

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290679** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.06.06

(51) Int. Cl. *A61K 39/135* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.28

(54) **АНТИГЕН ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ЯЩУРА, ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ,
СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **202010357569.9**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.04.29**

**Тянь Кэгун, Пан Вэньцян, Сяо Янь,
Чжан Сюйкэ (CN)**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2020/112115**

(74) Представитель:

(87) **WO 2021/217982 2021.11.04**

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

**ПЬЮЛАЙК БАЙОЛОДЖИКАЛ
ИНДЖИНИРИНГ, ИНК. (CN)**

(57) Изобретение относится к антигену вирусоподобных частиц ящура типа А, где указанный антиген подвергается сборке посредством антигенных белков VP2, VP3 и VP1 эпидемического штамма вируса ящура типа А. Антигенный белок VP2 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 1, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP3 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 2, или ее вырожденной последовательностью, а антигенный белок VP1 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 3, или ее вырожденной последовательностью.

A1

202290679

202290679

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573375EA/032

АНТИГЕН ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ЯЩУРА, ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники

Настоящее раскрытие относится к вирусному антигену и к фармацевтическому препарату антигена. В частности, настоящее раскрытие относится к антигену вирусоподобной частицы ящура, к вакцинной композиции, полученной на основе этого антигена, и к способу ее получения и применения.

Предпосылки к созданию изобретения

Ящур (FMD) представляет собой острое высококонтагиозное заболевание животных, способное быстро распространяться на большие расстояния и являющееся наиболее заразным заболеванием млекопитающих, которое при заражении парнокопытных животных приводит к значительным экономическим потерям во всем мире. Животными, страдающими ящуром, являются крупный рогатый скот, овцы и свиньи. Патогенным фактором этого заболевания является вирус ящура (FMDV), представляющий собой афтовиром, относящийся к семейству пикорнавирусов. Этот вирус имеет 7 серотипов (типы А, О, С, азиатский штамм, SAT1, SAT2 и SAT3), причем, вирус ящура типа О и вирус ящура типа А наиболее распространены в Китае. Вакцинация является эффективной мерой борьбы с этим заболеванием и предотвращает падеж домашнего скота.

В связи с непрерывным распространением вируса ящура типа А, этот вирус ящура типа А в Китае претерпел большие изменения. В ходе природных эпидемий, вирус ящура типа А вызывает заражение и заболевание в основном крупного рогатого скота и овец, и реже свиней. Однако, в отличие от уже известных в прошлом вирусов, распространенный в настоящее время вирус ящура типа А является патогенным для крупного рогатого скота и свиней, который в 10 раз более вирулентен, чем предшествующий ему вирус типа А. На фармацевтическом рынке отсутствует вакцина, которая обладала бы биологической безопасностью и иммунологическим действием.

Вирусоподобные частицы (VLP) представляют собой частицы, подобные вирусам, которые могут самостоятельно собираться в структуры оболочки вируса при экспрессии *in vitro* и/или *in vivo*, и псевдовirus, которые имеют структуру оболочки, аналогичную вирусам, но не обладают способностью к репликации. Вакцина на основе VLP может эффективно стимулировать организм к выработыванию противоинфекционного и противоопухолевого иммунитета. Вакцина на основе вирусоподобных частиц является идеальной формой вакцины. Таким образом, в настоящее время, неотложной задачей является скрининг идеальных последовательностей штаммов ящура для получения вирусоподобных частиц, которые также отвечают потребностям Государства в эффективной профилактике и в борьбе с основными болезнями животных и в обеспечении эффективного и стабильного развития животноводства.

Сущность изобретения

Для решения давно существующей проблемы, связанной с эпидемическими штаммами вируса ящура типа А, в настоящем изобретении рассматривается антиген вирусоподобных частиц ящура типа А, где антиген вирусоподобной частицы ящура типа А подвергается сборке посредством антигенных белков VP2, VP3 и VP1 эпидемического штамма вируса ящура типа А; антигенный белок VP2 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 1, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP3 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 2, или ее вырожденной последовательностью, а антигенный белок VP1 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 3, или ее вырожденной последовательностью.

Антиген вирусоподобной частицы ящура обладает хорошей иммуногенностью, и приготовленная из него однократная вакцинная композиция может обеспечить полную защиту от эпидемического штамма вируса ящура типа А. Между тем, антиген вирусоподобных частиц ящура обладает хорошей стабильностью. После его хранения при 4°C в течение 3 месяцев, его можно наблюдать под электронным микроскопом после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой, поскольку вирусоподобные частицы все еще имеют большие размеры и не агрегируются.

Антиген вирусоподобных частиц ящура типа А получают из уже имеющегося эпидемического штамма, и этот антиген может обеспечивать полную защиту от этого эпидемического штамма дикого типа.

Настоящее изобретение также относится к вакцинной композиции, где вакцинная композиция содержит иммуногенное количество антигена вирусоподобной частицы ящура типа А и фармацевтически приемлемый носитель.

Вакцина с вирусоподобными частицами ящура эпидемического штамма типа А согласно изобретению может давать титры антител выше 1:128 на 14-й день после иммунизации и долго сохранять высокие титры антител, которые могут обеспечивать защиту за весь период откорма даже при содержании антигена всего 160 мкг/мл, что демонстрирует его хорошую иммуногенность.

В одном из вариантов осуществления изобретения, в вакцинной композиции согласно изобретению содержание антигена вирусоподобных частиц ящура типа А составляет 160-240 мкг/мл.

Содержание антигена вирусоподобных частиц ящура типа А может быть выбрано из 160 мкг/мл, 170 мкг/мл, 180 мкг/мл, 190 мкг/мл, 200 мкг/мл, 210 мкг/мл, 220 мкг/мл, 230 мкг/мл и 240 мкг/мл.

Даже при содержании антигена вирусоподобных частиц ящура типа А в количестве всего 160 мкг/мл, титр антител выше 1:128 может быть достигнут на 14-й день после иммунизации, то есть, может вырабатываться иммунная защита, и могут поддерживаться высокие титры антител в течение длительного периода времени.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в вакцинной композиции согласно изобретению, содержание антигена вирусоподобных частиц ящура типа А составляет 160 мкг/мл, 200 мкг/мл или 240 мкг/мл.

В одном из вариантов осуществления изобретения, в вакцинной композиции согласно изобретению, фармацевтически приемлемый носитель содержит адъювант, выбранный из одного или более из (1) минерального масла, альгидрогелевого адъюванта, сапонинов, авридина, додециладипата (DDA); (2) эмульсии типа «вода-в-масле», эмульсии типа «масло-в-воде», эмульсии типа «вода-в-масле-в-воде»; или (3) полимеров акриловой или метакриловой кислоты, сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного; и адъювантной системы RIBI, блоксополимера, SAF-M, монофосфориллипида А, липид-аминового адъюванта авридина, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, холерного токсина, IMS 1314, мурамилдипептида, Монтанида ISA 206 и гелевого адъюванта; где сапонин предпочтительно представляет собой Quil А, QS-21 или GPI-0100; а адъювант предпочтительно представляет собой адъювант ISA 206.

Содержание адъюванта составляет 5-60% об./об., предпочтительно 30-60% об./об., а более предпочтительно 50% об./об.

В одном из вариантов осуществления изобретения, вакцинная композиция согласно изобретению дополнительно включает иммуногенное количество антигена вирусоподобной частицы ящура топотипа SEA типа О и/или иммуногенное количество антигена вирусоподобной частицы ящура топотипа CATNAY типа О, где антиген вирусоподобной частицы ящура топотипа SEA типа О подвергается сборке посредством антигенных белков VP4, VP2, VP3 и VP1 эпидемического штамма вируса ящура топотипа SEA типа О, где антигенный белок VP4 вируса ящура топотипа SEA типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 4, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP2 вируса ящура топотипа SEA типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 5, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP3 вируса ящура топотипа SEA типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 6, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP1 вируса ящура топотипа SEA типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 7, или ее вырожденной последовательностью; и антиген вирусоподобной частицы ящура топотипа CATNAY типа О подвергается сборке посредством антигенных белков VP0, VP3 и VP1 эпидемических штаммов вируса ящура топотипа CATNAY типа О, где антигенный белок VP0 вируса ящура топотипа CATNAY типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 8, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP3 вируса ящура топотипа CATNAY типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 9, или ее вырожденной последовательностью; а антигенный белок VP1 вируса ящура топотипа CATNAY типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 10, или ее вырожденной последовательностью.

Антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O согласно изобретению обладает хорошей иммуногенностью, и титр антител выше 1:128 может быть достигнут на 14-й день после иммунизации. Антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O обладает хорошей стабильностью. После его хранения при 4°C в течение 3 месяцев, его можно наблюдать под электронным микроскопом после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой, поскольку вирусоподобные частицы все еще имеют большие размеры и не агрегируются.

Антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SATNAУ типа O согласно изобретению обладает хорошей иммуногенностью, и титр антител выше 1:128 в ответ на вирус ящура топотипа SATNAУ типа O может быть достигнут на 14-й день после иммунизации. Антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SATNAУ типа O обладает хорошей стабильностью. После его хранения при 4°C в течение 3 месяцев, его можно наблюдать под электронным микроскопом после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой, поскольку вирусоподобные частицы все еще имеют большие размеры и не агрегируются.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в вакцинной композиции согласно изобретению, содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O составляет 100-200 мкг/мл; а содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SATNAУ типа O составляет 100-200 мкг/мл.

Содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O может быть выбрано из 100 мкг/мл, 110 мкг/мл, 120 мкг/мл, 130 мкг/мл, 140 мкг/мл, 150 мкг/мл, 160 мкг/мл, 170 мкг/мл, 180 мкг/мл, 190 мкг/мл и 200 мкг/мл.

Антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O может давать титры антител выше 1:128 на 14-й день после иммунизации и сохранять высокие титры антител в течение длительного периода времени, даже если содержание антигена составляет всего 100 мкг/мл, что указывает на хорошую иммуногенность.

Содержание антигена вирусоподобной частицы ящура топотипа SATNAУ типа O может быть выбрано из 100 мкг/мл, 110 мкг/мл, 120 мкг/мл, 130 мкг/мл, 140 мкг/мл, 150 мкг/мл, 160 мкг/мл, 170 мкг/мл, 180 мкг/мл, 190 мкг/мл и 200 мкг/мл.

Антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SATNAУ типа O может давать титры антител выше 1:128 на 14-й день после иммунизации и сохранять высокие титры антител в течение длительного периода времени, даже если содержание антигена составляет всего 100 мкг/мл, что указывает на хорошую иммуногенность.

В вакцинной композиции согласно изобретению, содержащей антиген вирусоподобных частиц ящура типа A, антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O и антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SATNAУ типа O, то есть, два типа антигенов вирусоподобных частиц ящура типа O синергически усиливают иммунный эффект, и даже если содержание антигенов уменьшается наполовину, то может наблюдаться иммунный эффект каждого отдельного компонента вакцины.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, в вакцинной

композиции согласно изобретению, содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O составляет 100 мкг/мл, 150 мкг/мл или 200 мкг/мл; и содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SATNAУ типа O составляет 100 мкг/мл, 150 мкг/мл или 200 мкг/мл.

В одном из вариантов осуществления изобретения, фармацевтически приемлемый носитель включает лекарственные средства, иммуностимуляторы, антиоксиданты, поверхностно-активные вещества, красители, летучие масла, буферы, диспергирующие агенты, пропелленты и консерванты; а иммуностимуляторами являются α -интерферон, β -интерферон, γ -интерферон, гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и интерлейкин 2 (IL2).

Для приготовления такой композиции могут быть применены известные методы.

Настоящее изобретение также относится к способу получения вакцинной композиции, где указанный способ включает: стадию (1) клонирования и рекомбинации генов антигенных белков VP2, VP3, VP1 вируса ящура типа A, соответственно, с образованием общего тандемного экспрессионного вектора; стадию (2) трансформации или трансдукции клетки-хозяина рекомбинантным экспрессионным вектором, полученным на стадии (1), и растворимой экспрессии рекомбинантного антигенного белка SUMO-VP2, рекомбинантного антигенного белка SUMO-VP3 и рекомбинантного антигенного белка SUMO-VP1 вируса ящура типа A, которые могут подвергаться самосборке с образованием антигенов вирусоподобных частиц; стадию (3) выделения и очистки рекомбинантных антигенов вируса ящура типа A, полученных на стадии (2), и удаление связанных меток SUMO посредством расщепления и очистки; и стадию (4) самосборки в антигены вирусоподобных частиц с последующим добавлением адьюванта с получением вакцинной композиции. В соответствии с настоящим изобретением могут быть получены стабильные самособирающиеся вирусоподобные частицы посредством экспрессии антигенных белков VP2, VP3 и VP1 эпидемического штамма вируса ящура типа A для облегчения последующей очистки и разделения антигенов посредством экспрессии в тандеме антигенных белков VP2, VP3 и VP1 эпидемического штамма вируса ящура типа A. Экспрессированный и очищенный активный белок может эффективно подвергаться самосборке в антиген вирусоподобной частицы эпидемического штамма ящура типа A.

В одном из вариантов осуществления изобретения, в способе согласно изобретению, тандемным экспрессионным вектором на стадии (1) является pET28a, pET28b или pET32a; клеткой-хозяином на стадии (2) является E. coli BL21 (DE3), Origami B(DE3) pLysS или Rosetta-gami B(DE3).

В настоящем изобретении, антигенные белки VP2, VP3 и VP1 экспрессируют в тандеме путем выбора тандемного экспрессионного вектора и бактерий-хозяев, что облегчает последующее выделение и очистку антигена и упрощает процедуру. Растворимые белки, экспрессированные, очищенные и самособирающиеся в

вирусоподобные частицы, обладают биологической активностью.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в способе согласно изобретению на стадии (2), после амплификации клетки-хозяина добавляют IPTG для индуцирования экспрессии белка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в способе согласно изобретению, процесс разделения и очистки на стадии (3) заключается в разрушении бактериальных клеток, сохранении супернатанта и очистке антигена вирусоподобных частиц путем фракционного осаждения сульфатом аммония и хроматографии.

В настоящем изобретении, три структурных белка VP2, VP3 и VP1 вируса ящура типа А были впервые использованы для получения вирусоподобных частиц ящура, которые имеют такие преимущества, как хорошая иммуногенность, отсутствие рисков снижения биологической безопасности и т.п. Композиция вакцины с вирусоподобными частицами, полученная в соответствии с настоящим изобретением, может не только обеспечивать защитную активность против ящура типа А, но также быстро продуцировать высокие уровни антител, значительно увеличивать продолжительность иммунитета и обеспечивать иммунную защиту в течение длительного периода времени.

Настоящее изобретение также относится к применению вакцинной композиции в целях приготовления лекарственных средств для профилактики и/или лечения ящура типа А.

Животными, подходящими для введения лекарственных средств в целях профилактики и/или лечения инфекции, вызываемой вирусом ящура согласно изобретению, являются свиньи.

Вакцинная композиция согласно изобретению может поддерживать титр антител более 1:128 в течение 133 дней после однократной вакцинации и обеспечивать полную защиту свиней в течение длительного периода времени, который может охватывать весь период откорма.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее будут описаны варианты осуществления настоящего изобретения.

Определения

«Вирус ящура» относится к роду Aphthovirus семейства Picornaviridae. Этот вирус подразделяется на семь серотипов, О, А, С, SAT1, SAT2, SAT3 (то есть, по названию южноафриканских территорий 1, 2, 3) и азиатский серотип 1, между которыми отсутствует реакция перекрестной защиты, и для каждого серотипа существует несколько подтипов. В центре вируса находится одноцепочечная «плюс-цепь РНК», состоящая приблизительно из 8000 оснований, которые являются основой инфекции и наследственности и окружены белками, определяющими антигенность, иммунитет и серологический ответ вируса; а капсид вируса представляет собой симметричный икосаэдр. Вирус ящура является возбудителем ящура, то есть, высококонтагиозной болезни парнокопытных животных. Эта болезнь занимает первое место в списке «А» инфекционных болезней животных согласно Международному Бюро по эпизоотиям (OIE)

и включена в Список А болезней, относящихся к карантинным болезням животных, ввозимых в Китайскую Народную Республику. Профилактика и лечение ящура в Китае в основном осуществляется путем вакцинации, а после заражения ящуром, животных забивают.

«Антиген» относится к веществу, которое может индуцировать иммунный ответ в организме, то есть, оно может специфически распознаваться и связываться с антигенным рецептором (TCR/BCR) на поверхности Т/В-лимфоцитов для активации Т/В-клеток с последующим их размножением, дифференцировкой и продуцированием продуктов иммунного ответа (сенсibilизированных лимфоцитов или антител), и могут специфически связываться с соответствующими продуктами *in vivo* и *in vitro*.

«Вирусоподобные частицы (VLP)» представляют собой частицы, собранные из одного или нескольких вирусных структурных белков, которые имеют внешние структуры и антигенность, сходные со структурами и антигенностью вирусных частиц, но не содержат вирусных генов.

