

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038831**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.26

(21) Номер заявки
201791957

(22) Дата подачи заявки
2016.03.04

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) МАРКЕРНАЯ СИСТЕМА, В ЧАСТНОСТИ, ДЛЯ ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ БАКУЛОВИРУСОМ СУБЪЕДИНИЧНЫХ АНТИГЕНОВ

(31) **62/128,744**

(32) **2015.03.05**

(33) **US**

(43) **2018.03.30**

(86) **PCT/US2016/021003**

(87) **WO 2016/141338 2016.09.09**

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

(72) Изобретатель:
**Айер Арун В., Германн Джозеф Ральф,
Руф Майкл Б., Вон Эрик Мартин,
Шеффер Меррилл Линн (US)**

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

(56) BONTO FABURAY ET AL.: "A Glycoprotein Subunit Vaccine Elicits a Strong Rift Valley Fever Virus Neutralizing Antibody Response in Sheep", VECTOR BORNE AND ZOONOTIC DISEASES, vol. 14, no. 10, 17 October 2014 (2014-10-17), pages 746-756, XP055273067, US ISSN: 1530-3667, DOI:10.1089/vbz.2014.1650 table 3a abstract

STEWART M. ET AL.: "Validation of a novel approach for the rapid production of immunogenic virus-like particles for bluetongue virus", VACCINE, vol. 28, no. 17, 9 April 2010 (2010-04-09), pages 3047-3054, XP055273068, GB ISSN: 0264-410X, DOI:10.1016/j.vaccine.2009.10.072 page 3053; figure 5

ANDERSON J. ET AL.: "Purification, Stability, and Immunogenicity Analyses of Five Bluetongue Virus Proteins for Use in Development of a Subunit Vaccine That Allows Differentiation of Infected from Vaccinated Animals", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 21, no. 3, 22 January 2014 (2014-01-22), pages 443-452, XP055273072, US ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00776-13 abstract; figures 4, 6

SHABBIR AHMAD ET AL.: "Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in Spodoptera exigua larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals", VIROLOGY, vol. 192, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 207-216, XP055273075, page 212; table 3

MA H. ET AL.: "Identification of a Novel Rhabdovirus in Spodoptera frugiperda Cell Lines", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 88, no. 12, 15 June 2014 (2014-06-15), pages 6576-6585, XP055273306, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00780-14 abstract

(57) Изобретение относится к области маркеров соответствия и маркерных вакцин, которые позволяют осуществлять дифференциацию между инфицированными и вакцинированными индивидуумами. В частности, оно относится к способу определения, получал ли индивидуум иммуногенную композицию, включающую рекомбинантный белок, который продуцируется с помощью бакуловирусной системы экспрессии в культивируемых клетках насекомых.

038831 B1

038831 B1

Список последовательностей

Данная заявка содержит список последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821-1.825. Список последовательностей сопровождает данную заявку и, таким образом, является введенным в нее в качестве ссылки в своей целостности.

Предпосылки создания изобретения

Область, к которой относится изобретение.

Настоящее изобретение относится к области маркеров соответствия и маркерных вакцин, которые позволяют дифференцировать инфицированных и вакцинированных особей. В частности, оно относится к маркеру соответствия вакцин, включающих субъединичный антиген, и системе DIVA (дифференцировка инфицированных и вакцинированных животных), которая позволяет дифференцировать животных, инфицированных патогеном, и животных, которые подверглись обработке субъединичным антигеном, полученным из указанного патогена, где указанный субъединичный антиген экспрессируется в культивируемых клетках насекомых, предпочтительно с помощью генетически сконструированного бакуловируса.

Описание предшествующего уровня техники.

Бакуловирусы представляют собой крупные стержневидные вирусы с двухцепочечной ДНК, которые инфицируют беспозвоночных, в частности насекомых, но не реплицируются в клетках млекопитающих или других позвоночных. Начиная с 1940-х гг. они были впервые использованы в качестве биопестицидов на полях. Кроме того, после публикации первых работ, описывающих избыточную экспрессию β -интерферона человека в клетках насекомых (Smith и др., *Mol. Cell. Biol.*, 3: 2156-2165 (1983)), генно-инженерные бакуловирусы широко используются для получения сложных рекомбинантных белков в культурах насекомых, включая производство антигенов для нескольких одобренных вакцин для человека, а также ветеринарных субъединичных вакцин (van Oers и др. *J. Gen. Virol.* 96: 6-23 (2015)).

Вакцинация является важным инструментом для управления здоровьем стада, в частности, в условиях ограничения плотности, где выращивается много мясомолочного скота. Когда возникает вспышка болезней у животных, которые предположительно были вакцинированы, возникают вопросы, касающиеся того, является ли вакцина неспособной защитить животных, или вакцина не была введена должным образом, причем последняя возможность относительно надлежащей доставки вакцины упоминается как соответствие вакцины.

Использование маркеров соответствия для определения того, правильно ли было вакцинировано животное, является в связи с этим весьма желательным для производителей. Публикация WO 2009/058835 A1 описывает, например, использование очищенной ксиланазы, которая была добавлена в качестве маркера соответствия к вакцине против свиного гриппа. Что касается вакцин, содержащих экспрессируемые бакуловирусом субъединичные антигены, то можно использовать бакуловирусные антигены в качестве маркера соответствия, при этом, однако, используемые в настоящее время системы имеют ограничения для животных, которые определяются как положительные, и для которых требуется большое количество антигена (Gerber и др. *Res. Vet. Sci.* 95:775-81 (2013); Lehnert. *Top. Agrar.* 5: S11-S14 (2011)).

Вакцины, используемые в программах по борьбе со вспышками вируса и инфекциями, должны иметь эффективную систему для мониторинга постоянного присутствия вирусной инфекции в пределах популяции. Однако вакцинация усложняет широкомасштабное наблюдение за распространением инфекции, например, с помощью серологических средств, поскольку как вакцинированные, так и подвергнутые инфицированию особи вырабатывают антитело, специфическое для вируса. Антигенное сходство между инфицирующим вирулентным полевым штаммом вируса и вирусной вакциной часто препятствует разграничению между инфицированными и вакцинированными особями, поскольку вакцинация приводит к возникновению и персистенции антител, которые являются неразличимыми у инфицированных и вакцинированных индивидуумов.

Во всем мире повышается интерес к стратегиям вакцинации DIVA (дифференцирование инфицированных и вакцинированных животных). Например, совместные совещания ВОЗ/Организация ООН по продовольствию и сельскому хозяйству/Международный центр по изучению эпизоотий по штамму вируса птичьего гриппа H5N1 HPAI рекомендовали, чтобы вся вакцинация применялась при использовании DIVA, поскольку в этом случае можно контролировать распространение инфекции. Однако современные методы DIVA трудно масштабировать, поэтому часто существуют проблемы с разграничением вакцинации и заражения другими циркулирующими вирусными штаммами.

Существующие методы мониторинга включают физическую маркировку вакцинированных животных, использование сигнальных животных и вирусологическое тестирование. Однако эти современные методы имеют ряд ограничений из-за материально-технических и экономических причин.

Физическая маркировка вакцинированных животных включает в себя длительную индивидуальную идентификацию вакцинированных индивидуумов с помощью физических средств, таких как ушные метки, полоски на ногах или метки на крыльях. Кроме того, использование невакцинированных сигнальных животных является логически и экономически сложным, и также существует риск, что если дозорные животные заражаются вирусом, например, птица зараженная вирусом H5N1, существует повышенный

риск распространения этого вируса на людей. Вирусологическое тестирование индивидуумов посредством скрининга и обнаружения живых вирусов или контрольного исследования при использовании RT-ПЦР представляет собой весьма дорогостоящий и сложный процесс инфраструктуры, который не является приемлемым для субъединичных вакцин, и предоставляет только информацию, касающуюся текущего индивидуума.

Ввиду указанных ограничений использование маркерных вакцин, которые позволяют осуществлять серологическое разграничение вакцинированных и инфицированных животных, является весьма предпочтительным, при этом такие маркерные вакцины могут быть получены либо как негативная, либо как позитивная маркерная вакцина.

Вакцину с отрицательным маркером получают при использовании антигенной части патогена или путем удаления антигена из патогена, который вызывает образование специфических антител у инфицированных животных. Вакцины с отрицательным маркером обычно представляют собой либо субъединичные вакцины, либо аттенуированные живые вакцины, содержащие генетически сконструированный штамм, в котором отсутствует иммуногенный антиген. Примером для вакцины с отрицательным маркером является, например, использование экспрессированного бакуловирусом белка вируса классической чумы свиней (CSFV) E2 в качестве субъединичного антигена для вакцинации против классической чумы свиней, где обнаружение антител, специфических для других антигенов CSFV, например белка E или белка NS3, в сыворотках вакцинированных свиней свидетельствует об инфекции CSFV.

Положительная маркерная вакцина содержит дополнительный антиген, который индуцирует выработку специфических антител у вакцинированных индивидуумов, но не у инфицированных. Пример подхода при использовании положительной маркерной вакцины описан в WO 2007/053899 A1, где инактивированный вирус H6N2 птичьего гриппа (A1) и столбнячный токсин, которые оба были получены отдельно, были объединены в одну инъекцию для вакцинации птиц, а затем антитела, специфические для столбнячного токсина, определяли в сыворотке, полученной от указанных птиц, в качестве маркеров, свидетельствующих о том, что птицы были вакцинированы.

Однако отдельное производство как вакцинного антигена, так и маркерного антигена, является относительно дорогостоящим и, кроме того, требует этапа смешивания для объединения нескольких компонентов в одном вакцинирующем агенте, причем это дополнительно может также влиять на стабильность вакцинных компонентов/антигенов.

Таким образом, является необходимой простая маркерная система для недорогого производства вакцин с положительным маркером, в частности субъединичных вакцин, включающих экспрессируемые бакуловирусом антигены.

Кроме того, необходимы эффективные маркеры соответствия, которые также позволяют осуществлять чувствительную идентификацию вакцинаций с низким количеством экспрессированного бакуловирусом субъединичного антигена.

Краткое описание фигур

- Фиг. 1 - амплифицированные продукты разгоняли на геле для подтверждения размера;
- фиг. 2 - вырезанную вставку и вектор разгоняли на геле для проверки линейаризации вектора;
- фиг. 3 - положительные клоны из лунок 2, 5, 7, 10, 11 и 12 подвергали секвенированию, а континги выравнивали с эталонной последовательностью конструкции для проверки на мутации; все клоны идеально совпадали;
- фиг. 4 - Вестерн-блоты для оценки экспрессии G гена конструкции;
- фиг. 5 - супернатант, а также растворимые и нерастворимые фракции клеток были исследованы на белок; при этом белок присутствовал в нерастворимой фракции;
- фиг. 6 - результаты эксклюзионной хроматографии размеров при использовании изократических условий на АКТА. Элюирование белков из колонки контролировали с помощью УФ-поглощения при длине волны 280 нм;
- фиг. 7 - результаты ПЦР в реальном времени: в столбце 1 указаны номера ячеек. В столбце 2 показан флюорофор-6-карбоксифлуоресцеин (FAM), связанный с используемым специфическим зондом. В столбце 3 указаны фракции антигена SfRV, которые были получены в результате эксклюзионной хроматографии размеров (фракции A11, A12, B1, B5, B12 и C6), или стандарты с известными количествами специфической для SfRV нуклеиновой кислоты, которые использовали для получения стандартной кривой (ячейки 7-14). Ячейка 15 представляет собой отрицательный контроль (без шаблона), а ячейка 16 представляет собой положительный контроль, содержащий концентрированный антиген SfRV до фракционирования по размерам (SEC);
- фиг. 8 - ELISA: планшеты ELISA покрывали при использовании четырех различных антигенов, включая полуочищенный SfRV (панель A), фракции эксклюзионной хроматографии размеров A11 (панель B), A12 (панель C) и B1 (панель D). Планшеты подвергали зондированию сыворотками при использовании отрицательных контрольных животных (перевернутые треугольники) или сыворотками 28-го дня, взятыми от животных, которым вводили экспериментальную вакцину, содержащую SfRV (кружочки).

Описание изобретения

Решение описанных выше технических проблем достигается при использовании описания и вариантов осуществления, представленных в формуле изобретения.

Таким образом, изобретение в его различных аспектах осуществляется в соответствии с формулой изобретения.

Изобретение основано на неожиданном обнаружении того, что использование клеток Sf⁺, которые инфицированы рабдовирусом, для получения экспрессированных бакуловирусом антигенов позволяет осуществлять недорогое и эффективное производство положительных маркерных вакцин и легкое маркирование природного соответствия, что позволяет получить чувствительный способ, который демонстрирует правильную доставку субъединичной вакцины.

Таким образом, в первом аспекте изобретение обеспечивает способ определения того, получил ли индивидум иммуногенную композицию, в частности вакцину, содержащую рекомбинантный белок, который продуцируется системой экспрессии, предпочтительно с помощью системы экспрессии бакуловируса, в культивированных клетках насекомых, где указанный способ включает стадии получения биологического образца от индивидума и определения в указанном биологическом образце наличия или отсутствия одного или нескольких маркеров, которые показывают, что индивидум получил один или несколько антигенов из вируса, который представляет собой РНК-содержащий вирус, способный заражать клетки насекомых, где присутствие указанных одного или нескольких маркеров в упомянутом биологическом образце указывает на то, что указанный индивидум получил указанную иммуногенную композицию, или где отсутствие указанных одного или нескольких маркеров в указанном биологическом образце указывает на то, что указанный индивидум не получил указанную иммуногенную композицию.

