184*.
- (8) GE Healthcare. *Recombinant Protein Purification Handbook*. 18-1142-75.
- (9) Gabriele и др. (eds.), *Antibody Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 2012, том 901, глава 7.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированный полинуклеотид парвовируса свиней 5B (PPV5B) для получения вакцины, выбранный из полинуклеотида
 - а) имеющего последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 1 или
 - б) имеющего последовательность нуклеотидов, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
2. Изолированный полипептид парвовируса свиней 5B (PPV5B) для получения вакцины, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
3. Изолированный парвовирус свиней 5B (PPV5B) для получения вакцины, включающий полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 1.
4. PPV5B по п.3, представляющий собой аттенуированную невирулентную форму PPV5B.
5. Вакцина для лечения или предотвращения инфекции вирулентным PPV5B, включающая убитую или аттенуированную невирулентную форму PPV5B по п.3 или 4.
6. Вакцина для лечения или предотвращения инфекции вирулентным PPV5B, включающая иммунологически эффективную субъединицу убитой или аттенуированной невирулентной формы PPV5B по п.3 или 4, где субъединица представляет собой капсидный белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.
7. Вакцина по п.6, где субъединица представляет собой иммунологически эффективный фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.
8. Иммуногенный препарат для формирования иммунного ответа против PPV5B у свиней, включающий иммунологически эффективное количество полипептида по п.2 и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.
9. Способ формирования иммунного ответа у свиней, включающий введение иммунологически эффективного количества PPV5B по п.3.
10. Способ формирования иммунного ответа у свиней, включающий введение иммунологически

эффективного количества полипептида по п.2.

11. Способ формирования иммунного ответа у свиней, включающий введение иммунологически эффективного количества вакцины по п.5.

12. Способ формирования иммунного ответа у свиней, включающий введение иммунологически эффективного количества вакцины по п.6.

13. Способ по п.9, где иммунный ответ обеспечивает протективный иммунитет к заболеванию, вызванному PPV5B инфекцией.

14. Способ по п.10, где иммунный ответ обеспечивает протективный иммунитет к заболеванию, вызванному PPV5B инфекцией.

15. Способ по п.11, где иммунный ответ обеспечивает протективный иммунитет к заболеванию, вызванному PPV5B инфекцией.

16. Способ по п.12, где иммунный ответ обеспечивает протективный иммунитет к заболеванию, вызванному PPV5B инфекцией.

17. Изолированное антитело, которое специфически связывается с PPV5B полипептидом, кодируемым полинуклеотидом парвовируса свиней 5B по п.1.

18. Способ идентификации присутствия PPV5B в биологическом образце, включающий:

а) обеспечение контакта биологического образца с антителом по п.17,

б) определение образования комплекса между антителом и PPV5B полипептидом, где образование указанного комплекса свидетельствует о присутствии PPV5B в биологическом образце.

19. Вектор экспрессии, который включает полинуклеотид по п.1.

20. Клетка-хозяин, которая включает вектор по п.19.

21. Гибридома, которая экспрессирует антитело по п.17.

22. Диагностический набор для идентификации присутствия PPV5B в биологическом образце, включающий:

а) антитело по п.17 и

б) реагенты для определения образования комплекса между антителом и PPV5B полипептидом.

23. Набор для иммунизации свиней от заболеваний, ассоциированных с инфекцией PPV5B, включающий:

а) по меньшей мере один PPV5B полипептид по п.2;

б) по меньшей мере один адъювант или носитель;

с) контейнер для получения иммуногенной композиции, получаемой путем смешения компонентов, указанных в подпунктах а) и б);

д) комплект распечатанных инструкций и

е) дозирующее устройство, предназначенное для введения указанной иммуногенной композиции животному.

24. Набор по п.23, который дополнительно включает по меньшей мере один иммуногенный белок, который является эффективным для иммунизации свиней против по меньшей мере одного патогенного вируса или бактерии свиней, которые вызывают заболевание, ассоциированное с указанным вирусом или бактерией.

