

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041112**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.15

(21) Номер заявки
202090236

(22) Дата подачи заявки
2018.07.09

(51) Int. Cl. **A61K 39/125** (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 14/085 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) **ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ SENECAVIRUS A И СПОСОБЫ С НИМИ**

(31) **62/531,578; 62/590,209**

(32) **2017.07.12; 2017.11.22**

(33) **US**

(43) **2020.06.02**

(86) **PCT/US2018/041321**

(87) **WO 2019/014144 2019.01.17**

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

(72) Изобретатель:
**Ийер Арун В., Паттерсон Эбби Рэй,
Виктория Джозеф Гильберт, Вон Эрик
Мартин, Эрнандес Лунс Алехандро,
Инглиш Дженнифер Л. (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) **WO-A2-2006101841
CN-A-107184969
WO-A1-2017181070**

**FAN YANG ET AL: "Immunogenicity
and protective efficacy of an inactivated cell
culture-derived Seneca Valley virus vaccine in
pigs", VACCINE, vol. 36, no. 6, 5 January
2018 (2018-01-05), pages 841-846, XP055505315,
AMSTERDAM, NL ISSN: 0264-410X, DOI:
10.1016/j.vaccine.2017.12.055 the whole document**

**XIANGLE ZHANG ET AL: "Review of
Seneca Valley Virus: A Call for Increased Surveillance
and Research", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY,
vol. 9, 11 May 2018 (2018-05-11), XP055505313,
DOI: 10.3389/fmicb.2018.00940 the whole document**

(57) Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям и вакцинам убитого/инактивированного и/или рекомбинантного Senecavirus A, а также способам профилактики или лечения животных, нуждающихся в этом, такой иммуногенной композицией и вакциной.

B1**041112****041112****B1**

Перечень последовательностей

Данная заявка содержит перечень последовательностей в соответствии с разделом 37 Свода федеральных нормативных актов США частями 1.821-1.825. Перечень последовательностей сопровождающих данную заявку включен в данное описание в полном объеме посредством ссылки.

Уровень техники изобретения

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к вирусу А долины Сенека или Senecavirus A (SVA) и его использование в качестве иммуногенной композиции или вакцины для лечения животных, пораженных Senecavirus A.

Описание предшествующего уровня техники

SVA является одноцепочечным РНК вирусом со смысловой цепью без оболочки из семейства Picornaviridae. Вирус ящура (FMDV) и вирус везикулярной болезни свиней (SVDA) также являются членами семейства Picornaviridae.

Вирус был первоначально обнаружен в качестве контаминанта из среды для культивирования клеток (См., Hales, L.M., et al., Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. J Gen Virol, 2008. 89(Pt 5): p. 1265-75, включенный в полном объеме посредством ссылки); однако, нейтрализующие антитела против вируса были обнаружены у свиней, крупного рогатого скота, мыши и человека (см., Knowles, N.J., et al., Epidemiology of Seneca Valley Virus: Identification and Characterization of Isolates from Pigs in the United States, in The Northern Lights EUROPIC 2006 - 14th meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. 2006: Saairselka, Inari, Finland, включенный в полном объеме посредством ссылки). Известные клинические признаки инфекции включают везикулярные поражения на морде и венчике копыта, острую хромоту, образование язв на венчике копыта и отслоение копыта (Singh, K., et al., Seneca Valley Virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. J Vet Sci Technol, 2012. 3(6) и Pasma, T., S. Davidson, and S.L. Shaw, Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. CVJ, 2008. 49: p. 84-85, оба включены в полном объеме посредством ссылки). В 2016 году был выполнен постулат Коха, когда изолят SVA, размноженный в культуре клеток, использовали для заражения обычных животных и через четыре дня после заражения наблюдали везикулярные поражения (Montiel, N., et al., Vesicular Disease in 9-Week-Old Pigs Experimentally Infected with Senecavirus A. Emerg Infect Dis, 2016. 22(7): p. 1246-8, включенный в полном объеме посредством ссылки).

Патент US 8039606 описывает использование вируса долины Сенека для лечения опухолей. Тем не менее, этот вирус долины Сенека отличается от SVA по настоящему изобретению.

Было необъяснимое увеличение количества случаев SVA в США, Канаде, Австралии, Италии, Новой Зеландии и Бразилии. Кроме того, из-за сходства клинических признаков с FMDV, этот вирус представляет интерес для свиноводства. Уведомление 16-03 Центра ветеринарных биопрепаратов (CVB) подтвердило, что CVB был заинтересован в лицензировании биопрепаратов и/или профилактических средств для вируса SVA.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, вакцинам, и связанным с ними способам, которые устраняют недостатки в данной области техники. Композиции и способы относятся к иммуногенным композициям, которые включают инактивированные/убитые и/или рекомбинантные формы (+) одноцепочечного РНК-вируса без оболочки SVA. В частности, данная заявка обеспечивает вакцину для вызова иммунного ответа у свиней для защиты от заболеваний, ассоциированных с Senecavirus A. Данный изолят Senecavirus A NAC#20150909 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3) был выделен из везикулярной жидкости, собранной от 5 месячных свиней с везикулярными поражениями на морде и венчике копыта.

Иммуногенные композиции и вакцины по данному изобретению содержат SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

Иллюстративные композиции по данному изобретению содержат полипептидные последовательности SEQ ID NO: 3 или их фрагменты, которые иммунореактивны к SVA.

Иммуногенные композиции и вакцины по данному изобретению содержат антиген SVA, экспрессированный в одном неограничивающем примере в клетках насекомых с помощью рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего модифицированные SVA P1, 2A, частичные 2B и 3B, и 3C протеазы, например модифицированную последовательность нуклеиновой кислоты SVA (SEQ ID NO: 18), кодирующей аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 19), и, как правило, также включает адъювант. Вакцина может также включать другие компоненты, такие как консервант(ы), стабилизатор(ы) и антигены против других патогенов свиней.

Предпочтительная последовательность нуклеиновой кислоты P1-2A-P3, пригодная для использования в настоящем изобретении, представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид P1-2A-P3, причем указанный полинуклеотид по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 91, 92, 93 или 94%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95, 96, 96,1, 96,2, 96,3, 96,4, 96,5, 96,6, 96,7, 96,8, 96,9, 97, 97,1, 97,2, 97,3, 97,4, 97,5, 97,6, 97,7, 97,8, 97,9, 98, 98,1, 98,2, 98,3, 98,4, 98,5, 98,6, 98,7, 98,8, 98,9, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7,

99,8, 99,9% идентичный SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 32 и 33. Как использовано в данном документе, под этим, в частности, следует понимать, что термин "идентичность последовательности к SEQ ID NO: X" или "идентичный SEQ ID NO: X", соответственно, являются эквивалентными термину "идентичность последовательности к последовательности SEQ ID NO: X по длине последовательности SEQ ID NO: X" или "идентичный последовательности SEQ ID NO: X по длине последовательности SEQ ID NO: X", соответственно, причем в этом контексте "X" представляет собой любое целое число, выбранное из 18, 20, 22, 24, 32 и 33."

Предпочтительный полипептид P1-2A-P3, пригодный для использования в настоящем изобретении, представляет собой полипептид, имеющий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27 и 29, имеющую по меньшей мере 80% гомологии с SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27 и 29, например по меньшей мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27 и 29, такую как имеющую по меньшей мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27 и 29, такую как имеющую по меньшей мере 90% гомологии с SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27 и 29, например, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере 99% гомологичную SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27 и 29.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют один или несколько полипептидов, конструкторов антител или конъюгатов антител. Генные последовательности, кодирующие полипептиды, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 95, 90, 85 или даже на 80% гомологичная и/или идентичная последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или их фрагментам, кодирующей полипептид, который является иммунореактивным к SVA. Иллюстративные последовательности нуклеиновых кислот по данному изобретению включают любую из последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и их фрагменты, которые кодируют полипептид, который является иммунореактивным к SVA.

Кроме того, полипептид по данному изобретению, как использовано в данном документе, включает полипептид, который содержит:

- полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
- полипептид, который по меньшей мере на 80% гомологичный и/или идентичный полипептиду I);
- фрагмент полипептидов I) и/или II);
- полипептид I) или II);
- фрагмент III) или IV), содержащий по меньшей мере 5, предпочтительно 8, более предпочтительно 10, наиболее предпочтительно 15 смежных аминокислот, включенных в последовательности SEQ ID NO: 3;

- полипептид, который кодируется полинуклеотидом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1 или 2;

- полипептид, который кодируется полинуклеотидом, который по меньшей мере на 80% гомологичный или идентичный полинуклеотидам VI);

- фрагмент белка, который кодируется полинуклеотидом, который содержит по меньшей мере 15, предпочтительно 24, более предпочтительно 30, наиболее предпочтительно 45 смежных нуклеотидов, включенных в последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, но не ограничивается ими.

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению, которые содержат по меньшей мере один или более полипептидов SVA, как определено в данном документе, могут дополнительно содержать физиологически приемлемый носитель, такой как фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинацию.

Любой из полипептидов SVA, предусмотренных в данном документе, или любые иммуногенные композиции, содержащие один или более из этих полипептидов SVA, предусмотренные в данном документе, могут быть использованы в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины или иммуногенной композиции, наиболее предпочтительно для профилактики или лечения инфекции SVA у субъекта.

Специалистам в данной области будет понятно, что композиции, используемые в настоящем документе, могут включать известные инъекционные физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к использованию раствора для парентеральной инъекции или инфузии легко доступны водные изотонические растворы, например физиологические растворы или растворы белка плазмы. Кроме того, иммуногенные и вакцинные композиции по настоящему изобретению могут включать ветеринарно приемлемые носители, разбавители, изотонические агенты, стабилизаторы или адъюванты.

Способы по изобретению включают способ вызова иммунного ответа на инфекцию SVA у субъекта, включающий стадию введения субъекту иммуногенной композиции, содержащей один или более полипептидов SVA, как определено в данном документе, но не ограничиваются ими. Композиции по изобретению могут быть использованы для лечения или в качестве альтернативы для предотвращения инфекции SVA. Предпочтительно, такой иммунный ответ снижает частоту или тяжесть одного или нескольких клинических признаков, связанных с или вызванных инфекцией серотипов SVA.

В данном документе подходящие субъекты и субъекты, которые нуждаются в этом, которым могут быть введены композиции по настоящему изобретению, включают животных, которые нуждаются либо в

профилактике, либо в лечении связанной с вирусом инфекции, заболевания или состояния. Животные, у которых иммунный ответ стимулировали путем использования композиций или способов по настоящему изобретению, включают домашний скот, такой как свиньи, крупный рогатый скот, козы и овцы. Предпочтительные животные включают свиней, муридовых, непарнокопытных, зайцеобразных и полорогих. Наиболее предпочтительно иммунный ответ стимулируют у свиней.

Изобретение также относится к способу снижения частоты или тяжести одного или нескольких клинических признаков, связанных с или вызванных инфекцией SVA, включающему стадию введения иммуногенной композиции по настоящему изобретению, которая содержит один или более пептидов SVA, как предусмотрено в данном документе, и предпочтительно молекулу-носитель, такой, что частота или тяжесть клинического признака инфекции SVA снижается по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 100% по отношению к субъекту, который не получал иммуногенную композицию, как предусмотрено в данном документе.

Такие клинические признаки включают везикулярное заболевание, такое как открытые или закрытые пузыри или поражения, расположенные на морде, слизистой оболочке полости рта и/или на стыке, где встречаются кожа и стенка копыта (венчик копыта), кровоизлияние в ногтевое ложе, внезапную хромоту с покраснением и отеком на или вокруг венчика копыта; и у размножающихся самок вызывает внезапный отказ от корма, вялость, потерю аппетита и/или повышение температуры до 105°F (~ 40,6°C).

Возникает краткосрочное (4-10 дней) увеличение смертности у новорожденных поросят (менее чем за 7 дней), которые могут иметь или не иметь диарею, связанную с этим. Оценки заболеваемости и смертности составляют 30-70% в течение короткого периода времени. При исследовании увеличения смертности новорожденных является обычным отмечать везикулярные поражения у животных случного возраста. Этот тип инфекции у свиней, который приводит к везикулам на рыле и венчике копыта, также называют идиопатическим везикулярным заболеванием свиней.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение также относится к способу профилактики инфекции SVA, отличающегося тем, что инфекция SVA может быть вызвана вирусом долины Сенека, включающим стадию введения иммуногенной композиции по настоящему изобретению, которая содержит один или более пептидов SVA, как предусмотрено в данном документе.

Настоящее изобретение также относится к способу приготовления любой из иммуногенных композиций, предусмотренных в данном документе, при этом способ включает смешивание одного или больше пептидов SVA, как предусмотрено в данном документе, с молекулой-носителем, предпочтительно таким образом, чтобы один или больше пептидов SVA и молекула-носитель были ковалентно связаны или конъюгированы друг с другом. Такие конъюгаты могут быть мультивалентными или одновалентными. Мультивалентные композиции или вакцины включают иммуноконъюгацию множественных пептидов SVA с молекулой-носителем. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу приготовления одного или больше пептидов SVA, при этом способ включает трансформацию клетки хозяина, предпочтительно прокариотической клетки, такой как *E. coli* молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует любой из пептидов SVA, как это предусмотрено в данном документе. Альтернативно, клетка хозяина может представлять собой эукариотическую клетку, такую как клетка животного, клетка протисты, клетку растения, или клетку гриба. Предпочтительно эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как CHO, BHK или COS, или клетку гриба, такого как *Saccharomyces cerevisiae*, или клетку насекомого, такую как Sf9.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения одного или больше пептидов SVA, которые индуцируют иммунный ответ на SVA. Он включает культивирование трансформированного вектора экспрессии, кодирующего и экспрессирующего один или более пептидов SVA, описанных в данном документе. Экспрессированные белки либо сохраняются путем экспрессии организма, либо секретируются в культуральную среду. Экспрессия происходит в условиях, достаточных для получения пептида SVA, способного индуцировать иммунный ответ на SVA.

Способ получения вакцины рекомбинантно экспрессированного антигена P1-2A-P3, полученного в клетках насекомого с помощью рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего модифицированный белок P1-2A-P3 SVA, также предусмотрен в данном документе. Способ в одном иллюстративном варианте осуществления включает клонирование последовательности P1-2A-P3 SVA в вектор pVL1393 (BD Biosciences) и ко-трансфекцию клеток насекомого Sf9. Для инактивированного рекомбинантного материала SVA, сбор бакуловирусного SVA инактивировали в течение 24 ч с использованием 5 мМ БЭИ, очищали и фильтровали через 0,45 мкм. Как правило, инактивированный вирус подвергают дальнейшей обработке, например, путем концентрирования и смешивания с другими компонентами, чтобы получить композицию для продажи. Так, например, жидкости, содержащие инактивированный вирус, могут быть сконцентрированы и смешаны с адьювантом и/или антигеном(ами) с одним или более другими свиными патогенами.

Способы приготовления композиций по настоящему изобретению могут дополнительно включать перемешивание конъюгата одного или больше пептидов SVA или инактивированных целновирусных

препаратов и молекулы-носителя с физиологически приемлемым носителем, таким как фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинация. Специалисту в данной области техники будут понятно, что выбор носителя, адъюванта или комбинации будет определяться способом доставки, личными предпочтениями и видами животных среди прочего.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики инфекции SVA у субъекта. Этот метод включает предоставление одного или более пептидов SVA; приведение в контакт одного или более пептидов SVA с образцом, полученным от субъекта; и идентификацию субъекта как имеющего инфекцию SVA, если в образце обнаружено антитело, способное связываться с одним или более пептидов SVA.

В другом аспекте, данное изобретение относится к способу определения, что субъект ранее подвергался воздействию инфекции SVA и способен проявлять иммунный ответ на SVA. Этот метод включает предоставление одного или более пептидов SVA; приведение в контакт одного или более пептидов SVA с образцом, полученным от субъекта; и идентификацию субъекта как имеющего инфекцию SVA, если в образце обнаружено антитело, способное связываться с одним или более пептидов SVA.

Изобретение также относится к наборам, которые содержат иммуногенную композицию, которая содержит один или более пептидов SVA, предпочтительно вместе с молекулой-носителем; контейнер для упаковки иммуногенной композиции; набор напечатанных инструкций; и дозатор, подходящий для введения иммуногенной композиции животному. Необязательно, один или более пептидов SVA и молекула-носитель могут быть упакованы в виде конъюгата или как отдельные соединения. При раздельном комплекте также комплектуются средства конъюгирования одного или более пептидов SVA и молекулы-носителя, а также соответствующие напечатанные инструкции.

Настоящее изобретение также относится к наборам для вакцинации животного, содержащим набор напечатанных инструкций; диспенсер, подходящий для введения иммуногенной композиции, предусмотренной в данном документе, содержащей один или более пептидов SVA, животному; и причем по меньшей мере один из пептидов SVA эффективно иммунизирует животное от по меньшей мере одного заболевания, связанного с инфекцией SVA. Предпочтительно, один или более пептидов SVA выбирают из предусмотренных в данном документе. Наборы по настоящему изобретению могут дополнительно содержать ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинацию.

Диспенсер в наборе по данному изобретению подходит для дозирования его содержимого в виде капель; и иммуногенная композиция содержащая пептиды SVA, как предусмотрено в данном документе, включенная в набор, подходит для снижения тяжести по меньшей мере одного клинического признака инфекции SVA при введении интраназально, перорально, подкожно или внутримышечно животному. Предпочтительно, тяжесть клинического знака снижается по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 100% по сравнению с зараженным животным без лечения.

Способы лечения или профилактики инфекций, вызванных SVA, также раскрыты. Способ включает введение эффективного количества иммуногенной композиции по настоящему изобретению субъекту, причем указанное лечение или профилактика выбраны из группы, состоящей из уменьшения признаков инфекции SVA, снижения тяжести или частоты клинических признаков инфекции SVA, снижения смертности субъектов от инфекции SVA, а также их комбинаций.

Композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинацию. Такие композиции могут быть использованы в качестве вакцины и содержат инактивированную вакцину. Такие вакцины вызывают защитный иммунный ответ на по меньшей мере одно заболевание, связанное с SVA.

Специалистам в данной области будет понятно, что композиции, используемые в настоящем документе, могут включать известные инъекционные физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к использованию раствора для парентеральной инъекции или инфузии легко доступны водные изотонические растворы, например физиологические растворы или растворы белка плазмы. Кроме того, иммуногенные и вакцинные композиции по настоящему изобретению могут включать фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители, разбавители, изотонические агенты, стабилизаторы или адъюванты.

Способы по данному изобретению также могут включать смешивание композиции по данному изобретению с ветеринарно приемлемым носителем, адъювантом, или их комбинацией. Специалисту в данной области техники будут понятно, что выбор носителя, адъюванта или комбинации будет определяться способом доставки, личными предпочтениями и видами животных среди прочего.

Способы лечения или профилактики инфекций, вызванных SVA, также раскрыты. Способ включает введение эффективного количества иммуногенной композиции по настоящему изобретению животному, причем указанное лечение или профилактика выбраны из группы, состоящей из уменьшения признаков инфекции SVA, снижения тяжести или частоты клинических признаков инфекции SVA, снижения смертности животных от инфекции SVA, а также их комбинаций.

Предпочтительные способы введения включают пероральный, интраназальный, внутрикожный и

внутримышечный. Введение внутримышечным способом, наиболее предпочтительно в виде разовой дозы, является предпочтительным. Специалисту в данной области техники будет понятно, что композиции по настоящему изобретению также могут быть введены в двух или более дозах, а также, другими способами введения. Например, такие другие способы введения включают подкожный, внутрикожный, внутривенный, интраваскулярный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, интратекальный, внутритрахеальный, внутрикожный, внутрисердечный, интралобальный, интрамедуллярный, внутрилегочный или интравагинальный. В зависимости от желаемой продолжительности и эффективности лечения, композиции, согласно данному изобретению, могут быть введены один или несколько раз, также периодически, например на ежедневной основе в течение нескольких дней, недель или месяцев, и в разных дозировках.

Настоящее изобретение также относится к наборам для вакцинации животного, содержащим набор напечатанных инструкций; дозатор, подходящий для введения вакцины животному; и по меньшей мере один изолят культуры SVA. Наборы по настоящему изобретению могут дополнительно содержать ветеринарно приемлемый носитель, адъювант или их комбинацию.

Диспенсер в наборе по данному изобретению подходит для дозирования его содержимого в виде капель; и изолят, включенный в набор, подходит для снижения тяжести по меньшей мере одного клинического признака инфекции SVA при введении интраназально, перорально, подкожно или внутримышечно животному. В некоторых наборах изолят также способен снижать тяжесть по крайней мере одного клинического признака инфекции SVA. Предпочтительно, тяжесть клинического знака снижается по меньшей мере на 10% по сравнению с зараженным животным без лечения.

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

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 показывает схему (A) конструкта SVVP13C (SEQ ID NO: 18) и схему (B) конструкта SVVP13C-CO (кодон-оптимизированного) (SEQ ID NO: 20) для системы экспрессии бакуловируса.

Фиг. 2 показывает схему (A) конструкта SVVP1-His-Sires-SVV3C (SEQ ID NO: 32) и схему (B) конструкта SVVP1CO-His-Sires-SVV3C (кодон-оптимизированного) (SEQ ID NO: 33) для системы экспрессии бакуловируса.

Фиг. 3 показывает схему (A) конструкта SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) для мутирования сайта расщепления VP3/VP1 и схему (B) конструкта SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) для системы экспрессии бакуловируса.

Фиг. 4 показывает вестерн-блоттинг образцов супернатанта BaculoFBU/SVVP13C (A) (SEQ ID NO: 18) и BaculoFBU/SVVP13C CO (B) (SEQ ID NO: 20) по сравнению с нативным антигеном SVV, выявленным перекрестно реагирующими кроличьими поликлональными антителами анти-альфа-SVV VP1, анти-альфа-C VP2 и анти-альфа-C VP3. Полоса A является стандартом белка, полоса 1 является сбором супернатанта Baculo SVV, полоса 2 является антигеном SVV (SEQ ID NO: 3) и полоса 3 является отрицательным контролем сбора супернатанта Baculo. Ожидаемые размеры бэндов: полноразмерный P1 SVV=около 95 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 1-859), VP1=около 29 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 596-859), VP2=около 32 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 73-356), VP3=около 26 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 357-595).

Фиг. 5 показывает вестерн-блоттинг фракции сахарозы (A) нативного вируса SVV и фракции сахарозы (B) BaculoFBU/SVVP13C с кроличьими поликлональными антителами альфа-SVV VP1, альфа-SVV VP2 и альфа-SVV VP3. Полоса A является стандартом белка, полосы 1-10 представляют фракции сахарозы 1-10, N - отрицательный контроль BaculoFBU/без вставки, P является положительным контролем нативного инактивированного SVV и S является исходным образцом градиента сахарозы. Ожидаемые размеры бэндов: полноразмерный P1 SVV=около 95 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 1-859), VP1=около 29 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 596-859), VP2=около 32 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 73-356), VP3=около 26 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 357-595).

Фиг. 6 показывает вестерн-блоттинг сборов супернатантов BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18) и BaculoFBU/VVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) с кроличьими поликлональными антителами α-SVV VP1 (верхний ряд) и α-SVV VP3 (нижний ряд). Полоса A - стандарт белка, полоса 1 - сбор супернатанта Baculo SVV, полоса 2 - сбор супернатанта антигена SVV и дорожка 3 - сбор супернатанта Baculo отр. контроль.

Фиг. 7 показывает вестерн-блоттинг фракций сахарозы BaculoFBU/VVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) с кроличьими поликлональными антителами анти-SVV VP1, анти-SVV VP2 и анти-SVV VP3. Полоса A является стандартом белка, N является нативным контролем BaculoFBU/без вставки, P является положительным контролем нативного инактивированного SVV (SEQ ID NO: 3), S является повторно суспендированным в TBS осадком SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22,) и полосы 1-9 представляют фракции сахарозы 1-9. Полноразмерный P1 SVV=около 95 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 1-859), VP1=около

29 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 596-859), VP2=около 32 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 73-356), VP3=около 26 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 357-595).

Фиг. 8 показывает вестерн-блоттинг сбора супернатанта BaculoFBU/VVP13CD (SEQ ID NO: 24), выявленного кроличьими поликлональными антителами анти-SVV VP1, анти-SVV VP2 и анти-SVV VP3. Полоса А является стандартом белка, полоса 1 является сбором супернатанта Baculo SVV, полоса 2 является антигеном SVV (SEQ ID NO: 3) и полоса 3 является отрицательным контролем сбора супернатанта Baculo. Ожидаемые размеры бэндов: полноразмерный P1 SVV=около 95 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 1-859), VP1=около 29 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 596-859), VP2=около 32 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 73-356), VP3=около 26 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 357-595).

Фиг. 9 показывает вестерн-блоттинг фракций сахарозы BaluloFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) с кроличьими поликлональными антителами анти-SVV VP1, анти-SVV VP2 и анти-SVV VP3. Полоса А является стандартом белка, полоса 1 представляет собой сбор супернатанта Baculo SVV, полоса N является отрицательным контролем BaculoFBU/без вставки, Р является положительным контролем нативного инактивированного SVV (SEQ ID NO: 3), S является повторно суспендированным в ТВА осадком SVVP13CD (SEQ ID NO: 25) и полосы 1-10 представляют фракции сахарозы 1-10. Ожидаемые размеры бэндов: полноразмерный P1 SVV=около 95 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 1-859), VP1=около 29 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 596-859), VP2=около 32 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 73-356), VP3=около 26 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 357-595).

Фиг. 10 показывает вестерн-блоттинг BaculoFBU/SVVP13C (А) (SEQ ID NO: 18), BaculoFBU/SVVP13CD (А) (SEQ ID NO: 24) и BaculoFBU/SVVP13CVP3/VP1 (В) (SEQ ID NO: 22). Растворимые фракции с кроличьими поликлональными антителами α -SVV VP1, α -SVV VP2 и α -CBB VP3 в День 3. ДНС-ПААГ гель для BaculoFBU/SVVP13C и BaculoFBU/SVVP13CD (С). Полоса А - стандарт белка, полоса Р - положительный контроль нативного антигена SVV, полоса 1 - растворимая фракция SVVP13C в день 3, полоса 2 - растворимая фракция SVVP13CD в день 3, полоса 3 - растворимая фракция SVVP13C VP3/VP1 в день 3 и полоса N - отрицательный контроль растворимой фракции BaculoFBU/без вставки. Ожидаемые размеры бэндов: полноразмерный P1 SVV=около 95 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 1-859), VP1=около 29 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 596-859), VP2=около 32 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 73-356), VP3=около 26 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 357-595).

Фиг. 11 показывает вестерн-блоттинг фракций сахарозы в день 3 растворимого BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18) (А), BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) (В) и BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) (С) с кроличьими поликлональными антителами анти-альфа-SVV VP1, анти-альфа-SVV VP2 и анти-альфа-SVV VP3. Полоса А является стандартом белка, Р является положительным контролем нативного инактивированного SVV, полосы 1-11 представляют собой фракции сахарозы 1-11 и N является отрицательным контролем растворимой фракции BaculoFBU/без вставки. Ожидаемые размеры бэндов: полноразмерный P1 SVV=около 95 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 1-859), VP1=около 29 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 596-859), VP2=около 32 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 73-356), VP3=около 26 кДа (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 357-595).

Фиг. 12 показывает среднее значение наименьших квадратов ректальных температур ($^{\circ}\text{C}$) в зависимости от дня исследования и группы.

Фиг. 13 показывает среднее значение $\log_{10}$ геномных копий/мл РНК SVA группы в сыворотке в зависимости от группы и дня.

Подробное описание

В осуществлении настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантной ДНК, белковой химии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См, например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. K. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); the series, *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Protein purification methods - a practical approach* (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); и *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Перед описанием настоящего изобретения в деталях, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной ДНК, последовательностями полипептидов или параметрами процесса, так как таковые могут, конечно, варьироваться. Кроме того, следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения. Следует отметить, что, как использовано в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают также и множественное число, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на "антиген" включает смесь двух или более антигенов; ссылка на "наполнитель" включает смеси двух или более наполнителей и тому подобное.

А. Определения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимает специалист в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение на момент подачи заявки. Значение и объем терминов должны быть ясными; однако, в случае какой-либо скрытой неясности, определения, приведенные в данном документе, имеют преимущества над определениями в любом словаре или вне документа. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины, употребляемые в единственном числе, должны включать множественное число и термины, употребляемые во множественном числе, должны включать единственное число. При этом в данном документе использование "или" означает "и/или" если не указано иное. Кроме того, использование термина "включая", а также других форм, таких как "включает" и "включен" не является ограничивающим. Все патенты и публикации, упомянутых в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки.

"Защита от болезни", "защитный иммунитет", "функциональный иммунитет" и подобные фразы означают ответ на заболевание или состояние, вызванный путем введения одного или более терапевтических композиций по настоящему изобретению, или их комбинации, что приводит к менее вредным эффектам, чем можно было бы ожидать у неиммунизированного субъекта, который подвергся воздействию болезни или инфекции. Т.е. тяжесть вредных последствий заражения уменьшается у вакцинированного субъекта. Инфекция может быть снижена, замедлена или, возможно, полностью предотвращена у вакцинированного субъекта. В данном документе отдельно указано, если профилактика инфекции была полной. Если не указано, что профилактика инфекции была полной, то термин включает частичную профилактику.

В данном документе "снижение частоты и/или тяжести клинических признаков" или "снижение клинических симптомов" означает снижение количества инфицированных субъектов в группе, снижение или устранение количества субъектов, проявляющих клинические признаки инфекции, или снижение тяжести каких-либо клинических признаков, которые присутствуют у одного или более субъектов по сравнению с инфекцией дикого типа, но не ограничиваются этим. Например, это должно относиться к любому снижению нагрузки патогена, выделению патогена, снижению передачи патогенов или снижению любого клинического признака симптомов малярии. Предпочтительно, чтобы эти клинические признаки снижались у одного или более субъектов, получающих терапевтическую композицию по настоящему изобретению, по меньшей мере на 10% по сравнению с субъектами, не получающими композицию и которые заразились. Более предпочтительно клинические признаки снижаются у субъектов, получающих композицию по настоящему изобретению, по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%.

Термин "повышенная защита" в настоящем изобретении означает статистически значимое снижение одного или нескольких клинических симптомов, которые связаны с инфекцией, вызванной инфекционным агентом, предпочтительно SVA, соответственно, в вакцинированной группе субъектов по сравнению с контрольной группой невакцинированных субъектов, но не ограничивается этим. Термин "статистически значимое снижение клинических симптомов" означает, что частота возникновения по меньшей мере одного клинического симптома в вакцинированной группе субъектов по меньшей мере на 10%, предпочтительно на 20%, более предпочтительно на 30%, еще более предпочтительно на 50% и еще более предпочтительно на 70% ниже, чем в невакцинированной контрольной группы после заражения инфекционным агентом, но не ограничивается этим.

"Длительная защита" относится к "улучшенной эффективности", которая сохраняется в течение по меньшей мере 3 недель, более предпочтительно по меньшей мере 3 месяцев, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 месяцев. В случае домашнего скота, наиболее предпочтительно, чтобы продолжительная защита сохранялась до среднего возраста, в котором животные продаются на мясо.

"Иммуногенная или иммунологическая композиция" относится к композиции вещества, которая содержит по меньшей мере одну иммуногенную композицию SVA или ее иммуногенную часть, которая вызывает иммунный ответ в организме хозяина клеточного или антитело-опосредованного иммунного ответа на композицию. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция индуцирует иммунный ответ, и, более предпочтительно, предоставляет защитный иммунитет против одного или более клинических признаков инфекции SVA.

"Иммуногенный" или "антиген", используемые в данном описании, относятся к полипептиду или белку, который вызывает иммунный ответ, как описано в данном документе. "Иммуногенной" белок или полипептид SVA включает полноразмерную последовательность любого SVA, определенного в настоящем описании, или аналоги или их иммуногенные фрагменты. Термин "иммуногенный фрагмент" или "иммуногенная область" относятся к фрагменту или усеченной и/или замещенной форме SVA, которая включает один или более эпитопов, и, таким образом, вызывает иммунологический ответ, описанным в данном документе. В общем, такие усеченные и/или замещенные формы или фрагменты будут содержать по меньшей мере шесть смежных аминокислот полноразмерного белка SVA. Более предпочтительно, усеченные или замещенные формы, или фрагменты будут иметь по меньшей мере 10, более предпочтительно

тельно по меньшей мере 15, и еще более предпочтительно по меньшей мере 19 смежных аминокислот полноразмерного белка SVA. Такие фрагменты могут быть идентифицированы с использованием любого количества методик картирования эпитопов, хорошо известных в данной области техники. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены с помощью одновременно синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, пептидов, соответствующих областям белковой молекулы, и взаимодействия пептидов с антителами, в то время как пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методы известны и описаны в данной области техники, см., например, патент США № 4708871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; и Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. Точно так же, конформационные эпитопы могут быть легко идентифицированы путем определения пространственной конформации аминокислот, например, с помощью рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См. протоколы картирования эпитопов выше. Синтетические антигены также включены в определение, например, полиэпитопов, фланкирующих эпитопов и других рекомбинантных или синтетически полученных антигенов. См., например, Bergmann et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. and Cell Biol.* 75:402-408; и Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998. (Описания и содержание которых включены в данный документ посредством ссылки).

"Иммунный ответ" или "иммунологический ответ" означает развитие клеточного и/или антителоопосредованного иммунного ответа на композицию или вакцину, представляющие интерес, но не ограничиваясь этим. Как правило, иммунный или иммунологический ответ включает один или более из следующих эффектов: производство или активацию антител, В-клеток, Т-хелперов, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных специфически на антиген или антигены, включенные в композицию или вакцину, представляющих интерес, но не ограничиваются ими. Предпочтительно, хозяин будет показывать либо терапевтическую или защитную иммунологическую (вторичную) реакцию таким образом, что устойчивость к новой инфекции будет повышена и/или клиническая тяжесть заболевания снижена. Такая защита будет продемонстрирована либо снижением количества симптомов, тяжести симптомов, либо отсутствием одного или более симптомов, связанных с инфекцией патогена, задержкой наступления виремии, снижением вирусной персистенции, снижением общей вирусной нагрузки и/или снижением вирусной экскреции.

В данном документе "специфический иммунореактивный" относится к иммунореактивному белку или полипептиду, который распознает характерный антиген инфекции SVA, но не реагирует с антигеном, характерным для строгого контрольного заражения.