«Антигенные белки VP2, VP3, VP1 вируса ящура» представляют собой структурный белок-предшественник Р1 вируса ящура, который катализируется и процессируется протеазой 3С с образованием VP0, VP1 и VP3. Эти три белка подвергаются самосборке в икосаэдрический вирусный капсид. Белок VP0 является промежуточным продуктом Р1 после расщепления протеазой 3С. VP2 и VP4 генерируются расщеплением VP0 при созревании на последней стадии образования вирусной частицы.

Термин «вакцина» или «вакцинная композиция», используемый в настоящем изобретении, относится к фармацевтической композиции, содержащей антигены вирусоподобных частиц ящура, которые могут индуцировать, стимулировать или усиливать иммунный ответ против ящура у свиней.

Термин «иммуногенное количество» следует понимать как «иммунологически эффективное количество», и этот термин также означает иммунопротективное количество или количество, эффективное для индуцирования иммунного ответа, то есть, количество антигена, эффективное для индуцирования иммунного ответа у реципиента, где указанное иммуногенное количество является достаточным для профилактики или ослабления признаков или симптомов заболевания, включая побочные эффекты или осложнения такого заболевания. Иммунный ответ может быть достаточным для диагностических целей или других тестов, или он может быть подходящим для профилактики признаков или симптомов заболевания, включая побочные эффекты, вызываемые патогенной инфекцией, или осложнения такого заболевания. Может быть индуцирован гуморальный иммунитет или клеточно-опосредованный иммунитет, или тот и другой. Иммунный ответ животного на иммуногенную композицию можно быть оценен косвенно, например, путем определения титров антител и анализа на пролиферацию лимфоцитов, или непосредственно путем мониторинга признаков или симптомов после заражения штаммами дикого типа, в то время как защитный иммунитет, обеспечиваемый вакциной,

может быть оценен например, по клиническим признакам у животных, таким как смертность, снижение заболеваемости, температура и общее физиологическое состояние, а также общее состояние здоровья и продуктивность. Иммунный ответ может включать, но не ограничивается ими, индуцирование клеточного и/или гуморального иммунитета.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится ко всем компонентам, кроме антигена вируса ящура в вакцинной композиции согласно изобретению, и такими компонентами являются носители или разбавители, не вызывающие значительного раздражения организма и не нарушающие биологическую активность и свойства вводимого соединения, а предпочтительно адъюванта. Термин «адъювант» может включать соединение, выбранное из группы, состоящей из альгидрогелевого адъюванта, сапонинов, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсии «вода-в-масле», эмульсии «масло-в-воде», эмульсии «вода-в-масле-в-воде», полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного. Термин «эмульсия» может означать эмульсию, полученную, в частности, на основе легкого жидкого парафинового масла (типа, соответствующего нормам Европейской фармакопеи); изопреноидного масла, такого как сквалановое или скваленовое масло, полученное в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; сложных эфиров кислот или спиртов, содержащих прямую алкильную группу, а в частности, растительных масел, этилолеата, сополимера пропиленгликоля и ди-каприлата/капрата, сополимера глицерила и три-каприлата/капрата или диолеата пропиленгликоля; сложных эфиров разветвленных жирных кислот или спиртов, а в частности, сложных эфиров изостеариновой кислоты. Масло используют в комбинации с эмульгатором для образования эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, а в частности сложные эфиры сорбитана, маннида (например, олеата ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислот, которые необязательно являются этоксилированными, и блоксополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, а в частности продукты Pluronic, а особенно L121. См. Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S). John Wiley and Sons, NY, pp 51-94 (1995) and Todd et al. *Vaccine* 15:564-570 (1997). Так, например, может быть использована эмульсия SPT, описанная на стр. 147 публикации «*Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*» ed. by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995., и M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на стр. 183 той же публикации. Термин «полимеры акриловой или метакриловой кислоты» предпочтительно означает полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые были перекрестно сшиты, в частности, с полиалкениловыми эфирами сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны под термином «карбомер» (торговый знак Carbopol) (*Pharmepora* Vol. 8, No. 2, June 1996). Специалисты в данной области могут также обратиться к патенту США No.

2909462, в котором описаны такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксилированными соединениями, имеющими по меньшей мере 3 гидроксильных группы, а предпочтительно не более 8, причем, атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных были заменены ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например винилы, аллиллы и другие этиленоненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы могут сами содержать другие заместители, такие как метил. Продукты, продаваемые под торговым знаком Carborol (BF Goodrich, Ohio, USA), являются особенно предпочтительными. Эти продукты перекрестно сшиты с аллилсахарозой или аллилпентаэритритом. Среди них можно упомянуть Carborol 974P, 934P и 971 P, а наиболее предпочтительным является Carborol 971P. Термин «сополимеры малеинового ангидрида и алкенильного производного» также может охватывать ЕМА (Monsanto), который представляет собой сополимер малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к образованию кислотного раствора, который будет нейтрализован, предпочтительно до физиологического рН, с получением раствора адьюванта, в который будет включена сама иммуногенная, иммунологическая или вакцинная композиция. Термин «адьювант» включает, но не ограничивается ими, адьювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блоксополимер (CytRx, Atlanta, Ga.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), монофосфориллипид А, липид-аминовый адьювант авридин, термолабильный энтеротоксин E. coli (рекомбинантный или какой-нибудь другой), холерный токсин, IMS 1314, мурамилдипептид, гелевый адьювант и многие другие. Предпочтительно, адьювант включает одно или более из белого масла, альгидрогелевого адьюванта, сапонинов, эмульсии «вода-в-масле», эмульсии «масло-в-воде», эмульсии «вода-в-масле-в-воде», полимеров акриловой или метакриловой кислоты, сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного, адьювантной системы RIBI, блоксополимера, SAF-M, монофосфориллипид А, липид-аминового адьюванта Авридина, термолабильного энтеротоксина E. coli, холерного токсина, IMS 1314, мурамилдипептида, Монтанида ISA 206 и гелевого адьюванта.

Термин «вырожденность последовательности» в молекулярной биологии означает феномен, при котором обычная аминокислота имеет два или более кодонов, и называется вырожденностью кодона, а такая последовательность называется вырожденной последовательностью.

Термин «рекомбинация генов» относится к рекомбинации генов, которые регулируют различные признаки. Современные генно-инженерные технологии позволяют реализовать генетическую рекомбинацию в тест-пробирках в соответствии со специальным протоколом с получением конструкции, также известной как рекомбинантная ДНК. Цель этой процедуры состоит в переносе гена в одной отдельной клетке на молекулу ДНК в другой отдельной клетке с другими признаками для обеспечения генетической изменчивости. После переноса целевых генов, взятых у донора,

в бактерию-реципиента, продукт гена может быть экспрессирован с получением продуктов, которые трудно получить обычными методами.

Термин «трансформация» относится к сообщению клеткам или культивируемым клеткам-реципиентам новых генетических фенотипов посредством автоматического синтеза или искусственного введения чужеродной ДНК.

Термин «трансдукция» относится к переносу ДНК и к рекомбинации генов, происходящей между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, когда вирус высвобождается из инфицированной (донорской) клетки и повторно заражает другую (реципиентную) клетку.

Термин «профилактика и/или лечение» применительно к инфицированию ящуром относится к ингибированию репликации и распространения ящура или к предотвращению колонизации хозяина вирусом ящура, а также к ослаблению заболевания или симптомов заболевания ящуром. Если вирусная нагрузка снижается, тяжесть заболевания уменьшается и/или потребление пищи и/или рост увеличиваются, то можно считать, что лечение достигло терапевтического эффекта.

Ниже приводится описание настоящего изобретения со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, и особенности и преимущества настоящего изобретения станут более очевидными из нижеследующего описания. Однако, эти варианты осуществления изобретения приводятся лишь в иллюстративных целях и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения. Специалисту в данной области будет очевидно, что модификации или альтернативы деталям и формам технического решения настоящего изобретения могут быть включены без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, и все эти модификации и альтернативы должны входить в объем настоящего изобретения.

Химические реагенты, используемые в примерах настоящего изобретения, имеют аналитическую чистоту и были приобретены у Sinopharm Group Co. Ltd. Экспериментальные методы, описанные в настоящей заявке, являются стандартными методами, если это не оговорено особо. Биологические материалы являются коммерчески доступными, если это не оговорено особо.