Термин "рекомбинантный белок", как используется в данной заявке, в частности, относится к белковой молекуле, которая экспрессируется из молекулы рекомбинантной ДНК, такой как полипептид, который получают методами рекомбинантной ДНК. Пример таких методик включает случай, когда ДНК, кодирующую экспрессируемый белок, вводят в подходящий вектор экспрессии, предпочтительно вектор экспрессии бакуловируса, который, в свою очередь, используется для трансфекции, или в случае бакуловирусного вектора экспрессии, для инфицирования клетки-хозяина с целью получения белка или ДНК, которая кодирует этот белок. Используемый в данной заявке термин "рекомбинантный белок", в частности, относится к молекуле белка, которая экспрессируется из молекулы рекомбинантной ДНК.

В соответствии с конкретным примером рекомбинантный белок получают с помощью способа, который включает следующие стадии: ген, который кодирует белок, клонируют в бакуловирусный вектор для переноса; этот вектор для переноса используется для получения рекомбинантного бакуловируса, содержащего указанный ген, путем гомологической рекомбинации в клетках насекомых; и белок затем экспрессируется в клетках насекомых во время заражения рекомбинантным бакуловирусом.

В соответствии с альтернативным примером рекомбинантный белок экспрессируется в клетках насекомых из рекомбинантной экспрессионной плазмиды. В случае этого альтернативного примера бакуловирус не является необходимым.

Кроме того, понятно, что термин "рекомбинантный белок, который состоит из последовательности", в частности, также относится к любой котрансляционной и/или посттрансляционной модификации или к модификации последовательности, обусловленной клеткой, в которой экспрессируется полипептид. Таким образом, термин "рекомбинантный белок, который состоит из последовательности", как описано в данной заявке, также является направленным на последовательность, имеющую одну или несколько модификаций, которые вызваны клеткой, в которой экспрессируется полипептид, в частности к модификациям аминокислотных остатков, осуществляемых при биосинтезе белка и/или белков, который(е) предпочтительно является(ются) выбранным(и) из группы, состоящей из гликозилирования, фосфорилирования и ацетилирования.

Предпочтительно, когда рекомбинантный белок в соответствии с настоящим изобретением получают или он может быть получен с помощью бакуловирусной системы экспрессии, в частности, в культивируемых клетках насекомых.

Используемый в данной заявке термин "система экспрессии", в частности, включает в себя носители или векторы для экспрессии гена в клетке-хозяине, а также носители или векторы, которые обеспечивают стабильную интеграцию гена в хромосому хозяина.

Как используется в данной заявке, термин "система экспрессии бакуловируса", в частности, означает систему для получения желаемого белка в клетке насекомого при использовании рекомбинантного вектора на основе бакуловируса, предназначенного для экспрессии указанного белка. Бакуловирусная система экспрессии обычно содержит все элементы, необходимые для достижения экспрессии рекомбинантного белка в клетках насекомых, и обычно включает в себя конструирование бакуловирусного вектора для экспрессии желаемого белка, введение сконструированного бакуловирусного вектора в клетки насекомых, культивирование клеток насекомых, содержащих сконструированный бакуловирусный вектор в подходящей среде для роста, так что желаемый белок экспрессируется, и извлечение белка. Как правило, конструирование бакуловирусного вектора включает в себя конструирование и изоляцию рекомбинантных бакуловирусов, в которых кодирующая последовательность для выбранного гена встраи-

вается за промотором для несущественного вирусного гена, причем большинство используемых в настоящее время бакуловирусных систем экспрессии основываются на последовательности вируса ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV) ((*Virology* 202 (2), 586-605 (1994), депозитный номер NCBI: NC_001623). Бакуловирусные экспрессионные системы являются хорошо известными в данной области техники и описаны, например, в "Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual" David R. O'Reilly, Lois Miller, Verne Luckow, опубли. Oxford Univ. Press (1994), "The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide" Linda A. King, R.D. Possee, опубликовано Chapman & Hall (1992). Типичный неограничивающий пример бакуловирусной системы для получения рекомбинантного белка представляет собой, например, тот, который описан в WO 2006/072065 A2.

В соответствии с первым аспектом настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает способ определения того, получил ли индивидуум иммуногенную композицию, которая включает рекомбинантный белок, продуцируемый системой экспрессии в культивируемых клетках насекомых, при этом указанный способ также называют "способом в соответствии с настоящим изобретением" далее в данной заявке, где указанный способ, в частности, включает определение в биологическом образце, полученном от указанного индивидуума, наличия или отсутствия одного или нескольких маркеров, показывающих, что индивидуум получил один или несколько антигенов из вируса, который представляет собой РНК-содержащий вирус, способный заражать клетки насекомых, и при этом наличие указанного одного или более маркеров в указанном биологическом образце свидетельствует о том, что указанный индивидуум получил указанную иммуногенную композицию.

Как используется в данной заявке, "клетка насекомого" означает клетку или культуру клеток, полученную из видов насекомых. Особый интерес в отношении настоящего изобретения представляют клетки насекомых, полученные из видов *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia*.

Используемый в данной заявке термин "вирус, который способен инфицировать клетки насекомых", в частности, понимается как несущие вирус структуры на поверхности вируса, которые способны взаимодействовать с клетками насекомых до такой степени, что вирус или, по крайней мере, вирусный геном, внедряется в клетку насекомого.

Указанная инфекция клетки насекомого более конкретно включает в себя прикрепление вируса к клетке-хозяину, проникновение вируса в клетку, декапсидацию вириона в цитоплазме, репликацию и транскрипцию вирусного генома, экспрессию вирусных белков, сборку и высвобождение новых инфекционных вирусных частиц.

Предпочтительно иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением представляет собой маркерную вакцину, в частности положительную маркерную вакцину.

Термин "маркерная вакцина", как описано в данной заявке, в частности, означает вакцину, которая приводит к иммунизации в иммунизированном организме, которая отличается от иммунизации организма, вызванной реальным патогеном.

"Вакцина с положительным маркером", в частности, относится к маркерной вакцине, содержащей дополнительный антиген, который индуцирует образование специфических антител, присутствующих у вакцинированных индивидуумов, но не у инфицированных.

Термин "маркер", как используется в контексте настоящего изобретения, предпочтительно является эквивалентным термину "биомаркер" и, в частности, относится к способному к измерению веществу или соединению, которое указывает на то, что индивидуум подвергся воздействию иммуногенной композиции, предпочтительно вакцины с положительным маркером или более конкретно дополнительного антигена положительной маркерной вакцины, которая индуцирует образование специфических антител, обнаруженных у вакцинированных субъектов, но не у инфицированных.

Как используется в данной заявке, термин "иммуногенная композиция", в частности, относится к композиции, которая будет вызывать иммунный ответ у индивидуума, подвергнувшегося воздействию композиции. Иммунный ответ может включать индукцию антител и/или индукцию ответа Т-клеток. В зависимости от предполагаемой функции композиции в нее может быть включен один или несколько антигенов. Предпочтительно иммуногенная композиция, как описано в данной заявке, является вакциной.

Термин "вакцина", как используется в данной заявке, определяется в соответствии с данной областью техники и относится к композиции, которая индуцирует или усиливает иммунитет индивидуума к конкретному заболеванию. С этой целью вакцина включает соединение, которое аналогично патогену или соединению указанного патогена, вызывающего указанное заболевание. При контакте с этим соединением иммунная система индивидуума запускается, чтобы распознать соединение как чужеродное и уничтожить его. Иммунная система впоследствии запоминает контакт с этим соединением, так что при более позднем контакте с патогеном, который вызывает заболевание, обеспечивается легкое и эффективное распознавание и разрушение патогена. В соответствии с настоящим изобретением вакцина может быть в виде любой формуляции для вакцин, известных в данной области техники, таких как, например, вакцины для внутримышечной инъекции, мукозальные вакцины или вакцины для подкожной или внутривенной инъекции, а также вакцины, которые вводятся путем ингаляции, такие как, например, как аэрозоли. Такие вакцинные составы являются хорошо известными в данной области и описаны, например, в Neutra M.R. и др. 2006, *Mucosal vaccines: the promise and the challenge* 6(2): 148-58 или Nijkamp F.P.,

Michael J. Parnham 2011; Principles of Immunopharmacology ISBN-13: 978-3034601351.

Таким образом, способ в соответствии с настоящим изобретением относится, в частности, к способу определения, получил ли индивидуум иммуногенную композицию, включающую рекомбинантный белок, продуцируемый системой экспрессии бакуловируса в культивируемых клетках насекомых, при этом указанный способ включает определение в полученном биологическом образце от указанного индивидуума наличия или отсутствия одного или нескольких маркеров, свидетельствующих о том, что индивидуум получил один или несколько антигенов из вируса, который представляет собой РНК-содержащий вирус, способный заражать клетки насекомых, и где наличие указанного одного или более маркеров в указанном биологическом образце свидетельствует о том, что указанный индивидуум получил указанную иммуногенную композицию.

Предпочтительно, когда биологический образец получают от указанного индивидуума, по крайней мере, через 14 дней и наиболее предпочтительно через 14-35 дней после того, как индивидуум был вакцинирован или, соответственно, предположительно был вакцинирован.

Предпочтительно клетка насекомого, как указано в данной заявке, представляет собой клетку *Spodoptera Frugiperda* (Sf) или клетку из клеточной линии, которая имеет происхождение от *Spodoptera Frugiperda*, и более предпочтительно выбирается из группы, состоящей из клеток Sf9 и клеток Sf+. Соответственно, клетки насекомых, как упоминалось в данной заявке, являются предпочтительно клетками *Spodoptera Frugiperda* (Sf) или клетками из клеточной линии, полученной из *Spodoptera Frugiperda*, и более предпочтительно выбираются из группы, состоящей из клеток Sf9 и Sf+.

Один или более маркеров, которые показывают, что индивидуум получил один или более антигенов из РНК-содержащего вируса, способного инфицировать клетки насекомых, как указано в данной заявке, которые также называются "одним или несколькими маркерами в соответствии с настоящим изобретением" в дальнейшем, предпочтительно представляют собой один или более маркеров, выбранных из группы, которая состоит из: антител, специфических для одного или более антигенов вируса, который представляет собой РНК-содержащий вирус, способный инфицировать клетки насекомых; одного или нескольких антигенов вируса, который представляет собой РНК-содержащий вирус, способный инфицировать клетки насекомых; одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, специфических для РНК-содержащего вируса, способного инфицировать клетки насекомых.

Наиболее предпочтительно, когда один или более маркеров в соответствии с настоящим изобретением являются антителами, специфическими для антигена вируса, который представляет собой РНК-содержащий вирус, способный инфицировать клетки насекомых.

Предпочтительно, когда антитела, как описано в данной заявке, представляют собой поликлональные антитела.

Используемый в данной заявке термин "антитела, специфические для" определенного антигена, в частности, относится к антителам, предпочтительно к поликлональным антителам, которые связывают антиген с аффинностью или K_a (т.е. константой равновесной ассоциации конкретного связывающего взаимодействия при использовании единиц 1/M), например, большей или равной приблизительно 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} или 10^{13} M^{-1} . Альтернативно, связывающая аффинность может быть определена как константа равновесной диссоциации (K_d) конкретного связывающего взаимодействия при использовании единиц M, например, от 10^{-5} M до 10^{-13} M . Связывающие аффинности антител могут быть легко определены при использовании методик, хорошо известных квалифицированному специалисту в данной области техники (см., например, Scatchard и др. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; патенты США №№ 5283173; 5468614; BIACORE® анализ или их эквиваленты).

Один или более антигенов из РНК-содержащего вируса, способного инфицировать клетки насекомых, как упоминалось в данной заявке, которые также называются "одним или более антигенами в соответствии с настоящим изобретением" ниже, предпочтительно представляют собой белок, включающий или состоящий из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, имеет 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и/или белок, включающий или состоящий из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7.

В отношении термина "по крайней мере, 90%", как упоминается в контексте настоящего изобретения, является понятным, что указанный термин предпочтительно относится к "по крайней мере, 91%", более предпочтительно к "по крайней мере, 92%", еще более предпочтительно "по крайней мере, 93%" или, в частности, "по крайней мере, 94%".

В отношении термина "по крайней мере, 95%", как упоминается в контексте настоящего изобретения, является понятным, что указанный термин предпочтительно относится к "по крайней мере, 96%", более предпочтительно "по крайней мере, 97%", еще более предпочтительно "по крайней мере, 98%" или, в частности, "по крайней мере, 99%".

Термин "который имеет 100% идентичности последовательности", как используется в данной заявке, понимается как такой, который является идентичным термину "является идентичным".

Как используется в данной заявке, термин "антиген", в частности, относиться к любому остатку или соединению, которое является способным вызывать иммунный ответ. Такой включает клеточный и/или гуморальный иммунный ответ.