Последовательность ДНК PPV5B

PPV5B_эталон:

ген 935..2024
 /метка = "Спрогнозированная репликаза"
 ген 2161..2860
 /метка="Спрогнозированный ген с неизвестной функцией/ORF3"
 ген 2861..5014
 /метка = "Спрогнозированный капсид"

Последовательность:

GCTTCAAGTCTATTAATTTGCATAATTTATGCAAGAGGGAAGTTAACCTGATTGGTCAGTTT
 TTTGGCGGGAAGCAATTTGATTGGACGGGAACTCAAGTCTTAATTTGCATTGACGTGGACCA
 ATCAGAATTGAGTACATATTATATAAGGAGGCCGAAAAAGAGGAAGTTTGTCAATTTGCGTTT
 TGGAGACCATCGCGAGCAGAACTCCGTCGTTTTCGGCCTGTATTTGAAGATGGAAACCTACT
 GGACAGGTATTTGCAGACTTTTTCCTGATGTTTTAAAAATACCTGGTGTTTATGAAGGACGC
 TATATTTTTGAAGTTCCTGTTTCTACCAGAGACTTTATGAAATGGCCTGATATATTTCAAAA
 TGAAAAAAATGAAGAACTGTGAGTCTGGCGCGGCGCTGCGCGCGCGCGCATGAAATTG
 ACAGTAATCTAGTAACGGCTGTAGACAAGGGGAGGCTCTATTTAGAGAGCTTCAAAAAAGAA
 CTTAGAAAAATCCTGTAGATTAGGAGTAGATCCTGGCATTTCATGCAATTGGAAAGAGTTGA
 CTCAAAAAGGTGGCTTACATTTGCATTGGTGTGTGTCTGTGCCGCTGGTACCCCGCAGATG
 TTTTAACTATATTTCAAAAATACAGAAAAAAGTTTCATTATATTACTTTGGTGTGGAGGA
 CTTAGCTTTTTTGTGCCACAAAAATAAACACGGAGCATGGAAGACACAGATGAAGGGTT
 TATTTATAATTATTTGCTAAAAAACTACCACTGAAAGAAATGCTTTTATGCATGGACTACAA
 TTGGAGGTACAAATAGGTGAAGCCTGTTTAAATACAGAAAAAGAAAAAGAACTATTAGATAAT
 AGACAAGATCCAGCAGTTATTGAAGAAATATCTGCTCCCATGTACAAATGTGCCACTGGAGA
 AAAAATGCTAGACATTGTACAGTGGTTGGTAGACAATAATATTTGTTCTGAATCCAAGATGGG
 AGGGAAAAAATGCTCTAAGCTTATACTCATTTCTAGCCACACAAGCTGGAGGATATATGGCA
 AAACAATGCTTGAGAATCGCTCAGCAAAAATTAATAAAGAAAAATCACTAGGGTTAACCTTT
 AATGGATTTTAAAAACATGGATGCTTTAAGAGCTTTCCAACAAGTGACATGGAGTGGCTCAT
 TCGATCATAACAGAATACATTACATTTTGCAGCTAACAACTATGATCCTAAAAATTCGTGCA
 GTTATAATGTTTCACTGGAGCATGAAACAAACGGGAAAAAGAACTGTGTATGGTTTACGG
 TCCTGCTACAAACAGGAAAAACAATATTGCACAGGCAATCTGCCATAGCTCAGCTAATTATG
 GCAATGTTAACTGGAAACAAATCCAAATTTTCCTTTTCAAGATATTGTAGGAGCTCAGGTAGGG
 TGGTGGGAAGAAGGAAAAATGACAGGAGACATGGTAGAAGCTGCAAAAGCTTTGCTGGGGGG
 AACTGCTTTGGCGCATCGACCGCAAAATGTATGCAATCTGTTGAAGTCAACAGTCCACCGGTTTA
 TTATAACATCGAATGTGGACATGACCGTGGTTCAAGAAGGAAGTTTGTGAAGCTTTGAACAC
 CAACAGCCGTTAGAGGACAGGATGATAAAATTTTCATTTAACCTGACACTACCTGGAACTT
 TGGTCTGATTACAACTGAAGAAGTGAAATCTTTTTTCCGGATGGGTGCAAACTTTTCAGTTA
 AACCTGAAATCATGAATTGCCAAATTTTCAAAAGAGGACCTGCCAGCATCCGCCACCTGAGTT
 CCTCTTGGGAAAAATTCCTCCACCAAGGAGATGCAATAAAAAACGACAGCCACTCTATTTGAG
 AGCTGAACCAGATGAAGAACAAAGAAACACCCAGACGCTCTGGATCATTTGGTTTGAAGAACCA
 GTCAAAAAAGAAAGAGACAGAAGACCCCTGCAAAACACGACACCTCCTGCGGCTTATGAGAAT
 TTAGATGACAACCTTTGAACCTGTTCCAGGTAAGAATTTTGCATTATCATTTTTTAAATGTTT
 CAAAAACAATAGAGCAAACTGGTGATATGTGCATAATTTCTACAGATAGCCAAGTGAACCTGA
 TATTTGACGTGGTCTACGAAGAGACACCCAGAGGTGGACGAAGTGGAGGAACAAATGAGCTTTA
 GTGGGTATTCTAAAAATCTCCCCCGGGTTAGAGGAAGTTACATTCCCATTTTGGGTGTAT
 TTTTTGCTTGGCAAGATAGCTGATTTTATTAATTGGTGTGGGTATTATAAATATAAATGTCC
 AGAAGCAGAAAAGGTATTTAGTATTGGACAATCTACACAGGTTTACTTAAATGGCCGGGTG
 CACAGGGAAGAAAGAACCCGAGTTAAGAACTTTACCGAAGCTGCGTTTCC
 ATATATGAAAGTACCTGTGAGACCAGACAACATTGAATGGATTAAATCCATGAGATGCTACATAAT