Примеры

Материалы и методы

Конструирование и трансформация вектора

Рекомбинантный вектор pET28a-SUMOV2-SUMOV3-SUMOV1, содержащий гены VP2, VP3, VP1 вируса ящура типа А

Фрагмент гена VP2 вируса ящура типа А, представленный в SEQ ID NO.1 в Списке последовательностей; фрагмент гена VP3 вируса ящура типа А, представленный в SEQ ID NO. 2 в списке последовательностей, и ген VP1 вируса ящура типа А, представленный в SEQ ID NO. 3 в Списке последовательностей, были синтезированы компанией GENEWIZ, Inc. и, соответственно, лигированы с вектором pETSUMO. Затем успешно лигированную рекомбинантную плазмиду использовали в качестве матрицы для амплификации

фрагментов, содержащих RBS-SUMO-VP2, T7-RBS-SUMO-VP3 и T7-RBS-SUMO-VP1. Фрагменты расщепляли с помощью Xba I/BamH I, Sac I/Sal I, Not I/Xho I, а затем последовательно клонировали в вектор pET28a.

Продукт лигирования трансформировали в компетентные клетки DH5 α , приготовленные с использованием CaCl₂, а затем их распределяли по резистентной к канамицину твердой среде LB. Когда отдельные колонии были четко видны, одну колонию собирали и помещали в жидкую среду LB, содержащую канамицин, а затем культивировали при 230 об/мин при 37°C в течение 12 часов в течение ночи, и экстрагировали рекомбинантную плазмиду pET28a-SUMOV2-SUMOV3-SUMOV1.

Вышеупомянутую рекомбинантную плазмиду pET28a-SUMOV2-SUMOV3-SUMOV1 со встроенными генами VP2, VP3, VP1 вируса ящура типа А трансформировали в 40 мкл компетентной E. coli BL21(DE3), приготовленной методом с использованием хлорида кальция, а затем наносили на резистентную к канамицину твердую среду LB и оставляли на 10-12 часов при 37°C до появления отчетливых одиночных колоний, после чего, одну колонию собирали в тест-пробирку, содержащую 4 мл резистентной к канамицину жидкой среды LB, инкубировали при 37°C со встряхиванием при 230 об/мин в течение 12 часов, и из этой среды лиофилизировали 1 мл бактериального раствора, который хранили при -80°C.

Рекомбинантный вектор, содержащий гены VP4, VP2, VP3 и VP1 вируса ящура топотипа SEA типа O

Фрагмент гена VP4 топотипа SEA типа O, представленный в SEQ ID NO. 4 в Списке последовательностей, фрагмент гена VP2 топотипа SEA типа O, представленный в SEQ ID NO. 5 в Списке последовательностей, и ген VP3 топотипа SEA типа O, представленный в SEQ ID NO. 6 в Списке последовательностей, и фрагмент гена VP1 топотипа SEA типа O, представленный в SEQ ID NO. 7 в Списке последовательностей, были синтезированы компанией GENEWIZ, Inc. и был сконструирован экспрессионный штамм Escherichia coli, который содержит рекомбинантную плазмиду pET28a-SUMOV4-SUMOV2-SUMOV3-SUMOV1 и может тандемно экспрессировать гены VP4, VP2, VP3 и VP1 вируса ящура топотипа SEA типа O. Штамм лиофилизировали и хранили при -80°C.

Рекомбинантный вектор, содержащий гены VP0, VP3 и VP1 вируса ящура топотипа CATNAY типа O

Фрагмент гена VP0 топотипа CATNAY типа O, представленный в SEQ ID NO. 8 в Списке последовательностей, фрагмент гена VP3 топотипа CATNAY типа O, представленный в SEQ ID NO. 9 в Списке последовательностей, и ген VP1 топотипа CATNAY типа O, представленный в SEQ ID NO. 10 в Списке последовательностей были синтезированы компанией GENEWIZ, Inc. и был сконструирован экспрессионный штамм Escherichia coli, который содержит рекомбинантную плазмиду pET28a-SUMOV0-SUMOV3-SUMOV1 и может тандемно экспрессировать гены VP0, VP3 и VP1 вируса ящура топотипа CATNAY типа O. Штамм лиофилизировали и хранили при -80°C.

Экспрессия, очистка и сборка антигенных белков и идентификация

вирусоподобных частиц ящура (VLP)**Антиген вируса ящура типа А и частицы VLP**

Штамм *Escherichia coli* с рекомбинантной плазмидой pET28a-SUMOVP2-SUMOVP3-SUMOVP1, хранившийся при -80°C , вынимали, инокулировали в 50 мл жидкой среды LB, резистентной к канамицину, культивировали при 37°C со встряхиванием при 230 об/мин в течение 12 часов, а затем переносили в 1 л жидкой среды LB и культивировали при 37°C для приготовления посевного бульона для ферментации.

Резервуар для ферментации представляет собой 50-литровый резервуар для ферментации (Shanghai Baoxing Bio-Engineer Equipment Co., Ltd.). Было приготовлено 30 л культуральной среды, которую затем помещали в резервуар для ферментации, и стерилизовали при 121°C в течение 30 минут. На следующий день, 3 л посевного бульона помещали в резервуар для ферментации, и когда концентрация клеточной культуры достигала приблизительно 10 OD_{600} , температуру культивирования снижали до 25°C и добавили IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ для индуцирования культивирования в течение 12 часов. Когда плотность ферментации составляла приблизительно 40 (OD_{600}), культивирование прекращали и бактерии собирали центрифугированием.

Бактерии ресуспендировали и разрушали 4 раза под давлением 800 бар с помощью гомогенизатора, а затем центрифугировали при 13500 об/мин в течение 40 минут. Супернатант сохраняли и детектировали с помощью электрофореза в 15% ПААГ-ДСН. Белок подвергали грубой очистке путем фракционного осаждения сульфатом аммония с последующей хроматографической очисткой, ферментативным расщеплением, хроматографической очисткой для удаления присоединенной метки SUMO и сборки вирусоподобных частиц ящура типа А. Очищенный белок подвергали электрофорезу в ПААГ-ДСН.

Вирусоподобные частицы ящура типа А наблюдали под электронным микроскопом после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой.

Антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA тип О и частицы VLP

Штамм *E. coli* с рекомбинантной плазмидой pET28a-SUMOVP4-SUMOVP2-SUMOVP3-SUMOVP1, хранящийся при -80°C , вынимали, инокулировали в 50 мл жидкой среды LB, резистентной к канамицину, культивировали в условиях, аналогичных условиям, описанным для вышеуказанного антигена вируса ящура типа А, а затем переносили в 1 л жидкой среды LB и культивировали при 37°C .

С использованием ферментера объемом 50 л проводили крупномасштабную ферментацию и экспрессию антигена вируса ящура топотипа SEA типа О в соответствии с условиями приготовления, аналогичными условиям приготовления вышеупомянутого антигена вируса ящура типа А.

Четыре антигена вируса ящура топотипа SEA типа О, экспрессированные в тандеме в бактериях, разделяли, очищали и идентифицировали в соответствии с условиями приготовления, аналогичными условиям приготовления вышеупомянутого антигена вируса ящура типа А.

Вирусоподобные частицы ящура топотипа SEA типа O наблюдали на электронном микроскопе после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой.

Антиген вируса ящура топотипа CATNAУ типа O и частицы VLP

Штамм *Escherichia coli* с рекомбинантной плазмидой pET28a-SUMOVPO-SUMOVPP3-SUMOVPP1, хранившийся при -80°C, вынимали, инокулировали в 50 мл жидкой среды LB, резистентной к канамицину, культивировали в условиях, аналогичных условиям, описанным для вышеуказанного антигена вируса ящура типа A, а затем переносили в 1 л жидкой среды LB и культивировали при 37°C.

С использованием ферментера объемом 50 л проводили крупномасштабную ферментацию и экспрессию антигена вируса ящура топотипа CATNAУ типа O в соответствии с условиями приготовления, аналогичными условиям приготовления вышеупомянутого антигена вируса ящура типа A.

Три антигена вируса ящура топотипа CATNAУ типа O, экспрессированные в тандеме в бактериях, разделяли, очищали и идентифицировали в соответствии с условиями приготовления, аналогичными условиям приготовления вышеупомянутого антигена вируса ящура типа A.

Вирусоподобные частицы ящура топотипа CATNAУ типа O наблюдали на электронном микроскопе после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой.

Приготовление вакцинных композиций вирусоподобных частиц ящура

Вакцинные композиции, содержащие антиген вирусоподобных частиц ящура типа A

Брали приготовленный антиген вирусоподобных частиц ящура типа A и медленно добавляли к адьюванту, а затем, в процессе добавления, непрерывно перемешивали с эмульгатором при 800 об/мин в течение 12 минут, тщательно смешивали и хранили при 4°C. Были приготовлены вакцинные композиции, содержащие антиген вирусоподобных частиц ящура типа A. Адьюванты, подходящие для использования в настоящем изобретении, могут представлять собой адьюванты, известные специалистам в данной области. В настоящем изобретении был выбран двухфазный адьювант (эмульсия «вода-в-масле-в-воде»), например, адьювант ISA 206 (SEPPIC, Франция).