Процент идентичности последовательности имеет признанное в области техники значение, и существует ряд способов для измерения идентичности между двумя полипептидными или полинуклеотидными последовательностями. См., например, Lesk, ред., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, ред., Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin и Griffin, ред., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); и Gribskov и Devereux, ред., Sequence Analysis Primer, M. Stockton Press, New York, (1991). Способы выравнивания полипептидов или полинуклеотидов являются зашифрованными в компьютерных программах, в том числе в программном пакете GCG (Devereux и др., Nuc. Acids Res. 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul и др., J. Molec. Biol. 215: 403 (1990)), и программе Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711), которая использует алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермена (Adv. App. Math., 2:482-489 (1981)). Например, может быть использована компьютерная программа ALIGN, которая использует алгоритм FASTA, с аффинным поиском пробелов со штрафом за открытие пробела -12 и со штрафом за удлинение пробела -2. Для целей настоящего изобретения нуклеотидные последовательности выравниваются при использовании способа Clustal W в MegAlign версии программного обеспечения 11.1.0 (59), 419 от DNASTAR Inc. при использовании набора параметров по умолчанию множественного выравнивания в программе (штраф за пробел = 15,0, штраф за длину пробела = 6,66, отсрочка различающихся последовательностей (%) = 30%, вес транзиции ДНК = 0,50 и вес матричной ДНК = IUB) и, соответственно, белковые/аминокислотные последовательности подвергаются выравниванию при использовании способа Clustal W в программном обеспечении MegAlign, которое использует версию 11.1.0 (59), 419 от DNASTAR Inc., при наборе параметров по умолчанию множественного выравнивания в программе (Gonnet серии веса белковой матрицы со штрафом за пробел = 10,0, штрафом за длину пробела = 0,2 и отсрочкой различающихся последовательностей (%) = 30%).

Как используется в данной заявке, подразумевается, что термин "идентичность последовательности с SEQ ID NO: X" является эквивалентным термину "идентичность последовательности с SEQ ID NO: X по длине последовательности SEQ ID NO: X" или термину "идентичность последовательности с SEQ ID NO: X на протяжении полной длины SEQ ID NO: X" соответственно. В этом контексте "X" представляет собой любое целое число, выбранное из 1-24 так, что "SEQ ID NO: X" представляет собой любую из последовательностей, упомянутых в данной заявке.

Одна или более молекул нуклеиновой кислоты, специфических для РНК-содержащего вируса, способного инфицировать клетки насекомых, как упоминается в данной заявке, которые также называются "одна или более молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением" далее предпочтительно представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют белок, который включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и/или; белок, который включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7; и/или РНК, которая имеет последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; и/или последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15.

Предпочтительно, способ в соответствии с настоящим изобретением включает этапы приведения биологического образца в контакт с реагентом захвата, иммобилизованным на твердой основе, где иммобилизованный реагент захвата является способным к связыванию с одним или более маркерами в соответствии с настоящим изобретением; и определения присутствия или отсутствия одного или более маркеров, связанных с реагентом захвата, где присутствие указанного одного или более маркеров, связанных с реагентом захвата, является показательным для присутствия указанного одного или более маркеров в указанном биологическом образце.

Термин "реагент захвата", как используется в данной заявке, в частности, относится к молекуле или мультимолекулярному комплексу, который может связываться с маркером. Реагент захвата предпочтительно является способным к связыванию с маркером существенно специфическим способом, предпочтительно с аффинностью или $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$ или предпочтительно $> 10^6 \text{ M}^{-1}$. Реагент захвата может необяза-

тельно представлять собой существующую в природе, рекомбинантную или синтетическую молекулу. Белковые и нуклеиновокислотные лиганды (аптамеры) являются в высокой степени приемлемыми в качестве агентов захвата. Цельный вирус или вирусный фрагмент или синтетический пептид могут также выступать в качестве реагентов захвата, поскольку они являются способными к связыванию с антителами.

Как используется в данной заявке, термин "иммобилизованный", в частности, означает, что реагент захвата может быть прикреплен к поверхности (например, твердой основе) любым образом или с помощью любого способа, включая, например, обратимое или необратимое связывание, ковалентное или нековалентное присоединение и подобные им.

Упомянутый в данной заявке реагент захвата является иммобилизованным на твердой основе и является способным к связыванию одного или более маркеров в соответствии с настоящим изобретением, где указанный реагент захвата также далее называется "реагент захвата в соответствии с настоящим изобретением" и является предпочтительно выбранным из группы, которая состоит из: белка, включающего или состоящего из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-6; белка, включающего или состоящего из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8; РНК-содержащего вируса, который является способным инфицировать клетки насекомых, где указанный вирус необязательно был инактивирован; олигонуклеотида, который является способным к специфической гибридизации с последовательностями, характерными для последовательности SEQ ID NO: 9; и олигонуклеотида, который является способным к специфической гибридизации с последовательностями, характерными для последовательности SEQ ID NO: 15.

Термин "специфическая гибридизация", как описывается в данной заявке, в частности, относится к гибридизации в жестких условиях. Указанные условия гибридизации могут быть установлены в соответствии с традиционными прописями, описанными, например, у Sambrook, "Molecular Cloning, A Laboratory Handbook", 2 изд. (1989), CSH Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989); или Higgins and Hames (ред.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC (1985). Пример для условий специфической гибридизации представляет собой гибридизацию в 4×SSC и 0,1% SDS при температуре 65°C с последующим промыванием в 0,1×SSC, 0,1% SDS при 65°C. Альтернативно, жесткие условия гибридизации представляют собой, например, 50% формамид, 4×SSC при 42°C.

Термин "твердый носитель", как упоминается в данной заявке, означает нежидкое вещество и включает в себя чипы, пробирки и частицы (включая микрочастицы и шарики), изготовленные из таких материалов, как полимер, металл (парамагнитные, ферромагнитные частицы), стекло и керамика; гелевые вещества, такие как диоксид кремния, оксид алюминия и полимерные гели; капилляры, которые могут быть изготовлены из полимера, металла, стекла и/или керамики; цеолиты и другие пористые вещества; электроды; микротитровальные планшеты; твердые ленты; и кюветы, трубки или другие контейнеры для образцов спектрометра. Твердый компонент носителя для анализа отличается от инертных твердых поверхностей, с которыми аналитические компоненты могут контактировать тем, что "твердый носитель" содержит, по крайней мере, один фрагмент на своей поверхности, который предназначен для взаимодействия с реагентом захвата, либо непосредственно, либо опосредованно. Твердый носитель может быть статическим компонентом, таким как трубка, лента, кювета или микротитровальный планшет, или может быть нестационарным компонентом, таким как шарики и микрочастицы. Микрочастицы могут также использоваться в качестве твердого носителя для гомогенных форматов анализа. Могут использоваться различные микрочастицы, которые допускают как нековалентное, так и ковалентное присоединение белков и других веществ. Такие частицы включают полимерные частицы, такие как полистирол и поли(метилметакрилат); частицы золота, такие как наночастицы золота и коллоиды золота; и керамические частицы, такие как частицы диоксида кремния, стекла и оксида металла. См., например, Martin, C.R., и др., *Analytical Chemistry-News & Features* 70 (1998) 322A-327A, который включен в данную заявку в качестве ссылки.

"Чип" представляет собой твердый, непористый материал, такой как металл, стекло или пластмасса. Материал необязательно может наноситься полностью или в определенных участках. На поверхности материала присутствует любой набор пятен, либо видимый, либо в системе координат. На каждом пятне может быть иммобилизован определенный полипептид, с линкером или спейсером или без них на поверхности материала. Все документы, упомянутые в данной заявке, как выше, так и ниже, включены в нее в качестве ссылки.

РНК-содержащий вирус, способный инфицировать клетки насекомых, как упоминается в данной заявке, который также называется "РНК-содержащим вирусом в соответствии с настоящим изобретением".

ем", далее предпочтительно представляет собой вирус, содержащий одноцепочечную (-)РНК, и необязательно представляет собой вирус, который принадлежит к семейству Rhabdoviridae; и/или вирус, который включает белок, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; и/или белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7; и/или вирус, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, который включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; и/или белок, который включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7; и/или вирус, геном которого включает молекулу РНК, имеющую последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; и/или последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15.

Все нуклеотидные последовательности, приведенные в списке последовательностей, являются представленными в направлении 5' - 3'. Последовательности SEQ ID NO: 9 и 15 кодируют кДНК, которые имеют позитивную полярность (+ цепочка). Термин "обратно комплементарный" означает, что последовательность является антипараллельной референтной последовательности.

РНК-содержащий вирус в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является способным реплицироваться, по крайней мере, в течение двух или более, предпочтительно, по крайней мере, трех недель в клеточной линии насекомых.

Предпочтительно, когда способ в соответствии с настоящим изобретением включает определение в биологическом образце присутствия или отсутствия одного или более маркеров в соответствии с настоящим изобретением, где указанные маркеры представляют собой антитела, специфические для белка, который включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; или антитела, специфические для белка, который включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7; и где указанный способ включает этапы:

а) приведение биологического образца в контакт с реагентом захвата, иммобилизованным на твердой основе, где реагент захвата является выбранным из группы, которая состоит из белка, который включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-6, или последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, необязательно инактивированного вируса, который включает белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; и/или белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, вируса, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; и/или белка, который включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более

предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, где указанный вирус был необязательно инактивирован, вируса, геном которого включает молекулу РНК, включающую последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; и/или последовательности, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, где указанный вирус был необязательно инактивирован.

b) отделение биологического образца от иммобилизованного реагента захвата;

c) приведение в контакт комплекса иммобилизованный реагент захвата-антитело со способным к определению агентом, который связывается с антителом комплекса реагент-антитело; и

d) измерение уровня антител, связанных с реагентом захвата, при использовании средств определения для способного к определению агента, и где этап измерения (d) предпочтительно дополнительно включает сравнение со стандартной кривой для определения уровня антител, связанных с реагентом захвата.

Предпочтительно, когда указанный способный к определению агент, который связывается с антителом комплекса реагент-антитело, представляет собой способное к определению антитело, более предпочтительно меченое вторичное антитело.

Реагент захвата, как описывается в данной заявке, предпочтительно представляет собой белок, который экспрессируется в бакуловирусе, и указанный экспрессируемый бакуловирусом белок предпочтительно экспрессируется бакуловирусом в соответствии с настоящим изобретением, как описано в данной заявке ниже.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом изобретения один или более маркеров в соответствии с настоящим изобретением могут также представлять собой одну или более Т-клеток, специфических для РНК-содержащего вируса в соответствии с настоящим изобретением, и/или одну или более В-клеток, специфических для РНК-содержащего вируса в соответствии с изобретением, и/или одну или более антиген-презентирующих клеток, которые презентуют один или более антигенов в соответствии с настоящим изобретением. Присутствие или отсутствие указанных одной или более В-клеток и/или указанных одной или более Т-клеток, и/или указанных одной или более антиген-презентирующих клеток предпочтительно определяют с помощью проточной цитометрии, и где, в частности, один или более флуоресцентно меченных антигенов в соответствии с настоящим изобретением используются для мечення указанных одной или более В-клеток и/или указанных одной или более Т-клеток, и/или где одно или более флуоресцентно меченных антител, специфических для РНК-содержащего вируса в соответствии с настоящим изобретением, используются для мечення указанных одной или более антиген-презентирующих клеток.

Рекомбинантный белок, который продуцируется системой экспрессии в культивируемых клетках насекомых, как упоминается в данной заявке, который также называется "рекомбинантным белком в соответствии с настоящим изобретением" в дальнейшем в данной заявке предпочтительно представляет собой белок ORF2 PCV2, и указанный белок ORF2PCV2, в частности, представляет собой белок, который имеет, по крайней мере, 90%, предпочтительно, по крайней мере, 91%, более предпочтительно, по крайней мере, 92%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 93% или, в частности, по крайней мере, 94% или, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом изобретения рекомбинантный белок в соответствии с настоящим изобретением представляет собой гемагглютинин вируса гриппа, в частности гемагглютинин вируса птичьего гриппа, где указанный гемагглютинин вируса птичьего гриппа предпочтительно представляет собой H5 белок вируса H5N1, и где указанный H5 белок вируса H5N1 более предпочтительно представляет собой белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24.

Способ в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно дополнительно включает этап определения в биологическом образце присутствия одного или более аналитических агентов, выбранных из группы, которая состоит из антител, специфических для рекомбинантного белка в соответствии с настоящим изобретением, полипептида, специфического для рекомбинантного белка в соответствии с настоящим изобретением, нуклеотидной последовательности, специфической для последовательности ДНК, которая кодирует рекомбинантный белок в соответствии с настоящим изобретением.

В контексте способа в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция предпочтительно представляет собой иммуногенную композицию, как описано в данной заявке ниже.

Термин "биологический образец", как используется в данной заявке, относится к любому образцу, взятому от индивидуума (например, от свиньи или птицы), и включает, без ограничения, содержащие

клетки жидкости организма, периферическую кровь, плазму крови или сыворотку, слюну, тканевые гомогенаты, аспираты легких и других органов, растворы лаважа и клизмы, а также любой другой источник, который можно получить от человека или животного. Для животных примерами "биологического образца" являются кровь, клетки, фекалии, образцы испражнений, молоко, слизь, мокрота, гной, слюна, сперма, пот, слезы, моча, окулярные жидкости, выделения из влагалища и рвота, если они присутствуют в этом животном.

Биологический образец, как упоминается в данной заявке, предпочтительно является изолированным от млекопитающего или птицы, предпочтительно от свиней или курей (*Gallus gallus domesticus*), и/или, в частности, является выбранным из группы, которая состоит из цельной крови, плазмы крови, сыворотки, мочи и оральных жидкостей. В данной заявке термин "сыворотка" подразумевается как таковой, который является эквивалентным "сыворотке крови".