 TATATAGACAAATAACACCGCAGACAACCTGAGAATGATTTACTTGCAGCTATCACTGCTACTCG
 ATCAGAGAGAGATCATCCATCCAGTCACCGGCGAGAAATGGGTTTTCGGTGAAGAAACAGAGCTTT
 TGCTACTGATTTGGAAGAAGCCGTGGATGAAGAAGATCCTGATACAGAGAAAAAACACCTACTGAT
 AAAACACAAGTAATAACAGAAAGGGGAAATTTGGTGAAGAAAGAAAGAGGTGATACCTTTACGT
 CAAATGAGGAACATCACCATCAAGAAAACTATTAGAACACGACTCAAGCGAAGAACACACAGAGA
 AGCTGGTCACCGAGAACAGAAAGAACTAGAAGACAATATTGAAGACATCAAACTAGGACGGGAGAA
 GACCAACCGGAACCGGTATCAACTTGCCAGGACATCGCTACACAGGTCTTGGAAATCCACTCCCTC
 ACGGAGCTCCTGCAATGAAATGATCTCTCTGCTGCGAAACATGATATCAGGTACAAACAATATC
 TCGATATGCTCACTGGCCATACATTTGGCGCCATATATTGATAAAAAAATGCAAGAAGATATTAGA
 GAGATAGTAAAAAAGGTTTAGGATTAGAAGGTAACCTTTTAGGTAACCTTATATCAGCTTTATGGC
 AAGCAAAATACAGATTAGGAGCCCGATATATGAAATTTTAAAAACAATTTTACCCCCGAAAGTAT
 GCCTACTAAAGAAATCTGTAGAAAAACATTTACCAAAACCTTTGCCCATGTATCTCCACAGACATCT
 TTACCGGTGATCTCTCTCGAACTCCTGACTTGGGTGGCGAGACTGGAATGAATGAAGAGCTC
 CAGCAAAAGAGAAATGACAGAAGACAGATGTGACAGCACCAAGGTGCGAAACATTGGACACACA
 ATATAGGATTCTAAATGGCGGGAGGGGTGGGGGGGAGGGAATCAACCTAAAGTTCTTGGATT
 GGGGGGGCTTCTTTACTGATACGACGGTTACTACTTATGGTACTAGAAGCTGTGTCTTAGCTCTT
 TTCGGCATAACTACTGCACCACAGAGAGCGGGGATCATATACCTAGCCTGTTGTCTGTACTCCATG
 GTACTATTATGATCTTAACATTCTATCAGCTCATTCTCTCCCTCTGCTTGGCAACCGCTTTTAGAA
 GAGTATGATGCTTTTAAACCTTTAAATTTGGAAGTTTAAATTTAAAGAGATAGTTGTTAAAGATGTTA
 ATAATATGACAGGGAACAATGCTGTGACACAGTTTCTGACAAATGCCATGGCTGCAGTGTGTGTTT
 TGAGGATACACATTACGAGCTGCCATATGTTTGGGAGGGGGACAGCTAACAGTGCCTGGTCATCTT
 CCAGGACAACTTATGAACCTTCCAAATACTGCTATAGAACCTGTGGGAAACCCGATAGCCGAGATGT
 GGTCACTGTAGATGTTTCCAAAGAGCCCACTTAGACATGCCTTTTGTTCAGCCACACAGAACAC
 TGAGTTCTTTATTTTAGAGAACAGACACTCTACCATCCTTCACACAGGCAATGAATCTTTCAAACCC
 TATGACTTTCCAGATTTACATTTTGAAGCAGTAACACAGTACATGTGGGACGCGAGGAGACTTGACA
 ATCCAATGAAAGGTCAAAGAAATACAGGTTATGAAAAACAACCTACAGAAAAAAGATCAAATGTT
 TGGTATCAGAGCTTCGAGTTACCTCGTTCCCTGGATTGTCAACTCTCTAAACAGACCTGCTATGTTT
 TTACAAGGAGGAAGATTAAAGACGGGGATTATTCATTTGTTGGGCTTGGGACAGAGAACAGGGCA
 CATACCACTACTTTAATGATACACCTGTGCTGGTTGAAGAGATATTTACAAATTTTACAACATGAT
 GCTTAAAGAGAACTCAACAGCCAGGACCGAGAACACAGGAAACACCGTAAAAACACCTGATGGG
 ACCATAATTATAACAACTAACAGTTTAGCGTATGGACAGGTGCCTGAAAAATGATAACATACCGA
 GTGATCACAAGCCGCTTTCCGGGTTACAGGGTACAGGCTTGTGTGCTGAACAGAGAGGGTATAG
 CACACCTGGAATGCCTTCTCATATAAGGAGATATTATTGCAAAAAACCCGAAACTATTAGAAAAA
 GATCAGCAAGAAATCACATTTCAAACCTTTGAAGGGTCTGTGACGCAAAAAAATCTCCGCTAATCTAG
 AGTCTCAGATTTGGGCTTATATCCCTAACACTGATAACAAACATAACTGCGGAAACGCCCCCTTTATC
 TATATGGGGAATGGAATAATCCTCCACCTATGGTTTTTTTGAGTTTACTCCCTCAACTGGGACCCCT
 GAAAAATCCAGCTGTTCTGGAGCAAACTCTTAAAAAGTTCTTGAATCAGTACTGCCAATTTTTAC
 TGGAAATATACTGTAACATGGGCTGTGTGAGGCGAAAGAAACATCTCCGAGGTGGAACCCCTATGCC
 GGGGTCACAAATTTCAACTTATAACAACGATCCTGTGTACATCCTTGACCAAAATGGATTTTATAAA
 TTGCCAGAACTGTTTGGACAGCAAGCAACGTGTAGAGCGCGGAAGATAATAAAAAAATTTGAG
 AAAAAAAGTTACTTCTCTTTTTTTTTGAATTTGAAAGCGCCAGGCTCTCGCCGGTCGCCCT
 GACGTACATCCGCTTCCGGTCAAAGGCGGGGTCAAAGGTCAAAGTCTTCATACGTCATATCCG
 CTTCCGGGTCAATGACC

