

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092689** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.11

(22) Дата подачи заявки
2020.04.16

(51) Int. Cl. *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)
A61K 39/187 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) ЛИНИЯ КЛЕТОК ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА E2 И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ, БЕЛОК E2 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 201910443709.1

(32) 2019.05.25

(33) CN

(86) PCT/CN2020/085026

(87) WO 2020/238458 2020.12.03

(71) Заявитель:
**ЙЕБАЙО БАЙОЭНДЖИНИРИНГ
КО., ЛТД. ОФ ЦИНДАО (CN)**

(72) Изобретатель:
**Го Вэйвэй, Лю Давэй, Сян Иньхуэй,
Ван Юйхун, Доу Сяолун, Лю Лэй,
Фань Гэньчэн, Ду Юаньчжао (CN)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящая заявка предусматривает линию клеток для экспрессии белка E2 и ее применение, белок E2 и соответствующую субъединичную вакцину, полученную с использованием белка E2 вируса чумы свиней. Антигенный белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3 для вакцины получают посредством экспрессии рекомбинантного белка E2 вируса чумы свиней с применением линии клеток E2-CHO. Вакцина, полученная в соответствии с настоящей заявкой, характеризуется высокой антигенной стабильностью, высокой чистотой, высокой специфичностью, не обуславливает образования других неродственных антител, а также предусматривает удобный и точный способ выявления, который может обеспечить создание надежной базы для производства субъединичной вакцины против вируса чумы свиней и диагностических реагентов для его выявления.

202092689

A1

A1

202092689

ЛИНИЯ КЛЕТОК ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА E2 И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ, БЕЛОК E2 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящая заявка заявляет преимущество и приоритет согласно заявке на патент КНР № 201910443709.1, поданной 25 мая 2019 года, под названием «Субъединичная вакцина на основе белка E2 вируса чумы свиней», включенной в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящая заявка принадлежит к области техники ветеринарных биологических препаратов и конкретно относится к линии клеток для экспрессии белка E2 и ее применению, белку E2 и соответствующей субъединичной вакцине, полученной с использованием белка E2 вируса чумы свиней.

СВЕДЕНИЯ О ПРЕДШЕСТВУЮЩЕМ УРОВНЕ ТЕХНИКИ

Чума свиней представляет собой острое, стремительно развивающееся и высококонтагиозное инфекционное заболевание, обусловленное вирусом классической чумы свиней (CSFV), которое приводит к значительным убыткам в мировой индустрии свиноводства. Хотя аттенуированная вакцина против CSFV, применявшаяся в предшествующем уровне техники, обладает хорошей иммунной эффективностью и высоким уровнем безопасности, является затруднительным отличить антитела, вырабатываемые организмом после стимуляции аттенуированной живой вакциной, от таковых, вырабатываемых свиньей, инфицированной вирусом дикого типа, что не является преимуществом для контроля эпидемического процесса и устранения вируса чумы свиней. Исследование и разработка субъединичной вакцины против вируса чумы свиней может обеспечить возможность отличить иммунизированное вакциной

животное и инфицированное животное, а также может обеспечить облегчение устранения CSFV.

Эпидемические штаммы вируса китайской чумы свиней могут быть подразделены на 2 генные группы и 4 генные подгруппы, а именно генные подгруппы 2.1, 2.2, 2.3 и 1.1. Исследования показывают, что между штаммами вируса чумы свиней, преобладающими в Китае, и высоковирулентными традиционными штаммами «Ши-Мынь» и аттенуированными на кроликах штаммами, применяемыми для производства вакцины, существует большое отличие в генах, кодирующих антигены. Традиционный китайский аттенуированный на кроликах вакцинный штамм принадлежит к генной подгруппе 1.1, однако вирус дикого типа из данной подгруппы составляет лишь малую ее часть, и он в основном встречается в относительно отдаленных районах свободновыгульного содержания. С учетом стремительного развития интенсивного свиноводства, главным эпидемическим штаммом CSFV в Китае является генная группа 2. В ходе эпидемиологического исследования CSFV было обнаружено, что традиционная аттенуированная вакцина на основе CSFV генной подгруппы 1.1, широко применяемая в настоящее время, не может обеспечить хорошую иммунную защиту против широко распространенного в настоящее время вируса чумы свиней генной группы 2.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящая заявка предусматривает линию клеток для экспрессии белка E2 и ее применение, а также белок E2 и его применение. Субъединичная вакцина на основе белка E2 вируса чумы свиней, получение которой описано в настоящей заявке, может обеспечить хорошую иммунную защиту для свиней.

В качестве первого варианта осуществления настоящая заявка предусматривает линию клеток для экспрессии белка E2, которая представляет собой линию клеток E2-CHO, содержащую нуклеотидный фрагмент, кодирующий белок E2; где белок E2 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:3.