Вакцинные композиции, содержащие антиген вирусоподобных частиц ящура типа A и антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O

Приготовленный антиген вирусоподобных частиц ящура типа A, а также приготовленный антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O получали в соответствии с описанным выше способом приготовления вакцинной композиции, содержащей антиген вирусоподобных частиц ящура типа A. Адьюванты, подходящие для использования в настоящем изобретении, могут представлять собой адьюванты, известные специалистам в данной области. В настоящем изобретении был выбран двухфазный адьювант (эмульсия «вода-в-масле-в-воде»), например, адьювант ISA 206 (SEPPIC, Франция).

Вакцинные композиции, содержащие антиген вирусоподобных частиц ящура

типа А, антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О и антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа CATNAУ типа О

Приготовленный антиген вирусоподобных частиц ящура типа А, антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О, а также антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа CATNAУ типа О получали в соответствии с описанным выше способом приготовления вакцинной композиции, содержащей антиген вирусоподобных частиц ящура типа А. Адъюванты, подходящие для использования в настоящем изобретении, могут представлять собой адъюванты, известные специалистам в данной области. В настоящем изобретении был выбран двухфазный адъювант (эмульсия «вода-в-масле-в-воде»), например, адъювант ISA 206 (SEPPIC, Франция).

Анализ на иммуногенность вакцинных композиций с вирусоподобными частицами ящура типа А

Иммуногенность композиции вакцины с вирусоподобными частицами ящура типа А

Иммуногенность антигена в вакцинной композиции оценивали по уровню антител в сыворотке иммунизированных свиней, определяемому методом ELISA.

Были отобраны здоровые и восприимчивые свиньи на откорме, негативные по антителу против антигена вируса ящура типа А, и имеющие массу приблизительно 40 кг, а затем их иммунизировали вакцинной композицией, содержащей антиген вирусоподобных частиц ящура типа А. Способ иммунизации групп иммунизации представлял собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею, а контрольную группу иммунизировали таким же количеством PBS. Пробы крови брали у каждой свиньи до иммунизации, а также на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й день после иммунизации. Для обнаружения антител в собранной сыворотке использовали набор для ELISA на антитела против ящура типа А.

Испытание на продолжительность иммунитета после введения вакцинной композиции на основе вирусоподобных частиц ящура типа А

Продолжительность иммунитета к антигену в вакцинной композиции оценивали по уровню антител в сыворотке иммунизированных свиней, определяемому методом ELISA.

Были отобраны здоровые и восприимчивые свиньи на откорме, негативные по антителу против антигена вируса ящура типа А, и имеющие массу приблизительно 40 кг, а затем их иммунизировали вакцинной композицией, содержащей антиген вирусоподобных частиц ящура типа А. Способ иммунизации групп иммунизации представлял собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею, а группу «пустого» контроля иммунизировали таким же количеством PBS. Всех свиней иммунизировали один раз. Пробы крови брали у каждой свиньи до иммунизации, а также на 21-й, 28-й, 35-й, 77-й, 105-й и 133-й день после иммунизации.

Контрольной группой является группа иммунизации коммерчески доступной инактивированной вакциной (штаммом Re-O/MYA98/JSCZ/2013+штаммом Re-A/WH/09). Способ иммунизации представлял собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в

шею, а контрольную группу иммунизировали таким же количеством PBS. Перед иммунизацией, у каждой свиньи брали пробу крови, а на 21-й день после 1-й иммунизации брали пробу крови и проводили 2-ю иммунизацию. На 7-й, 14-й, 56-й, 84-й и 112-й день после 2-й иммунизации у каждой свиньи брали пробу крови.

Иммуногенность вакцинных композиций с антигеном вирусоподобных частиц ящура типа А и с антигеном вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О

Иммуногенность антигена в вакцинной композиции оценивали по уровню антител в сыворотке иммунизированных свиней, определяемому методом ELISA.

Были отобраны здоровые и восприимчивые свиньи на откорме, негативные по антителу против антигена вируса ящура типа А и типа О, и имеющие массу приблизительно 40 кг, а затем их иммунизировали вакцинной композицией, содержащей антиген вирусоподобных частиц ящура типа А, и антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О, где способ иммунизации представлял собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею, а группа «пустого» контроля была иммунизирована 2 мл PBS. Пробы крови брали у каждой свиньи до иммунизации, а также на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й день после иммунизации.

Иммуногенность вакцинных композиций антигена вирусоподобных частиц ящура типа А, антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О и антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа CATNAУ типа О

Иммуногенность антигена в вакцинной композиции оценивали по уровню антител в сыворотке иммунизированных свиней, определяемому методом ELISA.

Были отобраны здоровые и восприимчивые свиньи на откорме, негативные по антителу против антигена вируса ящура типа А и типа О, и имеющие массу приблизительно 40 кг, а затем их иммунизировали вакцинной композицией, содержащей антиген вирусоподобных частиц ящура типа А, антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О и антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа CATNAУ типа О, где способ иммунизации представлял собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею, а контрольная группа была иммунизирована вакцинной композицией, содержащей антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О или антиген вирусоподобных частиц ящура топотипа CATNAУ типа О, где способ иммунизации представлял собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею, а группа «пустого» контроля была иммунизирована 2 мл PBS. Пробы крови брали у каждой свиньи до иммунизации, а также на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й день после иммунизации.

Пример 1. Вирусоподобные частицы ящура типа А

Бактериальные клетки, экспрессирующие антигенные белки вируса ящура типа А, ресуспендировали, и, как было обнаружено с помощью электрофореза в ПААГ-ДСН, три белка-мишени экспрессировались в тандеме в супернатанте. С помощью электрофореза в ПААГ-ДСН для очищенных белков было обнаружено, что все белки-мишени были очищены и обогащены.

На электронном микроскопе после негативного окрашивания фосфовольфрамовой

кислотой можно было наблюдать, что белок ящура типа А образовывал вирусоподобные частицы, причем, образовавшиеся вирусоподобные частицы имели объемную форму, высокую эффективность сборки и не агрегировались. После их хранения в течение 3 месяцев при 4°C, на электронном микроскопе после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой можно было наблюдать, что вирусоподобные частицы все еще имели объемную форму и не агрегировались. Было показано, что белок вируса ящура, оцененный путем секвенирования его последовательности согласно изобретению, образует стабильные вирусоподобные частицы.

Пример 2. Получение вакцинной композиции вирусоподобной частицы ящура типа А

Удельное отношение каждого компонента в приготовленной вакцине представлено в Таблице 1.

Таблица 1. Соотношение компонентов вакцинных композиций вирусоподобной частицы ящура типа А

Компонент	Вакцина 1	Вакцина 2	Вакцина 3
Антиген ящура (мкг/мл)	160	200	240
Двухфазный адъювант (об./об.%)	50%	50%	50%

Пример 3. Тест на иммуногенность вакцинных композиций, содержащих антиген вирусоподобных частиц ящура типа А

Было отобрано 20 здоровых и восприимчивых свиней на откорме, негативных по антителу против антигена вируса ящура типа А и имеющих массу приблизительно 40 кг, а затем их произвольно распределяли на 5 групп, по 4 свиньи в группе. Группы 1-3 представляли собой группы иммунизации соответствующей вакциной 1, вакциной 2 и вакциной 3, приготовленных как описано в Примере 2 согласно изобретению, соответственно, а группа 4 представляла собой группу «пустого» контроля. Группу иммунизации иммунизировали путем внутримышечной инъекции 2 мл вакцины в шею, а контрольную группу иммунизировали таким же количеством PBS.

Результаты определения титра антител показали, что антитела у всех свиней отсутствовали до иммунизации вакцинами, а на 14-й день после первой иммунизации, эти титры могли достигать более 1:128. Антитела у группы «пустого» контроля отсутствовали, при этом, не наблюдалось каких-либо изменений. Конкретные результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Уровни антител против вируса ящура типа А, детектируемые с помощью ELISA

Группа	Свинья №	До иммунизации	7-й день после иммунизации	14-й день после иммунизации	21-й день после иммунизации	28-й день после иммунизации
1	1	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720

	2	< 1:8	1:45	1:128	1:360	1:360
	3	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	4	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	5	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
2	6	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	7	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	8	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	9	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	10	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
3	11	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	12	< 1:8	1:64	1:180	1:360	1:360
	13	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	14	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	15	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
4	16	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	17	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	18	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	19	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	20	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8

Было показано, что вирусоподобные частицы, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быстро образовывать высокие уровни специфических антител и могут обеспечивать превосходную иммунную защиту против ящура типа А на 14-й день после иммунизации, даже если содержание антигена составляет всего 160 мкг/мл.