Фиг. 1

035320

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА РЕПЛИКАЗЫ PPV5B

METYWTGICRLFPDVLKIPGVYEGRYIFEVVPVSTRDFMKWPDIFQNEKNNENCESGAAPAPRDEIDSNLVT
AVRQGEALFRELQKELRKSCRLGVDPGIFMQLEVRVDSKGGHLHWCVSVSAGTPRDVLTI FKNTEKKVSLYY
FGVEGLSFFVPHKNKHGAWKSTDEGFIYNYLLKKLPLKECLYAWTTIGGTIGEACLNTEKKELLDNRQDPA
VIEELSAFMYKCATGEKMLDIVQWLVDNNICSESRWEGKNALSLYSFLATQAGGYMAKQCLRIAQQKLLKEK
SLGLTLMDFKNMDALRAFQQSDMECSFDHNRHYIFAANNYDPKIAAVIMFHWMSMKQTGKRNCVWFYGPATT
GKTNIAQAI CHSSANYGNVNNPNFPFDIVGAQVGWEEGKMTGDMVEAAKALLGGTALRIDRKCMQSVE
VNSPPFIITSNVDMTVVQEGSFVSFEHQPLEDRMIKFSFNLTLPGNFGLITTEEVKSFFRMGAKLSVKPEI
MNCQIFKRGPAASIRHLVPLGEIPPKEMHKRQPLYLRAEPDEEQETPDVLDHWFEEPSQKRKKTEDPANTT
PPAAENLDDNFEVPGKNFAFIIF

Фиг. 2

ORF3 PPV5B

MSFSGYSKNLPGLEEVTFPFVWDFLLARIADFINWCGYNNIKCPEAEKVFSIGQSTQVLLKWPAGAQQKENR
VKNFTEAAPPYMKVPVRPDNI EWIKIHEMLHNYDRQITPQTENDLLAAITADFDQREI IHPVTGEKWVFGK
KTEAFATDLEEAVDEEDPDTEKKQPTDKTQSNKKGEIGEKKEGDTLTSNEEHNQSRKLEHDSSEEQPEE
AGHREQKELEDNIEDIK