Нуклеотидный фрагмент имеет последовательность под SEQ ID NO:4.

В качестве второго варианта осуществления настоящая заявка предусматривает применение линии клеток E2-CHO в рекомбинантной экспрессии белка E2 вируса чумы свиней.

В качестве третьего варианта осуществления настоящая заявка предусматривает белок E2, аминокислотная последовательность которого указана под SEQ ID NO:3. Последовательность нуклеотидного фрагмента, кодирующего белок E2, указана под SEQ ID NO:4.

В качестве четвертого варианта осуществления настоящая заявка предусматривает субъединичную вакцину, полученную на основе белка E2 с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:3. Последовательность нуклеотидного фрагмента, кодирующего белок E2, указана под SEQ ID NO:4.

В качестве пятого варианта осуществления настоящая заявка предусматривает применение белка E2 в получении вакцины.

В качестве шестого варианта осуществления настоящая заявка предусматривает субъединичную вакцину против вируса чумы свиней, содержащую антиген и адъювант вакцины, и где антиген представляет собой белок E2, получение которого описано в настоящей заявке.

Субъединичная вакцина, полученная на основе белка E2 согласно по меньшей мере одному варианту осуществления настоящего изобретения, характеризуется высокой антигенной стабильностью, высокой чистотой, высокой специфичностью, не обуславливает образования других неродственных антител, а также предусматривает удобный и точный способ выявления, который может обеспечить создание надежной базы для производства субъединичной вакцины против вируса чумы свиней и диагностических реагентов для его выявления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Гликопротеин оболочки E2 является основным структурным белком CSFV, он

представляет собой главный определяющий фактор вирулентности и диапазона хозяев CSFV, располагается на внешней поверхности вириона и является главным антигенным белком, который вызывает выработку нейтрализующего вирус антитела и защищает обладающую иммунитетом свинью от атаки CSFV. Следовательно, в настоящей заявке описано применение белка E2 вируса чумы свиней в качестве важной белковой молекулы для разработки новой вакцины против вируса чумы свиней. Субъединичная вакцина, разработанная с применением эукариотических клеток, экспрессирующих антигены, представляющие собой рекомбинантный белок E2, применяется для установления отличия между иммунным ответом, индуцированным естественной вирусной инфекцией, и иммунным ответом, индуцированным субъединичной вакциной. Эта маркированная вакцина будет способствовать устранению вируса чумы свиней.

В частности, в настоящей заявке предусмотрена оптимизация генной последовательности белка E2 выделенного эпидемического штамма вируса чумы свиней генной группы 2 таким образом, чтобы рекомбинантный белок E2 мог быть экспрессирован с применением системы экспрессии на основе клеток CHO (клеток яичника китайского хомячка). Генно-инженерная субъединичная вакцина, полученная путем эмульгирования с адьювантом вакцины, характеризуется хорошим уровнем безопасности и эффективности при иммунизации свиней и является надежной защитой от эпидемических штаммов, и ее можно применять в качестве маркированной вакцины для устранения CSFV.

Настоящая заявка будет подробно описана ниже посредством иллюстративных вариантов осуществления. Однако следует понимать, что внедрение какого-либо варианта осуществления может быть реализовано другими путями или механизмами, что является очевидным для специалистов в данной области техники без дальнейшего перечисления, такими как без ограничения изменения экспериментальных параметров, замена реагентов для эксперимента и т. п. Способы, применяемые в рамках настоящей заявки, могут представлять собой способы, часто применяемые в области производства вакцин, и не ограничены конкретным перечислением вариантов осуществления в

настоящей заявке. Специалист в данной области техники может реализовать настоящую заявку посредством других общепринятых способов.

Пример 1. Скрининг в отношении белка E2 вируса чумы свиней

В 2018 году на свиноферме у свиней, которым уже были сделаны инъекции предшествующей вакцины против вируса чумы свиней (она представляет собой цельновирсионную живую вакцину против генного типа 1.1), появились типичные симптомы чумы свиней. С целью изоляции патогена проводили забор селезенки павшей свиньи в асептических условиях, гомогенизировали суспензию в стерильном физиологическом растворе, центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость. После стерилизации надосадочной жидкостью инокулировали клетки ST (тестикул свиньи). Через 96 часов осуществляли первый забор надосадочной жидкости, содержащей вирус, и через 72 часа осуществляли второй забор надосадочной жидкости, содержащей вирус. Собранный раствор, содержащий вирус, очищали и после этого получали штамм вируса. Вирус анализировали и определяли свойства вируса, касающиеся уровня содержания, иммуногенности, специфичности и чистоты вируса и т. д., и результаты демонстрировали наличие специфической реакции между выделенным штаммом вируса и сывороткой против вируса чумы свиней, а также отсутствие бактерий, микоплазм и контаминации экзогенными вирусами.

