

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043331**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.15

(21) Номер заявки
201990539

(22) Дата подачи заявки
2017.08.24

(51) Int. Cl. **C12N 7/00** (2006.01)
C12N 15/45 (2006.01)
C07K 14/115 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)

(54) НОВЫЙ ПАРАМИКСОВИРУС И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **16185761.0**

(32) **2016.08.25**

(33) **EP**

(43) **2019.09.30**

(86) **PCT/EP2017/071392**

(87) **WO 2018/037100 2018.03.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Фаленкамп Томас В., Зиг Михаэль
(DE)**

(74) Представитель:
**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-A1-2013107290**

P.C.Y. WOO ET AL.: "Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 14, 3 April 2012 (2012-04-03), pages 5435-5440, XP055078968, ISSN: 0027-8424, DOI:10.1073/pnas.1119972109, FmoPV M252A (EMBL:JQ411016)

JP-A1-2015198654

S. SAKAGUCHI ET AL.: "Genetic diversity of feline morbilliviruses isolated in Japan", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 95, no. Pt 7, 11 April 2014 (2014-04-11), pages 1464-1468, XP055415460, GB, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.065029-0, the whole document

MARACCI MAURILIA ET AL.: "Genome characterization of feline morbillivirus from Italy", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 234, 4 May 2016 (2016-05-04), pages 160-163, XP029569230, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2016.05.002, EMBL:KT825132; the whole document

SIEG MICHAEL ET AL.: "Discovery of new feline paramyxoviruses in domestic cats with chronic kidney disease", VIRUS GENES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BOSTON, US, vol. 51, no. 2, 12 August 2015 (2015-08-12), pages 294-297, XP035535220, ISSN: 0920-8569, DOI: 10.1007/S11262-015-1232-7 [retrieved on 2015-08-12] the whole document

(57) Изобретение касается нового кошачьего парамиксовируса. Парамиксовирус согласно изобретению представляет собой вирус (-)оцРНК и в одном аспекте имеет геном, комплементарный нуклеиновой кислоте согласно последовательностям SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8. Изобретение также касается соответствующих нуклеиновых кислот и полипептидов, антител и вакцин. Кроме того, изобретение касается медицинского применения и способов диагностики парамиксовируса согласно изобретению.

B1**043331****043331 B1**

Область изобретения

Изобретение касается нового кошачьего парамиксовируса и вакцин и способов лечения от вышеупомянутого нового парамиксовируса. Изобретение также касается обнаружения вышеупомянутого парамиксовируса и диагностирования инфицирования вышеупомянутым парамиксовирусом.

Уровень техники

Парамиксовирусы представляют собой оболочечные, отрицательно-полярные одноцепочечные РНК ((-)оцРНК) вирусы, связанные со многими инфекционными болезнями людей и животных. Существует два подсемейства парамиксовирусов, Paramyxovirinae и Pneumovirinae, и как минимум пять родов в пределах подсемейства Paramyxovirinae: Respirivirus, Rubulavirus, Morbillivirus, Henipavirus и Avulavirus. Примерами парамиксовирусов могут быть вирус собачьей чумки, вирус кори, вирус чумы, вирус свинки и вирусы парагриппа человека. Парамиксовирусы имеют линейный геном, кодирующий семь вирусных полипептидов: нуклеокапсидный белок, фосфопротеин, матриксный белок, слитый белок, гемагглютининовый белок и полимеразу. Вирионы парамиксовируса являются оболочечными и могут быть сферическими, филаментными или плейоморфными, с диаметром около 150 нм. Слитые белки и стыковочные белки (гемагглютинин, "Н") выглядят как зубцы на поверхности вириона. Матриксные белки ("М") внутри оболочки стабилизируют структуру вируса. Нуклеокапсидное ядро состоит из геномной РНК, нуклеокапсидных белков ("Н"), фосфопротеинов ("Р") и полимеразных белков ("L" для "большого белка"). Слитый белок ("F") выступает от поверхности оболочки как тример и опосредует проникновение в клетку путем вызывания слияния между вирусной оболочкой и клеточной мембраной.