Фиг. 3

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА КАПСИДА PPV5B

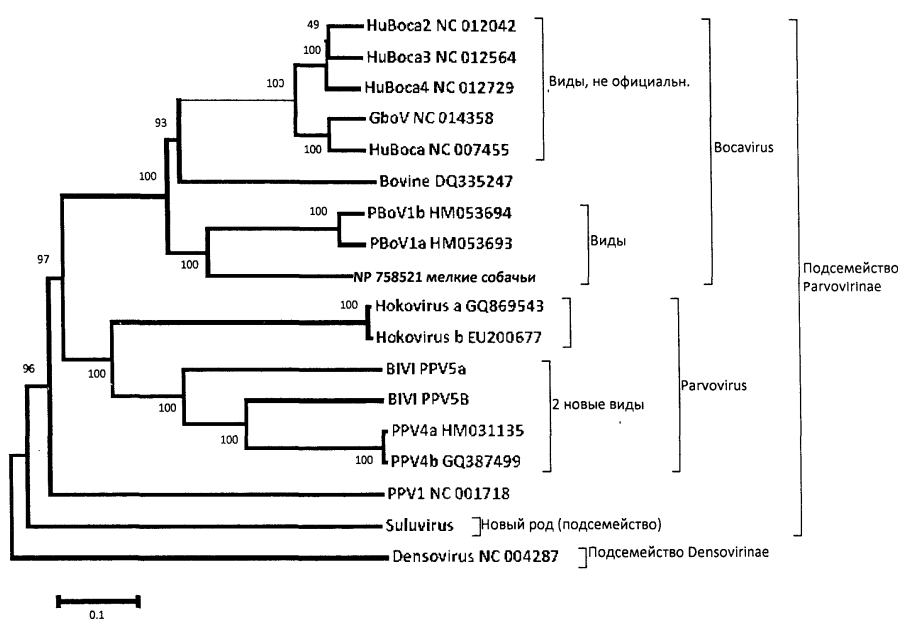
MLHNYDRQITPQTENDLLAAITADFDQREI IHPVTGEKWVFGKKTEAFATDLEEAVDEEDPDTEKKQPTDK
TQSNKKGEIGEKKEGDTLTSNEEHNQSRKLEHDSSEEQPEEAGHREQKELEDNIEDIKHGAGEDQTGTG
INWPGHRYTGPGNPLPHGAPRNEIDLSAAKHDIRYKQYSRYGHWPIYAPYIDKKMQEDI REIVKKGLGLEG
KLLGNLISALWQAKYRLGAPIYEILKTLPPKSMPTKESVEKHLPKPLPIDPPQTS LPGASPRPTPDLGGET
GMNEEPPAKRRMTEDRCDSITTCETLDTQYEDSKMAGGGGGGNQPKSSWIGGAFFTDTTVTYTGTRRCVLS
SFPHNYCTESGDHIPS LVVCTPWYYIDLNILSAHFSPSAWQTLLEEYDAFKPLKLEVKIKELIVVKDNNMT
GKQCCD TVSDNAMA AVL CFEDTHYELPYVLGGQLTVP GHLPQQT YELPKYCYRTV GKP HSEMWSPVDGSKR
AHLDMFPFVQPTQNT EFFILENRHSTI LHTGNEFFQTYDFPDLHFEQLTQYMW DARRLDNPMKGQRIQVMKNK
PTENKDMFGIRASSYLVPWIVNSLNR PAMFLQGGRLKDG DYSIVGPGTREQATYHYFNDTPVVVERDIYKF
TTSMLKRETQQGPRTQETTVKTPDGTIIITNSLAYGQVPENIDNI PSDHKA AFGVTGYRLAVAEQRGYST
PGMP SHIREILLTKTPKLEKDQOEITFPNFE GSVSEKTSANLESQIWAYI PNTDNKHNCGTPPLSIWGMEN
PPPMVFLRLLPQLGPPEKSSCSGSKPSKKFLNQYCQFLLEYTVTWAVVRRKKHTPRWNPMGPVTIPTYNNDP
VYILDQNGFYKLPETVWTAKQVRARR