В данном варианте осуществления проводили определение свойств штамма вируса, в отношении которого осуществляли скрининг, и полученные результаты показали, что штамм принадлежал к вирусу чумы свиней. Результаты теста с заражением показали, что вирус, в отношении которого осуществляли скрининг, может вызывать гибель свиней, а результаты патологоанатомического исследования демонстрировали наличие кровотечения, некроза и инфаркта внутренних органов.

Был секвенирован ген белка E2 (называемый геном E2), который является структурным белком штамма, в отношении которого осуществляли скрининг, и идентифицированного штамма. Ген E2 имеет длину 1110 п. о. и кодирует 370

аминокислот. Аминокислотная последовательность указана под SEQ ID NO:1 и нуклеотидная последовательность кодирующего гена указана под SEQ ID NO:2. Проводили построение дерева эволюции гена и анализ гомологии нуклеотидных последовательностей для настоящей последовательности гена E2 и последовательности гена E2, зарегистрированной в GenBank, и обнаружили, что степень гомологии аминокислот настоящего E2 и применяемого в настоящее время вирулентного штамма «Ши-Мынь» составляет приблизительно 87%, а степень гомологии аминокислот настоящего E2 и распространенного генотипа 2.1d составляет приблизительно 98%. Результаты показали, что вирус мутировал и вакцина против 1.1 больше не являлась способной к защите от эпидемического штамма вируса чумы свиней.

Пример 2. Конструирование рекомбинантной плазмиды для экспрессии гена E2

1. Сплайсинг и оптимизирование гена E2

Домен Pestivirus_E2 гена E2 вырезали, и 23aa с N-конца и 32aa с C-конца отсекали для обеспечения лучшего сворачивания белка в третичную структуру и лучшего экспонирования антигенного сайта белка E2. В то же время оптимизировали кодоны гена E2, и оптимизированная и модифицированная аминокислотная последовательность, указанная под SEQ ID NO:3, способна обеспечить хороший уровень экспрессии антигенного сайта. Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO:3, является оптимизированной по кодонам, и нуклеотидная последовательность оптимизированного гена указана под SEQ ID NO:4.

Последовательность SEQ ID NO:4 синтезировали в компании Shanghai Bioengineering Co., Ltd. и вставляли в вектор puc57 с получением puc57-seq4.

2. Конструирование рекомбинантной плазмиды 14.4-E2

2.1. Реакция расщепления ферментами

(1) Маркировали пробирку EP объемом 1,5 мл, подлежащую использованию, добавляли образцы и перемешивали в пробирке EP объемом 1,5 мл в соответствии со следующей

таблицей; объем реакционной смеси составлял 50 мкл, как показано в таблице ниже.

Добавленные компоненты	Объем (мкл)
Вектор	2 мкг
Рестрикционная эндонуклеаза BstI	2,5
Рестрикционная эндонуклеаза HindIII	2,5
10X буфер	5
Бидистиллированная H ₂ O	Доведение до 50

При каждой реакции расщепления ферментами согласно таблице вектор выбирали из вектора pEE14.4 (плазмида), puc57-seq4 и puc57-seq1 соответственно, где puc57-seq1 могли использовать в качестве контрольной группы. Соответственно, три данных вектора подвергали реакции расщепления ферментами.

(2) Пробирку EP объемом 1,5 мл из стадии (1) помещали в емкость для водяной бани при постоянной температуре 37°C на 2-3 часа. Получали три системы расщепления двумя ферментами соответственно.

2.2. Выделение продукта двойного расщепления ферментами с помощью геля

Извлекали вышеупомянутые системы расщепления двумя ферментами и проводили электрофорез в агарозном геле для извлечения фрагментов ДНК. Получали фрагменты плазмиды и ДНК-фрагменты оптимизированного гена E2 (содержащие целевой ген) соответственно.

(1) Маркировали пробирку EP для сбора образцов, адсорбционную колонку и собирательную пробирку.

(2) Взвешивали пустую маркированную пробирку EP и регистрировали полученное значение.

(3) Осторожно вырезали из агарозного геля одну полоску целевой ДНК с помощью скальпеля на ноже для резки геля и помещали ее в чистую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

(4) Добавляли 600 мкл буфера для экстракции в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл из стадии (3) и помещали на водяную баню при 50°C на приблизительно 5 мин. Во время этого непрерывно осторожно поворачивали центрифужную пробирку вверх и

вниз с целью обеспечения полного растворения гелевого блока для получения первого раствора.

(5) Добавляли первый раствор, полученный на стадии (4) в адсорбционную колонку, затем центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 30 с; удаляли отработанную жидкость из собирательной пробирки и помещали адсорбционную колонку в собирательную пробирку.