Пример 4. Сравнительное испытание на продолжительность иммунитета, сообщаемого вакцинными композициями, содержащими антиген вирусоподобных частиц ящура типа А.

Было отобрано 20 здоровых и восприимчивых свиней на откорме, негативных по антителу против антигена вируса ящура типа А и имеющих массу приблизительно 40 кг, а затем их произвольно распределяли на 5 групп, по 4 свиньи в группе. Группа 5 представляла собой группу иммунизации вакциной 2, приготовленной как описано в Примере 2 согласно изобретению, группа 7 представляла собой группу иммунизации коммерчески доступной инактивированной вакциной (штаммом Re-

	30	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
Группа	свинья № №.	До 1 -й иммунизации	21 день после 1 -й иммунизации	7 день после 2-й иммунизации	14 день после 2-й иммунизации	День 56 после 2-й иммунизации	День 84 после 2-й иммунизации	День 112 после 2-й иммунизации
7	31	< 1:8	1:45	1:360	1:720	1:720	1:360	1:180
	32	< 1:8	1:45	1:180	1:360	1:360	1:180	1:180
	33	< 1:8	1:45	1:360	1:720	1:360	1:180	1:128
	34	< 1:8	1:45	1:180	1:360	1:360	1:180	1:128
	35	< 1:8	1:45	1:180	1:360	1:360	1:180	1:128
8	36	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	37	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	38	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	39	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	40	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8

Приведенные выше эксперименты показали, что вакцинная композиция с вирусоподобными частицами, полученная в соответствии с настоящим изобретением, по сравнению с коммерчески доступной инактивированной цельновирусной вакциной, не только может обеспечить быстрое продуцирование антител на высоком уровне против антигена вирусоподобных частиц ящура типа А с превосходным эффектом иммунной защиты уже после однократной иммунизации, но также может значительно увеличить продолжительность иммунитета и поддерживать иммунную защиту в течение более длительного периода времени.

Пример 5. Вирусоподобные частицы ящура топотипа SEA типа О

Бактериальные клетки, экспрессирующие антигенные белки вируса ящура топотипа SEA типа О, ресуспендировали, и, как было обнаружено с помощью электрофореза в ПААГ-ДСН, четыре белка-мишени экспрессировались в тандеме в супернатанте. С помощью электрофореза в ПААГ-ДСН для очищенных белков было обнаружено, что все белки-мишени были очищены и обогащены.

На электронном микроскопе после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой можно было наблюдать, что белок ящура топотипа SEA типа О образовывал вирусоподобные частицы, причем, образовавшиеся вирусоподобные частицы имели объемную форму, высокую эффективность сборки и не агрегировались. После их хранения в течение 3 месяцев при 4°C, на электронном микроскопе после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой можно было наблюдать, что вирусоподобные частицы ящура все еще имели объемную форму и не агрегировались. Было показано, что белок вируса ящура, оцененный путем секвенирования его последовательности согласно

изобретению, образует стабильные вирусоподобные частицы.

Пример 6. Приготовление двухвалентных вакцинных композиций на основе вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О и типа А.

Удельное соотношение каждого компонента в приготовленной вакцине представлено в Таблице 4.

Таблица 4. Соотношения компонентов двухвалентных вакцинных композиций на основе вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О и типа А.

Компонент	Вакцина 4	Вакцина 5	Вакцина 6
Антиген ящура типа А (мкг/мл)	160	200	240
Антиген ящура топотипа SEA типа О (мкг/мл)	100	150	200
Двухфазный адъювант (об./об.%)	50%	50%	50%

Пример 7. Тест на иммуногенность двухвалентных вакцинных композиций на основе вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О и типа А.

Было отобрано 20 здоровых и восприимчивых свиней на откорме, негативных по антителу против антигена вируса ящура типа А и типа О и имеющих массу приблизительно 40 кг, а затем их произвольно распределяли на 4 группы, по 5 свиней в группе. Группы 9-11 представляли собой группы иммунизации соответствующей вакциной 4, вакциной 5 и вакциной 6, приготовленных как описано в Примере 6 согласно изобретению, соответственно, а группа 12 представляла собой группу «пустого» контроля. Группу иммунизации иммунизировали путем внутримышечной инъекции 2 мл вакцины в шею, а контрольную группу иммунизировали таким же количеством PBS. Перед иммунизацией и на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й день после иммунизации, у каждой свиньи брали пробу крови.

Для детектирования соответствующих антител в собранной сыворотке использовали набор для ELISA-анализа на антитела против вируса ящура типа А. Результаты показали, что антитела у всех свиней до вакцинации отсутствовали, и у всех животных уровни антител могли достигать выше 1:128 на 14-й день после однократной вакцинации; а антитела у группы «пустого» контроля отсутствовали и никаких изменений не наблюдалось. Конкретные результаты представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Уровни антител против вируса ящура типа А, оцененные с помощью ELISA

Группа	Свинья №	До иммунизац	7-й день после	14-й день после	21-й день после	28-й день после
--------	----------	--------------	----------------	-----------------	-----------------	-----------------

		ии	иммуниза ции	иммунизац ии	иммунизац ии	иммуниза ции
9	41	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	42	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	43	< 1:8	1:45	1:128	1:360	1:360
	44	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	45	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
10	46	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	47	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	48	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	49	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	50	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
11	51	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	52	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	53	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	54	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	55	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
12	56	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	57	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	58	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	59	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	60	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8

Для детектирования соответствующих антител в собранной сыворотке

использовали набор для ELISA-анализа на антитела против вируса ящура топотипа SEA типа О. Результаты показали, что антитела у всех свиней в каждой группе иммунизации до вакцинации отсутствовали, и у всех животных уровни антител могли достигать выше 1:128 на 14-й день после однократной вакцинации; а антитела у свиней группы «пустого» контроля отсутствовали и никаких изменений не наблюдалось. Конкретные результаты представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Уровни антител против вируса ящура топотипа SEA типа О, оцененные с помощью ELISA

Группа	Свинья №	До иммунизации	7-й день после иммунизации	14-й день после иммунизации	21-й день после иммунизации	28-й день после иммунизации
9	41	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	42	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	43	< 1:8	1:64	1:128	1:720	1:720
	44	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	45	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
10	46	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	47	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	48	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	49	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	50	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
11	51	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	52	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	53	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	54	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	55	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720

12	56	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	57	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	58	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	59	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	60	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8

Приведенные выше эксперименты показали, что вакцинные композиции на основе вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа А и типа О, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быстро образовывать высокие уровни специфических антител и могут обеспечивать хорошую иммунную защиту против ящура типа А и топотипа SEA типа О.

Пример 8. Вирусоподобные частицы ящура топотипа SATNAУ типа О

Бактериальные клетки, экспрессирующие антигенные белки вируса ящура топотипа SATNAУ типа О, ресуспендировали, и, как было обнаружено с помощью электрофореза в ПААГ-ДСН, три белка-мишени экспрессировались в тандеме в супернатанте. С помощью электрофореза в ПААГ-ДСН для очищенных белков было обнаружено, что все белки-мишени были очищены и обогащены.

На электронном микроскопе после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой можно было наблюдать, что белок ящура топотипа SATNAУ типа О образовывал вирусоподобные частицы, причем, образовавшиеся вирусоподобные частицы имели объемную форму, высокую эффективность сборки и не агрегировались. После их хранения в течение 3 месяцев при 4°C, на электронном микроскопе после негативного окрашивания фосфовольфрамовой кислотой можно было наблюдать, что вирусоподобные частицы ящура все еще имели объемную форму и не агрегировались. Было показано, что белок вируса ящура, оцененный путем секвенирования его последовательности согласно изобретению, образует стабильные вирусоподобные частицы.

Пример 9. Получение двухвалентных вакцинных композиций на основе вирусоподобных частиц ящура типа О (топотипа SEA, топотипа SATNAУ) и типа А

Удельное соотношение каждого компонента в приготовленных вакцинах показано в Таблице 7.

Таблица 7. Соотношения компонентов двухвалентных вакцинных композиций на основе вирусоподобных частиц ящура типа О (топотипа SEA, топотипа SATNAУ) и типа А

Компонент	Вакцина 7	Вакцина 8	Вакцина 9	Вакцина 10	Вакцина 11

Антиген вируса ящура (мкг/мл) типа А	160	200	240	-	-
Антиген вируса ящура топотипа SEA типа О (мкг/мл)	100	150	200	200	-
Антиген вируса ящура топотипа САТНАУ типа О (мкг/мл)	100	150	200	-	200
Двухфазный адъювант (об./об.%)	50%	50%	50%	50%	50%

Пример 10. Тест на иммуногенность двухвалентных вакцинных композиций вирусоподобных частиц ящура типа О (топотипа SEA, топотипа САТНАУ) и типа А.