Термин "оральные жидкости", как используется в данной заявке, в частности, относится к одной или более жидкостям, обнаруженным в ротовой полости индивидуально или в комбинации. К таковым относятся, но без ограничения, слюна и мукозальный транссудат. При этом понятно, что оральные жидкости могут содержать комбинацию жидкостей из ряда источников (например, околоушных, подчелюстных, подъязычных, вспомогательных желез, слизистой оболочки десен и слизистой оболочки рта), а термин "пероральные жидкости" включает жидкости из каждого указанного источника индивидуально или в сочетании. Термин "слюна" относится к комбинации оральных жидкостей, таких, которые обычно содержатся во рту, в частности, после жевания. Термин "мукозальный транссудат", как используется в данной заявке, относится к жидкости, полученной путем пассивной диффузии компонентов сыворотки из интерстициальной слизистой оболочки полости рта в полость рта. Транссудат слизистой оболочки часто образует один компонент слюны. Иммуобилизованный реагент захвата, как описывается в данной заявке, предпочтительно наносится на микротитровальный планшет, в частности, на микротитровальный планшет, который возможно использовать для считывания с помощью считывающего устройства для ELISA.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантный бакуловирус, где указанный бакуловирус включает последовательность ДНК, кодирующую белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-6; и/или белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8; и/или где указанный бакуловирус включает последовательность ДНК, которая включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 9-14; и/или последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает вектор, в частности вектор переноса, который содержит последовательность ДНК, кодирующую белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-6; и/или белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8; и/или которая содержит последовательность, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 9-14; и/или последовательность ДНК, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

Вектор переноса в контексте настоящего изобретения предпочтительно представляет собой "бакуловирусный вектор переноса".

Термин "вектор переноса" является общепризнанным в области техники и относится к первой молекуле нуклеиновой кислоты, к которой была присоединена вторая молекула нуклеиновой кислоты, и включает, например, плазмиды, космиды и фаги.

В некоторых вариантах осуществления вектор переноса может быть "вектором экспрессии", который относится к реплицирующейся конструкции ДНК, которая используется для экспрессии ДНК, коди-

рующей желаемый белок, и которая включает блок транскрипции, содержащий комплекс (i) генетического(их) элемента(ов), который(ые) имеет(ют) регуляторную роль в экспрессии генов, например промоторы, операторы или энхансеры, функционально связанные с (ii) последовательностью ДНК, кодирующей желаемый белок, который транскрибируется в мРНК и транслируется в белок, и (iii) подходящие последовательности инициации транскрипции и трансляции и терминации. Выбор промотора и других регуляторных элементов обычно зависит от предполагаемой клетки-хозяина. В общем случае, используемые векторы экспрессии в методиках рекомбинантной ДНК часто представлены в виде "плазмид", которые относятся к кольцевым двухцепочечным петлям ДНК, которые в своей векторной форме не связаны с хромосомой. Изобретение является предназначенным для включения таких других форм векторов экспрессии, которые выполняют эквивалентные функции и которые впоследствии станут известны в данной области техники.

Некоторые векторы переноса могут содержать регуляторные элементы для контроля транскрипции или трансляции, которые в общем случае могут иметь происхождение от генов млекопитающих, микробов, вирусов или насекомых. Способность к репликации в хозяине обычно обеспечивается источником репликации, при этом может быть дополнительно введен ген селекции для того, чтобы способствовать распознаванию трансформантов.

Векторы переноса, которые имеют происхождение от вирусов, которые могут упоминаться как "вирусные векторы", могут использоваться в некоторых вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением. Некоторые примеры включают бакуловирусы, ретровирусы, аденовирусы и т.п. Вирусные векторы, в частности, бакуловирусные векторы, например бакуловирусный вектор переноса, являются, в частности, предпочтительными в соответствии с настоящим изобретением. Что касается векторов экспрессии, то вирусные векторы могут включать регуляторные элементы.

Конструирование любого вектора переноса может зависеть от таких факторов, как выбор хозяйской клетки, которую подвергают трансформации, и/или типа белка, который желают экспрессировать. Кроме того, могут приниматься во внимание количество копий вектора, способность к контролю количества копий и экспрессии каких-либо других белков, которые кодируются этим вектором, таких как антибиотические маркеры (например, ампициллин).

Еще в одном дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, которая также далее называется "иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением", где указанная композиция включает рекомбинантный белок, который вырабатывается бакуловирусной системой экспрессии в культивируемых клетках насекомых; и один или более антигенов из РНК-содержащего вируса в соответствии с настоящим изобретением, где указанный вирус предпочтительно был инактивирован; и где указанный рекомбинантный белок является предпочтительно выбранным из группы, которая состоит из ORF2 белка PCV2, который предпочтительно включает или состоит из последовательности, которая имеет, по крайней мере, 90%, предпочтительно, по крайней мере, 91%, более предпочтительно, по крайней мере, 92%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 93% или, в частности, по крайней мере 94% или, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23; и гемагглютини́на вируса гриппа, в частности гемагглютини́на вируса птичьего гриппа, предпочтительно H5 белка вируса H5N1, более предпочтительно белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24; и белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-8.

Термин "инактивированный", как используется в данной заявке, означает то, что этот антиген не вызывает заболевания, когда вводится млекопитающему-хозяину или не реплицируется в клетке-хозяине.

В данной области техники известны различные физические и химические способы инактивации. Термин "инактивированный" относится к ранее вирулентному или не вирулентному вирусу, который подвергся облучению (ультрафиолетовому (УФ), рентгеновскому, электронно-лучевому или гамма-излучению), подвергся нагреванию или химической обработке для инактивации, сохраняя при этом свою иммуногенность. В одном варианте осуществления инактивированный вирус, который раскрыт в данной заявке, является инактивированным путем обработки инактивирующим агентом. Подходящие инактивирующие агенты включают β -пропиолактон, бинарный или β -, или ацетил-этиленимин, глутаровый альдегид, озон и формалин (формальдегид).

Для инактивации формалином или формальдегидом формальдегид обычно смешивают с водой и метиловым спиртом для получения формалина. Добавление метилового спирта предотвращает деградацию или перекрестную реакцию во время процесса активации.

В частности, термин "инактивированный" означает, что вирус является неспособным к репликации *in vivo* или *in vitro*. Например, термин "инактивированный" может относиться к вирусу, который был

размножен, например, *in vitro*, и затем был дезактивирован при использовании химических или физических средств так, чтобы он больше не был способен к репликации.

Предпочтительно, когда вирус в соответствии с настоящим изобретением, который был инактивирован, представляет собой вирус, инактивированный с помощью бинарного этиленимина (BEI).

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением, который включает этапы введения рекомбинантного бакуловируса, который кодирует указанный рекомбинантный белок, в клетку насекомого, где указанная клетка насекомого является инфицированной указанным РНК-содержащим вирусом, способным инфицировать клетки насекомых, культивирования указанной клетки насекомого, которая несет указанный рекомбинантный бакуловир и указанную РНК вируса; и извлечение указанного рекомбинантного белка из указанного вируса предпочтительно в супернатант; и предпочтительно дополнительно включает начальный этап встраивания последовательности ДНК, которая кодирует указанный рекомбинантный белок, в вектор переноса, способный к введению указанной последовательности в геном бакуловируса, продуцируя, таким образом, рекомбинантный бакуловир.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение обеспечивает набор, в частности, аналитический набор для определения, получал ли индивидуум иммуногенную композицию, включающую рекомбинантный белок, который продуцируется бакуловирусной системой экспрессии в культивируемых клетках насекомых, где указанный набор содержит один или более реагентов захвата, иммобилизованных на твердой основе, где один или более иммобилизованных реагентов захвата являются способными к связыванию одного или более маркеров, выбранных из группы, которая состоит из антител, специфических для одного или более антигенов в соответствии с настоящим изобретением; одного или более антигенов из РНК-содержащего вируса в соответствии с настоящим изобретением и одной или более молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением; и где указанный один или более реагентов захвата являются предпочтительно выбранными из группы, которая состоит из белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-6; белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет, по крайней мере, 70%, предпочтительно, по крайней мере, 80%, более предпочтительно, по крайней мере, 90%, еще более предпочтительно, по крайней мере, 95% или, в частности, 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8; РНК-содержащего вируса, способного инфицировать клетки насекомых, где указанный вирус был необязательно инактивирован; олигонуклеотида, который является способным к специфической гибридизации с последовательностями с характеристиками SEQ ID NO: 9; и олигонуклеотида, который является способным к специфической гибридизации с последовательностями с характеристиками SEQ ID NO: 15.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает праймер или пару праймеров, соответственно, выбранных из группы, которая состоит из последовательностей, которые имеют, по крайней мере, 90% или предпочтительно, по крайней мере, 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 17-22.

В соответствии с другим аспектом реагент захвата в соответствии с настоящим изобретением включает или состоит из вирусных частиц и/или вирусоподобных частиц РНК-содержащего вируса, способного инфицировать клетки насекомых, где указанный РНК-содержащий вирус, способный инфицировать клетки насекомых, предпочтительно представляет собой РНК-содержащий вирус в соответствии с настоящим изобретением, и где указанный реагент захвата получают с помощью способа, который включает следующие этапы:

i) получение супернатанта из культуры клеток насекомых, инфицированных с помощью РНК-содержащего вируса, предпочтительно при использовании РНК-содержащего вируса в соответствии с настоящим изобретением, где указанный супернатант включает вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы РНК вируса, и где указанные клетки насекомых не являются предпочтительно инфицированными бакуловиром и/или предпочтительно не являются трансфицированными с помощью плазмиды,

ii) отделение клеточного дебриса от указанных вирусных частиц и/или вирусоподобных частиц при использовании стадии разделения, включающей микрофльтрацию, по крайней мере, через один фильтр, предпочтительно два фильтра, где, по крайней мере, один фильтр, который предпочтительно имеет размер пор больше, чем указанные вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы, в частности, имеет размер пор от приблизительно 0,1 до приблизительно 4 мкм, предпочтительно от приблизительно 0,2 до приблизительно 2 мкм, и сбор фильтрата,

iii) и необязательное осуществление эксклюзионной хроматографии размеров при пропускании фильтрата ii), который содержит указанные вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы, где предпочтительно присутствие белка в элюенте измеряют путем измерения поглощения света элюентом при 260 нм или 280 нм (A_{260} или A_{280}), и где собирают элюент, который демонстрирует первый пик A_{260} или A_{280} .

Изобретение также обеспечивает композицию, которая включает указанный реагент захвата, где указанную композицию получают с помощью указанного способа.

На описанной в данной заявке стадии эксклюзионной хроматографии размеров (SEC) молекулы разделяют в соответствии с их размером в слое, заполненном инертной пористой средой, в частности инертной гелевой средой, которая представляет собой композицию поперечно-сшитых полисахаридов, например поперечно-сшитой агарозы и декстрана в виде сферических гранул. Молекулы, большие, чем наибольшие поры в набухших гелевых шариках, не попадают в гелевые гранулы и, следовательно, быстрее проходят через хроматографический слой. Меньшие молекулы, которые поступают в гелевые шарики в различной степени в зависимости от их размера и формы, замедляются при прохождении через слой. Таким образом, молекулы обычно элюируются в порядке уменьшения молекулярного размера. Колонка SEC, содержащая среду, подходящую для эксклюзионной хроматографии размеров, описанной в данной заявке, предпочтительно представляет собой колонку HiPrep 26/60 Сефакрил S300HR (GE Healthcare Bio-Sciences).

В частности, является понятным, что элюент, проявляющий первый пик A_{260} или A_{280} , представляет собой фракцию фильтрата ii), содержащую самые крупные белковые структуры, включенные в фильтрат ii). Таким образом, элюент, который демонстрирует первый пик A_{260} или A_{280} , представляет собой элюент или его часть, содержащую большую часть вирусных частиц и/или вирусоподобных частиц, включенных в фильтрат ii).

Примеры

Приведенные ниже примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения. Они не должны ограничивать объем применения формулы изобретения каким-либо образом.

Пример 1. Инфицирование клеток Sf рабдовирусом, получение полуочищенного рабдовируса и клонирование и экспрессия антигенов рабдовируса.

Для того чтобы подтвердить инфицирование клеток Sf+ и Sf9 рабдовирусом, которые также называются SFRV или SFRV (Sf-клетки с рабдовирусом) в дальнейшем, праймеры были сконструированы таким образом, чтобы амплифицировать гены G и N SFRV с целью введения уникальных 5' и 3' сайтов рестрикции. Кроме того, 3'-концевой праймер был сконструирован для добавления сайта расщепления протеазой вируса гравировки табака (TEV) с последующим добавлением 6X гистидиновой метки. Это было сделано для того, чтобы обеспечить очистку экспрессированного белка на никелевой колонке при использовании метки His с последующим отщеплением His-метки при использовании протеазы TEV для получения нативного белка G или N.

Последовательности праймеров, используемых для конструкций G гена (включая последовательность SEQ ID NO: 1), являются последовательностями, как представлено в SEQ ID NO: 17 и 18, последовательность нуклеиновой кислоты для конструкции G гена обеспечивается в SEQ ID NO: 12, аминокислотная последовательность для конструкции G гена представляет собой SEQ ID NO: 4.