Фиг. 4

Попарное сравнение аминокислот на идентичность																
	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]
[1] Крупный рогатый скот		47.2%	52.3%	50.3%	50.5%	52.8%	52.8%	52.8%	52.6%	6.6%	22.7%	22.5%	20.7%	20.7%	20.2%	18.4%
[2] Мелкие собаки	43.3%		51.0%	60.2%	61.0%	50.5%	51.3%	50.5%	51.8%	7.4%	25.0%	24.7%	21.7%	21.7%	21.4%	18.1%
[3] GboV	43.7%	49.8%		50.0%	50.3%	91.3%	83.7%	83.7%	84.2%	6.6%	23.7%	23.7%	21.7%	21.7%	22.5%	17.6%
[4] PBoV1a	42.8%	53.5%	49.1%		93.9%	51.8%	50.5%	49.7%	51.5%	7.1%	24.0%	24.0%	20.9%	20.9%	22.2%	19.9%
[5] PBoV1b	43.3%	53.7%	49.5%	94.7%		51.8%	51.3%	49.7%	51.8%	7.9%	24.5%	24.5%	20.4%	20.4%	22.5%	20.2%
[6] HuBoca	44.2%	50.9%	93.3%	50.0%	50.7%		82.7%	82.7%	83.2%	6.9%	24.2%	24.2%	21.2%	21.2%	22.5%	17.9%
[7] HuBoca2	47.0%	50.5%	78.4%	50.0%	50.2%	80.5%		91.8%	91.1%	7.9%	23.5%	23.2%	20.9%	20.9%	24.0%	18.4%
[8] HuBoca3	44.7%	51.2%	92.6%	50.2%	50.5%	93.3%	80.0%		92.1%	8.7%	24.0%	23.7%	21.7%	21.7%	23.0%	18.6%
[9] HuBoca4	46.5%	50.2%	77.7%	50.0%	50.5%	80.2%	96.5%	79.3%		8.2%	23.5%	23.7%	21.4%	21.4%	23.2%	19.1%
[10] Densovirus	7.9%	7.0%	6.5%	7.7%	8.1%	6.5%	6.1%	6.7%	5.8%		7.7%	7.4%	8.4%	8.2%	8.7%	6.6%
[11] Hokovirus_a	20.5%	20.7%	20.5%	22.6%	22.3%	20.9%	20.2%	20.7%	20.5%	7.9%		99.5%	33.9%	34.2%	32.9%	17.6%
[12] Hokovirus_b	20.0%	20.9%	20.5%	22.6%	22.3%	20.9%	20.2%	20.7%	20.5%	8.1%	98.6%		33.9%	34.2%	32.9%	17.9%
[13] PPV4a	21.4%	21.2%	22.1%	22.1%	21.6%	22.8%	21.2%	22.8%	21.4%	6.3%	29.1%	29.1%		99.5%	65.3%	17.1%
[14] PPV4b	21.4%	21.2%	22.1%	22.1%	21.6%	22.8%	21.4%	22.8%	21.6%	6.3%	29.3%	29.3%	22.1%	22.3%	65.6%	23.3%
[15] BIVI_PPV5B	21.4%	22.3%	23.0%	21.9%	21.9%	23.5%	21.9%	23.0%	21.9%	6.5%	29.1%	29.1%	90.5%	90.0%		18.4%
[16] PPV1	18.6%	25.4%	23.3%	20.5%	21.2%	22.8%	26.1%	23.5%	25.1%	5.8%	16.5%	16.5%	18.4%	18.4%	17.4%	
Сверху = аминокислотная идентичность VP1/CAP																
Внизу = аминокислотная идентичность REP																

Фиг. 5

Филогенетический анализ VP1/CAP участка PPV5B



Фиг. 6

Результаты BLASTp капсида PPV5B против общих последовательностей GenBank

Самое близкое совпадение: парвовирус свиньи 4 PPV4 - депоз.номер GenBank:

AFM73881

Идентичность последовательности: 53% (367/690)

Гомология последовательности: 68% (468/690)