(6) Добавляли 600 мкл буфера для экстракции в адсорбционную колонку, затем центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 30 с; удаляли отработанную жидкость из собирательной пробирки и помещали адсорбционную колонку в собирательную пробирку.

(7) Добавляли 600 мкл буфера для отмывки в адсорбционную колонку, отстаивали в течение 3 мин., затем центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 30 с; удаляли отработанную жидкость из собирательной пробирки и помещали адсорбционную колонку в собирательную пробирку.

(8) Повторяли стадию (7).

(9) Центрифугировали пустую адсорбционную колонку при 12000 об./мин. в течение 2 мин. для максимально возможного удаления буфера для отмывки; оставляли адсорбционную колонку при комнатной температуре на 10 мин. и тщательно просушивали.

(10) Помещали адсорбционную колонку в собирательную пробирку, капали 50 мкл буфера для элюирования (предварительно нагретого до 65°C) в центральную часть адсорбционной мембраны, отстаивали в течение 3 мин. и затем центрифугировали при 12000 об./мин. в течение 2 мин.

(11) Извлекали центрифужную пробирку из стадии (10) из центрифуги, удаляли из адсорбционной колонки центральную часть, закрывали крышку центрифужной пробирки и оставляли ДНК-образец в центрифужной пробирке.

(12) Оставляли ДНК-образец из стадии (11) при 4°C для хранения, и готовили систему для электрофореза в агарозном геле для идентификации и извлечения ДНК-фрагментов

с помощью геля. Таким образом могут быть получены линеаризованный вектор pEE14.4 и целевой ген соответственно для последующей реакции лигирования.

В настоящем примере набор для экстракции из геля приобретали в Hangzhou Bioer Technology Co., LTD.

2.3 Реакция лигирования

(1) Маркировали центрифужную пробирку объемом 0,2 мл, подлежащую использованию.

(2) Добавляли образцы в маркированную центрифужную пробирку объемом 0,2 мл в соответствии с реакционной смесью объемом 20 мкл, как показано в таблице ниже.

Добавленные компоненты	Объем (мкл)
Линеаризованный вектор pEE14.4	50 ~ 200 нг
Вставочный ДНК-фрагмент	20 ~ 200 нг
Лигаза	1
10X буфер	2
Бидистиллированная H ₂ O	Доведение до 20

Вставочный ДНК-фрагмент в таблице представляет собой целевой ген, полученный на стадии 2.2 (12).

(3) После добавления образцов компоненты смешивали путем пипетирования несколько раз.

(4) Помещали центрифужную пробирку объемом 0,2 мл в условия с температурой 37°C и оставляли для прохождения реакции на 30 мин.; после завершения реакции быстро помещали реакционную пробирку на ледяную баню на 5 мин. для охлаждения. Получали раствор, в котором произошла реакция лигирования, содержащий продукты реакции, и продуктами реакции являлись плазмиды, несущие целевой ген.

(5) Продукты реакции из стадии (4) могут применяться непосредственно для трансформации или храниться при -20°C до последующего размораживания и трансформации, когда это необходимо.

2.4. Реакция трансформации

(1) Быстро добавляли 10 мкл раствора реакции лигирования в 100 мкл компетентных

клеток (в данном примере были выбраны компетентные клетки *Escherichia coli* DH5 α) в пробирке для образцов, смешивали путем пипетирования и помещали на ледяную баню на 30 мин.

(2) После стадии (1) извлекали пробирку для образцов, помещали ее на водяную баню при 42°C на 100 с, а затем быстро помещали на ледяную баню на 2 мин.

(3) После стадии (2) извлекали пробирку для образцов, добавляли 600 мкл жидкой среды LB в пробирку для образцов на ультраточной рабочей поверхности, и помещали пробирку для образцов в шейкер при постоянной температуре 37°C, 220 об./мин., и инкубировали в течение 1 ч.

(4) Готовили чашки Петри для трансформации: готовили чашки Петри для трансформации с LB и соответствующим антибиотиком в соответствии с устойчивостью плазмиды.

(5) Нанесение на чашку Петри для трансформации: извлекали пробирку для образцов, центрифугировали при комнатной температуре при 8000 об./мин. в течение 2 мин.; удаляли 600 мкл надосадочной жидкости и ресуспендировали бактерии на дне пробирки с помощью оставшейся надосадочной жидкости, помещали ресуспендированную жидкость с бактериями в центр соответствующей чашки Петри для трансформации и равномерно распределяли жидкость с бактериями в центре планшета для трансформации с помощью шпателя.

(6) Помещали чашки Петри для трансформации из стадии (5) в биохимический инкубатор при постоянной температуре 37°C и инкубировали в течение 1 ч., затем переворачивали чашки Петри для трансформации и инкубировали в течение 15 ч.; и получали моноклоны (т. е. отдельную колонию).