Последовательности праймеров, используемых для конструкций N гена (включая последовательность SEQ ID NO: 7), являются последовательностями, как представлено в SEQ ID NO: 21 и 22, последовательность нуклеиновой кислоты для конструкции N гена обеспечивается в SEQ ID NO: 16, аминокислотная последовательность для конструкции N гена представляет собой SEQ ID NO: 8.

Кроме того, трансмембранные и интрацеллюлярные домены SFRV G гликопротеина прогнозировали при использовании TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), как описано у K. Hofmann & W. Stoffel (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374, 166, TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), которая использует скрытую Марковскую модель, описанную у Moller S.I., Croning M.D., Apweiler R., Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions, Bioinformatics (2001) 17 (7): 646-653 и SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>). На основе результатов, полученных из TMpred и TMHMM, последовательность G SFRV заканчивалась аминокислотой 550 и TEV сайтом расщепления, также прибавляли 6X His метку и Pst I сайты. Последовательности праймеров, которые использовались для каждой конструкции G гена (включая последовательность SEQ ID NO: 2), являются последовательностями, как представлено в SEQ ID NO: 17 и 19, последовательность нуклеиновой кислоты для конструкции G гена обеспечивается в SEQ ID NO: 13, и аминокислотная последовательность для конструкции G гена представляет собой SEQ ID NO: 5.

Кроме того, последовательность секреторного сигнала мелитина медоносных пчел сливали с укороченной последовательностью SFRV G (Chouljenko и др. J. Virol., 84: 8596-8606 (2010); Tessier и др. Gene. 98: 177-83 (1991)), где последовательность мелитина прибавляли к полноразмерному G SFRV с сайтом расщепления TEV и 6X his путем замены ее N терминального конца. Последовательности праймеров, используемых для таких конструкций G гена (включая последовательность SEQ ID NO: 3), являются последовательностями, как представлено в SEQ ID NO: 20 и 18, последовательность нуклеиновой кислоты для конструкции G гена обеспечивается в SEQ ID NO: 14, и аминокислотная последовательность для конструкции G гена представляет собой SEQ ID NO: 6.

Полную геномную последовательность SFRV в соответствии с MA и др. (J. Virol. 88: 6576-6585 (2014)), которая является депонированной в GenBank (депозитный номер KF947078), использовали в

качестве основы для конструирования праймера. Подобно этому, для TEV сайта расщепления использовали последовательность ENLYFQG на основе доступной опубликованной информации.

SFRV очищали из отработанной среды, используемой при росте Sf9 (прикрепленных клеток) и Sf+ (суспензионных клеток): отработанную среду собирали из инфицированных SFRV и традиционно размноженных клеток Sf9 и Sf+ и фильтровали через фильтр 0,2 мкм для удаления клеточного дебриса. Затем фильтрат загружали в 30% сахарозный раствор в буфере NaCl-Трис HCl-ЭДТА (NTE) с pH 7,4 и подвергали ультрацентрифугированию при 32000 об/мин при 4°C в течение 3 ч. Супернатант осторожно отсасывали и осадок регидратировали и повторно суспендировали в буфере NTE. Общее содержание белка измеряли на устройстве с нанокляпями, а аликватам присваивали номера партий и замораживали при $\leq -70^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования. Этот препарат антигена содержал полуочищенный вирус для покрытия планшетов ELISA, как описано ниже.

Отработанную среду SF9 использовали в качестве источника экстракции вирусной РНК SFRV. Набор для экстракции вирусной РНК QIAamp (Qiagen) использовали в соответствии с инструкциями производителя.

Для амплификации генов G и N набор One-Step Superscript III использовали в соответствии с инструкциями производителя. Градиентную ПЦР в реальном времени использовали при следующих условиях: 1 цикл при 60°C в течение 30 мин (этап обратной транскрипции), после чего осуществляли один цикл при 94°C в течение 2 мин. После этого осуществляли 40 циклов при 94°C в течение 15 с, градиент отжига 75°C-50°C в течение 60 с, после этого проводили удлинение при 68°C в течение 2 мин. В завершение реакционную смесь подвергали одному циклу при 68°C в течение 5 мин после окончания процедуры. Образцы выдерживали при 4°C.

Амплифицированные продукты разгоняли на геле для подтверждения размеров. Полосы геля ожидаемого размера вырезали из геля и очищали при использовании Qiaquick набора для гелевой экстракции при использовании инструкций производителя (фиг. 1).

Далее по тексту описывается только дополнительная работа при использовании гена G (включая последовательность SEQ ID NO: 1).

Амплифицированный ген G (верхняя полоса на фиг. 1) с ожидаемым размером ~1,6 Кб вырезали и экстрагировали из геля, как описано ранее. Затем его разрезали при использовании рестрикционных ферментов Eco RI и Pst I. Полученный продукт представлял собой вставку. Аналогично, бакуловирусный вектор переноса в форме плазмиды pVL1393 (Pharmingen) разрезали рестрикционными ферментами Eco RI и Pst I для получения вектора. Вырезанную вставку и вектор разгоняли на геле (см. фиг. 2) для проверки линейаризации вектора. Полоски вырезали и экстрагировали из геля и вектор подвергали дефосфорилированию. Клонировали вставку (разрезанная с помощью Eco RI-Pst I конструкция SFRV-G) в вектор (разрезанный Eco RI-Pst I pVL1393, дефосфорилированный) и лигировали при использовании стандартных процедур.

Лигированный продукт использовали для трансформации клеток E. coli (One Shot Max efficiency DH5a химически компетентные клетки от Invitrogen), и клетки высаживали на LB агар с добавлением ампициллина. Колонии собирали на следующий день и подвергали скринингу на поглощение плазмиды при использовании ПЦР колоний и присваивали номера колониям.

Условия реакции для ПЦР колоний были следующими: один цикл при 98°C в течение 3 мин с последующими 34 циклами денатурации при 98°C в течение 30 с, отжиг при 58°C в течение 30 с и удлинение при 72°C в течение 2 мин. После этого этапа осуществляли заключительный этап удлинения при 72°C в течение 10 мин и выдерживали после окончания процедуры при 4°C.

Продукты ПЦР разгоняли на агарозном геле для идентификации клонов, которые содержали плазмиду (см. фиг. 3).

Положительные клоны затем выращивали на LB-ампициллиновом бульоне, и плазмиду очищали от культур при использовании набора для очистки плазмиды QIAPrep miniprep (Qiagen) при использовании инструкций производителя. Вектор переноса, полученный таким образом, содержал конструкцию гена G SFRV, его разделяли на аликвоты, которым присваивали серию номеров.

Для получения рекомбинантных бакуловирусов, экспрессирующих конструкцию гена G SFRV, плазмиду для переноса совместно трансфицировали линейаризованной ДНК flashBAC ULTRA бакуловируса (Genway biotech) в клетки Sf9 при использовании реагента для трансфекции ESCORT (SAFC). Через неделю супернатантами, полученными в результате трансфекции (p0), инокулировали свежие клетки Sf9 для амплификации любых рекомбинантных бакуловирусов, которые могли быть получены.

Осадок клеток, полученный в результате трансфекции, собирали, разгоняли на SDS-геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану для Вестерн-блоттинга. Белок зондировали при использовании антитела против His (Invitrogen). Размер прогнозируемого белка составлял ~71,5 кДа. Гель показал (фиг. 4) два близких пятна, которые соответствуют маркеру 62 кДа и выше, для всех пяти проверенных клонов (2, 5, 7, 10 и 11) и отсутствие каких-либо пятен в дорожке клеточного контроля (cc).

Клоны 2 и 5 рекомбинантного вируса далее дополнительно пассировали и выращивали в центрифужных колбах для массового производства белка в суспензионной культуре Sf+. Супернатант, растворимые и нерастворимые фракции клеток подвергали исследованию на белок. В это время белок присут-

ствовал только в нерастворимой части (фиг. 5). В результате были получены укороченные с С-конца гликопротеины G SFRV в качестве следующего этапа для использования в анализе ELISA.

Пример 2. Разработка ELISA.

Был разработан ELISA для оценки присутствия ответа антитела против SFRV у животных, вакцинированных при использовании PCV2 или других субъединичных вакцин на основе бакуловируса, экспрессированного в инфицированных SFFV клетках Sf. Вкратце, планшет ELISA покрывали 250 нг/ячейка полуочищенным антигеном SFRV (как описано выше) из супернатанта клеток Sf9 или Sf+.

Покрывание проводили путем разбавления антигена в карбонатно-бикарбонатном буфере с pH 9,0 с получением конечной концентрации 250 нг/ячейка. Покрывание осуществляли при температуре 4°C в течение ночи.

Планшет промывали на следующий день с помощью PBS-Tween (PBST) и блокировали при использовании 10% молока в течение 1 ч при комнатной температуре.

Затем планшеты зондировали разведенной в соотношении 1:100 сывороткой (в блокирующем буфере), полученной от животных, вакцинированных PCV2 субъединичным антигеном, бакуловирусом, экспрессированным в инфицированных SFF клетках Sf, или такой, которую получали от невакцинированных контрольных групп (см. раздел данных).

Планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 ч и затем промывали 5 раз с помощью PBST для устранения несвязанных антител.

Затем планшеты зондировали разведенными в соотношении 1:100000 вторичными антителами (конъюгат козий антисвиной IgG H + L-HRP от Bethyl laboratories), инкубировали при 37°C в течение 1 ч и затем промывали 5 раз с помощью PBST для устранения несвязанных антител.

В завершение добавляли субстрат SureBlue TMB (KPL) и планшеты инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, а затем останавливали реакцию с помощью раствора для остановки реакции TMB (KPL).

Затем планшеты считывали при 450 нм. Распределения в планшетах ELISA были следующими:

ряд а, ячейки 1-10 покрывали SFRV, полученным из Sf9,

ряд b, ячейки 1-10 покрывали SFRV, полученным из Sf9.

Сыворотки свиней оценивались в виде двукратных повторностей, и животных, которые были вакцинированы с помощью PCV2 (A, B) субъединичного антигена, выделяли жирным шрифтом. Такие должны были показать положительные результаты, если животные уже сталкивались с SFRV путем вакцинации и вырабатывали антитела к SFRV.

Отрицательные контроли выделяли курсивом (C и D).

Столбцы 9 и 10 представляют собой контроли буфера (без первичных антител).

Результаты ELISA показаны в таблице.

	A		B		C		D			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ряд а	0,774	0,626	0,217	0,215	<i>0,058</i>	<i>0,098</i>	<i>0,095</i>	<i>0,091</i>	0,044	0,039
Ряд b	0,857	0,909	1,556	1,028	<i>0,993</i>	<i>0,554</i>	<i>0,104</i>	<i>0,103</i>	0,041	0,033

В таблице представлены данные оценки антигена SfRV, который имеет происхождение из клеток Sf9 (ряд а) и клеток Sf+ (ряд b). Четыре образца сыворотки были оценены в двукратной повторности. Столбцы A и B содержали сыворотку 28-го дня, полученную от животных, вакцинированных экспериментальной вакциной, в то время как столбцы C и D содержали сыворотку от отрицательных контрольных животных. Результаты показывают, что как Sf9, так и Sf+ клетки содержат SfRV и могут быть использованы в качестве антигена вируса. Кроме того, специфическое распознавание антигена у вакцинированных, но не контрольных животных указывает на полезность SfRV как неотъемлемого маркера соответствия.

Интерпретация данных.

Исходя из полученных значений ELISA, животные, вакцинированные с помощью субъединичного антигена PCV2 (группы A и B), демонстрируют хороший ответ против полуочищенного SFRV.

Животные отрицательного контроля (группы C и D) не проявляют реакции на полуочищенный SFRV.

Результаты показывают полезность SFRV для характерной маркировки соответствия и для подхода DIVA.

Пример 3.

ELISA при использовании SFRV антигена (где антиген представляет собой белок, включающий любую из последовательностей SEQ ID NO: 1-6, или где антиген является очищенным или полуочищенным вирусом в соответствии с настоящим изобретением), как описано выше.

Объект исследования: исследовали образцы сыворотки (или оральных жидкостей) на присутствие антител к SFRV антигенам.

Материалы и методы.

А. Оборудование:

устройство для промывки ELISA,
 считывающее устройство для ELISA,
 WFI для культуры клеток, USP (Gibco, каталожный номер # A12873-02),
 карбонат-бикарбонатный буфер (pH 9,6) (Sigma, каталожный номер # C3041-100CAP),
 планшеты для иммунных анализов на 96 лунок (планшеты с круглым или плоским дном, Nunc Maxisorb),

12-канальные устройства для пипетирования, различные пипетки с диапазоном от 1 мкл до 1 мл,
 наконечники для пипеток,
 термостат на 37°C,
 холодильник на 4°C,
 вортекс,
 крышки для планшетов (Thermo, каталожный номер # AB-0752),
 S-блоки для разведения 2 мл (Phenix каталожный номер # M-1810S или эквивалент),
 резервуары для реагентов,
 таймер.

В. Реагенты.

1. Буфер для покрытия: карбонатно-бикарбонатный буфер,
 100 мл WFI,

1 капсула карбонатно-бикарбонатного буфера,
 открывают капсулу, распределяют порошок в WFI, перемешивают до растворения,
 фильтруют стерилизующий раствор при использовании фильтра 0,2 мкм,
 хранение при температуре 4°C,
 срок хранения: 1 неделя,
 для анализа необходимо (4 планшета): 50 мл.