Было отобрано 30 здоровых и восприимчивых свиней на откорме, негативных по антителу против антигена вируса ящура типа А и типа О и имеющих массу приблизительно 40 кг, а затем их произвольно распределяли на 6 групп, по 5 свиней в группе. Группы 13-15 представляли собой группы иммунизации соответствующей вакциной 7, вакциной 8 и вакциной 9, приготовленных как описано в Примере 9 согласно изобретению, соответственно, где способ иммунизации представляет собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею, группы 16-17 представляли собой группы иммунизации соответствующими вакцинами 10 и 11, приготовленными как описано в Примере 9 согласно изобретению, соответственно, где способ иммунизации представляет собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею; а группа 18 представляла собой группу «пустого» контроля, которую иммунизировали путем внутримышечной инъекции 2 мл PBS в шею. Перед иммунизацией и на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й день после иммунизации, у каждой свиньи брали/собирали пробу крови.

Для детектирования соответствующих антител в собранной сыворотке использовали набор для ELISA-анализа на антитела против вируса ящура типа А. Результаты показали, что антитела у всех свиней до вакцинации отсутствовали, и у всех животных групп 13, 14 и 15, уровни антител могли достигать выше 1:128 на 14-й день после однократной вакцинации; при этом, антитела у группы 16 и 17 и у группы «пустого» контроля отсутствовали и никаких изменений не наблюдалось. Конкретные результаты представлены в Таблице 8.

Таблица 8. Уровни антител против вируса ящура типа А, оцененные с помощью ELISA

Группа	Свинья №	До иммунизации	7-й день после иммунизации	14-й день после иммунизации	21-й день после иммунизации	28-й день после иммунизации
13	61	< 1:8	1:45	1:128	1:360	1:360
	62	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	63	< 1:8	1:45	1:128	1:360	1:360
	64	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	65	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
14	66	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	67	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	68	< 1:8	1:45	1:128	1:360	1:360
	69	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	70	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
15	71	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	72	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	73	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	74	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	75	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
16	76	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	77	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	78	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	79	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	80	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
17	81	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	82	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	83	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	84	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8

	85	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
18	86	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	87	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	88	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	89	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	90	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8

Для детектирования соответствующих антител в собранной сыворотке использовали набор для ELISA-анализа на антитела против вируса ящура топотипа SEA типа О. Результаты показали, что антитела у всех свиней до вакцинации отсутствовали, и у всех животных групп 13, 14, 15 и 16, уровни антител могли достигать выше 1:128 на 14-й день после однократной вакцинации; причем, что касается группы иммунизации двухвалентной (трехкомпонентной) вакцинной композицией, содержащей вирусоподобные частицы ящура на низком уровне, то у этой группы, уровень антител по-прежнему соответствовал или превышал уровень антител у группы иммунизации одновалентной вакцинной композицией, содержащей вирусоподобные частицы ящура топотипа SEA типа О на высоком уровне; а антитела у группы 17 и у группы «пустого» контроля отсутствовали и никаких изменений не наблюдалось. Конкретные результаты представлены в Таблице 9. Сравнение результатов ELISA-анализа на антитела против вируса ящура топотипа SEA типа О у групп 13, 14, 15 и 16, которым вводили двухвалентную вакцинную композицию на основе вирусоподобных частиц ящура типа О (SEA, CATHAУ) и типа А согласно изобретению, показало, что между двумя антигенами О-типа возникает синергический эффект, а поэтому иммунный эффект может быть гарантирован даже при половинном содержании антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа О.

Таблица 9. Уровни антител против вируса ящура топотипа SEA типа О, оцененные с помощью ELISA

Группа	Свинья №	До иммунизац	7-й день после	14-й день после	21-й день после	28-й день после
13	61	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	62	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	63	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	64	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	65	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
14	66	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	67	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720

	68	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	69	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	70	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
15	71	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	72	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	73	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	74	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	75	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
16	76	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	77	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	78	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	79	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	80	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
17	81	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	82	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	83	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	84	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	85	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
18	86	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	87	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	88	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	89	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	90	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8

Для детектирования соответствующих антител в собранной сыворотке использовали набор для ELISA-анализа на антитела против вируса ящура топотипа SATNAУ типа О. Результаты показали, что антитела у всех свиней до вакцинации отсутствовали, и у всех животных групп 13, 14, 15 и 17, уровни антител могли достигать выше 1:128 на 14-й день после однократной вакцинации; причем, что касается группы иммунизации двухвалентной (трехкомпонентной) вакцинной композицией, содержащей вирусоподобные частицы ящура на низком уровне, то у этой группы, уровень антител по-прежнему соответствовал или превышал уровень антител у группы иммунизации одновалентной вакцинной композицией, содержащей вирусоподобные частицы ящура топотипа SATNAУ типа О на высоком уровне; а антитела у группы 16 и у группы «пустого» контроля отсутствовали и никаких изменений не наблюдалось. Конкретные результаты представлены в Таблице 10. Сравнение результатов ELISA-анализа на

антитела против вируса ящура топоти́па СATHAY типа О у групп 13, 14, 15 и 17, которым вводили двухвалентную вакцинную композицию на основе вирусоподобных частиц ящура типа О (топотипа SEA, топоти́па СATHAY) и типа А согласно изобретению, показало, что между двумя антигенами О-типа возникает синергический эффект, а поэтому иммунный эффект может быть гарантирован даже при половинном содержании антигена вирусоподобных частиц ящура топоти́па СATHAY типа О.

Таблица 10. Уровни антител против вируса ящура топоти́па СATHAY типа О, оцененные с помощью ELISA

Группа	Свинья №	До иммунизации	7-й день после иммунизации	14-й день после иммунизации	21-й день после иммунизации	28-й день после иммунизации
13	61	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:360
	62	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	63	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	64	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	65	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
14	66	< 1:8	1:64	1:180	1:720	1:720
	67	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	68	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	69	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	70	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
15	71	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	72	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	73	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
	74	< 1:8	1:64	1:128	1:360	1:720
	75	< 1:8	1:90	1:180	1:720	1:720
16	76	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	77	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	78	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	79	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	80	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
17	81	< 1:8	< 1:8	1:128	1:360	1:720
	82	< 1:8	< 1:8	1:128	1:360	1:720

	83	< 1:8	< 1:8	1:180	1:720	1:720
	84	< 1:8	< 1:8	1:180	1:720	1:720
	85	< 1:8	< 1:8	1:128	1:360	1:360
18	86	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	87	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	88	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	89	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8
	90	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8	< 1:8

Приведенные выше эксперименты показали, что двухвалентные (трехкомпонентные) вирусоподобные частицы ящура, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быстро индуцировать образование специфических антител на высоком уровне, причем, два антигена О-типа могут действовать синергически друг с другом и могут обеспечивать хорошую иммунную защиту против вируса ящура топотипа SEA типа О и топотипа CATNAУ, даже если содержание антигена снижено наполовину; и в то же время, это также указывает на то, что одновалентные вирусоподобные частицы ящура топотипа CATNAУ типа О могут давать хороший иммунный ответ и обеспечивать полную защиту у свиней.

Пример 11. Испытание на защиту от вируса после иммунизации двухвалентными вакцинными композициями на основе вирусоподобных частиц ящура типа О (топотипа SEA, топотипа CATNAУ) и типа А.

Было отобрано 34 здоровых и восприимчивых свиней на откорме, негативных по антителу против антигена вируса ящура типа А и типа О, и имеющих массу приблизительно 40 кг, а затем их произвольно распределяли на 8 групп, по 5 свиней на группу для групп 19-23 и по 3 свиньи на группу для групп 24-26. Группы 19-21 представляли собой группы иммунизации соответствующей вакциной 8, приготовленной как описано в Примере 9 согласно изобретению, а способ иммунизации представлял собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею; группы 22-23 представляли собой группы иммунизации коммерчески доступной инактивированной вакциной (штаммом Re-O/MYA98/JSCZ/2013+штаммом Re-A/WH/09), где способ иммунизации представлял собой внутримышечную инъекцию 2 мл вакцины в шею; а группы 24-26 представляли собой группы «пустого» контроля, которых иммунизировали путем внутримышечной инъекции 2 мл PBS в шею. Клинические симптомы для каждой группы наблюдали после иммунизации. На 28-й день после вакцинации, каждой свинье внутримышечно вводили 1000ID50 вирулентных штаммов. В качестве контрольного штамма для групп 19, 22 и 24 использовали штамм O/0718 топотипа CATNAУ, для групп 20, 23 и 25 использовали штамм O/MYA98/BY/2010 топотипа SEA, а для групп 21 и 26 использовали штамм A/GDMM/2013 типа А. После наблюдения в течение 10 дней, свиньи с волдырями или язвами хотя бы на одном копыте рассматривались как больные. Заболеваемость и

значения PD50 представлены в Таблицах 11, 12 и 13.