(7) Наблюдали и регистрировали результат трансформации.

2.5. Экстракция рекомбинантной плазмиды и идентификация с помощью ПЦР.

2.5.1. Экстракция рекомбинантной плазмиды

(1) Применяли наконечник для микродозатора объемом 10 мкл для отбора моноклона (содержащего рекомбинантную плазмиду) из чашки Петри для трансформации в 5 мл

жидкой среды LB, содержащей антибиотик ампициллин, встряхивали бактерии в течение ночи при 37°C, 220 об./мин.

(2) Переносили бактериальный раствор в пробирку EP объемом 1,5 мл с помощью пипетки, центрифугировали при комнатной температуре и 12000 об./мин. в течение 2 мин. и удаляли надосадочную жидкость.

(3) Добавляли 250 мкл реагента для экстракции плазмиды, представляющего собой буфер P1, в пробирку EP из стадии (2) для полного суспендирования бактерий.

(4) Добавляли 250 мкл буфера P2 в раствор из стадии (3), и сразу перемешивали путем осторожного переворачивания центрифужной пробирки 5-10 раз, и отстаивали при комнатной температуре в течение 2-4 мин.

(5) Добавляли 350 мкл буфера N3 в раствор из стадии (4), и сразу перемешивали путем осторожного переворачивания центрифужной пробирки 5-10 раз, и отстаивали при комнатной температуре в течение 2-4 мин.

(6) Центрифугировали раствор из стадии (5) при комнатной температуре, 14000 об./мин. в течение 10 мин.

(7) Переносили надосадочную жидкость из стадии (6) в центр адсорбционной колонки, центрифугировали при комнатной температуре, 12000 об./мин. в течение 30 с и удаляли жидкость из собирательной пробирки.

(8) Добавляли 500 мкл буфера PE в центр адсорбционной колонки, центрифугировали при комнатной температуре, 12000 об./мин. в течение 30 с и удаляли жидкость из собирательной пробирки. Повторяли один раз.

(9) Пустую адсорбционную колонку центрифугировали при комнатной температуре, 12000 об./мин. в течение 2 мин.

(10) Помещали адсорбционную колонку в чистую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 30 мкл буфера для элюирования в центр адсорбционной мембраны, отстаивали в течение 5 мин. при комнатной температуре, и центрифугировали при комнатной температуре, 12000 об./мин. в течение 2 мин., и хранили раствор ДНК в пробирке при 4°C.

На данной стадии в результате размножения клеток в культуре и экстракции рекомбинантной плазмиды получали относительно чистую рекомбинантную плазмиду (рекомбинантную плазмиду 14.4-E2), т.е. раствор ДНК из стадии (10) для последующего процесса трансфекции.

В данном варианте осуществления набор для экстракции плазмиды приобретали у компании QIAGEN.

2.5.2 Идентификация с помощью ПЦР

(1) Маркировали пробирку для ПЦР, подлежащую использованию, добавляли образцы и смешивали в соответствии со следующей таблицей. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл.

Добавленные компоненты	Объем (мкл)
Прямой праймер (10 мкМ)	0,5
Обратный праймер(10 мкМ)	0,5
Экстрагированная плазмидная матрица	0,5
Смесь 2X	12,5
Бидистиллированная H ₂ O	Доведение до 25

Экстрагированная плазмидная матрица в таблице представляет собой относительно чистую рекомбинантную плазмиду 14.4-E2, полученную в результате экстракции рекомбинантной плазмиды в пункте 2.5.1.

(2) Процедура ПЦР-амплификации

98°C	2 мин.	}	30 циклов
98°C	5 с		
55°C	15 с		
72°C	80 с		
72°C	10 мин.		
4°C	постоянно		

(3) Секвенирование. Отправляли рекомбинантную плазмиду 14.4-E2, идентифицированную как положительную с помощью ПЦР, в компанию, предоставляющую услуги по секвенированию, для проведения секвенирования. Результаты секвенирования показали, что вставленные нуклеотиды в рекомбинантной плазмиде расположены в соответствии с SEQ ID NO:4 из списка последовательностей,

и полученные в результате трансляции аминокислоты расположены в соответствии с SEQ ID NO:3 из списка последовательностей.

3. Конструирование рекомбинантной плазмиды 14.4-E2-G418

Способ конструирования рекомбинантной плазмиды 14.4-E2-G418 является аналогичным способу, приведенному в стадии 2 данного примера.

В частности, ген G418, хранящийся в лаборатории, и рекомбинантную плазмиду 14.4-E2, идентифицированную как положительную с помощью ПЦР, подвергали расщеплению ферментами SmaI и EcoRI соответственно. Затем полученные ДНК-фрагменты лигировали, подвергали трансформации и идентифицировали, как на стадии 2 данного варианта осуществления, таким образом, чтобы сконструировать рекомбинантную плазмиду 14.4-E2-G418.