Как использовано в данном документе "фармацевтически- или ветеринарно-приемлемый носитель" включает все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, адъюванты, стабилизирующие агенты, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты замедления адсорбции и тому подобное. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, и особенно тех, которые включают лиофилизированные иммуногенные композиции, стабилизирующие агенты для применения в настоящем изобретении включают стабилизаторы для лиофилизации или сублимационной сушки.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит адъювант. Термин "адъюванты", используемый в данном документе, может включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например Квил А, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию вода-в-масле, эмульсию масло-в-воде, эмульсию вода-в-масле-в-воде. Эмульсия может быть основана, в частности, на легком жидком парафиновом масле (по типу европейской фармакопеи); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном в результате олигомеризации алкенов, в частности изобутена или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более конкретно, растительных маслах, этилолеате, пропиленгликоле ди-(каприлат/капрат), глицериле три-(каприлат/капрат) или пропиленгликоле диолеате; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности эфиров изостеариновой кислоты. Масло используют в комбинации с эмульгаторами для образования эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности сложные эфиры сорбитана, маннита (например, ангидроманнит олеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистереариновой кислоты, которые необязательно этоксилированы, и полиоксипропилен-полиоксиэтиленовые сополимерные блоки, в частности продукты плуроника, особенно L121. См. Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) и Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Иллюстративные адъюванты представляют собой эмульсию SPT, описанную на стр. 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" в редакции M. Powell и M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на странице 183 этой же книги. Еще одним примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильных производных. Предпочтительные

адъювантные соединения представляют собой полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые являются поперечно-связанными, особенно с полиалкениловыми простыми эфирами Сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны под термином карбомер (Phameugopa Vol. 8, No. 2, June 1996). Специалисты в данной области техники могут также сослаться на патент США № 2909462, который описывает подобные акриловые полимеры, поперечно-сшитые с полигидроксильрованным соединением, имеющим по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более чем 8, атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных групп заменены ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительные радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, являются, например, винилами, аллилами и другими этиленненасыщенными группами. Ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие как метил. Эти продукты, продаваемые под названием КАРБОПОЛ® (Lubrizol) являются особенно подходящими. Они являются поперечно-сшитыми с аллилсахарозой или аллил пентаэритритом. Среди них может быть упомянут Карбопол 974Р, 934Р и 971Р. Наиболее предпочтительным является использование Карбопол 971Р. Среди сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила, являются сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к кислотному раствору, который будет нейтрализован, предпочтительно до физиологического рН для обеспечения раствора адъюванта, в который будет включена только иммуногенная, иммунологическая или вакцинная композиция.

Другие подходящие адъюванты включают адъювантную систему RIBI (Ribi Inc.) сополимерный Блок (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA) монофосфорилилипид А, липидно-аминный адъювант Avridine, термолабильный энтеротоксин E.coli (рекомбинантный или иной), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид или природные цитокины или рекомбинантные цитокины, или их аналоги, или стимуляторы эндогенного высвобождения цитокинов, среди многих других, но не ограничиваются ими.

Ожидается, что адъювант может быть добавлен в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу, более предпочтительно в количестве от примерно 500 мкг до примерно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно в количестве от примерно 750 мкг до примерно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно в количестве примерно 1 мг на дозу. Альтернативно, адъювант может быть в концентрации примерно от 0,01 до 50%, предпочтительно в концентрации от примерно 2 до 30%, более предпочтительно в концентрации от примерно 5 до 25%, еще более предпочтительно в концентрации около 7 до 22%, и наиболее предпочтительно в концентрации от 10 до 20% по объему конечного продукта.

Термин "разбавители" может включать воду, физиологический раствор, декстрозу, этанол, глицерин и тому подобное. Изотонические агенты могут включать хлорид натрия, декстрозу, манит, сорбит и лактозу среди прочих.

Стабилизаторы включают альбумин и щелочные соли этилендиаминтриуксусной кислоты, среди прочих.

Термин "выделенный" означает измененный "от руки человека" от его естественного состояния, т.е., если он существует в природе, он был изменен или удален из своей первоначальной среды, или оба. Например, полинуклеотид или полипептид, естественным образом присутствующие в живом организме, не являются "изолированными", но тот же полинуклеотид или полипептид, выделенные из сосуществующих материалов в их естественном состоянии, являются "выделенными", как этот термин используется в настоящем описании.

Термин "безопасность" относится к отсутствию неблагоприятных последствий у вакцинированных животных после вакцинации, в том числе: потенциальной реверсии вакцины на основе бактерии к вирулентности, клинически значимым побочным эффектам, таким как стойкость, системной болезни или неприемлемого воспаления в месте введения вакцины, но не ограничиваясь ими.

Термины "вакцинация" или "вакцинирование" или его варианты, как используются, означает процесс, который включает введение иммуногенной композиции по настоящему изобретению, которая при введении в организм животного вызывает или способна вызывать - прямо или косвенно - иммунный ответ у животного на SVA, но не ограничивается этим.

Термин "смертность" в контексте настоящего изобретения относится к смерти, вызванной инфекцией SVA, и включает ситуацию, когда инфекция является настолько серьезной, что животное умерщвляют, чтобы предотвратить страдания и обеспечить гуманное окончание его жизни.

В данном документе термин "эффективная доза" означает количество антигена, которое вызывает или может вызывать иммунный ответ, который приводит к снижению клинических симптомов у животного, которому вводят антиген, но не ограничиваясь этим.

Как использовано в данном описании термин "эффективное количество" означает, в контексте композиции, количество иммуногенной композиции, способной индуцировать иммунный ответ, который снижает частоту или уменьшает тяжесть инфекции или инцидент заболевания у животного. В частности, эффективное количество относится к колониеобразующим единицам (КОЕ) на дозу. В качестве альтернативы, в контексте терапии, термин "эффективное количество" относится к количеству терапии, которое является дос-

таточным для снижения или ослабления тяжести или продолжительности заболевания или расстройства, или одного или более их симптомов, предотвращения прогрессирования заболевания или расстройства, причинения регрессии заболевания или расстройства, предотвращения рецидивов, развития, начала или прогрессирования одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или расстройством, или повышения или улучшения профилактики или лечения другой терапией или терапевтическим агентом.

Термин "фрагмент" относится к фрагменту или усеченной и/или замещенной форме пептида SVA или гена, кодирующего такой пептид SVA, который включает один или более эпитопов, и, таким образом, вызывающим иммунологическую реакцию на SVA. Предпочтительно, такой фрагмент представляет собой фрагмент или усеченную и/или замещенную форму любого из пептидов SVA или любого из генов SVA, предусмотренных настоящим документом. В общем, такие усеченные и/или замещенные формы или фрагменты будут содержать по меньшей мере шесть смежных аминокислот полноразмерной последовательности SVA. Более предпочтительно, усеченные или замещенные формы, или фрагменты будут иметь по меньшей мере 10, более предпочтительно по меньшей мере 15, и еще более предпочтительно по меньшей мере 19 смежных аминокислот полноразмерной последовательности SVA. Такие фрагменты могут быть идентифицированы с использованием любого количества методик картирования эпитопов, хорошо известных в данной области техники. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены с помощью одновременно синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, пептидов, соответствующих областям белковой молекулы, и взаимодействия пептидов с антителами, в то время как пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методы известны и описаны в данной области техники, см., например, патент США № 4708871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; и Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. Точно так же, конформационные эпитопы могут быть легко идентифицированы путем определения пространственной конформации аминокислот, например, с помощью рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса.

См. протоколы картирования эпитопов выше. Синтетические антигены также включены в определение, например, полиэпитопов, фланкирующих эпитопов и других рекомбинантных или синтетически полученных антигенов. См., например, Bergmann et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. and Cell Biol.* 75:402-408; и Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998. (Описания и содержание которых все включены в данный документ посредством ссылки).

Термин "вариант" по отношению к последовательности (например, полипептиду или последовательности нуклеиновой кислоты) означает, по существу, сходные последовательности. Для получения нуклеотидных последовательностей, содержащих открытую рамку считывания, варианты включают последовательности, которые, из-за вырожденности генетического кода, кодируют идентичную аминокислотную последовательность нативного белка. Вариантные нуклеотидные последовательности также включают синтетически полученные нуклеотидные последовательности, такие как те, которые получены, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза, и для открытых рамок считывания кодируют нативный белок, а также те, которые кодируют полипептид, имеющий аминокислотные замены по отношению к нативному белку в целях оптимизации кодонов. Как правило, варианты нуклеотидной последовательности по данному изобретению будут по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 91, 92, 93 или 94%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95, 96, 96,1, 96,2, 96,3, 96,4, 96,5, 96,6, 96,7, 96,8, 96,9, 97, 97,1, 97,2, 97,3, 97,4, 97,5, 97,6, 97,7, 97,8, 97,9, 98, 98,1, 98,2, 98,3, 98,4, 98,5, 98,6, 98,7, 98,8, 98,9, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9% идентичны последовательности в сравнении с эталонной последовательностью, используя одну из программ выравнивания, описанную с использованием стандартных параметров.

Термин "иммунореактивный к SVA", как используются в данном документе, означает, что пептид или фрагмент вызывает иммунологический ответ на SVA.

Термин "гомология", как он используется в данном документе, относится к способу определения родства двух последовательностей. Для определения гомологии последовательности две или более последовательностей оптимально выравнивают и при необходимости вводят гэпы. Однако в отличие от "идентичности последовательности", консервативные аминокислотные замены учитываются в качестве совпадения при определении гомологии последовательностей. Другими словами, чтобы получить полипептид или полинуклеотид, имеющий 95% гомологии последовательности с эталонной последовательностью, 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% аминокислотных остатков или нуклеотидов в эталонной последовательности должны соответствовать или содержать консервативную замену с другой аминокислотой или нуклеотидом, или количество аминокислот или нуклеотидов до 15%, предпочтительно до 10%, еще более предпочтительно до 5% от общего количества аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включая консервативные замены, в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Предпочтительно гомологичная последовательность содержит по меньшей мере отрезок из 50, еще более предпочтительно из 100, еще более предпочтительно из 250, еще более предпочтительно из 500 нуклеотидов.

"Консервативная замена" относится к замене аминокислотного остатка или нуклеотида на другой аминокислотный остаток или нуклеотид, имеющий сходные характеристики или свойства, включая размер, гидрофобность и т.д., таким образом, чтобы общая функциональность существенно не меняется.

"Идентичность последовательности", как это известно в данной области техники, относится к родству между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, а именно эталонной последовательностью и последовательностью, предоставленной для сравнения с эталонной последовательностью. Идентичность последовательности определяется путем сравнения данной последовательности с эталонной последовательностью после того, как последовательности будут оптимально выровнены, чтобы достичь самой высокой степени сходства последовательностей, как это определено с помощью совпадений между строками таких последовательностей. После такого выравнивания идентичность последовательности определяется положением за положением, например, последовательности являются "одинаковыми" по определенному положению, если в этом положении нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. Общее количество таких идентичностей положений затем делится на общее количество нуклеотидов или остатков в эталонной последовательности для определения процента идентичности последовательности. Идентичность последовательностей можно легко рассчитать с помощью известных методов, включая те, которые описаны в Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Bio-computing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), но не ограничиваясь ими, описание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Предпочтительные методы определения идентичности последовательности разработаны, чтобы дать наибольшее совпадение между тестируемыми последовательностями. Методы определения идентичности последовательностей зашифрованы в общедоступных компьютерных программах, определяющих идентичность последовательности между данными последовательностями. Примеры таких программ включают пакет программ GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), но не ограничиваются ими. Программа BLASTX общедоступна на NCBI и других ресурсах (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), описание которых включено в настоящее описание посредством ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности с использованием штрафов за гэп по умолчанию для того, чтобы обеспечить высокий уровень идентичности последовательностей между данными и эталонными последовательностями. В качестве иллюстрации, под полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% "идентичности последовательности" с эталонной нуклеотидной последовательностью, предполагают, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида идентична эталонной последовательности за исключением того, что данная последовательность полинуклеотида может включать до 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде, имеющем нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности с эталонной нуклеотидной последовательностью, до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими нуклеотидами, или количество нуклеотидов до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% от общего количества нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти мутации эталонной последовательности могут происходить в концевых положениях 5' или 3' эталонной нуклеотидной последовательности или где-нибудь между этими концевыми положениями, вперемежку либо по отдельности среди нуклеотидов в эталонной последовательности или в одной или нескольких смежных группах в пределах эталонной последовательности. Аналогично, под полипептидом, имеющим данную аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью, предполагают, что данная аминокислотная последовательность полипептида идентична эталонной последовательности за исключением того, что данная последовательность полипептида может включать до 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно до 5 изменений аминокислотного состава на каждые 100 аминокислот эталонной аминокислотной последовательности. Другими словами, чтобы получить данную последовательность полипептида, имеющего по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью, до 15%, предпочтительно до 10%, еще более предпочтительно до 5% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или замещены другой аминокислотой, или количество аминокислот до 15%, предпочтительно до 10%, еще более предпочтительно до 5% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталон-

ную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить на аминокислотных или карбоксильных концевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, вперемежку либо по отдельности среди остатков в эталонной последовательности, или в одной или нескольких смежных группах в пределах эталонной последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Тем не менее, консервативные замены не включены в качестве совпадения при определении идентичности последовательности.

Термины "идентичность последовательности" или "процент идентичности" используются в данном документе взаимозаменяемо. Для целей настоящего изобретения в данном документе определено, что для того, чтобы определить процент идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в последовательность первой аминокислоты или нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Аминокислотные или нуклеотидные остатки в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных положениях затем сравниваются. Когда положение в первой последовательности занято одним и тем же аминокислотным или нуклеотидным остатком в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными по данному положению. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество положений}} \times 100$). Предпочтительно, чтобы эти две последовательности имели одинаковую длину.

Сравнение последовательностей может быть осуществлено по всей длине двух сравниваемых последовательностей или по фрагментам двух последовательностей. Как правило и предпочтительно в объеме настоящего изобретения, сравнение осуществляют по всей длине двух сравниваемых последовательностей. Однако идентичность последовательности может быть осуществлена по области, например, двадцати, пятидесяти, ста или более смежных аминокислотных остатков.

Как использовано в данном описании и, в частности, понятно, что термин "имеющий по меньшей мере X% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты/аминокислоты в соответствии с SEQ ID NO: Y" (или, альтернативно, термин "имеющий по меньшей мере X% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты/аминокислоты в соответствии с SEQ ID NO: Y") эквивалентен термину "имеющий по меньшей мере X% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты/аминокислоты в соответствии с SEQ ID NO: Y по длине последовательности SEQ ID NO: Y" или термин "имеющий по меньшей мере X% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты/аминокислоты в соответствии с SEQ ID NO: Y по всей длине последовательности SEQ ID NO: Y", соответственно.

Векторы и способы получения и/или применения векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут быть способами или аналогичными способами, описанными в: Патентах США № 4603112, 4769330, 5174993, 5505941, 5338683, 5494807, 4722848, 5942235, 5364773, 5762938, 5770212, 5942235, 382425, PCT публикациях WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update," PNAS USA 93: 11349-11353, October 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, October 1996; Smith et al., Патент США № 4745051 (рекомбинантный бакуловирус); Richardson, C. D. (Editor), *Methods in Molecular Biology* 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector," *Molecular and Cellular Biology*, December, 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156-2165; Pennock et al., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector," *Molecular and Cellular Biology* March 1984, Vol. 4, No. 3, p. 406; EPA0370573; заявке США № 920197, поданной 16 октября 1986 года; публикации патента EP № 265785; патенте США № 4769331 (рекомбинантный вирус герпеса); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, October 1996; Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, October 1996; Robertson et al., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes," PNAS USA 93: 11334-11340, October 1996; Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, October 1996; Kitson et al., *J. Virol.* 65, 3068-3075, 1991; Патентах США. № 5591439, 5552143. WO 98/00166; решений по заявкам США № 08/675556 и 08/675566, обе поданы 3 июля 1996 (рекомбинантный аденовирус); Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," *Seminars in Virology* (Vol. 3) p. 237-52, 1993; Ballay et al. *EMBO Journal*, vol. 4, p. 3861-65, Graham, *Tibtech* 8, 85-87, April, 1990; Prevec et al., *J. Gen Virol.* 70, 42434; PCT WO 91/11525; Feigner et al. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561, *Science*, 259: 1745-49, 1993; и McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, October 1996; и патентах США. № 5591639, 5589466 и 5580859, также как и WO 90/11092, WO 93/19183, WO 94/21797, WO 95/11307, WO 95/20660; Tang et al., *Nature*,

and Furth et al., *Analytical Biochemistry*, относящихся к экспрессии ДНК-векторов, в частности. Смотрите также WO 98/33510; Ju et al., *Diabetologia*, 41: 736-739, 1998 (Система экспрессии лентивирусов); Sanford et al., патентах США № 4945050; Fischbach et al. (Intracel); WO 90/01543; Robinson et al., *Seminars in Immunology* vol. 9, pp. 271-283 (1997), (векторные системы ДНК); Szoka et al., патенте США № 4394448 (способ введения ДНК в живые клетки); McCormick et al., патенте США № 5677178 (использование цитопатических вирусов); и патенте США № 5928913 (векторы для доставки генов); а также других документов, цитируемых в настоящем описании.

Предпочтительные вирусные векторы включают бакуловирус, такие как BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Calif.), в частности, при условии, что производственные клетки представляют собой клетки насекомых. Хотя система экспрессии бакуловируса является предпочтительной, специалистам в данной области техники понятно, что и другие системы экспрессии будут работать для целей настоящего изобретения.

Б. Молекулы-носители.

Молекулы-носители, с которыми пептиды SVA по данному изобретению могут быть конъюгированы или ковалентно связаны, предпочтительно являются теми, которые были описаны выше. Предпочтительными носителями для использования у животных являются бычий сывороточный альбумин и гемоцианин лимфы улитки. Белковые носители, пригодные для использования у человека, включают столбнячный анатоксин, анатоксин дифтерии, бесклеточную вакцину коклюша (анатоксин LPF), перекрестно реагирующие материалы (CRM), которые являются похожими по антигену на бактериальные токсины, но нетоксичными из-за мутации. Так, например, CRM 197, полученный в соответствии с Pappenheimer, et al, *Immunochemistry*, 9, 891-906 (1972), а также другие бактериальные белковые носители, например, может быть использован менингококковый белок внешней мембраны. Предпочтительно, чтобы сам белок-носитель являлся иммуногеном.