PPV5B	50	RYGHWPIWAPYIDKKMQEDIREIVKKGLGLEKLLGNLISALWQAKYRLGAPIYEILKT	109
		++GHP++WAP++D++M ++I+++K L KLL N I ALW+AK ++GAPIYEI+K	
PPV4_	3	KHGHWPFLWAPFVDRQMSQEIQQVLKGSTKLSQKLLANFIALWRAKEKIGAPIYEIVKG	62
PPV5B	110	ILPPKSMPKESV-EKHLPKPLPIDPPQTSPLGASPPRTPDLGGETGMNEEPPAKRRMT	168
		+ P T ES+ P P P PQ ASPP++P+ E M+ K E	
PPV4_	63	VFPSVDKKTVESLLPHDPPIAPPSSPQRGSKRASPPQSPNAHDEDTMSGHKRQKTMEVE	122
PPV5B	169	DRCDSTTRCETLDTQYEDSKMAGGGGGGNQPKSSWIGGAFFDTTDTTVTYGTRRCVLSF	228
		CD + C T + D ++ G GGG N+ K +W+GG FTD++ T+GTRRCVLS+F	
PPV4_	123	SECDKSLLCPTQAG-ADFELCGTGGGATNE-KGTWVGQTQFTDTSIRTFGTRRCVLSAF	180
PPV5B	229	PHNYCTTESGDHPSLVVCTPWYYDLNLSAHFSPSAWQTLLEEDAFKPLKLEVKIKE	288
		P YC+ SGD IPS++ TPWYYDLNI+S HFSPSA+QTL+E+YDAF+P L V +KE	
PPV4_	181	PDTYCSMMSGDAIPSIIFNTPWYYDLNIMSCHFSPSAFQTLIEDYDAFRPRSLTVHLKE	240
PPV5B	289	IVVKDVNNMTGKQCCDVTSDNAMAALVCFEDTHYELPYVLGGGQLTVPGHLPQGYELPK	348
		+V+KDV G Q + VSDN A +L FED +YELPYVLGGGQ++VPGHLPQGYELPK	
PPV4_	241	LVIKDVCQQQLQA-EQVSDNNSATLLAFEDVNYELPYVLGGGQVSVPGHLPQGYELPK	299
PPV5B	349	YCYRTVGKPHSEMSPVDGSKRAHLDMPFVQP-----TQNTTEFFILENRHST	395
		Y YRTVGKP S + H D P TQ+TEF+ILEN +T	
PPV4_	300	YSYRTVGKPDNP--SGFVPGRNTHPDQGGHPKASKTIWYSQYLETQDTEFYILENHKAT	357
PPV5B	396	ILHTGNEFFQTYDFDLHFEQLTQYMWDAARRLDNPMKGQRIQVMKNKPTENKQDMFGIRA	455
		ILH+GN F Q Y+FPDL FEQLTQYMWDAARR DNP+ QRIQVM + + F I I	
PPV4_	358	ILHSGNTFSQNYNFPDLPFELTQYMWDAARRQDNPLIDQRIQVMSRMYDDGPQKTFAIKV	417
PPV5B	456	SSYLVPWIVNSLNRPMFLQGGRLKGDYSIVGPGTREQATYHYFNDTPVVVERDIYKFT	515
		+ Y+VP+ V S +RPAMFL GGR KGDYSI GPG RE+ ++ Y+ND P ++ RD Y F+	
PPV4_	418	NPYIVPFTVKSTRPAMFLAGGRFKGDYSITGPGDREKTSFRYYNDPPWIITRDYLF	477
PPV5B	516	TSMLKRETQQPGPRTOETTVKTPDGTIIITNSLAYQVNPENIDNIPSDHKAAGVGTGYR	575
		+ + K E +QPGPR +T V+TPDGT+I+TTN+LAYG E + NIP GV +R	
PPV4_	478	SDLAKTEREQPGPRQGDVTVPDGTILIVTTNALAYGYTTEYLKNIPLLSKYHGVENFR	537
PPV5B	576	LAVAEQRGYSTPGMPFSHIREILT-KTPKLL-----EKDQOEITFPNFEFSGVSEKTS	627
		LAV +RGYS PG PSIRE L K P + E ++EITFP++ GSV+EKT+A	
PPV4_	538	LAVENERGYSMFGHPSHIRETLFRGKLPEIRESTIKSEDQRKEITFPDYMGVNEKTTA	597
PPV5B	628	NLESQIWAYIPNTDNKHNCGTPLPSIWGMENPPPMVFLRLLPQLGPPEKSSCSGSKPSKK	687
		NLESQIW+ IPNTD C TPPLSIWGM+NPPPMVFLRLLPQLGPPEKSSCSGSKPS	
PPV4_	598	NLESQIWSQIPNTDITEKCTTPPLSIWGMKNPPPMVFLRLLPQLGPPEKSSCSGSKPS	657
PPV5B	688	FLNQYQCFLLEYTVTAVVVRKKHTPRWNP	717
		+LNQYQCFL Y + W V++R + T RWNP	
PPV4_	658	YLNQYQCFLLEYTVTAVVVRKKHTPRWNP	687

Фиг. 7

Результаты BLASTp репликазы PPV5B против общих последовательностей GenBank

Самое близкое совпадение: парвовирус свиньи 4 PPV4 - депоз.номер GenBank:

ADF59557

Идентичность последовательности: 87% (517/597)

Гомология последовательности: 93% (555/597)