Пример 3. Транфекция клеток CHO-K1

(1) Подготовка. Проводили стерилизацию бокса микробиологической безопасности ультрафиолетовым излучением в течение 30 мин.; нагревали среду для культивирования F-12 до 37°C на водяной бане, предварительно нагретой до 37°C.

(2) Добавляли 2,5 мкг рекомбинантной ДНК (т. е. рекомбинантной плазмиды 14.4-E2-G418), P3000 (реагент для трансфекции) к 125 мкл среды для культивирования OPTI-MEM и хорошо перемешивали. Добавляли 3,75 мкл липосом Lipofectamine 3000 к 125 мкл среды для культивирования OPTI-MEM и хорошо перемешивали. Смешивали липосомы с рекомбинантной ДНК и отстаивали при комнатной температуре в течение 10 мин.

(3) Извлекали из инкубатора 6-луночный планшет с клетками (клетки CHO-K1), помещенный туда в горизонтальном положении 24 часа назад при 37°C, удаляли среду, представляющую собой надосадочную жидкость, отмывали клетки три раза с помощью предварительно нагретой среды для культивирования OPTI-MEM и удаляли среду для культивирования OPTI-MEM.

(4) Добавляли 2 мл 10% среды для культивирования F-12 с добавлением 1%

эмбриональной бычьей сыворотки, содержащей два вида антител, в каждую лунку.

(5) Осторожно добавляли смесь рекомбинантной ДНК и липосом к клеткам в каждой лунке, осторожно перемешивали и культивировали в инкубаторе для культур клеток при 37°C и 5% CO₂.

(6) Через 72 часа после трансфекции клеток CHO-K1 проводили забор надосадочной жидкости для выявления белка и добавляли к клеткам G418 для обеспечения давления отбора.

(7) Через 144 часа получали моноклональные клетки; тестировали моноклональные клетки и обеспечивали размножение клеток с положительным результатом (т. е. рекомбинантных клеток CHO), которые могут использоваться для крупномасштабного производства белка.

В данном варианте осуществления реагенты для трансфекции приобретали в Thermo Fisher Scientific Co., LTD.

Пример 4. Очистка белка и его выявление

1. Экспрессия и идентификация рекомбинантного белка E2 в клетках CHO

Культивировали клетки, отобранные в примере 3 (т. е. клетки с положительным результатом) при 37°C до 240 часов и проводили забор раствора белка каждые 48 часов, всего 5 раз, и проводили анализ белка в растворе белка, отобранном за 5 раз, с помощью SDS-PAGE. Результаты демонстрировали, что ген E2 до оптимизации не экспрессировался в клетках CHO, в то время как оптимизированный ген E2 экспрессировался в клетках CHO.

2. Хроматографическая очистка рекомбинантного белка E2

Надосадочную жидкость, представляющую собой раствор белка E2, собранный на стадии 1, подвергали аффинной хроматографии с применением среды Ni Sepharose Excel от GE. Для применения в качестве раствора для загрузки собранную надосадочную жидкость центрифугировали при 5000 об./мин. в течение 5 мин.

2.1. Отмывали среду с помощью дистиллированной воды, объем которой составлял 5

объемов колонки.

2.2. Отмывали среду с помощью уравнивающего буфера, объем которого составлял 5 объемов колонки.

2.3. Загружали образец, при этом колонку можно загружать из расчета 4 мг белка на миллилитр.

2.4. Отмывали среду с помощью буфера для отмывки, объем которого составлял 20 объемов колонки.

2.5. Элюировали белок с помощью буфера для элюирования, объем которого составлял 5 объемов колонки.

3. Испытание методом вестерн-блоттинга

Проводили SDS-PAGE для цельного вируса чумы свиней и белка, полученного на стадии 2 настоящего примера, в одно и то же время, переносили полосы целевого белка на мембрану из PVDF (поливинилиденфторида) полусухим способом при 20 вольт и переносили и проводили блоттинг в течение 30 мин., блокировали мембрану для переноса с помощью блокирующего буфера в течение ночи, отмывали три раза с помощью фосфатно-солевого буферного раствора с Tween (PBST) обрабатывали сывороткой, положительной в отношении вируса чумы свиней, разбавленной в соотношении 1:500, при 37°C в течение 1,5 ч., отмывали три раза с помощью PBST, обрабатывали мечеными пероксидазой хрена (HRP) антителами козы к антителам свиньи http://dict.cnki.net/dict_result.aspx?scw=酶 标 抗 体&tjType=sentence&style=&t=enzyme-labeled+antibody, разбавленными в соотношении 1:2000, при 37°C в течение 1,5 ч., отмывали три раза с помощью PBST, обрабатывали раствором субстрата в течение 5 мин. и проводили проявку цветов в системе гель-документирования chemiDOC. Результаты показали, что полоса, соответствовавшая цельному вирусу, была очень слабой, в то время как полоса, соответствовавшая белку E2, экспрессированному геном с оптимизированной нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO:4, в клетке CHO, была очень яркой, что указывало на то, что экспрессированный белок E2 характеризовался

хорошим уровнем иммуногенности.