Пептиды SVA по данному изобретению могут быть ковалентно связаны с носителем любым удобным способом, известным в данной области техники. В то время как использование симметричного линкера, такого как дигидразид адипиновой кислоты, как описано в Schneerson et al, *J. Experimental Medicine*, 152, 361-376 (1980), или гетеробифункционального линкера, такого как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионат, как описано в Fattom et al, *Infection and Immunity*, 56, 2292-2298 (1988) находится в пределах объема настоящего изобретения, предпочтительным является избегать использования любого линкера, и вместо этого соединить пептид SVA по данному изобретению непосредственно с молекулой-носителем. Такое соединение может быть достигнуто с помощью восстановительного аминирования, как описано в Landi et al *J. Immunology*, 127, 1011-1019(1981).

Размер иммуногенной композиции, как определено средней молекулярной массой, является переменным и зависит от выбранного пептида(ов) SVA и способа сочетания пептида(ов) SVA с носителем. Таким образом, он может быть как 1000 дальтон (10) или больше, чем 10 дальтон. С помощью способа соединения восстановительным аминированием, молекулярный вес пептида(ов) SVA находится, как правило, в диапазоне от 5000 до 500000, например от 300000 до 500000, или, например, от 5000 до 50000 дальтон.

Молекулы-носители, т.е. пептиды, их производные и аналоги, и пептидомиметики, которые специфически связывают пептид SVA по данному изобретению, могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, в том числе твердофазным синтезом или с помощью раствора (Nakanishi et al., 1993, *Gene* 137:51-56; Merrifield, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 15:2149-2154; Neurath, H. et al., Eds., *The Proteins*, Vol II, 3d Ed., p. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976), включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме), но не ограничиваясь ими.

Пептиды SVA по данному изобретению или антитела или их связывающие области по настоящему изобретению могут вводиться в инъеклируемых дозах в растворе или в суспензии в разбавителе с фармацевтическим или ветеринарным носителем.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких молекул может быть определена с помощью стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (летальной дозы для 50% популяции).

Вакцины по настоящему изобретению могут быть мультивалентными или одновалентными. Мультивалентные вакцины сделаны посредством иммуно-конъюгации множества пептидов SVA с молекулой-носителем.

В одном аспекте композиции пептидов SVA содержат эффективное иммунизирующее количество иммуногенного конъюгата, предпочтительно в комбинации с иммуностимулятором; и физиологически приемлемый носитель. Как используется в данном контексте, термин "иммуностимулятор" охватывает любое соединения или композицию, которые обладают способностью усиливать активность иммунной системы, будь то специфический потенцирующий эффект в сочетании со специфическим антигеном или просто независимый эффект от активности одного или более элементов иммунного ответа. Соединения иммуностимуляторы включают минеральные гели, например гидроксид алюминия; поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы PLURONIC®; полианионы; пептиды; масляные эмульсии; квасцы и MDP, но не ограничиваются ими. Способы использования этих материалов хорошо

известны в данной области техники, и специалист в данной области способен определить оптимальное количество стимулятора для данной вакцины. Более чем один иммуностимулятор может быть использован в данной композиции.

Иммуноген также может быть включен в липосомы или конъюгирован с полисахаридами и/или другими полимерами для использования в составе вакцины.

Композиции могут, по желанию, быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну или более единичных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Упаковка или дозирующее устройство может сопровождаться инструкциями по введению предпочтительно по введению млекопитающему, особенно свинье. С таким контейнером(ами) может быть связано уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, такое уведомление отражает разрешение агентством производства, применения или продажи для введения человеку.

В. Адьюванты.

С целью дальнейшего повышения иммуногенности иммуногенные композиции, предусмотренные настоящим документом, и которые содержат один или более пептидов SVA, могут также содержать один или более адьювантов.

Адьювант может быть очищен с помощью любого из способов, описанных ранее или известных в данной области техники. Предпочтительным способом очистки является хроматография на силикагеле, в частности "флэш" (быстрый) хроматографический метод, как описано в W. Clark Still et al, J. Organic Chemistry, 43, 2923-2925 (1978). Тем не менее, другие хроматографические методы, в том числе HPLC, могут быть использованы для очистки адьюванта. Кристаллизация может также использоваться для очистки адьюванта. В некоторых случаях, никакая очистка не требуется, поскольку непосредственно из синтеза получают продукт аналитической чистоты.

В вакцинные композиции по настоящему изобретению получают путем физического смешивания адьюванта с пептида(ами) SVA в соответствующих стерильных условиях в соответствии с известными способами, чтобы получить композицию с адьювантом. Комплексообразование пептида(ов) SVA и адьюванта облегчается наличием чистого отрицательного заряда на конъюгате, который электростатически притягивается к положительному заряду, присутствующему на длинноцепочечном алкильном соединении адьюванта.

Ожидается, что адьювант может быть добавлен в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу, более предпочтительно в количестве от примерно 500 мкг до примерно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно в количестве от примерно 750 мкг до примерно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно в количестве примерно 1 мг на дозу. Альтернативно, адьювант может быть в концентрации примерно от 0,01 до 75%, предпочтительно в концентрации от примерно 2 до 30%, более предпочтительно в концентрации от примерно 5 до 25%, еще более предпочтительно в концентрации около 7 до 22%, и наиболее предпочтительно в концентрации от 10 до 20% по объему конечного продукта.

Г. Физиологически приемлемые носители.

Вакцинные композиции по настоящему изобретению могут быть составлены с использованием способов, аналогичных тем, которые используются для других фармацевтических полипептидных композиций. Таким образом, адьювант и пептид(ы) SVA, предпочтительно конъюгированные с молекулой-носителем и/или смешанные с адьювантом, могут храниться в лиофилизированной форме и быть восстановленными в физиологически приемлемом носителе с получением суспензии перед введением. Альтернативно, адьювант и конъюгат могут храниться в носителе. Предпочтительные носители являются стерильными растворами, в частности стерильными буферными растворами, такими как фосфатно-солевой буфер. Любой способ комбинирования адьюванта и конъюгата в носителе для улучшения иммунологической эффективности иммуногенной композиции является подходящим.

Объем разовой дозы вакцины по настоящему изобретению может изменяться, но обычно находится в пределах диапазонов, обычно используемых в обычных вакцинах. Объем разовой дозы составляет предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 3 мл, предпочтительно от примерно 0,2 до примерно 1,5 мл, более предпочтительно от примерно 0,2 до примерно 0,5 мл при концентрациях конъюгата и адьюванта, указанных выше.

Вакцинные композиции по настоящему изобретению могут быть введены любым удобным способом.

Д. Составы.

Иммуногенные конъюгаты, содержащие пептид SVA, связанный с молекулой-носителем, могут быть использованы в качестве вакцины для иммунизации против SVA. Вакцины, содержащие иммуногенный конъюгат в физиологически приемлемом носителе, могут быть использованы в способе иммунизации животных, предпочтительно свиней, для лечения или профилактики инфекций, вызванных SVA.

Антитела, сгенерированные в ответ на иммуногенные конъюгаты по настоящему изобретению путем иммунизации иммуногенным конъюгатом, могут быть использованы в пассивной иммунотерапии и генерации антиидиотипических антител для лечения или профилактики инфекции SVA.

Субъект, которому вводят композицию, предпочтительно представляет собой животное, включая коров, лошадей, овец, свиней, птиц (например, куриц), коз, кошек, собак, хомяков, мышей и крыс, но не ограничиваясь ими, наиболее предпочтительно млекопитающее является свиньей.

Составы по данному изобретению содержат эффективное иммунизирующее количество одного или более иммуногенных композиций или антител к ней, и физиологически приемлемый носитель. Вакцины содержат эффективное иммунизирующее количество одного или более иммуногенных композиций и физиологически приемлемый носитель. Состав должен соответствовать способу введения.

Иммуногенная композиция, по желанию, может также содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH-буферные агенты. Иммуногенная композиция может представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетку, пилюлю, капсулу, препарат с замедленным высвобождением, или порошок. Пероральные составы могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния и т.д.

Е. Эффективная доза.

Соединения, описанные в данном документе, могут быть введены субъекту в терапевтически эффективных дозах для лечения SVA-ассоциированных заболеваний. Доза будет зависеть от хозяина, который получает вакцину, а также таких факторов как размер, вес и возраст хозяина.

Точное количество иммуногенного конъюгата или антитела по данному изобретению для использования в составе, будет зависеть от способа введения и природы субъекта (например, вида, возраста, размера, стадии/уровня заболеваемости), и должно быть определено в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого субъекта в соответствии со стандартными клиническими методами. Эффективное иммунизирующее количество представляет собой количество, достаточное для лечения или профилактики инфекционного заболевания SVA у субъекта. Пример соответствующей дозы составляет примерно от 6 до 7 log TCID₅₀/мл. В качестве альтернативы эффективные дозы также могут быть экстраполированы с кривых доза-ответ, полученных на модельных тест-системах животных, и могут варьировать от 0,001 до 100 мг/кг.

Токсичность и терапевтическая эффективность соединений может быть определена с помощью стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (летальной дозы для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной в 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом, и он может быть выражен как отношение LD₅₀/ED₅₀. Соединения, которые проявляют высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В то время как могут быть использованы соединения, которые проявляют токсические побочные эффекты, следует соблюдать осторожность, чтобы разработать систему доставки, которые нацеливают такие соединения к участку пораженной ткани, чтобы свести к минимуму потенциальную опасность повреждения неинфицированных клеток и, тем самым, уменьшить побочные эффекты.

Данные, полученные из анализов на клеточных культурах и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона дозировок для применения у животных, особенно свиней. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с низкой токсичностью или практически без нее. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Для любого соединения, используемого в способах по данному изобретению, терапевтически эффективная доза может быть изначально оценена из анализов на клеточных культурах. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме, который включает IC₅₀ (т.е. концентрацию испытуемого соединения, которое достигает полумаксимального ингибирования симптомов), как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения доз у субъектов. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Иммуногенность композиции может быть определена путем мониторинга иммунного ответа испытуемых после иммунизации композицией путем использования любого иммуноанализа, известного в данной области техники. Генерация гуморального (антитела) ответа и/или клеточно-опосредованного иммунитета может быть принята в качестве показателя иммунного ответа. Испытуемые субъекты могут включать животных, таких как свиньи, мыши, хомяки, собаки, кошки, кролики, коровы, лошади, овцы, птицы (например, курицы, утки, гуси и индейки).

Иммунный ответ испытуемых субъектов может быть проанализирован с помощью различных подходов, таких как: реактивности полученной иммунной сыворотки к иммуногенному конъюгату, как анализировали с помощью известных методов, например иммуноферментного анализа (ИФА), иммуноблоттинга, иммунопреципитации и т.д.; или путем защиты иммунизированных хозяев от инфицирования патогеном и/или ослабления симптомов вследствие инфекции, вызванной патогеном, у иммунизированных хозяев, как определено любым способом, известным в данной области техники, для количественного определения уровней агента инфекционного заболевания, например бактериальных уровней (например, путем культивирования образца от субъекта), или другим методом, известным в данной области техники. Уровни агента инфекционного заболевания также могут быть определены путем измерения уровней антигена, против ко-

торого направлен иммуноглобулин. Снижение уровней агента инфекционного заболевания или облегчение симптомов инфекционного заболевания указывает, что композиция является эффективной.

Терапевтические средства по данному изобретению может быть протестированы *in vitro* на желаемую терапевтическую или профилактическую активность перед использованием *in vivo* у животных или человеке. Например, анализы *in vitro*, которые могут быть использованы, чтобы определить введение конкретного терапевтического средства, включают анализы клеточных культур *in vitro*, в которых соответствующие клетки из клеточной линии или культивированные клетки от субъекта, имеющего конкретное заболевание или расстройство, подвергаются действию или введению терапевтического средства, и наблюдается эффект терапевтического средства на клетки.

Альтернативно, терапевтическое средство может быть исследовано путем контактирования терапевтического средства с клетками (либо культивируемыми от субъекта, либо от культивируемой клеточной линии), которые восприимчивы к инфекции, вызванной агентом инфекционного заболевания, но это не инфицированы агентом инфекционного заболевания, воздействия на клетку агентом инфекционного заболевания, а затем определения, является ли уровень инфицирования клеток, контактировавших с терапевтическим средством, ниже, чем уровень инфицирования клеток, не контактировавших с терапевтическим средством. Заражение клеток агентом инфекционного заболевания может быть проанализировано с помощью любого способа, известного в данной области техники.

Кроме того, терапевтическое средство может быть оценено путем измерения уровня молекулы, против которой направлено антитело, в модели животного или человеческого субъекта в соответствующие интервалы времени до, во время или после терапии. Любое изменение или отсутствие изменений в количестве молекулы могут быть идентифицированы и коррелированы с эффектом лечения у субъекта. Уровень молекулы может быть определен любым способом, известным в данной области техники.

После вакцинации животного инфекцией SVA с использованием способов и композиций по настоящему изобретению, любой анализ связывания, известный в данной области техники, может быть использован для оценки связывания между полученным в результате антителом и конкретной молекулой. Эти анализы могут быть также выполнены для отбора антител, которые проявляют более высокую аффинность или специфичность в отношении конкретного антигена.

Ж. Способы обнаружения и диагностики.

Антитела или их связывающие области, полученные в результате использования пептидов SVA по настоящему изобретению, могут быть использованы для обнаружения в образце наличия вируса SVA. Этот метод обнаружения содержит следующие этапы: обеспечение изолированного антитела или его связывающей области, выработанного на пептид SVA по данному изобретению, добавление к изолированному антителу или его связывающей области образца, предположительно содержащего количество SVA, и обнаружение присутствия комплекса, включающего связывания изолированного антитела или его связывающей области с SVA.

Антитела или их связывающие области по настоящему изобретению также могут быть использованы для обнаружения в образце наличия пептида SVA. Этот метод обнаружения содержит следующие этапы: обеспечение изолированного антитела или его связывающей области, выработанного на пептид SVA, добавление к изолированному антителу или его связывающей области образца, предположительно содержащего количество пептида SVA, и обнаружение присутствия комплекса, включающего связывания изолированного антитела или его связывающей области с пептидом SVA.

Иммуноглобулины, в частности антитела (и их функционально активные фрагменты), которые связываются с конкретной молекулой, которая является членом связывающейся пары, могут быть использованы в качестве диагностики и прогнозирования, как описано в данном документе. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает измерение члена связывающейся пары и использование таких измерений в клинической практике. Иммуноглобулины по настоящему изобретению могут быть использованы, например, в обнаружении антигена в биологическом образце, при этом субъекты могут быть проверены на аберрантные уровни молекулы, с которой связывается иммуноглобулин, и/или на наличие аномальных форм таких молекул. Под "аномальным уровнем" подразумевают повышенный или пониженный по отношению к настоящему, или стандартный уровень, представляющий настоящий, в аналогичном образце из части тела или от субъекта без заболевания. Антитела по данному изобретению могут быть также включены в качестве реагента в виде набора для применения в качестве диагностики и прогнозирования.

В одном из аспектов антитело по данному изобретению, которое иммуноспецифически связывается с пептидом SVA, может быть использовано для диагностики, прогнозирования или скрининга инфекции SVA.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики или скрининга на наличие инфекции SVA или иммунитета к ней, включающие измерение у субъекта уровня иммуноспецифического связывания антитела с образцом, полученным от субъекта, в котором антитело иммуноспецифически связывается с пептидом SVA, в котором повышение уровня упомянутого иммуноспецифического связывания по отношению к уровню указанного иммуноспецифического связывания в аналогичном образце от субъекта без агента инфекционного заболевания указывает на наличие SVA.

Примеры подходящих анализов для обнаружения присутствия пептидов SVA или их антагонистов включают твердофазный ИФА, радиоиммуноанализ, анализ реакции диффузной преципитации в геле, анализ иммунодиффузии, анализ агглютинация, флуоресцентный иммуноферментный анализ, иммуноанализ белка А или иммуноэлектрофоретический анализ, но не ограничиваются ими.

Иммуноанализы для конкретной молекулы, как правило, включают инкубацию образца, такого как биологическая жидкость, экстракт ткани, свежесобранные клетки или лизаты культивированных клеток, в присутствии детектируемого меченого антитела и обнаружение связанного антитела любым из методов, хорошо известных в данной области техники.

Связывающая активность данного антитела может быть определена в соответствии с хорошо известными способами. Специалист в данной области техники будет способен определить рабочие и оптимальные условия анализа для каждого определения с использованием рутинных экспериментов.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к диагностическим наборам для обнаружения или измерения SVA. Предложены наборы для диагностического использования, которые содержат анти-SVA пептидное антитело в одном или более контейнерах, и, необязательно, меченый связывающий партнер к антителу. В качестве альтернативы анти-SVA пептидное антитело может быть помечено (детектируемым маркером, например хемилюминесцентным, ферментативным, флуоресцентным или радиоактивным фрагментом). Соответственно, настоящее изобретение предлагает диагностический набор, включающий анти-SVA пептидное антитело и контрольный иммуноглобулин. В конкретном варианте осуществления один из указанных выше соединений контейнера может быть помечен обнаруживаемой меткой. Набор может дополнительно содержать в контейнере заранее определенное количество пептида SVA, которое распознается антителом набора, для использования в качестве стандарта или контроля.

Предпочтительные способы введения включают пероральный, интраназальный, внутрикожный и внутримышечный, но не ограничиваются ими. Введение внутримышечным способом, наиболее предпочтительно в виде разовой дозы, является желательным. Специалисту в данной области техники будет понятно, что композиции по настоящему изобретению также могут быть введены в одной, двух или более дозах, а также, другими способами введения. Например, такие другие способы введения включают подкожный, внутрикожный, внутривенный, интраваскулярный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, интратекальный, внутритрахеальный, внутрикожный, внутрисердечный, интралобальный, интрамедуллярный, внутрилегочный и интравагинальный. В зависимости от желаемой продолжительности и эффективности лечения, композиции, согласно данному изобретению, могут быть введены один или несколько раз, также периодически, например на ежедневной основе в течение нескольких дней, недель или месяцев, и в разных дозировках.