2. 10XPBS:

1 упаковка концентрата PBS, Fisher BP665-1,
 доводят до 1 л при использовании GenPur H₂O (или эквивалента),
 хранение при комнатной температуре,
 срок хранения: 1 год.

3. Раствор буфера для промывания: 0,05% Tween 20 в PBS Дюльбекко,
 0,5 мл Tween 20, Fisher BP337 или эквивалента,
 100 мл 10X D-PBS, pH 7,2-7,4,
 доводят до 1 л при использовании GenPur H₂O (или эквивалента) pH до 7,2 ± 0,1,
 хранение при комнатной температуре,
 срок хранения: 6 месяцев,
 для анализа необходимо (4 планшета): 2 л.

4. PBST:

500 мл 1X PBS pH 7,4 (Gibco, каталожный номер #10010-023),
 0,3 мл Tween 20, Fisher BP337 или эквивалента,
 хранение при комнатной температуре,
 срок хранения: 6 месяцев,
 для анализа необходимо (4 планшета): 100 мл.

5. Блокирующий раствор: 10% обезжиренное сухое молоко в растворе PBST,
 20 г блокирующего раствора для блоттинга, Bio-Rad 170-6404 или эквивалента,
 200 мл PBST,
 хранение при 4°C,
 срок хранения: 0 дней,
 для анализа необходимо (4 планшета): 200 мл.

6. Антиген SFRV:

неинфицированный супернатант культуры клеток SF или SF+ фильтровали через фильтр 0,2 мкм (Thermo, каталожный номер # 456-0020). В этом контексте "неинфицированный супернатант клеток SF или SF+" означает супернатант клеток SF или SF+ в культуре, где указанные клетки не были инфицированы бактеирием, но были инфицированы SFRV.

Кроме того, в контексте клеток, описанных в данной заявке, термин "SF" является эквивалентным термину "SP", термин "SF+" является эквивалентным термину "Sf+", а термин "SF9" является эквивалентным термину "Sf9" соответственно.

Фильтрат загружали на 30% сахарозную подушку и центрифугировали при 28000-34000 об/мин при 4°C в течение 2-4 ч.

После центрифугирования из супернатанта тщательно отсасывали жидкость и осадок суспендировали в буфере NaCl-Трис-ЭДТА, pH 7,4.

Полученный продукт представляет собой полуочищенный антиген.

Концентрацию белка оценивали спектрофотометрически и белок разделяли на аликвоты и замораживали при -70°C до момента использования.

7. 2° антитело: козий антисвиной конъюгат IgG h+1 HRP. Bethyl Labs, каталожный номер A100-105P, хранение при $4\pm 3,0^{\circ}\text{C}$.

8. Субстрат: SureBlue TMB I - Component Microwell Peroxidase Substrate. Kirkgaard and Perry Laboratories каталожный номер 52-00-01 или эквивалент. Хранение субстрата при $4\pm 3,0^{\circ}\text{C}$, предварительная инкубация при $25\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ и применение при $25\pm 3,0^{\circ}\text{C}$.

9. Раствор для остановки реакции: TMB Stop Solution. Kirkgaard and Perry Laboratories каталожный номер 50-85-04 или эквивалент. Хранение при комнатной температуре.

С. Процедура.

1. Готовят буфер покрытия при использовании рецептуры, указанной в В1 выше.

2. Разводят антиген SFRV в буфере для покрытия до концентрации 250 нг/ячейка. Смешивают антиген при вращении в течение 10 раз. Покрывают при использовании 250 нг/100 мкл (т.е. 2,5 мкг/мл = 250 нг/ячейка).

3. Добавляют 100 мкл разбавленного антигена SFRV ко всем ячейкам.

4. Прикрывают планшет(ы) для исследования пластиковыми крышками и инкубируют в течение ночи при температуре 4°C на дне холодильника для того, чтобы свести к минимуму помехи.

На следующий день

5. Готовят достаточное количество раствора для блокирования (только для текущего анализа). Рекомендуется использовать 200 мкл блокирующего раствора для 4 планшетов. Хранение при температуре 4°C до применения.

6. Промывают планшет(ы) для исследования 5 раз промывочным раствором при использовании ультрапромывного устройства плюс устройство для промывания микротитровального планшета или эквивалента.

7. Прибавляют 100 мкл блокирующего раствора ко всем ячейкам контрольного(ых) планшета(ов). Накрывают планшет(ы) для исследования и инкубируют в течение 1,0 ч при $37\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

8. Во время блокирования инкубации осуществляют разведение исследуемых образцов сыворотки в соотношении 1:100 в s-блокирующем растворе. Для оральных жидкостей разводят образцы в соотношении 1:2 блокирующим раствором. Каждый образец исследуют индивидуально. Аналогичным образом разводят положительные и отрицательные контролы.

9. Промывают планшет(планшеты) для исследования 1 раз. После последнего промывания необходимо осторожно вытряхнуть планшеты на бумажное полотенце.

10. Прибавляют 100 мкл на ячейку предварительно разведенных образцов для исследования к соответствующему планшету(ам). Следует избегать контакта с наконечником пипетки. Следует заменять наконечник для каждого исследуемого образца. Накрывают контрольный(ые) планшет(ы) и инкубируют в течение 1,0 ч при $37\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ для образцов сыворотки. Образцы пероральных жидкостей инкубируют в течение 16,0 ч при $4\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

11. Непосредственно перед промыванием планшета(ов) для исследования изымают пробирку со вторичным антителом из морозильника и разводят до 1:10000 в растворе для блокирования. Рекомендуется делать серийные разведения до достижения разведения 1:10000 (4 разведения). Смешивают разведенное антитело при вращении 10 раз.

12. Промывают исследуемый(ые) планшет(ы) 5 раз.

13. Прибавляют 100 мкл разведенного антитела для определения ко всем ячейкам исследуемого(ых) планшета(ов). Накрывают исследуемый(ые) планшет(ы) и инкубируют в течение 1 ч при температуре $37\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

14. Немедленно вынимают субстрат SureBlue TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate из холодильника ($4\pm 3^{\circ}\text{C}$), переносят в коричневый или светонепроницаемый контейнер из полиэтилена высокой плотности (HDPE) приемлемого объема и инкубируют в течение 1 ч ± 15 мин при $25\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (рабочая поверхность стола).

15. Промывают исследуемый(ые) планшет(ы) 5 раз. После последнего промывания осторожно вытряхивают планшеты на бумажное полотенце. Рекомендуется включить устройство для считывания тогда, когда планшет(ы) промываются. Прибавляют 100 мкл ко всем ячейкам исследуемого(ых) планшета(ов).

16. Инкубируют при $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин.

17. Останавливают реакцию путем прибавления 100 мкл раствора для остановки реакции ко всем ячейкам.

18. Измеряют поглощение при длине волны 450 нм.

D. Критерии соответствия/результаты.

Положительный контроль: сыворотка (или оральные жидкости, соответственно), полученная от свиней, гипериммунизированных G гликопротеином SFRV/SRFV.

Интактная сыворотка свиней (или оральные жидкости, соответственно) или сыворотка (или оральные жидкости, соответственно) от невакцинированных свиней, которые демонстрируют незначительную реакцию на SFRV антиген.

Пример 4. Получение полуочищенного рабдовируса, эксклюзионная хроматография размеров (SEC), ПЦР в реальном времени, электронная микроскопия фракций SEC и ELISA.

Получение полуочищенного рабдовируса.

Перед загрузкой на колонку получали полуочищенный рабдовirus в этом супернатанте клеточной культуры (40 мл) инфицированных SfRV Sf+ клеток насекомых, который был сконцентрирован от 5 л до 800 мл при использовании фильтрации через полые волокна, фильтровали через шприцевой фильтр 1,2 мкм. Полученный фильтрат представлял собой "полуочищенный рабдовirus" в соответствии с данным примером.

Эксклюзионная хроматография размеров (SEC).

Эксклюзионную хроматографию размеров осуществляли при изократических условиях на устройстве АКТА Explorer с колонкой HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR (GE Healthcare Bio-Sciences) при скорости истечения 1 мл/мин. Колонку уравнивали с помощью буфера в количестве 1,5 объемов колонки (1X забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4, Gibco), после чего осуществляли введение осветленного образца (приблизительно 5% объема колонки) полуочищенного рабдовируса, полученного в соответствии с (i). Разделение осуществляли при скорости потока 1,0 мл/мин на 1,5 объема буфера колонки и собирали фракции (8 мл) от момента введения в течение всего процесса очистки. Элюирование белков из колонки подвергали мониторингу при использовании абсорбции УФ при 280 нм (фиг. 6).

Фракции анализировали с помощью 4-12% SDS-ПАГЭ (Thermo Fisher) после концентрации пиковых фракций при использовании осаждения TCA/ацетоном. Вкратце, 1 мл каждой фракции осаждали TCA (200 мкл) в течение 1 ч на льду. Образцы центрифугировали в течение 2 мин при 20000 G и супернатант удаляли. Фракции промывали с помощью 500 мкл ледяного ацетона и перемешивали путем встряхивания с последующим центрифугированием в течение 2 мин при 20000 G. Стадии центрифугирования и промывки ацетоном повторяли для всех ацетоновых промываний. Гранулы высушивали в течение 20 мин, суспендировали в 20 мкл буфера для загрузки геля и загружали в гель. Гели окрашивали в течение 1 ч при использовании Imperial protein stain (Thermo Fisher) и обесцвечивали в течение, по крайней мере, 3 ч с помощью деионизированной воды. После гелевого анализа концентрации белковых фракций определяли с помощью анализа BCA (Thermo Fisher) при использовании сывороточного альбумина в качестве стандарта.

ПЦР в реальном времени.

Присутствие РНК SfRV в полуочищенном рабдовирусе (фильтрате) в соответствии с (i) и во фракциях, собранных с помощью SEC в соответствии с (ii), определяли/количественно определяли при использовании следующих способов и последовательностей для ПЦР в реальном времени.

Праймеры/зонды/контроль G-блоков

Наименование	Последовательность	Положение в геноме*
Rhab_qPCR-F	SEQ ID NO: 25	5584-5603
Rhab_qPCR-R	SEQ ID NO: 26	5654-5672 (RC)
Rhab_qPCR-PR (FAM)	SEQ ID NO: 27	5624-5646 (RC)
Rhab_gBlock	SEQ ID NO: 28	5565-5690

*Положение в геноме на основе референтного штамма GenBank: KF947078.

Все последовательности были нацелены на участок, кодирующий гликопротеин SfRV.

Условия проведения циклов:

1 цикл @ 50°C в течение 10 мин,

1 цикл @ 95°C в течение 3 мин,

40 циклов @ 95°C в течение 15 с,

57°C в течение 15 с.

**Сбор данных (FAM).

Краткое описание осуществляемых этапов.

Аmplификацию осуществляли при использовании набора BioRad iTaq Universal Probes One-Step Kit (каталожный номер 172-5141) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Праймеры добавляли до получения конечной концентрации 0,4 мкМ в реакционном объеме 25 мкл, в то время как зонд добавляли до получения конечной концентрации 0,16 мкМ. В каждом прогоне стандартная кривая соответствовала синтезированной последовательности двухцепочечных g-блоков (IDT), которые отвечали прогнозируемому ампликону. Реакцию осуществляли при использовании системы детекции на основе ПЦР в режиме реального времени CFX96 (BioRad) при следующих условиях: начальная обратная транскрипция при 50°C в течение 10 мин, с последующей первоначальной денатурацией при 95°C в течение 3 мин, с последующими 40 циклами денатурации при 95°C в течение 15 с, отжиг и удлинение при 57°C в течение 15 с со сбором данных в канале FAM. Оптические данные были проанализированы при использовании программного обеспечения CFX Manager (версия 2.1, BioRad).

Прогнозы считались действительными на основе согласованности стандартной кривой, значений г-

квадратов, превышающих 0,99, и расчетной эффективности от 80 до 120%. Для каждого определения пороговые линии автоматически вычислялись при использовании установки регрессии для режима порога цикла (Ct). Вычитание базовой линии осуществлялось автоматически при использовании режима вычитания базовой линии.

Результаты ПЦР в реальном времени являются представленными на фиг. 7.

На фиг. 7 в столбце 1 указаны номера ячеек. В столбце 2 показан флуорофор 6-карбоксифлуоресцеин (FAM), связанный со специфическим зондом, который используется в этой ПЦР в реальном времени. В столбце 3 указаны фракции антигена SfRV, полученные в результате эксклюзионной хроматографии размеров (фракции A11, A12, B1, B5, B12 и C6) или стандарты с известными количествами специфической нуклеиновой кислоты SfRV, используемой для получения стандартной кривой (ячейки 7-14). Ячейка 15 служила отрицательным контролем (без матрицы), а ячейка 16 служила положительным контролем, содержащим концентрированный антиген SfRV до фракционирования по размеру (SEC).

Цикл количественного определения (Cq) представлял собой цикл, при котором регистрируется флуоресценция. Более низкие значения Cq указывают на более высокое количество копий специфической мишени в образце. Эти данные представлены в столбце 4. Экстраполированные количества геномных копий показаны в столбце 5 в виде количественной оценки последовательности (SQ) и демонстрируют количество геномных копий на 1 мл.