4. Непрямая иммунофлуоресценция

После того, как клетки (т. е., рекомбинантные клетки CHO) фиксировали, осветляли и блокировали и т. д., добавляли моноклональные антитела к His tag. После инкубации при 37°C в течение 2 ч. отмывали три раза с помощью PBS, и добавляли второе антитело с зеленым флуоресцентным белком, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Применяли инвертированный флуоресцентный микроскоп для проведения наблюдений и фотодокументирования. Результаты демонстрировали, что у клеток CHO, трансфицированных неоптимизированным геном E2, специфическая флуоресценция отсутствовала, в то время как клетки CHO, трансфицированные оптимизированным геном E2, характеризовались выраженной специфической флуоресценцией.

Пример 5. Получение вакцины и определение ее эффективности

1. Получение вакцины

(1) Стерилизовали адъювант 201 при 116°C в течение 40 мин. в условиях высокого давления; и перед применением поддерживали температуру адъюванта 201 на водяной бане на уровне приблизительно 37°C.

(2) Приготовление водной фазы: смешивали раствор очищенного белка, полученный на стадии 2 в примере 4, со стерильным физиологическим раствором в подходящем соотношении, при котором содержание белка в каждых 0,2 мл водной фазы составляла не менее 10 мкг/мл.

(3) Эмульгирование: брали равные массы масляной фазы и водной фазы, эмульгировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин. После эмульгирования отбирали 10 мл и центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 15 мин., таким образом, чтобы уровень осажденной водной фазы на дне пробирки не превышал 0,5 мл, получая таким образом вакцину.

2. Определение эффективности вакцины

1) Иммунологический анализ на кроликах

Японских белых кроликов, вес каждого из которых составлял приблизительно 2,5 кг, распределяли в две группы. Пяти кроликам в группе с иммунизацией делали подкожные инъекции 0,2 мл субъединичной вакцины, а другим пяти кроликам, которых использовали в качестве контрольной группы, иммунизацию не проводили. Через двадцать один день после иммунизации забирали кровь из ушной вены, отделяли сыворотку и проводили выявление антител с помощью ELISA. Результаты показывали, что все представители группы с иммунизацией являлись положительными в отношении антител, и уровень блокирования составлял более 60%, в то время как все представители контрольной группы являлись отрицательными в отношении антител, и уровень блокирования составлял менее 30% (см. таблицу 1).

Таблица 1. Выявление антител через 21 день после иммунизации кроликов с применением субъединичной вакцины

Группа	№	Доза, применявшаяся для иммунизации (мл/кролик)	Дни после первой иммунизации (дней)	Уровень блокирования (%)	Отрицательный/положительный	Частота положительных результатов
Группа с иммунизацией	1	0,2	21	72,3	Положительный	5/5
	2	0,2	21	79,4	Положительный	
	3	0,2	21	77,7	Положительный	
	4	0,2	21	74,1	Положительный	
	5	0,2	21	76,2	Положительный	
Контрольная группа	6	/	21	20,3	Отрицательный	0/5
	7	/	21	22,1	Отрицательный	
	8	/	21	17,5	Отрицательный	
	9	/	21	20,3	Отрицательный	
	10	/	21	16,4	Отрицательный	

2) Результаты исследования иммуногенности у свиней

Пятнадцать здоровых восприимчивых (имевших отрицательные результаты в отношении как антигена вируса чумы свиней, так и антитела из ELISA) свиней произвольным образом распределяли в 3 группы по 5 свиней в каждой группе. Первую группу иммунизировали с применением цельного вируса; каждой свинье

внутримышечно вводили 1,0 мл вакцины; и через 21 день после первой иммунизации проводили вторую иммунизацию с применением такой же вакцины в такой же дозе. Вторая группа представляла собой группу с иммунизацией ранее существующей на рынке вакциной; каждой свинье внутримышечно вводили 1,0 мл вакцины; и через 21 день после первой иммунизации проводили вторую иммунизацию с применением такой же вакцины в такой же дозе. Третью группу, являвшуюся контрольной группой, не иммунизировали. На день 14 после второй иммунизации проводили забор образцов крови для выявления антител против CSFV с помощью ELISA и затем каждой свинье внутримышечно в область шеи вводили 1,0 мл (с содержанием не менее 105,0 MLD) штамма, выделенного в примере 1, и наблюдали до дня 16. Если во время периода наблюдения имелись павшие свиньи, вскрытие должно было проводиться сразу, а для остальных свиней вскрытие должно было проводиться в конце исследования (через 16 дней после заражения), и результаты исследования регистрировали.