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, описанные в примерах, представляют собой методы, открытые авторами изобретения, которые функционируют также в практике настоящего изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы практической реализации. Тем не менее, специалистам в данной области техники должно быть, в свете настоящего описания, понятно, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных вариантах осуществления, которые раскрыты, и все-равно привести к получению похожего или аналогичного результата без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

Перечень последовательностей.

Данная заявка содержит перечень последовательностей. Перечень последовательностей содержит следующие последовательности:

SEQ ID NO: 1 обозначает последовательность РНК практически полного генома штамма SVA по настоящему изобретению.

SEQ ID NO: 2 обозначает подмножество последовательности геномной РНК, которая кодирует вирусный полипротеин (антиген; SEQ ID NO: 3).

SEQ ID NO: 3 обозначает подмножество последовательности геномной РНК, которая кодирует вирусный полипротеин (антиген SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 4 обозначает GenBank KX377924.

SEQ ID NO: 5 обозначает GenBank KT321458.

SEQ ID NO: 6 обозначает GenBank KR063107.

SEQ ID NO: 7 обозначает GenBank KR063108.

SEQ ID NO: 8 обозначает GenBank KR063109.

SEQ ID NO: 9 обозначает GenBank HJ999048.

SEQ ID NO: 10 обозначает GenBank KC667560.

SEQ ID NO: 11 обозначает GenBank GY488390.

SEQ ID NO: 12 обозначает GenBank GV614995.

SEQ ID NO: 13 обозначает GenBank DM060849.

SEQ ID NO: 14 обозначает GenBank NC 011349.

SEQ ID NO: 15 обозначает GenBank GY488390 CDS.

SEQ ID NO: 16 обозначает GenBank GV614995 CDS.

SEQ ID NO: 17 обозначает GenBank DM060849 CDS.

SEQ ID NO: 18 обозначает нуклеотидную последовательность вставки SVVP13C в конструкторе BaculoFBU/SVVP13C (A).

SEQ ID NO: 19 обозначает аминокислотную последовательность полипротеина SVVP13C, экспрессируемую BaculoFBU/SVVP13C.

SEQ ID NO: 20 обозначает нуклеотидную последовательность вставки SVVP13C в конструкторе BaculoFBU/SVVP13C-CO, где область P1 SVV является кодон-оптимизированной для экспрессии в клетках насекомых (B).

SEQ ID NO: 21 обозначает аминокислотную последовательность полипротеина SVVP13C, экспрессируемую BaculoFBU/SVVP13C-CO.

SEQ ID NO: 22 обозначает BaculoFBU/VVP13C VP3/VP1.

SEQ ID NO: 23 обозначает последовательность нуклеиновой кислоты вставки SVVP13C VP3/VP1 в конструкторе BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1.

SEQ ID NO: 24 обозначает последовательность нуклеиновой кислоты вставки SVVP13CD конструктора BaculoFBU/SVVP13CD.

SEQ ID NO: 25 обозначает аминокислотную последовательность полипротеина SVVP13CD, экспрессируемую BaculoFBU/SVVP13CD.

SEQ ID NO: 26 обозначает последовательность нуклеиновой кислоты ПЦР-продукта, содержащего последовательность, кодирующую SVVP1-His.

SEQ ID NO: 27 обозначает аминокислотную последовательность SVVP1-His, экспрессируемую конструктором BaculoG/SVVP1-His-sIRES-SVV3C.

SEQ ID NO: 28 обозначает последовательность нуклеиновой кислоты ПЦР-продукта, содержащего последовательность, кодирующую SVVP1-His, кодон-оптимизированную для экспрессии в клетках насекомых (SVVP1CO-His).

SEQ ID NO: 29 обозначает аминокислотную последовательность SVVP1-His, экспрессируемую конструктором BaculoG/SVVP1CO-His-sIRES-SVV3C.

SEQ ID NO: 30 обозначает последовательность нуклеиновой кислоты ПЦР-продукта, содержащую последовательность, кодирующую SVV3C.

SEQ ID NO: 31 обозначает аминокислотную последовательность SVV3C, экспрессируемую конструкторами BaculoG/SVVP1-His-sIRES-SVV3C и BaculoG/SVVP1CO-His-sIRES-SVV3C.

SEQ ID NO: 32 обозначает последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии SVVP1-His-Sires-SVV3C в pORB-SVVP1-His-sIRES-SVV3C.

SEQ ID NO: 33 обозначает последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии SVVP1CO-His-sIRES-SVV3C в pORB-SVVP1CO-His-sIRES-SVV3C.

SEQ ID NO: 34 обозначает ПЦР-праймер P3219012A (SVVP1 прямой).

SEQ ID NO: 35 обозначает ПЦР-праймер P3219039A (SVVP1 His обратный).

SEQ ID NO: 36 обозначает ПЦР-праймер P3219012C (SVVP1-CO прямой).

SEQ ID NO: 37 обозначает ПЦР-праймер P3219039B (SVVP1-CO His обратный).

SEQ ID NO: 38 обозначает ПЦР-праймер P3219012E (SVV3C прямой).

SEQ ID NO: 39 обозначает ПЦР-праймер P3219039C (SVV3C обратный).

SEQ ID NO: 40 обозначает ПЦР-праймер P3219165A (VP3/VP1 прямой).

SEQ ID NO: 41 обозначает ПЦР-праймер P3219165B (VP3/VP1 обратный).

SEQ ID NO: 42 обозначает ПЦР-праймер P3219166A (SVV3D прямой).

SEQ ID NO: 43 обозначает ПЦР-праймер P3219166B (SVV3C обратный).

SEQ ID NO: 44 обозначает ПЦР-праймер P3219166C (SVV3D обратный).

SEQ ID NO: 45 обозначает последовательность, кодирующую SVV3D. Изобретение дополнительно включает следующие пункты.

1) Способ вызова иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммунологически эффективного количества убитого вируса долины Сенека А (SVA), включающий:

(а) последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или

(б) последовательность нуклеиновой кислоты на 97% идентичной SEQ ID NO: 1, которая кодирует полипептид, обладающий иммунологически эффективной активностью полипептида SEQ ID NO: 3.

2) Способ вызова иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммунологически эффективного количества убитого SVA, содержащего:

(а) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

(б) аминокислотную последовательность на 80% идентичную SEQ ID NO: 3 и имеющую биологически или иммунологически эффективную активность полипептида, кодируемого SEQ ID NO: 3; или

(в) фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, содержащий по меньшей мере 15 смежных аминокислот SEQ ID NO: 3 и имеющих иммунологически эффективную активность.

3) Способ вызова иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммунологически эффективного количества убитого SVA, включающий:

- (а) последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; или
- (б) последовательность нуклеиновой кислоты на 97% идентичной SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, которая кодирует полипептид, обладающий иммунологически эффективной активностью полипептида SEQ ID NO: 3.
- 4) Способ вызова иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммунологически эффективного количества иммуногенных композиций по п.1.
- 5) Способ вызова иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммунологически эффективного количества иммуногенных композиций по п.2.
- 6) Способ вызова иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по п.3.
- 7) Способ по п.1, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой свинью и иммунный ответ обеспечивает защитный иммунитет к болезни, вызванной инфекцией SVA.
- 8) Способ по п.2, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой свинью и иммунный ответ обеспечивает защитный иммунитет к болезни, вызванной инфекцией SVA.
- 9) Способ по п.3, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой свинью и иммунный ответ обеспечивает защитный иммунитет к болезни, вызванной инфекцией SVA.
- 10) Вакцина, содержащая один или более антигенов Senecavirus A (SVA), отличающаяся тем, что SVA является любым SVA, содержащим:
 - (а) нуклеиновую кислоту, кодируемую SEQ ID NO: 1, и/или содержит последовательность SEQ ID NO: 1 и/или содержит РНК-эквивалент SEQ ID NO: 1;
 - (б) нуклеиновую кислоту, которая является последовательностью, по меньшей мере на 99% идентичной последовательности SEQ ID NO: 1 и/или по меньшей мере на 99% идентичной РНК-эквиваленту SEQ ID NO: 1;
 - (в) полипептид, который кодируется полинуклеотидом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1 или 2;
 - (г) полипептид, который кодируется полинуклеотидом, который по меньшей мере на 80% гомологичный или идентичный полинуклеотидам а);
 - (д) фрагмент белка, который кодируется полинуклеотидом, который содержит по меньшей мере 15, предпочтительно 24, более предпочтительно 30, наиболее предпочтительно 45 смежных нуклеотидов, включенных в последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2;
 - (е) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
 - (ж) полипептид, который по меньшей мере на 80% гомологичный и/или идентичный полипептиду е);
 - (з) фрагмент полипептидов е) и/или ж);
 - (и) полипептид е) или ж); или
 - (к) фрагмент з) или и), содержащий по меньшей мере 5, предпочтительно 8, более предпочтительно 10, наиболее предпочтительно 15 смежных аминокислот, включенных в последовательности SEQ ID NO: 3.
- 11) Вакцина по п.10, причем вакцина представляет собой рекомбинантную вакцину или убитую вакцину.
- 12) Вакцина по п.10, причем вакцина представляет собой убитую вакцину.
- 13) Вакцина по п.10, в которой Senecavirus A (SVA) является химически инактивированным.
- 14) Вакцина по п.13, в которой Senecavirus A (SVA) является химически инактивированным путем обработки химическим инактивирующим агентом, который включает соединение, выбранное из группы, состоящей из этиленимина, бинарного этиленимина, ацетилэтиленимина и их смесей.
- 15) Вакцина по п.14, в которой Senecavirus A (SVA) является химически инактивированным путем обработки бинарным этиленимином.
- 16) Вакцина по п.10, причем вакцина дополнительно содержит адъювант.
- 17) Вакцина по п.16, в которой адъювант представляет собой адъювант на основе эмульсии масло-в-воде EMULSIGEN®.
- 18) Вакцина по п.6, отличающаяся тем, что Senecavirus A (SVA) содержит SEQ ID NO: 1 и/или содержит РНК-эквивалент SEQ ID NO: 1.
- 19) Вакцина по п.11, причем вакцина представляет собой рекомбинантную вакцину.
- 20) Вакцина по п.11, отличающаяся тем, что такая рекомбинантная вакцина содержит один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, состоящей из:
 - (а) изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген Senecavirus A (SVA), причем рекомбинантный полипептид имеет по меньшей мере 90% гомологии с SEQ ID NO: 3;
 - (б) вектора, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту а);
 - (с) рекомбинантного белка, кодируемого нуклеиновой кислотой а); и
 - (д) любой их комбинации.
- 21) Вакцина по п.20, причем такая вакцина содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

22) Вакцина по п.21, отличающаяся тем, что наполнитель представляет собой один или более адъювантов.

23) Вакцина по п.22, в которой адъювант представляет собой адъювант на основе эмульсии масла-в-воде EMULSIGEN®.

24) Вакцина по п.20, причем вакцина дополнительно содержит один или более дополнительных антигенов.

25) Вакцина по п.20, в которой иммуногенный компонентом является изолированной нуклеиновой кислотой.

26) Вакцина по п.20, в которой иммуногенный компонент является вектором.

27) Вакцина по п.11, в которой иммуногенный компонент является рекомбинантным белком P1 Senecavirus A (SVA).

28) Вакцина по п.20, в которой иммуногенный компонент является комбинацией.

Примеры

Пример 1.

В этом исследовании использовались обычные животные, чтобы определить предварительную возможность индукции серологического ответа после введения вакцины. Основная цель данного исследования состояла в том, чтобы оценить, проявляют ли инактивированные целновирусные препараты с использованием Senecavirus A (SVA) (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и/или последовательность нуклеиновой кислоты, на 97% идентичная SEQ ID NO: 1, которая кодирует полипептид, обладающий иммунологически эффективной активностью полипептида SEQ ID NO: 3) сероконверсию в обычных свиньях на вакцину SVA.

Для выделения вируса 0,5 мл везикулярной жидкости фильтруют через фильтрующий шприц 0,2/0,8 мкм (Pall Acrodisc Cat 4658) и фильтрат используют для инокуляции в клетки семенников свиньи (ST-клетки). ST-клетки выращивают в 6-луночных планшетах с 80-100% конфлюэнтностью. Среду откачивают и 0,25 мл фильтрата инокулируют в клетки. После часа адсорбции при 37°C к клеткам добавляют простую бессывороточную среду. Планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и проверяются ежедневно на цитопатические эффекты (CPE). CPE обычно завершалась через 24-28 ч. Собранный вирус пассировали несколько раз, и использовали для получения серий.

Вирусный концентрат был получен путем инокуляции колб, засеянных клетками AI-ST с 5 мл вирусного концентрата и 160 мл среды (минимальная питательная среда+2,5% HEPES). Колбы инкубировали в течение приблизительно 48 ч. Колбы замораживали и затем оттаивали при комнатной температуре. Материал фильтровали через 0,2 мкм. Вирусный сбор инактивировали комбинацией 10 мМ БЭИ и 0,2% формальдегида с постоянным перемешиванием при 37°C в течение 72 ч. Инактивацию нейтрализовали тиосульфатом натрия (добавляли 17% от объема БЭИ) и бисульфитом натрия. Инактивация была подтверждена двумя пассажами материала в клетки AI-ST. Для начального пассажа 10 мл инактивированного материала инокулировали в колбу T75 с клетками AI-ST. Колбы инкубировали в течение семи дней при 37°C+5% CO₂ и периодически оценивали на наличие цитопатического эффекта. Для второго пассажа колбы замораживали, а затем оттаивали. Материал центрифугировали и 10 мл супернатанта инокулировали в колбу T75 с клетками AI-ST. Колбы инкубировали в течение семи дней при 37°C+5% CO₂ и периодически оценивали на наличие цитопатического эффекта. Положительные и отрицательные контрольные образцы были включены в анализ. Результаты подтвердили отсутствие роста в обеих партиях. Инактивированный вирусный сбор концентрировали до 12,4х при 10 тыс., ультрафильтрацией через картридж с полым волокном 650см². Концентрированную серию комбинировали с EMULSIGEN® D (коммерчески доступный от Phibro Animal Health Corporation) для получения 12,5% состава. Смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем асептически разливали во флаконы для вакцины на 30 мл и хранили при 4°C. Материал испытывали на бактериальную стерильность путем рутинного культивирования (анаэробного и аэробного) на чашках с кровяным агаром при 37°C в течение 48 ч. Бактериальное загрязнение не было обнаружено.

Двадцать свиней были рандомизированы на две группы, как показано в табл. 1. В табл. 1 ниже приведены описания групп и структура размещения. В день 0, свиньям вводили внутримышечно 2 мл дозы вакцины SVA или плацебо. В день 21, животные получали стимулирующее введение вакцины SVA или плацебо. Кровь собирали у всех свиней до введения лечения при каждой вакцинацией (день 0 и день 21) и в день 35. Подмножество образцов сыворотки анализировали на наличие сероконверсии на SVA. Общие наблюдения за состоянием здоровья записывали на протяжении всего исследования. Места инъекций наблюдали на реакции в течение как минимум трех дней после введения вакцины. Животных гуманно умерщвляли в конце испытания.

Таблица 1. Схема исследования

Группа	Помещение	Кол-во (n)	Вакцинация	Доза/способ
1	114	11	Вакцина-прототип инактивированного SVA (Senecavirus A; x+10; фильтруют через 0,2 мкм; титры до инактивации (объединяют две партии) = 6,95/6,51 log TCID ₅₀ /мл; инактивируют 10мМ БЭИ + 0,2% формальдегида; нейтрализуют бисульфитом натрия и тиосульфатом натрия; концентрируют 12,4X (полосе волокно 10 кДа); добавляют как адъювант 12,5% EMULSIGEN®D)	2 мл/ в/м
2	114	7	Плацебо (1xPBS (Gibco, № 10010-023 в каталоге, L№1793111) с адъювантом с 12,5% EMULSIGEN®D)	2 мл/ в/м
	219	2		

Это исследование показало 100% сероконверсии (как измерено с помощью нейтрализации вируса) к SVA после введения двух доз BEI-инактивированного прототипа SVA с адъювантом с 12,5% EMULSIGEN® D. В табл. 2 приведен график ключевых событий и отбор образцов.

Таблица 2. График ключевых событий и отбор образцов

День исследования	Событие исследования
День 3	Отбор крови у животных
День 1	Передача животных из исследования
День 0	- Вакцинация №1 - Наблюдения места инъекции в течение трех дней после вакцинации - Отбор крови у животных
День 14	- Отбор крови у животных
День 21	- Вакцинация №2 - Отбор крови у животных - Наблюдения места инъекции в течение трех дней после вакцинации*
День 0 - День 34	Общие наблюдения за состоянием здоровья (1 раз в день)
День 34	- Аутопсия - Отбор терминальной крови (1 x флакон на 250 мл) у всех животных

*следует отметить, что наблюдения продолжались до тех пор, пока реакции не устранялись.

Во избежание систематической ошибки оценки лечение вводил в день 0 и день 21 персонал, не связанный с клиническим мониторингом животных. В день 0 здоровым свиньям в мускулатуру шеи с правой стороны вводили 2 мл дозы вакцины с использованием стерильной иглы и шприца соответствующего размера. В день 21 процесс был идентичным за исключением того, что инъекцию вводили в левую сторону шеи. Номер партии, размер дозировки, идентификационные номера животных и время введения материала вакцины были записаны в Запись подтверждения дозы вакцины.

В течение периода вакцинации животных оценивали ежедневно с помощью формы общего наблюдения за состоянием здоровья. В частности, если все животные были нормальными, N вводили для баланса. В случае если была найдена аномальная свинья, A вводили для баланса и приводили идентификационный номер конкретного животного и аномальность. Места участков инъекции были проверены на наличие покраснения, отека, нагрева и боли (либо присутствие, или отсутствие) и размер (см) в течение как минимум трех дней после каждой вакцинации. Если повреждения были видны, их наблюдали до их прекращения.