Данные показывают, что исходный материал имел 6 logs SfRV специфических геномных копий/мл SfRV (ячейка 16), аналогично, фракции A11 и A12 имели 6 log геномных копий/мл. Эти две фракции вместе с хвостовой фракцией B1 должны содержать большую часть вирусных частиц/вирионов SfRV и вирусоподобных частиц (VLP). Другие фракции B5, B12 и C6 должны содержать субвирусные частицы в SEC и, следовательно, меньшее количество вирусной РНК, если таковое имеется.

Электронная микроскопия.

Фракции, собранные с помощью SEC (ii), окрашивали 2,5% фосфовольфрамовой кислотой (ПТА) в течение 3 мин (отрицательное окрашивание) для электронной микроскопии. Во фракциях A11 и A12 (см. фиг. 6) наблюдали частицы размером ~30-35 нм, которые считались вирусными частицами SfRV.

ELISA.

ELISA осуществляли так, как описано в примере 2, где использовались материалы и методы, описанные в примере 3, с той разницей, что вместо "SFRV антигена" (под номером B.6 из примера 3) использовали полуочищенный рабдовирус (филтрат) (i) и фракции A11, A12 и B1, собранные в результате SEC (ii), каждый из которых разводили в буфере для покрытия до концентрации 250 нг в 100 мкл, а затем 100 мкл каждого из указанных антигенов наносили на ячейку.

В качестве образцов сыворотки для исследования использовали сыворотку крови, полученную от животных, иммунизированных экспериментальной вакциной, указанную вакцину, содержащую рекомбинантный белок, полученный с помощью бакуловиральной системы экспрессии в культивируемых клетках насекомых, зараженных SfRV. Сыворотку получали из крови, взятой у животных через 28 дней после введения экспериментальной вакцины.

В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови соответствующих неиммунизированных животных соответственно.

Результаты ELISA показаны на фиг. 8.

Планшеты ELISA покрывали четырьмя различными антигенами, включая полуочищенный SfRV (панель A), фракции эксклюзионной хроматографии размеров A11 (панель B), A12 (панель C) и B1 (панель D). Планшеты подвергали зондированию с помощью сывороток, полученных от отрицательных контрольных животных (перевернутые треугольники), или сывороток 28-го дня, полученных от животных, которым вводили экспериментальную вакцину, содержащую SfRV (кружочки).

Результаты показывают, что сыворотки, полученные от вакцинированных животных, реагировали с антигенами покрытия, тогда как отрицательная контрольная сыворотка имела минимальную реакцию. Кроме того, вакцинированные животные сильно реагировали на ячейки, покрытые фракциями A11, A12 и B1 (панели B, C и D), о чем свидетельствуют увеличенные значения OD, и реакции были более плотно кластеризованы с этими фракциями по сравнению с полуочищенным SfRV (панель A). Это указывает на более сильное распознавание и более специфический ответ на антиген покрытия (фракции A11, A12 и B1).

В списке последовательностей

SEQ ID NO: 1 соответствует последовательности G белка SFRV,

SEQ ID NO: 2 соответствует последовательности укороченного G белка SFRV,

SEQ ID NO: 3 соответствует последовательности укороченного G белка SFRV с N-терминальной последовательностью мелитина,

SEQ ID NO: 4 соответствует SEQ ID NO: 1 с модификациями (включая 6x His метку),

SEQ ID NO: 5 соответствует SEQ ID NO: 2 с модификациями (включая 6x His метку),

SEQ ID NO: 6 соответствует SEQ ID NO: 3 с модификациями (включая 6x His метку),

SEQ ID NO: 7 соответствует последовательности N белка SFRV,

SEQ ID NO: 8 соответствует SEQ ID NO: 7 с модификациями (включая 6х His метку),
 SEQ ID NO: 9 соответствует последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 1,
 SEQ ID NO: 10 соответствует последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 2,
 SEQ ID NO: 11 соответствует последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 3,
 SEQ ID NO: 12 соответствует последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 4,
 SEQ ID NO: 13 соответствует последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 5,
 SEQ ID NO: 14 соответствует последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6,
 SEQ ID NO: 15 соответствует последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 7,
 SEQ ID NO: 16 соответствует последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8,
 SEQ ID NO: 17 соответствует обратному праймеру для конструкции SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13,
 SEQ ID NO: 18 соответствует обратному праймеру для конструкции SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14,
 SEQ ID NO: 19 соответствует обратному праймеру для конструкции SEQ ID NO: 13,
 SEQ ID NO: 20 соответствует обратному праймеру для конструкции SEQ ID NO: 14,
 SEQ ID NO: 21 соответствует обратному праймеру для конструкции SEQ ID NO: 16,
 SEQ ID NO: 22 соответствует обратному праймеру для конструкции SEQ ID NO: 16,
 SEQ ID NO: 23 соответствует последовательности ORF2 белка PCV2,
 SEQ ID NO: 24 соответствует последовательности гемагглютинаина H5 белка (вирус гриппа).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения, получал ли индивидиум иммуногенную композицию, включающую рекомбинантный белок, который вырабатывается бакуловирусной системой экспрессии в культивируемых клетках *Spodoptera Frugiperda* (Sf) или культивируемых клетках клеточной линии, полученной из *Spodoptera Frugiperda*, где указанный способ включает определение в биологическом образце, полученном от указанного индивидиума, присутствия или отсутствия антител, специфичных для одного или более антигенов РНК вируса, способного инфицировать клетки *Spodoptera Frugiperda* (Sf) или клетки из клеточной линии, полученной из *Spodoptera Frugiperda*, где указанный РНК вирус является вирусом семейства *Rhabdoviridae*, которые указывают, что индивидиум получил один или более антигенов вируса, и где присутствие указанного одного или более антител в указанном биологическом образце свидетельствует о том, что указанный индивидиум получил указанную иммуногенную композицию.

2. Способ по п.1, где указанный один или более антиген вируса семейства *Rhabdoviridae*, способного инфицировать клетки насекомых, представляет собой белок, который включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1.

3. Способ по п.1 или 2, который включает этапы:

а) приведение биологического образца в контакт с реагентом захвата, иммобилизованным на твердой основе, где иммобилизованный реагент захвата способен связываться с антителами; и

б) определение присутствия или отсутствия указанных антител, связанных с реагентом захвата, где присутствие указанных антител, связанных с реагентом захвата, указывает на присутствие указанных антител в указанном биологическом образце.

4. Способ по п.3, где указанный реагент захвата выбран из группы, которая состоит из

а) белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из любой последовательности SEQ ID NO: 1-6;

б) вируса семейства *Rhabdoviridae*, способного инфицировать клетки насекомых, который необязательно может быть инактивированным, и/или где указанный вирус необязательно является получищенным цельным вирусом.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанный вирус семейства *Rhabdoviridae*, способный инфицировать клетки насекомых, представляет собой вирус, включающий:

i) белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; и/или

ii) белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и/или

iii) указанный вирус семейства *Rhabdoviridae*, способный инфицировать клетки насекомых, который представляет собой вирус, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, включающий или состоящий из последовательности SEQ ID NO: 1; и/или

iv) указанный вирус семейства *Rhabdoviridae*, способный инфицировать клетки насекомых, который представляет собой вирус, геном которого включает молекулу РНК, имеющую последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9; и/или

v) последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15.

6. Способ по любому из пп.1-5, где указанный способ включает определение в указанном биологическом образце присутствия или отсутствия указанного одного или более маркеров, где указанные маркеры представляют собой антитела, специфичные в отношении белка, который включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1; и где указанный способ включает этапы:

а) приведение биологического образца в контакт с реагентом захвата, иммобилизованным на твердой основе, где реагент захвата выбран из группы, которая состоит из

i) белка, который включает или состоит из последовательности, выбранной из группы, которая состоит из любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-6,

ii) необязательно инактивированного вируса, который включает белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; и/или

iii) вируса, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, включающий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и/или белка, который включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 7, где указанный вирус необязательно является инактивированным;

iv) вируса, геном которого включает молекулу РНК, включающую последовательность, которая является обратной комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9 и/или последовательности, которая является обратной комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15, где указанный вирус был необязательно инактивирован; и/или

v) синтетического пептида, имеющего последовательность, выбранную из последовательностей, которые состоят из 5-11 последовательных аминокислотных остатков последовательности SEQ ID NO: 1; и

б) отделение биологического образца от иммобилизованного реагента захвата;

с) контакт комплекса иммобилизованный реагент захвата-антитело с детектируемым агентом, который связывается с антителом комплекса реагент-антитело; и

д) измерение уровня антитела, связанного с реагентом захвата, при использовании средств определения для детектируемого агента.

7. Способ по п.6, где этап измерения (д) дополнительно включает сравнение со стандартной кривой для определения уровня антитела, связанного с реагентом захвата, и/или где указанный детектируемый агент, который связывается с антителом комплекса реагент-антитело, представляет собой детектируемое антитело, предпочтительно меченное вторичное антитело.

8. Способ по любому из пп.3-7, где указанный реагент захвата представляет собой экспрессируемый в бакуловирусе, предпочтительно рекомбинантном бакуловирусе, белок, где указанный бакуловирис включает последовательность ДНК, кодирующую белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из последовательностей SEQ ID NO: 1-6; и/или где указанный бакуловирис включает последовательность ДНК, которая включает или состоит из последовательности, выбранной из группы последовательностей SEQ ID NO: 9-14.

9. Способ по любому из пп.1-8, который дополнительно включает этап определения в указанном биологическом образце присутствия одного или более аналитов, выбранных из группы, которая состоит из антител, специфичных для указанного рекомбинантного белка, полипептида, специфичного для указанного рекомбинантного белка, нуклеотидной последовательности, специфичной для последовательности ДНК, которая кодирует указанный рекомбинантный белок, где указанный рекомбинантный белок выбран из группы, которая состоит из ORF2 белка PCV2, где указанный ORF2 белок PCV2 предпочтительно представляет собой белок, который по меньшей мере на 90% идентичен последовательности SEQ ID NO: 23, и гемагглютинаина вируса гриппа, предпочтительно гемагглютинаина вируса птичьего гриппа, в частности, H5 белка вируса H5N1, где указанный гемагглютинин вируса птичьего гриппа или H5 белок вируса H5N1 предпочтительно представляет собой белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности SEQ ID NO: 24.

10. Способ по любому из пп.1-9, где указанная иммуногенная композиция представляет собой иммуногенную композицию, включающую рекомбинантный белок, который вырабатывается бакуловирусной системой экспрессии в культивируемых клетках насекомых, и один или более антигенов из вируса, который представляет собой вирус семейства Rhabdoviridae, способный инфицировать клетки насекомых, где указанный рекомбинантный белок выбран из группы, которая состоит из

а) ORF2 белка PCV2, который предпочтительно включает или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 23,

б) гемагглютинаина вируса гриппа, предпочтительно гемагглютинаина вируса птичьего гриппа, в частности, белка H5 вируса H5N1, где указанный гемагглютинин вируса птичьего гриппа или белок H5 вируса H5N1 предпочтительно представляет собой белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности SEQ ID NO: 24; и

с) белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из последовательностей SEQ ID NO: 1-8,

и/или указанный вирус семейства Rhabdoviridae, способный инфицировать клетки насекомых, яв-

ляется вирусом, который включает белок, содержащий или включающий:

- i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и/или
- ii) белок, который включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и/или вирус семейства Rhabdoviridae, способный инфицировать клетки насекомых, и геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, который включает или состоит из
- i) последовательности SEQ ID NO: 1; и/или
- ii) белок, который включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 7; и/или вирус семейства Rhabdoviridae, способный инфицировать клетки насекомых, геном которого

включает:

- i) молекулу РНК, имеющую последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9; и/или
- ii) последовательности, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15; и/или

где биологический образец был выделен от животного или птицы, предпочтительно от свиньи или курицы, и выбран из группы, которая состоит из цельной крови, плазмы крови, сыворотки, мочи и оральных жидкостей, и/или

где иммобилизованным реагентом захвата покрывают микротитровальный планшет.

11. Способ по любому из пп.1-10, где указанная клетка насекомого или клетки насекомого представляют собой клетки Sf9 клетки или Sf+ клетки.

12. Способ по любому из пп.3-11, где указанный реагент захвата включает или состоит из вирусных частиц и/или вирусоподобных частиц вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, и где указанный реагент захвата получают с помощью способа, который включает этапы:

i) получение супернатанта из культуры клеток насекомых, инфицированных вирусом семейства Rhabdoviridae, способным инфицировать клетки насекомых, где указанный супернатант включает вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы вируса семейства Rhabdoviridae, и где указанные клетки насекомых, инфицированные вирусом семейства Rhabdoviridae, способным инфицировать клетки насекомых, предпочтительно не являются инфицированными бакуловирусом и/или предпочтительно не являются трансфицированными плазмидой,

ii) отделение указанных вирусных частиц и/или вирусоподобных частиц от клеточного дебриса с помощью этапа отделения, включающего микрофильтрацию, включая микрофильтрацию по меньшей мере через один фильтр, предпочтительно два фильтра, где по меньшей мере один фильтр предпочтительно имеет размер отверстий больший, чем указанные вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы, в частности имеет размер отверстий приблизительно от 0,1 до приблизительно 4 мкм, предпочтительно от приблизительно 0,2 до приблизительно 2 мкм,

iii) и необязательная обработка фильтрата в соответствии с ii), который содержит указанные вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы, при использовании эксклюзионной хроматографии, где присутствие белка в элюенте определяют путем измерения поглощения света при длине волны 260 или 280 нм (A_{260} или A_{280}), и где предпочтительно собирают элюент, который демонстрирует пик A_{260} или A_{280} .