Таблица 11 Результаты защиты от заражения штаммом O/0718

Группа	Доза иммунизации	Свинья №	Результаты защиты от заражения	PD50
19	2 мл/свинью	1419	Защищена	15,59
		1420	Защищена	
		1423	Защищена	
		1425	Защищена	
		1426	Защищена	
22	2 мл/свинью	1451	Больна	2,01
		1454	Больна	
		1455	Защищена	
		1457	Защищена	
		1458	Больна	
24	2 мл/свинью	1465	Больна	-
		1482	Больна	
		1484	Больна	

Таблица 12. Результаты защиты от заражения штаммом O/MYA98/BY/2010

Группа	Доза иммунизации	Свинья №	Результаты защиты от заражения	PD50
20	2 мл/свинью	1421	Защищена	13,97
		1422	Защищена	
		1424	Защищена	
		1427	Защищена	
		1428	Защищена	

23	2 мл/свинью	1449	Защищено	7,19
		1450	Защищена	
		1452	Больна	
		1453	Защищена	
		1456	Защищена	
25	2 мл/свинью	1464	Больна	-
		1466	Больна	
		1483	Больна	

Таблица 13. Результаты защиты от заражения штаммом A/GDMM/2013

Группа	Доза иммунизации	Свинья №	Результаты защиты от заражения	PD50
21	2 мл/свинью	A1	Защищена	13,59
		A35	Защищена	
		A41	Защищена	
		A48	Защищена	
		A77	Защищена	
26	2 мл/свинью	A24	Больна	-
		A70	Больна	
		A76	Больна	

Результаты показали, что двухвалентные вакцинные композиции на основе вирусоподобных частиц ящура типа О (топотипа SEA, топотипа CATNAУ) и вирусоподобных частиц ящура типа А согласно изобретению могут обеспечивать хороший иммунопротективный эффект против эпидемических штаммов ящура топотипа SEA и CATNAУ типа О и типа А, и PD50 составляет 13,59-15,59; коммерчески доступная инактивированная вакцина не может полностью защитить от эпидемического штамма ящура топотипа SEA типа О, и PD50 составляет 7,19; а коммерчески доступная инактивированная вакцина не может эффективно защитить от эпидемического штамма ящура топотипа CATNAУ типа О, и PD50 составляет 2,01.

Было показано, что двухвалентные вакцинные композиции на основе вирусоподобных частиц ящура типа О (топотипа SEA, топотипа CATNAУ) и вирусоподобных частиц ящура типа А согласно изобретению обеспечивают хорошую иммуногенность, могут противостоять атаке эпидемических штаммов и, в отличие от уже

существующих инактивированных вакцин, не способных эффективно защищать от эпидемических штаммов, они являются эффективными, а также обеспечивают надежную биологическую безопасность.

Приведенное выше описание представляет собой просто предпочтительные примеры настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения в любой форме. Хотя настоящее изобретение было раскрыто на предпочтительных примерах, однако, следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается этими примерами. Специалист в данной области может внести в раскрытое выше техническое описание некоторые эквивалентные изменения или модификации, не выходящие за рамки объема технических решений настоящего изобретения, для получения эквивалентных примеров. Все любые простые модификации, эквивалентные изменения и модификации, внесенные в приведенные выше примеры в соответствии с технической сущностью настоящего изобретения, и не выходящие за рамки объема технических решений настоящего изобретения, входят в объем технических решений настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антиген вирусоподобных частиц ящура типа А, где антиген вирусоподобной частицы ящура типа А подвергается сборке посредством антигенных белков VP2, VP3 и VP1 эпидемического штамма вируса ящура типа А; антигенный белок VP2 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 1, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP3 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 2, или ее вырожденной последовательностью, а антигенный белок VP1 вируса ящура типа А кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 3, или ее вырожденной последовательностью.

2. Вакцинная композиция, где вакцинная композиция содержит иммуногенное количество антигена вирусоподобной частицы ящура типа А по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

3. Вакцинная композиция по п.2, где содержание антигена вирусоподобных частиц ящура типа А составляет 160-240 мкг/мл; предпочтительно, содержание антигена вирусоподобных частиц ящура типа А составляет 160 мкг/мл, 200 мкг/мл или 240 мкг/мл.

4. Вакцинная композиция по п.2, где фармацевтически приемлемый носитель содержит адъювант, выбранный из одного или более из (1) минерального масла, альгидрогелевого адъюванта, сапонинов, авридина, DDA; (2) эмульсии типа «вода-в-масле», эмульсии типа «масло-в-воде», эмульсии типа «вода-в-масле-в-воде»; или (3) полимеров акриловой или метакриловой кислоты, сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного; и адъювантной системы RIBI, блоксополимера, SAF-M, монофосфориллипида А, липид-аминового адъюванта авридина, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, холерного токсина, IMS 1314, мурамилдипептида, Монтанида ISA 206 и гелевого адъюванта; где сапонин предпочтительно представляет собой Quil А, QS-21 или GPI-0100; предпочтительно адъювант представляет собой адъювант ISA 206, где содержание адъюванта составляет 5-60% об./об., предпочтительно 30-60% об./об., а более предпочтительно 50% об./об.

5. Вакцинная композиция по п.2, где вакцинная композиция дополнительно включает иммуногенное количество антигена вирусоподобной частицы ящура топотипа SEA типа О и/или иммуногенное количество антигена вирусоподобной частицы ящура топотипа CATNAУ типа О, где антиген вирусоподобной частицы топотипа SEA ящура типа О подвергается сборке посредством антигенных белков VP4, VP2, VP3 и VP1 эпидемического штамма вируса ящура топотипа SEA типа О, где антигенный белок VP4 вируса ящура топотипа SEA типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 4, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP2 вируса ящура топотипа SEA типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 5, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP3 вируса ящура топотипа SEA типа О кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 6, или ее

вырожденной последовательностью; антигенный белок VP1 вируса ящура топотипа SEA типа O кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 7, или ее вырожденной последовательностью; и

антиген вирусоподобной частицы ящура топотипа CATNAУ типа O подвергается сборке посредством антигенных белков VP0, VP3 и VP1 эпидемических штаммов вируса ящура топотипа CATNAУ типа O, где антигенный белок VP0 вируса ящура топотипа CATNAУ типа O кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 8, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP3 вируса ящура топотипа CATNAУ типа O кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 9, или ее вырожденной последовательностью; антигенный белок VP1 вируса ящура топотипа CATNAУ типа O кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 10, или ее вырожденной последовательностью.

6. Вакцинная композиция по п.5, где содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O составляет 100-200 мкг/мл; предпочтительно, содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа SEA типа O составляет 100 мкг/мл, 150 мкг/мл или 200 мкг/мл; содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа CATNAУ типа O составляет 100-200 мкг/мл; предпочтительно, содержание антигена вирусоподобных частиц ящура топотипа CATNAУ типа O составляет 100 мкг/мл, 150 мкг/мл или 200 мкг/мл.

7. Способ получения вакцинной композиции по п.2, где способ включает:

стадию (1) клонирования и рекомбинации генов антигенных белков VP2, VP3, VP1 вируса ящура типа A, соответственно, с образованием общего тандемного экспрессионного векторв;

стадию (2) трансформации или трансдукции клетки-хозяина рекомбинантным экспрессионным вектором, полученным на стадии (1), и растворимой экспрессии рекомбинантного антигенного белка SUMO-VP2, рекомбинантного антигенного белка SUMO-VP3 и рекомбинантного антигенного белка SUMO-VP1 вируса ящура типа A, которые могут подвергаться самосборке с образованием антигенов вирусоподобных частиц;

стадию (3) выделения и очистки рекомбинантных антигенов вируса ящура типа A, полученных на стадии (2), и удаления связанных меток SUMO посредством расщепления и очистки; и

стадию (4) самосборки в антигены вирусоподобных частиц с последующим добавлением адьюванта для получения вакцинной композиции.

8. Способ по п.7, где тандемный экспрессионный вектор, полученный на стадии (1), представляет собой pET28a, pET28b или pET32a; клеткой-хозяином на стадии (2) является E. coli BL21 (DE3), Origami B(DE3) pLysS или Rosetta-gami B(DE3).

9. Способ по п.7, где на стадии (2), после амплификации клетки-хозяина добавляют IPTG для индуцирования экспрессии белков.

10. Применение вакцинной композиции по любому из пп. 2-6 в получении лекарственных средств для профилактики и/или лечения ящура типа А.

По доверенности