В даты сбора крови исследователь или уполномоченный представитель отбирал от трех до восьми мл венозной цельной крови через переднюю полую вену у каждой свиньи с использованием иглы VACUTAINER® соответствующего размера, иглодержателя VACUTAINER® (оба коммерчески доступны от корпорации Becton Dickinson and Company) и пробирок для отделения сыворотки (SST) соответствующего размера.

Образцы сыворотки держали при температуре 2-8°C до тестирования. Обработка была завершена через 48 ч с момента получения. Пробирки с кровью центрифугировали при 1960×g в течение 10 мин при 4°C. Сыворотку отделяли от сгустка путем центрифугирования и декантации в две криогенные вials с завинчивающейся крышкой, помеченных, по меньшей мере, номером исследования, днем исследования и ID животного. Аликвоты хранили при -70±10°C. Образцы хранили в течение как минимум шести месяцев после завершения этого исследования.

Отобранные образцы сыворотки были протестированы с помощью вируснейтрализующего анализа с использованием изолята SVA NAC № 20150909.

Во время завершения испытания животных помещали под глубокий наркоз и отбирали 1×250 мл колбу для центрифуги крови каждого животного. Животное умерщвляли и место инъекции пальпирова-

Таблица 5. Последовательности праймеров для SVVP13C VP3/VP1 и SVVP13CD

Праймер	Последовательность (5' - 3')	SEQ ID NO:
P3219165A (VP3/VP1 Прямой)	CTTCTACGTCGCTCAGGGGGTTGACAACGCCGAGACTGGG	40
P3219165B (VP3/VP1 Обратный)	CCCAGTCTCGGCGTTGTCAACCCCTGAGGCACGTAGGAAG	41
P3219166A (SVV3D Прямой)	TACAATGCAAGGACTGATGACTGAGCTAGAGCCTG	42
P3219166B (SVV3C Обратный)	TCAGTCATCAGTCCTTGCAATTGATGCCAGAG	43
P3219166C (SVV3D Обратный)	GCGGCCGCTCAGTCGAACAAGGCCCTCCATCT	44

Вставка SVV3C (SEQ ID NO: 30) была лигирована во второй сайт множественного клонирования (MCS2) вектора Porb-MCS1-Sires-MCS2 (Allele Biotechnology) с использованием сайтов рестрикции SpeI и SacI. Далее, либо SVVP1-His или SVVP1CO-His лигировали в MCS1 Porb-MCS1-Sires-SVV3C с использованием сайтов рестрикции BamHI и NotI, чтобы получить Porb-SVVP1-His-Sires-SVV3C (SEQ ID NO: 32) и pORB-SVVP1CO-His-Sires-SVV3C (SEQ ID NO: 33), соответственно.

Праймеры были разработаны, чтобы мутировать сайт расщепления VP3/VP1 (нуклеотиды 1786-1797) последовательности SVVP13C (SEQ ID NO: 18) в pUCIDT-AMP-SVVP13C из FH/ST в PQ/GV (в табл. 5 выше представлены праймеры, SEQ ID NO: 40 и 41) с использованием набора сайт направленного мутагенеза Lightning Quik (Stratagene). В мутированной последовательности SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) вырезали из pUCIDT-AMP-SVVP13C VP3/VP1 и лигировали в вектор pVL1393 для получения pVL1393-SVVP13C VP3/VP1. Дополнительный конструктор был слит из последовательности, кодирующей SVV3D (SEQ ID NO: 45), с 3' концом последовательности SVVP13C (SEQ ID NO: 18) путем ПЦР с перекрывающимися праймерами (ОЕ-ПЦР) с использованием наборов перекрывающихся праймеров (SEQ ID NO: 34, 42, 43 и 44). Полученный в результате продукт ПЦР, SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) клонировали в pVL1393 с помощью сайтов рестрикции BamHI и NotI. (На фиг. 3 показаны диаграммы конструкторов SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) и SVVP13CD (SEQ ID NO: 24)).

Рекомбинантные конструкторы капсида SVV в плазмидах на основе pVL1393 были совместно трансфицированы с помощью ДНК бакуловируса (Oxford Expression Technologies) FlashBAC ULTRA (FBU) в клетки Sf9, тогда как плазмидах на основе pORB были совместно трансфицированы ДНК бакуловируса BaculoGold (BD Biosciences) в клетки насекомых Sf9 с использованием реагента трансфекции ESCORT (Sigma Aldrich) в соответствии с инструкциями изготовителя. Супернатанты клеточных культур из трансфицированных клеток Sf9 собирали и очищали центрифугированием при 1000×g в течение 5 мин для осаждения клеточного дебриса. Очищенный супернатант собирали, фильтровали через 0,2 мкм и хранили как сбор трансфекции P1. Клетки насекомых Sf9 были использованы для создания концентратов P2, а концентраты P2 были затем использованы для создания амплификаций конструкторов SVV P3 и P4 для определения экспрессии белка в клетках насекомых SF+. Инфицированные бакуловирусом клетки SF+ собирали и очищали при 10000×g в течение 10 мин при 4°C. Образцы культур, инфицированных бакуловирусом клеток SF+, отбирали ежедневно, чтобы контролировать общее количество клеток/мл, количество жизнеспособных клеток/мл, процент жизнеспособности клеток и диаметр клеток с помощью анализа Vi-Cell. Амплификации собирали, когда жизнеспособность была ≤30% жизнеспособности или когда количество жизнеспособных клеток было ≤1×10⁶ клеток/мл. Отбирали дополнительный один мл ежедневных образцов для оценки экспрессии белка, так как инфекции прогрессировали, и обрабатывались как описано выше. Собранные супернатант и образцы клеточного осадка хранили при -70°C до определения.

Лизис осадков клеток насекомых для разделения растворимых и нерастворимых фракций.

Образцы культуры клеток насекомого SF+ центрифугировали для осаждения клеток, после чего среду удаляли и клеточные осадки были заморожены до лизиса. Осадки повторно суспендировали в буфере для лизиса, содержащем следующее: 20 mM Трис, 1% Тритон X-100, смесь ингибиторов протеаз для His-меченых белков (10 мкл/мл) и бензоназа (250 единиц/мл) в деионизированной воде с pH 7,4. Повторно суспендированные лизаты клеток насекомых перемешать вихревым способом в течение 10 с, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, снова перемешать вихревым способом в течение 10 с, затем центрифугировали при 19090×g в течение 10 мин при 4°C для осаждения нерастворимого материала. Растворимые лизаты отсасывали пипеткой из нерастворимых фракций и хранили в пробирках при -70°C.

Очистка рекомбинантных белков капсида SVV.

Сборы супернатантов, содержащие экспрессированные рекомбинантные белки капсида SVV фильтровали через 0,2 мкм, разливали в пробирки для ультрацентрифуги и центрифугировали при 100000×g в течение двух часов при 4°C для осаждения белка и возможных VLP. Очищенный супернатант осторожно

декантировали и осажденный материал повторно суспендировали в TBS и хранили при 4°C. Ступенчатый 10-60% градиенты сахарозы использовали для дальнейшей очистки рекомбинантных белков капсида SVV для соответствующих конструкторов. Соответствующие повторно суспендированные материалы добавляли к верхней части градиента и центрифугировали при 100000×g в течение двух часов при температуре 4°C. Фракции из градиентов сахарозы собирали в равных частях в пробирки (с фракцией 1, начиная с верхней части поверхности градиента) и хранили при 4°C.

ДНС-ПААГ и вестерн-блоттинг.

ДНС-ПААГ проводили с использованием системы электрофореза NuPAGE и 4-12% Bis-Tris MES мини гелей. Образцы разделяли в восстановительных условиях с использованием 0,05 М ДТТ при 175 В в течение соответствующего времени. Гели окрашивали на общий белок с использованием устройства для окрашивания белка eStain 2,0 или переносили на нитроцеллюлозные мембраны с использованием системы iBlot для вестерн-блоттинга. Вестерн-блоттинг выполняли с поликлональными кроличьими антителами к пептиду SVV (анти-VP1-2, анти-VP2-2 и анти-VP3-1, в различных разведениях) и козьими антикроличьими мечеными пероксидазой вторичными антителами (1:500) с помощью системы обнаружения белка Snap ID (EMD Millipore), используя антиген бакуловируса как отрицательный контроль в растворе разведенных антител, и обнаруживали с использованием субстрата для пероксидазы мембраны TMB.

Диализ и концентрирование очищенных рекомбинантных белков капсида SVV.

Фракции градиента сахарозы, содержащие рекомбинантный белок, как определено вестерн-блоттингом, были объединены вместе и разлиты в диализные кассеты с целлюлозной мембраной с 10000 MWCO или 50000 MWCO. Диализная кассета была помещена в 3,5 л TBS с магнитным перемешивающим элементом, накрыта, и помещена на мешалку при 4°C на как минимум 6 часов. Диализную кассету затем помещают в свежий стакан с 3,5 л TBS, а затем подвергают диализу при перемешивании в течение ночи или дольше. Образец удаляли из диализной кассеты и концентрировали, в случае необходимости, в зависимости от объема диализованного образца. Концентрирование проводили с использованием блока гель-фильтрации и центрифугирования в соответствии с инструкциями производителя до тех пор, пока не достигали желаемого объема образца.

Электронная микроскопия (ЭМ).

Очищенные в градиенте сахарозы и диализованные образцы рекомбинантного белка капсида SVV оценивали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ЭМ) в учреждении USDA NADC для визуализации VLP. Ожидаемый размер икосаэдрического вирусного капсида для нативного SVV составлял приблизительно 27 нм в диаметре.

Результаты и обсуждение.

Нативный полипротеин P1 SVV (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 1-859) обрабатывали саморасщепляющейся протеазой, чтобы сформировать отдельные субъединицы белков вирусного капсида VP1-VP4. Конструкторы бакуловируса SVV, описанные в данном изобретении, были разработаны таким же образом, который используется для конструкторов бакуловируса FMDV, использующих саморасщепление экспрессированного полипротеина на отдельные субъединицы белков для формирования пустого капсида или VLP. Конструкторы, кодирующие полноразмерный полипротеин P1 SVV, 2A, частичные 2B и 3C, и 3C (SEQ ID NO: 18), были приготовлены с нативной кодирующей последовательностью или с кодон-оптимизированными последовательностями P1, 2A и 2B (SEQ ID NO: 20) для клеток насекомых. Предыдущие исследования с похожими конструкторами бакуловируса FMDV на основе pVL1393 показали токсичность для клеток SF+, приписываемую экспрессии 3C. Беспокойство относительно потенциальной токсичности 3C SVV также привело к созданию конструкторов бакуловируса на основе pORB для определения. Конструкторы на основе pORB используют внутренний сайт связывания рибосомы (WSSV sIRES) (SEQ ID NO: 32, нуклеиновые кислоты 2647-2826), что обеспечивает инициацию кэп-независимой трансляции мРНК, которая отличается от 5'-кэп-зависимой трансляции последовательности наиболее близкой к 3'-концу промотора полиэдрина. Несколько исследований показали, что применение sIRES, например из WSSV, часто приводит к снижению экспрессии белка транслированной последовательности, находящейся после sIRES. В контексте описанных конструкторов бакуловируса SVV (SEQ ID NO: 32 и 33), использование sIRES может привести к снижению экспрессии саморасщепляющейся протеазы 3C SVV, что, в свою очередь, может облегчить проблемы токсичности 3C без снижения экспрессии SVVP1. Конструкторы на основе pORB и pVL1393 были аналогичны тем, что они оба используют одну и ту же последовательность SVVP1 и включают С-концевую метку 6x-His. Тем не менее, основное различие между конструкторами на основе pORB и pVL1393 заключается в том, что в конструкторах на основе pORB последовательность протеазы SVV3C размещена после сайта sIRES. После определения этих начальных наборов конструкторов, еще два конструктора были созданы путем модификации исходной последовательности ДНК SVV. Один конструктор модифицировал последовательность сайта расщепления VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22), а другой конструктор дополнительно включал последовательность ДНК SVV3D на конце последовательности SVV3C (SEQ ID NO: 24). У всех конструкторов оценивали экспрессию субъединиц капсида, а также производство VLP.

Экспрессия белков капсида SVV в инфицированных бакуловирусом клетках насекомых.

Конструкты BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18) и BaculoFBU/SVVP13C-CO (SEQ ID NO: 20) использовали для инфицирования клеток SF⁺ образцами, собранными для оценки экспрессии белков капсида SVV. Бэнды белков ожидаемых размеров для субъединиц капсида VP1 (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 596-859), VP2 (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 73-356) и VP3 (SEQ ID NO: 19, аминокислоты 357-595) были обнаружены с помощью вестерн-блоттинга с анти-SVV P1-субъединица-специфическими антителами в супернатанте клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом, которые были аналогичными по размерам с нативными белкам капсида SVV (фиг. 4). Интересно отметить, что дополнительный бэнд белка ~55 кДа был обнаружен при вестерн-блоттинге альфа-SVV VP1 и альфа-SVV VP3. Бэнд ~55 кДа не был обнаружен в нативном образце антигена SVV или отрицательном контроле (фиг. 4). Наличие дополнительного белка с размером ~55 кДа предполагает, что он может содержать нерасщепленный белковый продукт VP3-VP1.

Фиг. 4 также обеспечивает сравнение уровней экспрессии белка капсида SVV между нативной (A) (SEQ ID NO: 18) и кодон-оптимизированной (B) (SEQ ID NO: 20) последовательностями ДНК SVV в инфицированных бакуловирусом клетках SF⁺. На основе этих вестерн-блоттингов не было никаких очевидных различий в уровнях экспрессии белка капсида SVV между кодон-оптимизированным BaculoFBU/SVVP13C-CO (SEQ ID NO: 20) и исходным, нативным BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18), поэтому только конструкт BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18) оценивали в дальнейшем. Второй набор конструктов с протеазой 3C, размещенной после sIRES не производит обнаруживаемые субъединицы белков капсида SVV во время инфицирования клеток насекомых SF⁺. Не только конструкты sIRES не производили обнаруживаемые субъединицы белков капсида SVV, но и не было обнаружено никаких проблем цитотоксичности SF⁺. Следовательно, конструкты sIRES далее не оценивали. На основе этих общих наблюдений сбор супернатанта с BaculoFBU/SVVP13C-инфицированными клетками насекомых SF⁺ был наиболее перспективным конструктом для дальнейшей очистки в градиенте сахарозы и определения наличия VLP.

Для того чтобы определить ожидаемую подвижность полученных из BaculoFBU/SVVP13C белков капсида SVV в градиенте сахарозы, осажденный нативный вирус SVV отделяли в градиенте сахарозы и анализировал с помощью вестерн-блоттинга (фиг. 5A). Большинство нативных субъединиц белков SVV были обнаружены во фракциях 5 и 6 после очистки в градиенте сахарозы нативного SVV. Предполагалось, что, если VLP были сформированы в инфицированных бакуловирусом клетках SF⁺, они будут присутствовать в аналогичном или немного более высоком диапазоне собранных фракций градиента.

Сбор супернатанта конструкта BaculoFBU/SVVP13C также подвергали очистке в градиенте сахарозы. Вестерн-блоттинги фракций градиента сахарозы обнаружили только небольшое количество рекомбинантного белка капсида VP2 SVV в первой фракции сахарозы (фиг. 5B). VP1 и VP3 не были обнаружены во фракциях сахарозы, хотя слабый бэнд белка при ~55 кДа, который посчитали нерасщепленным VP3-VP1, был обнаружен во всех фракциях сахарозы с помощью вестерн-блоттинга VP1 α-SVV. Ни один рекомбинантный белок капсида SVV не был обнаружен во фракциях 5 и 6, в отличие от обнаружения ожидаемых белков нативного SVV. Эти результаты свидетельствуют о том, что субъединицы белков капсида, экспрессируемые в BaculoFBU/SVVP13C-инфицированных клетках насекомых, не образуют VLP.

Даже если BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18), продуцирует рекомбинантные белки капсида SVV, обнаруженные в качестве субъединиц белков с антителами альфа-SVV, VLP не наблюдались. Субъединицы белков капсида были аналогичного размера по сравнению с белками нативного вируса SVV, но несколько других бэндов белков были также обнаружены в инфицированных бакуловирусом клетках SF⁺, в том числе бэнд белка при ~55 кДа в вестерн-блоттинге альфа-SVV VP1 и альфа-SVV VP3, что предполагает нерасщепленный белковый продукт VP3-VP1, не присутствующий в нативном вирусе SVV. Это может быть признаком проблемы эффективного расщепления и разделения субъединиц VP3-VP1, которые, в свою очередь, могут препятствовать образованию VLP в клетках насекомых, инфицированных бакуловирусом.

Определение модифицированных конструктов BaculoFBU/SVVP13C.

Для исследования возможности не разделять полностью субъединицы белков капсида SVV VP1 и VP3, два новых конструкта были разработаны на основе предшествующих публикаций. В публикации 2008 года Hales и др. заявил, что сайт расщепления SVV P1 VP3/VP1, FH/ST, был нетипичным для пикорнавирусов, включая род *Cardiovirus*, наиболее тесно связанный с SVV. Для сравнения типичный сайт расщепления PQ/GV является консервативным во многих известных пикорнавирусах. Таким образом, мутация сайта расщепления VP3/VP1 в типичную для пикорнавирусов последовательность расщепления может повышать расщепление субъединиц капсида VP3 и VP1. Конструкт BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18) мутировали для содержания последовательности PQ/GV на границе VP3/VP1 с получением конструкта, обозначенного как BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22). Этот новый конструкт использовали для инфицирования клеток SF⁺ и оценивали экспрессию белка таким же образом, как для конструкта BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18). Вестерн-блоттинг образцов супернатанта, полученных из BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1, с использованием антител альфа-SVV VP1 или альфа-SVV VP3, обнаружил предполагаемый нерасщепленный белковый продукт VP3-VP1 и бэнды отдельных субъеди-

ниц VP3 или VP1 в том же количестве, как это наблюдалось для BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18) (фиг. 6). Бэнд белка при ожидаемой полноразмерном полипротеине P1 SVV, ~95 кДа, был также обнаружен в сборах супернатантов BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1.