Запрос	1	METYWTGICRLFPDVLKIPGVYEGRYIFEVVPVSTRDFMKWPDIFQNEKNNECESGAAPA	60
Объект	1	METYWTGICRLFPDVLKIPGVYEGRYIFEVVP+STRD MKWPDIF NE N+EN +SGAAPA METYWTGICRLFPDVLKIPGVYEGRYIFEVPISTRDCMKWPDIFGNENNSNQSGAAPA	60
Запрос	61	APRDEIDSNLVTAVRQGEALFRELQKELRKSCRLGVDPGIFMQLERVDSKGGHLHWCVS	120
Объект	61	APR+ ++SNLV AVRQ EALFRELQKELRKSCRLGVDPGIFMQLE VDSKGGHLHWCVS APRENLSNLVIAVRQAEALFRELQKELRKSCRLGVDPGIFMQLEEVDSKGGHLHWCVS	120
Запрос	121	VSAGTPRDVLTIFKNTEKKVSLYYFGVEGLSFFVPHKNKHGAWKSTDEGFIYNYLLKKLP	180
Объект	121	VSAGTPRDVLTIFKNTEKKVSLYYFGVEGLSFFVPHKNKHGAWKSTDEGFIYNYLLKKLP VSAGTPRDVLTIFKNTEKKVSLYYFGVEGLSFFVPHKNKHGAWKSTDEGFIYNYLLKKLP	180
Запрос	181	LKECLYAWTTIGGTIGEACLNTEKRKELLDNRQDPAVIEELSAPMYKCATGEKMLDIVQW	240
Объект	181	LKECLYAWTTIGG IG+ACLT+KRKELLDNRQDPAVIEELSAPMYKCATGEKMLDIVQW LKECLYAWTTIGGAIGDACLNTDKRKELLDNRQDPAVIEELSAPMYKCATGEKMLDIVQW	240
Запрос	241	LVDNNICESRWEKGNALSLYSFLATQAGGYMAKQCLRIAQQKLLKEKSLGLTLMDFKNM	300
Объект	241	LVDNNICESRWE KNALSLYSFLATQAGGYMAKQCLRIAQQKLLKEK LGLTLM+FK+M LVDNNICESRWENKNALSLYSFLATQAGGYMAKQCLRIAQQKLLKEKPLGLTLMDFKDM	300
Запрос	301	DALRAFQQSDMECSFDHNRIHYIFAANNYDPKIAAVIMFHWMSKQTKGRNCVWFYGPATT	360
Объект	301	+ALR FQQ + E +FD+NR+HYIFA NNYDPKIA+VIM+ WSMKQTKGRNCVWFYGPATT NALRRFQQDEGEMTFDNNRMHYIFAANNYDPKIASVIMYFWSMKQTKGRNCVWFYGPATT	360
Запрос	361	GKTNIAQAICHSSANYGNVWNNNPFQDIVGAQVGWEEGKMTGDMVEAAKALLGGTA	420
Объект	361	GKTN+QAACHSSANYGNVWNNN NFPFQDIVGAQVGWEEGKMTGDMVEAAKALLGGTA GKTNMAQAICHSSANYGNVWNNNANFPFQDIVGAQVGWEEGKMTGDMVEAAKALLGGTA	420
Запрос	421	LRIDRKCMQSSEVNSPPFIITSNVDMTVVQEGSFVSFEHQPLEDRMIKFSFNLTLPNGF	480
Объект	421	LRIDRKCMQS+EVNSPPE+ITSNVDMT+VQEGSFVSFEHQPLEDRMIKFSFN+TLPGNF LRIDRKCMQSI EVNSPPFLITSNVDMTIVQEGSFVSFEHQPLEDRMIKFSFNMTLPNGF	480
Запрос	481	GLITTEEVKSFFRMGAKLSVKPEIMNCQIFKRGPAIRHLVPLGEIPPPKEMHKRQPLY	540
Объект	481	GLIT+EEVKSFFRMGAKL+ +P+IMNC IFK+GPASIRHLVP+GEIPPPKEM KRQPLY GLITSEEVKSFFRMGAKLAAQPDIMNCPIFKKGPASIRHLVPVGEIPPPKEMHKRQPLY	540
Запрос	541	LRAEPDEEQETPDVLDHWFEE--PSQKRKKTEDPANTTPPAAYENLDDN-FEPVPGK	594
Объект	541	+RAEPDE Q+ P+ LDHWFEE P +K++KT++ A P E + + F P PGK MRAEPDEIQDNPEELDHWFEEAPRKKKQKTKNTATKNPAETVEIITETEFIPAPGK	597

Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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