13. Способ по п.12, где указанный вирус семейства Rhabdoviridae включает или состоит из

a) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, включающего белок, который включает или состоит из

- i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; и/или
- ii) белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и/или

и/или

b) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, геном которых включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, который включает или состоит из

- i) последовательности SEQ ID NO: 1; и/или
- ii) белка, который включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 7; и/или

c) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, геном которых включает:

i) молекулу РНК, имеющую последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9; и/или

ii) последовательность, которая является обратно комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15.

14. Набор для определения, получал ли индивидуум иммуногенную композицию, которая включает рекомбинантный белок, который продуцируется бакуловирусной системой экспрессии в культивируемых клетках *Spodoptera Frugiperda* (Sf) или культивируемых клетках клеточной линии, полученной из *Spodoptera Frugiperda*, где указанный набор содержит один или более реагентов захвата, иммобилизованных на твердой подложке, где один или более иммобилизованных реагентов захвата способны к связыванию антигенов, специфичных для одного и более антигенов из РНК-содержащего вируса, способного заразить клетки *Spodoptera Frugiperda* (Sf) или культивируемые клетки клеточной линии, полученной из

Spodoptera Frugiperda, где указанный РНК-содержащий вирус является вирусом из семейства Rhabdoviridae, где указанный один или более реагентов захвата выбран из группы, которая состоит из

а) белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности выбранной из группы, которая состоит из последовательностей SEQ ID NO: 1-6;

б) вируса семейства Rhabdoviridae, способного заразить клетки Spodoptera Frugiperda (Sf) или культивируемые клетки клеточной линии, полученные из Spodoptera Frugiperda, причем указанный вирус был инактивирован.

15. Набор по п.14, где указанный вирус семейства Rhabdoviridae включает или состоит из

а) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, включающего белок, который включает или состоит из

i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; и/или

ii) белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и/или

б) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, геном которых включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, который включает или состоит из

i) последовательности SEQ ID NO: 1; и/или

ii) белка, который включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 7; и/или

с) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, геном которого включает:

i) молекулу РНК, имеющую последовательность, которая является обратной комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9; и/или

ii) последовательность, которая является обратной комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15.

16. Набор по п.14 или 15, где указанный один или более антигенов вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, представляет собой белок, который включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1.

17. Набор по любому из пп.14-16, где указанная клетка насекомого или клетки насекомого представляют собой Sf9 клетку или Sf+ клетку.

18. Набор по любому из пп.14-17, где указанный реагент захвата включает или состоит из вирусных частиц и/или вирусоподобных частиц вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, и где указанный реагент захвата получают с помощью способа, который включает этапы:

i) получение супернатанта из культуры клеток насекомых, инфицированных вирусом семейства Rhabdoviridae, способным инфицировать клетки насекомых, где указанный супернатант включает вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы вируса семейства Rhabdoviridae, и где указанные клетки насекомых, инфицированные вирусом семейства Rhabdoviridae, способным инфицировать клетки насекомых, предпочтительно не являются инфицированными бакуловиром и/или предпочтительно не являются трансфицированными плазмидой,

ii) отделение указанных вирусных частиц и/или вирусоподобных частиц от клеточного дебриса с помощью этапа отделения, включающего микрофилтрование, включая микрофилтрование по меньшей мере через один фильтр, предпочтительно два фильтра, где по меньшей мере один фильтр имеет размер отверстий, больший, чем указанные вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы, в частности имеет размер отверстий приблизительно от 0,1 до приблизительно 4 мкм, предпочтительно от приблизительно 0,2 до приблизительно 2 мкм,

iii) и необязательная обработка фильтрата в соответствии с ii), который содержит указанные вирусные частицы и/или вирусоподобные частицы, при использовании эксклюзионной хроматографии, где присутствие белка в элюенте определяют путем измерения поглощения света при длине волны 260 или 280 нм (A_{260} или A_{280}), и где предпочтительно собирают элюент, который демонстрирует пик A_{260} или A_{280} .

19. Набор по п.14, где указанный вирус семейства Rhabdoviridae включает или состоит из

а) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, включающего белок, который включает или состоит из

i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; и/или

ii) белка, который включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и/или

б) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, геном которых включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, который включает или состоит из

i) последовательности SEQ ID NO: 1; и/или

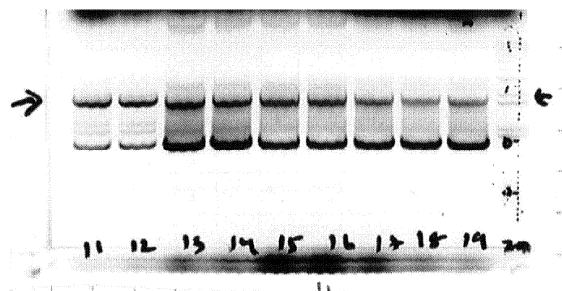
ii) белка, который включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 7; и/или

с) вируса семейства Rhabdoviridae, способного инфицировать клетки насекомых, геном которого включает:

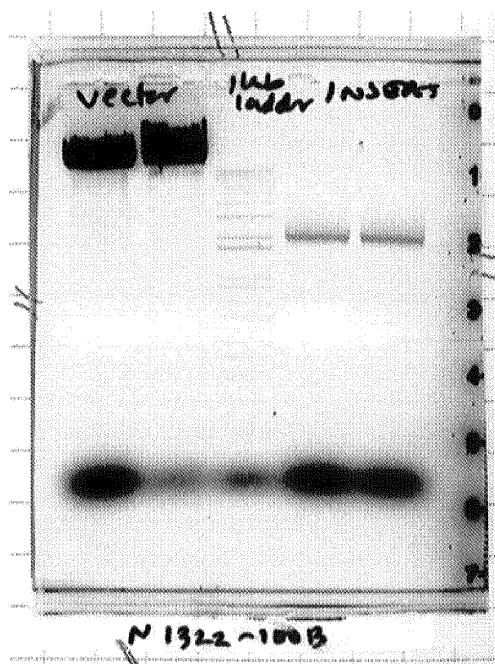
i) молекулу РНК, имеющую последовательность, которая является обратной комплементарной по-

следовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9; и/или

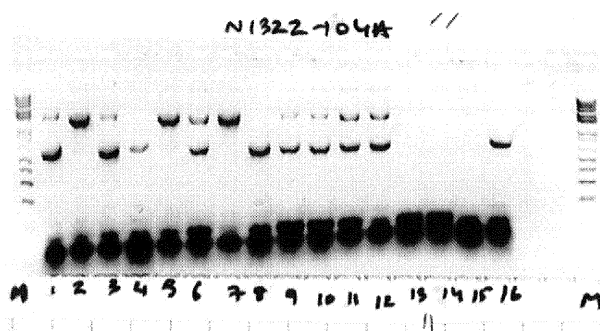
ii) последовательности, которые являются обратно комплементарными последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15.



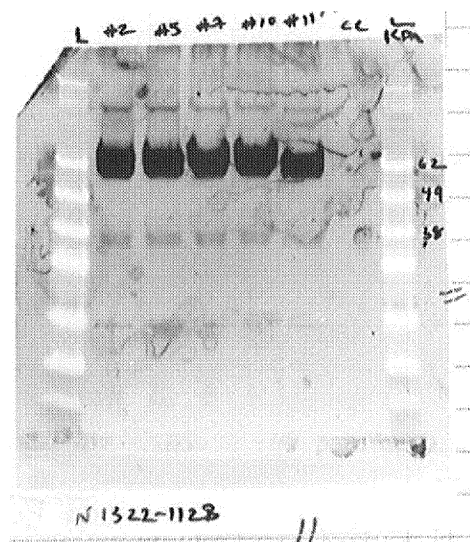
Фиг. 1



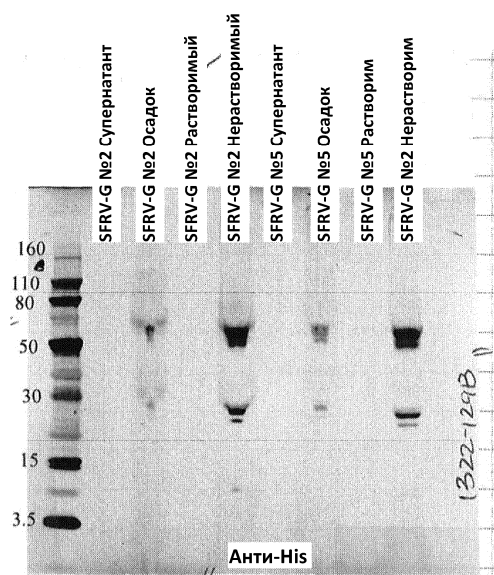
Фиг. 2



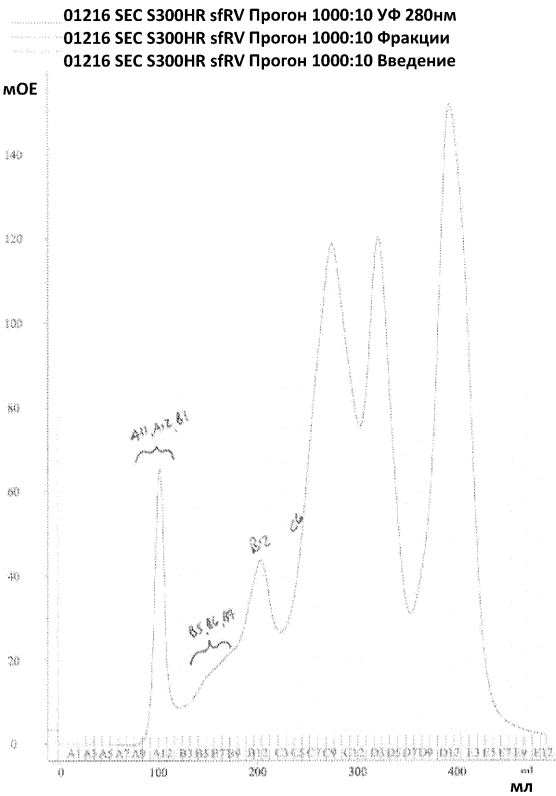
Фиг. 3



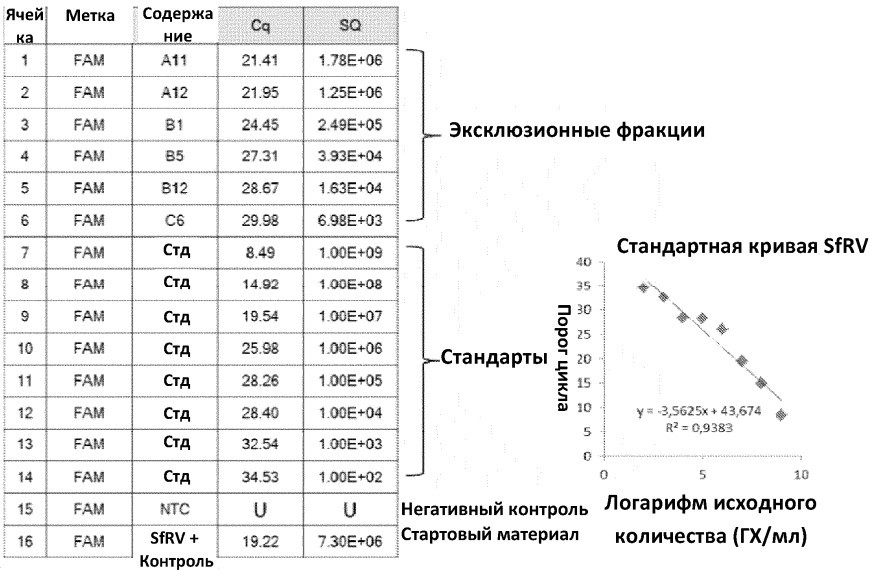
Фиг. 4



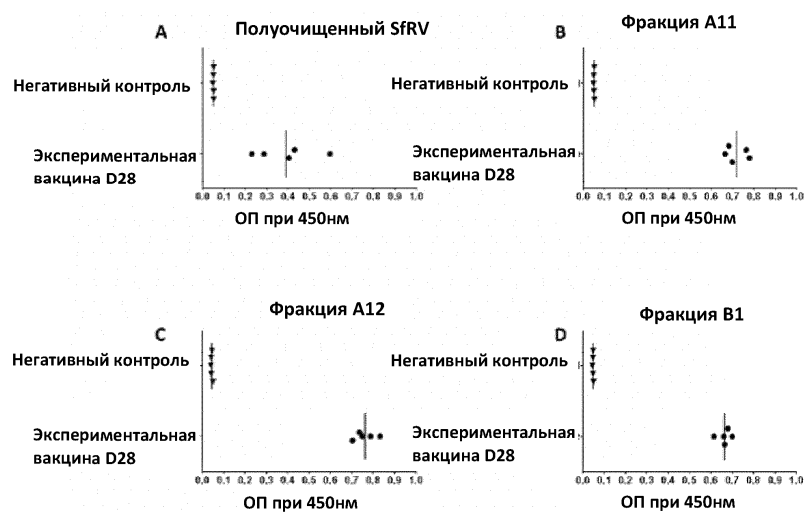
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