Кроме того, определение вестерн-блоттингом фракций градиента сахарозы сбора супернатанта (фиг. 7) были сравнимы с результатами BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18). Вестерн-блоттинг α -SVV VP2 обнаружил рекомбинантный белок капсида VP2 SVV во всех фракциях сахарозы с большинством во фракциях один и девять. Субъединицы белков VP1 и VP3 не были обнаружены во фракциях сахарозы, хотя бэнд белка при ~55 кДа был обнаружен во всех фракциях сахарозы вестерн-блоттинга α -VP1 и во фракциях сахарозы один и девять вестерн-блоттинга α -VP3, что, возможно, соответствует нерасщепленным белкам VP3-VP1. Все три вестерн-блоттинга имели несколько бэндов белка, обнаруженных в самой последней фракции сахарозы, которая оказалась аналогичной с исходным образцом градиента сахарозы. Это предполагает, что белки капсида SVV могут агрегировать и осаждаться в нижнюю часть градиента. Белки капсида не были обнаружены в вестерн-блоттинге последней фракции градиента сахарозы BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18) на фиг. 5B, но наблюдались и в предыдущих определениях (NB 3219-123). Как видно из этих определений вестерн-блоттингом, мутация последовательности расщепления из FH/ST в PQ/GV не оказывает никакого влияния на присутствии бэнда ~55 кДа, который считают нерасщепленным VP3-VP1. По сравнению с исходным конструктором не было обнаружено увеличение количества субъединиц белка VP3 и VP1, и не наблюдалось образование VLP.

Другие роды пикорнавируса, включая энтеровирусы и афтовирусы, показали более эффективное расщепление VP3-VP1, при наличии протеазы 3CD в нативном вирусе; таким образом, был разработан второй конструктор Senecavirus, BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24). BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) экспрессировали в клетках SF+ и сбор супернатанта определяли с помощью вестерн-блоттинга (фиг. 8). Наблюдались результаты, сопоставимые с предыдущими оценками VLP, с обнаружением субъединиц VP1, VP2 и VP3, а также предполагаемым нерасщепленным белком VP3-VP1 ~55 кДа в вестерн-блоттинге α -SVV VP1 и α -SVV VP3.

В отличие от оценки экспрессии белка SVV с другими конструктами бакуловируса SVV, определение вестерн-блоттингом фракций сахарозы BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) показали наличие во фракциях сахарозы 1 и 2 мономерных субъединиц белков капсида VP1, VP2 и VP3 SVV с VP1 и VP2, обнаруженными во всех фракциях сахарозы. Бэнд белка ~55 кДа присутствовал в вестерн-блоттинге α -SVV VP1 и α -SVV VP3 во фракциях сахарозы 1 и 2, но не в образце отрицательного контроля или вестерн-блоттинге α -SVV VP2 (фиг. 9). Аналогично с определениями фракций сахарозы BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22), большинство белков капсида SVV агрегировали и осаждали в нижней части градиента сахарозы BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24). Однако обнаружение субъединиц белков VP1 и VP2 SVV во всех фракциях, полученные из инфицированных конструктором BaculoFBU/SVVP13CD клеток SF+ предлагает возможность образования VLP.

Несмотря на неясные результаты определений в градиенте сахарозы каждого конструктора, фракции с ожидаемым содержанием VLP определяли с помощью электронной микроскопии (ЭМ) в USDA NADC. Объединенные фракции сахарозы сборов супернатантов BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18), BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) и BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) подвергали диализу в TBS и концентрировали при подготовке к ЭМ. Образцы имели сильный фон, что затрудняет четко визуализировать VLP с помощью ЭМ негативным окрашиванием. Некоторые сферические формы были редко замечены в объединенных фракциях сахарозы BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) и BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24), которые были аналогичными по размерам с ожидаемыми VLP SVV, но их было не достаточно во всех образцах, чтобы подтвердить наличие VLP.

Рекомбинантные белки SVV экспрессировали в клетках насекомых SF+.

Один из возможных вариантов, почему отдельные рекомбинантного белки капсида вируса SVV обнаружены в супернатанте, но, по всей видимости, не образуют VLP заключается в том, что VLP могут диссоциировать вскоре после высвобождения в супернатант из-за низкого pH среды клеток насекомых. Чтобы проверить эту гипотезу, образцы клеточного осадка 3-го дня, когда жизнеспособность клеток была еще относительно высока, инфицированных BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18), BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) и BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24), лизировали в буфере с физиологическим pH для получения фракции растворимого белка для определения рекомбинантных субъединиц белков SVV с помощью вестерн-блоттинга (фиг. 10). Как видно, для образцов сборов супернатантов конструкторов бакуловирусного SVV были обнаружены уровни субъединицы белков капсида VP1, VP2 и VP3 в растворимых фракциях 3-го дня. Бэнд ~55 кДа предположительно нерасщепленных белков VP3-VP1 был также обнаружен в вестерн-блоттинге α -SVV VP1 и α -SVV VP3 в образцов полосах бакуловирусного SVV, как отмечено выше. Образцы растворимых фракции 3-го дня были очищены в градиенте сахарозы и определялись с помощью вестерн-блоттинга, чтобы посмотреть, присутствует ли VLP в клетках до лизиса (фиг. 11).

Фракции сахарозы растворимых фракций 3-го дня имели сопоставимые результаты как показано для фракций сахарозы сбора супернатанта клеток насекомых, инфицированных BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18), BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) и BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID

NO: 24), соответственно. Бэнды белка, предположительно соответствующие белкам капсида SVV, были обнаружены в основном во фракциях один и два и/или осаждены на дно, предлагая, что субъединицы белков SVV внутри клеток насекомых не образуют VLP до лизиса клеток. ЭМ проводили для объединенных фракций сахарозы растворимого образца BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) 3-го дня, в котором не наблюдался VLP. Фракции сахарозы растворимого BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18) и BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) 3-го дня не определяли с помощью ЭМ.

Выводы.

Несмотря на то, что было установлено, что рекомбинантные белки капсида VP1, VP2 и VP3 вируса SVV экспрессировались в какой-то степени как полностью расщепленные белки, согласно очистке в градиенте сахарозы и ЭМ они не приводили к образованию VLP. В определении вестерн-блоттингом фракций градиента сахарозы рекомбинантные белки капсида SVV были обнаружены в первых нескольких фракциях и/или в последних фракциях градиента. Эти результаты свидетельствуют о том, что белки не собираются в VLP, а остаются неассоциированными мономерами или образуют крупные агрегаты, указывающие на неправильно свернутые или неправильно собранные белки. Электронная микроскопия подтверждает эти результаты, а именно, что VLP не были обнаружены в объединенных фракциях сахарозы, которые содержали субъединицы белков капсида SVV.

Пример 3.

В этом исследовании используют обычных животных, чтобы определить предварительную возможность индукции серологического ответа после введения вакцины. Основная цель данного исследования заключается в определении того, приводит ли введение вакцин-прототипов BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO: 18), BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO: 22) и BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO: 24) к сероконверсии у обычных свиней.

Сорок свиней рандомизировали на четыре группы, как показано в табл. 1. В табл. 6 ниже приведены описания групп и структура размещения. В день 0 свиньям вводили внутримышечно 2 мл дозы вакцины-прототипа или плацебо. В день 21 животные получают стимулирующее введение вакцины-прототипа или плацебо. Кровь собирают у всех свиней до введения лечения при каждой вакцинации (день 0 и день 21) и в день 35. Подмножество образцов сыворотки анализируют на наличие сероконверсии на SVA. Общие наблюдения за состоянием здоровья записывают на протяжении всего исследования. Места инъекций наблюдают на реакции в течение как минимум трех дней после введения вакцины. Животных гуманно умерщвляют в конце испытания. В табл. 7 приведен график ключевых событий и отбора образцов.

Таблица 6. Схема исследования

Группа	Кол-во (n)	Вакцинация	Доза/способ
1	10	BaculoFBU/SVVP13C (SEQ ID NO:18); инактивированный 5-10 мМ БЭИ; добавленный в качестве адъюванта 12,5% EMULSIGEN®D)	2 мл/ в/м
2	10	BaculoFBU/SVVP13C VP3/VP1 (SEQ ID NO:22) инактивированный 5-10 мМ БЭИ; добавленный в качестве адъюванта 12,5% EMULSIGEN®D)	2 мл/ в/м
3	10	BaculoFBU/SVVP13CD (SEQ ID NO:24); инактивированный 5-10 мМ БЭИ; добавленный в качестве адъюванта 12,5% EMULSIGEN®D)	2 мл/ в/м
4	10	Плацебо (BaculoFBU/пустой); инактивированный 5-10 мМ БЭИ; добавленный в качестве адъюванта 12,5% EMULSIGEN®D)	2 мл/ в/м

Таблица 7. График ключевых событий и отбор образцов

День исследования	Событие исследования
День 3	Отбор крови у животных
День 1	Передача животных из исследования
День 0	- Вакцинация №1 - Наблюдения места инъекции в течение трех дней после вакцинации - Отбор крови у животных
День 14	- Отбор крови у животных
День 21	- Вакцинация №2 - Отбор крови у животных - Наблюдения места инъекции в течение трех дней после вакцинации*
День 0 - День 34	Общие наблюдения за состоянием здоровья (1 раз в день)
День 34	- Аутопсия - Отбор терминальной крови (1 х флакон на 250 мл) у всех животных

*следует отметить, что наблюдения продолжались до тех пор, пока реакции не устранились.

Во избежание систематической ошибки оценки лечение вводят в день 0 и день 21 персонал, не связанный с клиническим мониторингом животных. В день 0 здоровым свиньям в мускулатуру шеи с правой стороны вводят 2 мл дозы вакцины с использованием стерильной иглы и шприца соответствующего размера. В день 21 процесс идентичен за исключением того, что инъекцию вводили в левую сторону шеи. Номер партии, размер дозировки, идентификационные номера животных и время введения материала вакцины записывают в запись подтверждения дозы вакцины.

В течение периода вакцинации животных оценивают ежедневно с помощью формы общего наблюдения за состоянием здоровья. В частности, если все животные нормальные, N вводят для баланса. В случае если находят аномальную свинью, A вводят для баланса и приводят идентификационный номер конкретного животного и аномальность. Места участков инъекции проверяют на наличие покраснения, отека, нагрева и боли (либо присутствие, или отсутствие) и размер (см) в течение как минимум трех дней после каждой вакцинации. Если повреждения видимые, их наблюдают до их прекращения.

В даты сбора крови исследователь или уполномоченный представитель отбирает от трех до восьми мл венозной цельной крови через переднюю полую вену у каждой свиньи с использованием иглы VACUTAINER® соответствующего размера, иглодержателя VACUTAINER® (оба коммерчески доступны от корпорации Becton Dickinson and Company) и пробирок для отделения сыворотки (SST) соответствующего размера.

Образцы сыворотки держат при температуре 2-8°C до тестирования. Обработка завершена через 48 ч с момента получения. Пробирки с кровью центрифугируют при 1960×g в течение 10 мин при 4°C. Сыворотку отделяют от сгустка путем центрифугирования и декантации в две криогенные вials с закручивающейся крышкой, помеченных по меньшей мере номером исследования, днем исследования и ID животного. Аликвоты хранят при -70°C ±10°C. Образцы хранят в течение как минимум шести месяцев после завершения этого исследования.

Пример 4.

Это исследование использует обычных животных для оценки эффективности двухдозовой инактивированной цельновирусной вакцины Senecavirus A по сравнению с гетерологичным заражением гетерологичным полевым изолятом Senecavirus A. В общей сложности 25 свиней были использованы для исследования. Животных рандомизировали на две экспериментальные группы. В день 0 тринадцать свиней в группе SVA-Vx инокулировали внутримышечно (в/м) инактивированной цельновирусной вакциной Senecavirus A, в то время как остальные двенадцать свиней в группе плацебо получили контрольный продукт. В день 14 стимулирующую вакцину вводили внутримышечно всем свиньям с использованием соответствующего материала. В день 35 всех свиней заражали 8,36 log TCID₅₀/доза гетерологичным полевым изолятом Senecavirus A (вирусный сбор) в суммарном объеме 5 мл (2 мл перорально 3 мл и интраназально). Все свиньи были размещены смешанно в одном помещении. У свиней мониторили общее состояние здоровья ежедневно со дня 0 до дня 33. Со дня 34 до дня 49 у свиней мониторили ежедневно клинические признаки, связанные с инфекцией SVA. Кровь и ректальные температуры измеряли периодически на протяжении всего исследования. Проводили аутопсию всех животных в день 49 (через 14 дней после заражения). В табл. 8 приведено краткое описание схемы эксперимента.

Таблица 8. Схема исследования

Группа	n	Помещение	Вакцина (День 0, День 14)	Заражение (День 35)	Завершение испытания
SVA-Vx	13	316	Инактивированная цельновирусная вакцина Senecavirus A	8,36 log TCID ₅₀ /5 мл дозы; гетерологичный полевой изолят Senecavirus A (вирусный сбор).	День 49
Плацебо	12	316	Плацебо		

В табл. 9 ниже приведено краткое описание вакцины и составов контрольных продуктов. Рутинное культивирование и ПЦР *Mycoplasma* sp. проводили для материала вакцины; не было обнаружено роста (анаэробного или аэробного на кровяном агаре) или заражения ДНК микоплазмы. Вакцины вводили в день 0 внутримышечно в правую сторону шеи по середине между основанием уха и плечом с использованием стерильных игл и шприцев соответствующего размера. В день 14 вакцину вводили в то же место, как описано выше, но в левую сторону шеи. Все группы получили дозу 2 мл.

Таблица 9. Вакцина и контроль

Группа	Вакцинация
SVA-Vx	Senecavirus A; pre-MSV; фильтруют через 0,2 мкм; титры до инактивации = 7,71 log TCID ₅₀ /мл; инактивируют 10 мМ БЭИ + 0,2% формальдегида; нейтрализуют бисульфитом натрия и тиосульфатом натрия; добавляют как адъювант 12,5% Emulsigen D; Lot#3423-022.
Плацебо	Псевдозаражение средой; инактивируют 10 мМ БЭИ + 0,2% формальдегида; нейтрализуют бисульфитом натрия и тиосульфатом натрия; добавляют как адъювант 12,5% Emulsigen D; Lot#3423-023.

На основании отчетов в реальных условиях и предыдущих публикаций, животных мониторили на хромоту, поражения копыт, а также наличия везикул. Если животное имело любую клиническую анома-

лию на протяжении всего исследования, его считали пораженным. В табл. 10 указана частота пораженных животных по группам. Оценка профилактической фракции 0,322 (0,004, 0,539; 95% ДИ) указывает, что вакцинация снижает количество пораженных животных. Анализ облегченных фракций также делали в дни, когда животное проявляло ненормальные клинические признаки. Оценка облегченных фракций 0,710 (0,333, 0,935; 95% ДИ) указывает, что вакцинация снизит количество дней, когда животное считалось пораженным.

Таблица 10. Частотное распределение наличия/отсутствия клинических признаков по группам во время фазы заражения

Группа	Пораженные? *				Общее кол-во
	Нет		Да		
	Кол-во (N)	%	Кол-во (N)	%	
SVA-Vx	4	31	9	69	13
Плацебо	0	0	11	100	11 [†]

*пораженные=наблюдался клинический признак, по крайней мере один раз в ходе исследования;

[†] животное № 648 удалили из анализа.

Ректальные температуры собрали в течение периода заражения; среднее значение наименьших квадратов ректальных температур в зависимости от дня исследования и группы представлены на фиг. 12. Вакцинация приводит к значительно более низким температурам в день 40 и день 42.

Образцы сыворотки дней 0, 14, 35 и 49 определяли с помощью вируснейтрализующего анализа. Средние геометрические значения титров в зависимости от группы и дня исследования представлены в табл. 11. После двух доз вакцины 13/13 (100%) животных имели нейтрализующих титры больше, чем 400.

Таблица 11. Сводные статистические данные титров нейтрализации вируса в зависимости от дня исследования и группы

Группа	День исследования	Кол-во (n)	Средние геометрические значения	Минимум	Максимум	% положительных животных (>40)
SVA-Vx	0	13	20,00	20	20	0,00
	14	13	68,17	20	160	69,23
	35	13	440,64	80	1280	100,00
	49	13	640,76	80	2560	100,00
Плацебо	0	12	20,00	20	20	0,00
	14	12	20,00	20	20	0,00
	35	12	21,19	20	40	0,00
	49	11	2256,9	640	2560	100,00

значения <40 были представлены как 20;

значения >2560 были приведены к 2560.

Наличие вирусной РНК в сыворотке обнаруживали с помощью количественной ПЦР в реальном времени. На фиг. 13 приведены групповые средние величины ($\log_{10}$ геномных копий/мл) РНК SVA в сыворотке. РНК SVA не была обнаружена у вакцинированных животных в любое время в ходе исследования. Для сравнения вирусная РНК была обнаружена в группе плацебо со дня 36 до дня 42.

В заключение вакцинация двумя дозами инактивированной цельновиральной вакцины Senecavirus A приводила к полному снижению вирусемии, статистически значимому снижению клинических признаков ($PF=0,322$; 95% ДИ=0,004, 0,539), и больше, чем четырехкратным титрам нейтрализации вируса у 13/13 вакцинированных животных до заражения.