Результаты демонстрировали, что все 5 поросят из группы субъединичной вакцины и таковые из группы предшествующей вакцины являлись положительными в отношении антител, и уровень блокирования составлял 80% и 60% соответственно. Все представители контрольной группы были отрицательными в отношении антител, и уровень блокирования составлял менее 30%. После заражения все представители контрольной группы погибли, и все представители группы субъединичной вакцины были защищены, в то время как в группе предшествующей вакцины наблюдались 3 защищенных и 2 заболевших животных (см. таблицу 2).

Таблица 2. Выявление у свиней антител, к белку E2 через 35 дней после первой иммунизации

Группа	№	Доза при иммунизации (мл/свинья)	Дни после первой иммунизации (дней)	Уровень блокирования (%)	Отрицательный/положительный	Защита в течение 16 дней после заражения	Уровень защиты
Группа субъединичной вакцины	1	1,0+1,0	35	88,6	Положительный	Здоровый	5/5
	2	1,0+1,0	35	85,5	Положительный	Здоровый	
	3	1,0+1,0	35	92,1	Положительный	Здоровый	
	4	1,0+1,0	35	93,7	Положительный	Здоровый	

	5	1,0+1,0	35	91,9	Положительный	Здоровый	
Группа предшест- вующей вакцины	6	1,0+1,0	35	60,2	Положительный	Больной	3/5
	7	1,0+1,0	35	69,4	Положительный	Здоровый	
	8	1,0+1,0	35	68	Положительный	Здоровый	
	9	1,0+1,0	35	60,4	Положительный	Больной	
	10	1,0+1,0	35	70,1	Положительный	Здоровый	
Контроль- ная группа	11	/	35	15,7	Отрицательный	Павший	0/5
	12	/	35	25,3	Отрицательный	Павший	
	13	/	35	17,2	Отрицательный	Павший	
	14	/	35	19,6	Отрицательный	Павший	
	15	/	35	-3,1	Отрицательный	Павший	

Примечание: «1,0+1,0» означает, что в группах с иммунизацией иммунизацию проводили дважды, по 1,0 мл/свинья каждый раз; «/» означает, что контрольная группа не была иммунизирована.

Подводя итог, следует отметить, что субъединичная вакцина на основе E2, описанная в настоящей заявке, характеризовалась наибольшим уровнем заражения и наилучшим защитным эффектом в отношении эпидемического штамма, что указывало на то, что эпидемический штамм мутировал и предшествующая вакцина, присутствующая на рынке, больше не способна защищать от эпидемического штамма. Вакцина против эпидемического штамма является крайне необходимой, и субъединичная вакцина на основе белка E2, предусмотренная в настоящей заявке, является безопасной, устойчивой и обладает хорошим защитным эффектом и хорошей рыночной перспективой.

Описанные варианты осуществления представляют собой лишь описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки, и не предназначены для ограничения объема настоящей заявки. Специалистами в данной области техники могут быть выполнены разнообразные модификации и улучшения в отношении технических решений данной заявки без отступления от сути настоящей заявки, которые следует считать охваченными объемом правовой защиты, определенным формулой изобретения данной заявки.

Формула изобретения

1. Линия клеток для экспрессии белка E2, где линия клеток представляет собой линию клеток E2-CHO, содержащую нуклеотидный фрагмент, кодирующий белок E2; и аминокислотная последовательность белка E2 представляет собой последовательность под SEQ ID NO:3.
2. Линия клеток по п. 1, где последовательность нуклеотидного фрагмента представляет собой последовательность под SEQ ID NO:4.
3. Применение линии клеток по п. 1 для экспрессии рекомбинантного белка E2 вируса чумы свиней.
4. Применение по п. 3, где последовательность нуклеотидного фрагмента, кодирующего белок E2, представляет собой последовательность под SEQ ID NO:4.
5. Белок E2, где аминокислотная последовательность белка E2 представляет собой последовательность под SEQ ID NO:3.
6. Белок E2 по п. 5, где последовательность нуклеотидного фрагмента, кодирующего белок E2, представляет собой последовательность под SEQ ID NO:4.
7. Применение белка E2 по п. 5 для получения субъединичной вакцины.
8. Применение по п. 7, где последовательность нуклеотидного фрагмента, кодирующего белок E2, представляет собой последовательность под SEQ ID NO:4.
9. Субъединичная вакцина против вируса чумы свиней, где субъединичная вакцина содержит антиген и адъювант вакцины, и антиген представляет собой белок E2 по п. 5.
10. Вакцина по п. 9, где последовательность нуклеотидного фрагмента, кодирующего белок E2, представляет собой последовательность под SEQ ID NO:4.