Все композиции и способы, описанные и заявленные в данном документе, могут быть изготовлены и осуществлены без излишних экспериментов в свете настоящего описания. Хотя композиция и способы по данному изобретению были описаны в виде предпочтительных вариантов осуществления, специалисту в данной области техники будет очевидно, что к композициям и способам, и к стадиям или последовательностям стадий описанного в данном документе способа могут быть применены изменения без отхода от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные агенты, которые являются химически и физиологически схожими, могут быть заменены на агенты, описанные в данном документе, с достижением такого же или аналогичного результата. Все такие аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются не выходящими за пределы сущности, объема и концепции изобретения, как определено ниже следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, кодирующая Senecavirus A (SVA), содержащая полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(а) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2;

(б) нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% идентичной SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2;

(в) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 3;

(г) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% идентична SEQ ID NO: 3;

(д) комплементарной цепи любой из нуклеотидных последовательностей от (а) до (г).

2. Нуклеиновая кислота по п.1, отличающаяся тем, что Senecavirus A (SVA) способен индуцировать инфекцию у субъекта, в частности инфекцию у субъекта с клиническими признаками, связанными с или вызванными такой инфекцией, которая выбрана из группы, состоящей из: идиопатического везикулярного заболевания, везикулярного заболевания, такого как открытые или закрытые пузыри или поражения, расположенные на морде, слизистой оболочке полости рта и/или на стыке, где встречаются кожа и стенка копыта (венчик копыта), кровоизлияния в ногтевое ложе, внезапной/острой хромоты с покраснением и отека на или вокруг венчика копыта; образования язв на венчике копыта и отслоения копыта; и у размножающихся самок вызывает внезапный отказ от корма, вялость, потерю аппетита и/или повышение температуры до 105°F (~40,6°C); предпочтительно субъект является свиньей.

3. Senecavirus A (SVA) для профилактики или лечения субъекта от инфекции, обусловленной Senecavirus A (SVA), или для стимуляции иммунного ответа на указанную инфекцию у субъекта, геном которого содержит рибонуклеиновую кислоту по п.1 от (а) до (д).

4. Senecavirus A (SVA) по п.3, отличающийся тем, что Senecavirus является ослабленным или инактивированным.

5. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.1, 2.

6. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.5, предназначенная для получения нуклеиновой кислоты по пп.1, 2.

7. Полипептид Senecavirus A (SVA), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(а) аминокислотной последовательности, которая кодируется нуклеотидом по п.1 от (а) до (б);

(б) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3;

(в) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% идентична SEQ ID NO: 3;

(г) последовательности полипептида, являющегося полипептидом P1-2A-P3, имеющего аминокислотную последовательность, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33;

(д) последовательности полипептида, являющегося полипептидом P1-2A-P3, имеющего аминокислотную последовательность, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32 и/или SEQ ID NO: 33;

(е) последовательности полипептида, являющегося полипептидом P1-2A-P3, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29;

(ж) последовательности полипептида, являющегося полипептидом P1-2A-P3, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей

шей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% идентична SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 и/или SEQ ID NO: 29.

8. Антитело, которое специфически связывается с полипептидом по п.7.

9. Способ обнаружения Senecavirus A (SVA) по п.3 или 4 в образце, включающий стадии:

(I) приведения в контакт образца с одним или несколькими олигонуклеотидными праймерами и/или зондами, которые являются специфическими для нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-2, и

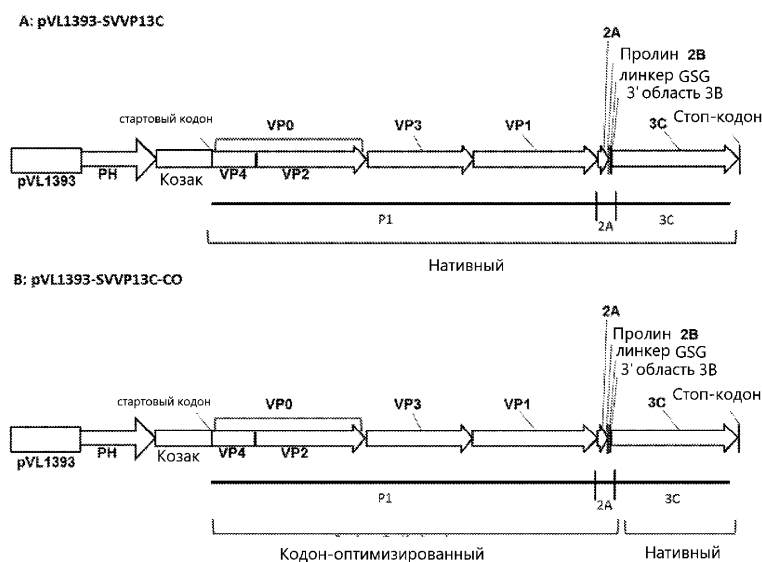
(II) обнаружения связывания между указанным Senecavirus A (SVA) и указанным одним или несколькими олигонуклеотидными праймерами и/или зондами; или

(III) приведения в контакт образца с антителом по п.8, и

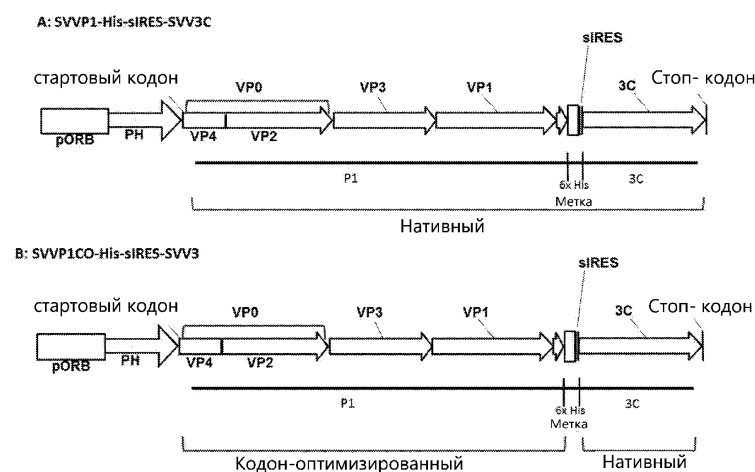
(IV) обнаружения связывания между указанным Senecavirus A (SVA) и указанным антителом; или

(V) обнаружение наличия или отсутствия антитела против указанного Senecavirus A (SVA) в указанном образце.

10. Способ диагностики инфекции Senecavirus A (SVA) по п.3 или 4 в образце от субъекта, предпочтительно свиньи, включающий способ для обнаружения Senecavirus A (SVA) по п.9, причем присутствие указанного Senecavirus A (SVA) является показателем инфекции, или включающий способ обнаружения антитела против указанного Senecavirus A (SVA) по п.9, причем наличие указанных антител является показателем инфекции от указанного Senecavirus A (SVA).

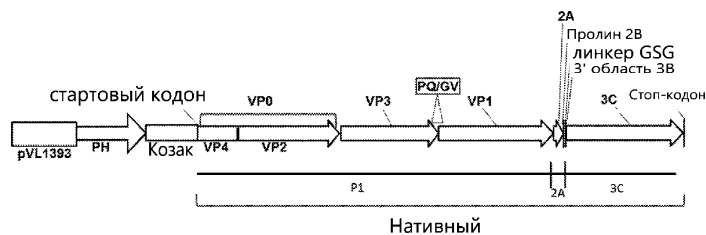


Фиг. 1

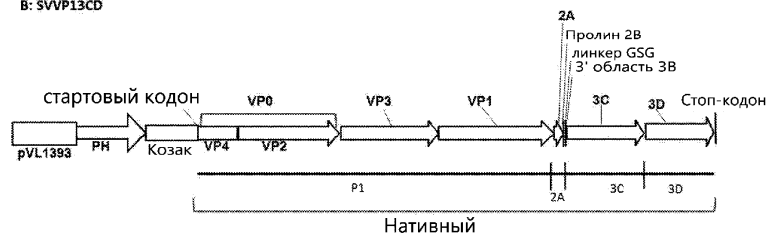


Фиг. 2

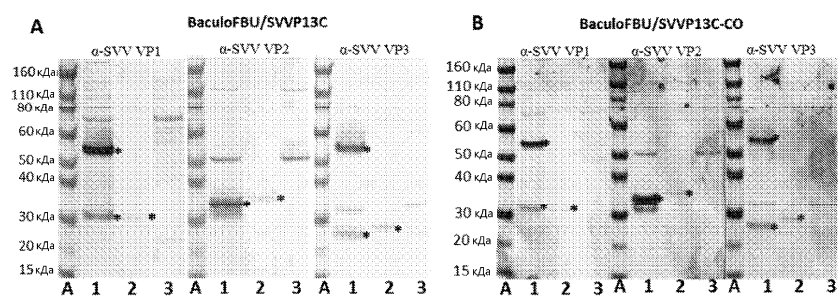
A: SVVP13C VP3/VP1



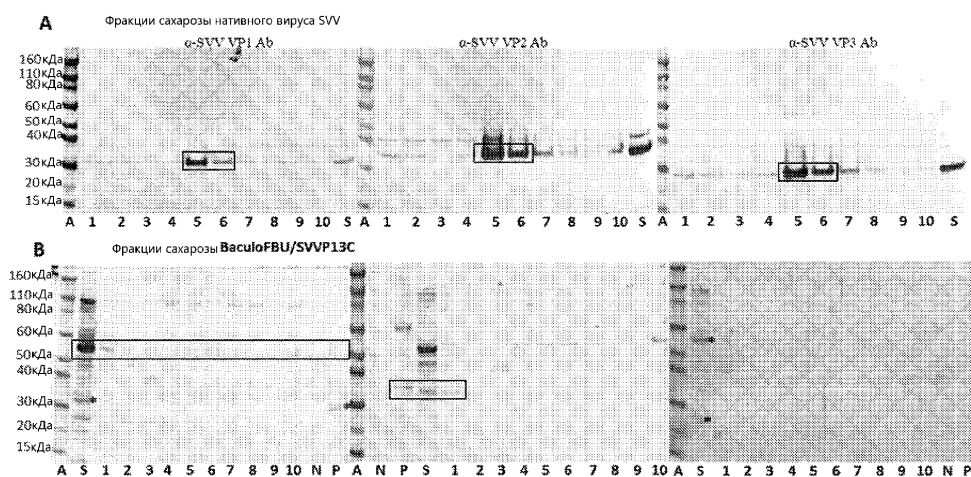
B: SVVP13CD



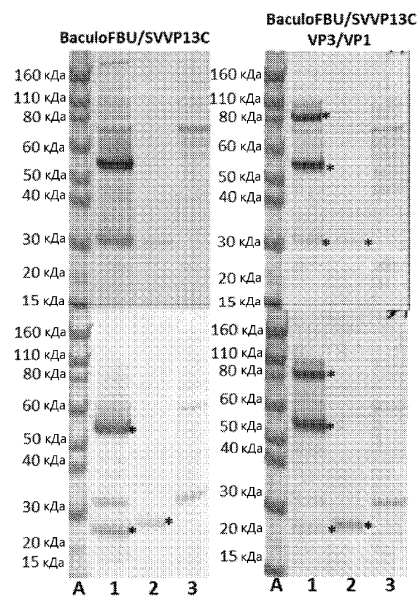
Фиг. 3



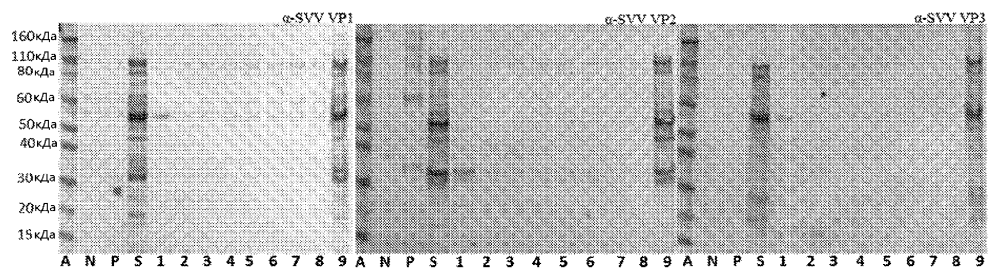
Фиг. 4



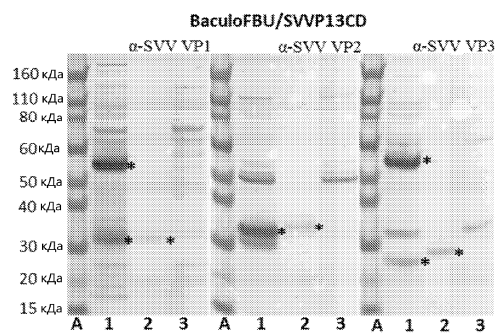
Фиг. 5



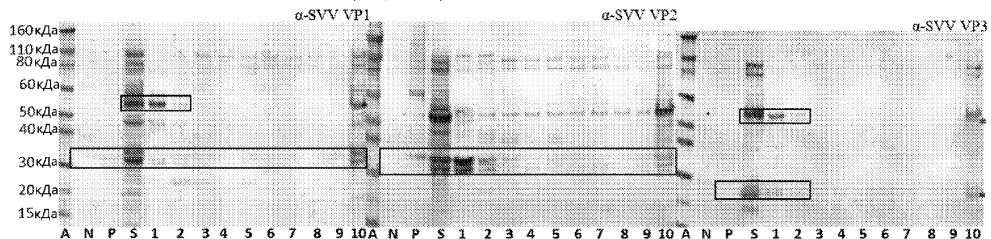
Фиг. 6

Фракции сахарозы **BaculoFBU/SVVP13C** VP3/VP1

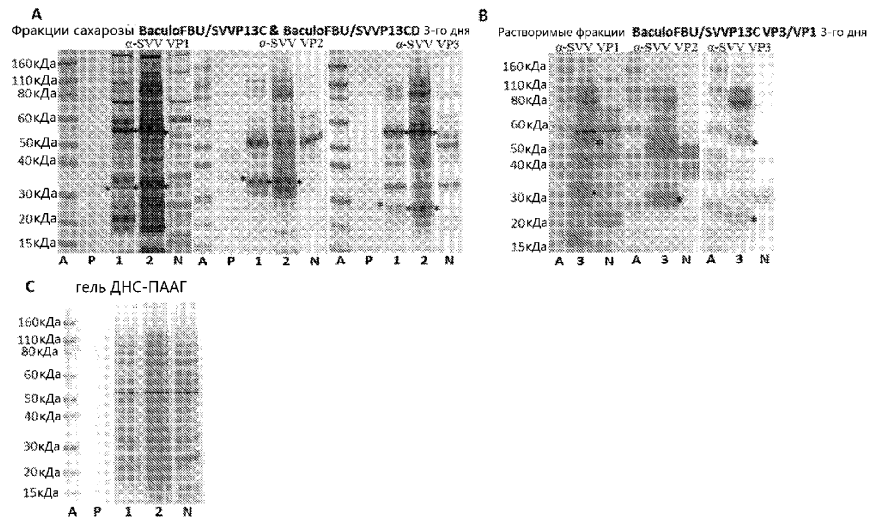
Фиг. 7



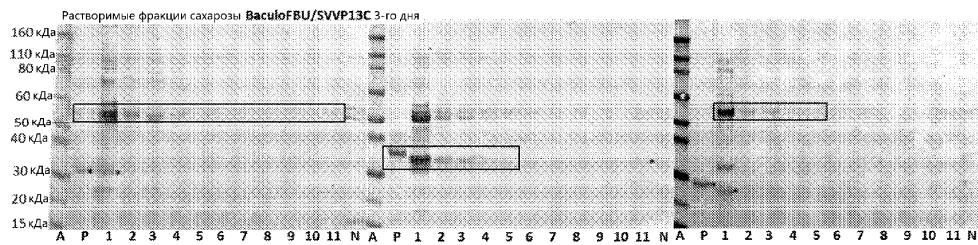
Фиг. 8

Фракции сахарозы **BaculoFBU/SVVP13CD**

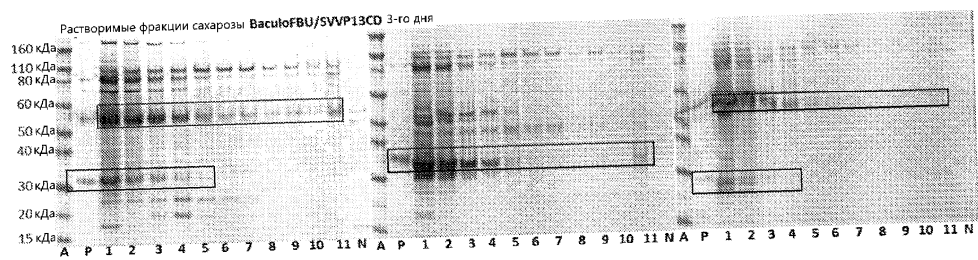
Фиг. 9



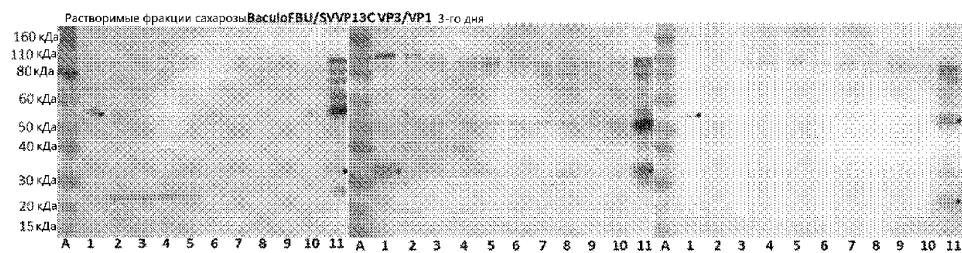
Фиг. 10



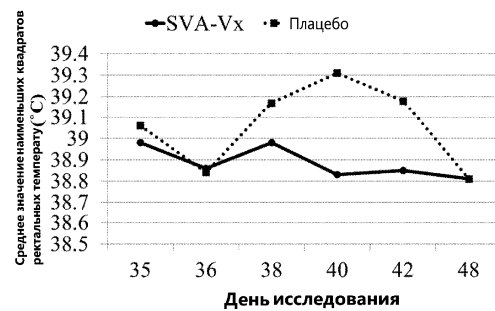
Фиг. 11А



Фиг. 11В



Фиг. 11С



Фиг. 12