Парамиксовирусы, например, были выделены из организма диких или домашних животных, включая кошек, грызунов и летучих мышей, а также человека. Парамиксовирусные инфекции, в частности, вызванные представителями подсемейства Paramyxovirinae, связаны с заболеваниями почек из-за повреждения почечной ткани, демонстрируемого у разных видов.

Заболевание почек, в частности хроническое заболевание почек (CKD), например, относится к наиболее распространенным заболеваниям и является одной из наиболее частых причин смерти у домашних кошек, в особенности у старших особей. Авторы публикации Lulich et al. (Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (1992) 14(2): 127 - 125) сообщают о распространенности хронического заболевания почек приблизительно 1,5% среди общей популяции домашних кошек и приблизительно 7,5% среди домашних кошек старше 10 лет. Причины этих заболеваний могут быть очень различными. Во многих случаях точная этиология не поддается определению. С другой стороны, известно, что хроническое заболевание почек часто случается в результате воспаления почечных канальцев и почечной интерстициальной ткани. Оно называется идиопатическим тубулоинтерстициальным нефритом (TIN).

В публикациях существующего уровня техники было описано несколько кошачьих парамиксовирусов. В публикациях US 2013/0230529 A1 и Woo et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. (2012) 109(14): 5435 - 5440) описывается выделенный в Гонконге кошачий морбилливирус (FmoPV), связанный с TIN у домашних кошек. Другие исследовательские группы из Японии (Sakaguchi et al. (2014) General Virology, 95(7), 1464-1468; Furuya et al. (2014) Archives of virology, 159(2), 371 - 373), Италии (Lorusso et al. (2013) Vet Ital. 51(3): 235 - 237) и США (Sharp et al. (2016) Emerging Infectious Diseases 22(4): 760) также обнаружили парамиксовирусы в образцах мочи кошек. В публикации Sieg et al. (Virus Genes (2015) 51(2): 294-297) описывается обнаружение кошачьих парамиксовирусов у домашних кошек с хроническим заболеванием почек.

Однако эти парамиксовирусы являются генетически различными, и существует потребность в распознавании соответствующих парамиксовирусов и обеспечении вакцин и способов лечения от вышеупомянутых парамиксовирусов.

Описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает новый кошачий парамиксовирус под названием кошачий парамиксовирус Тип 2 (FPaV-2). Парамиксовирус согласно настоящему изобретению представляет собой вирус (-)оцРНК и в одном аспекте имеет геном, комплементарный нуклеиновой кислоте согласно последовательностям SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8. Эти две последовательности представляют комплементарные последовательности ДНК генома двух штаммов FPaV-2, которые были выделены авторами настоящего изобретения, т.е. штамма "Гордон" (SEQ ID NO: 1) и штамма "TV25" (SEQ ID NO: 8). Последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 8 представлены как последовательности ДНК, соответствующие положительной цепи РНК, в которую транскрибирован вирусный геном отрицательной цепи РНК, т.е. они включают ORF в направлении от 5' до 3' как мРНК. Специалистам в данной области известно, что вирусный геном парамиксовируса в соответствии с изобретением представляет собой геном (-)оцРНК. Таким образом, в одном аспекте изобретение также касается нуклеиновой кислоты согласно последовательностям SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8 или последовательности, являющейся по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, 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% идентичной последовательностям SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8. Нуклеиновокислотная последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8 включает шесть открытых рамок считывания (ORF) для шести вирусных полипепти-

дов парамиксовируса. Последовательность элементов на нуклеиновой кислоте SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8 такова (от 5' до 3'): 3' нетранслируемая область (UTR) вирусного генома, нуклеокапсидный белок ("N") ORF, фосфопротеин ("P") ORF, матриксный белок ("M") ORF, слитый белок ("F") ORF, гемагглютинин ("H") ORF, РНК-зависимая РНК-полимераза ("L" для "большого белка") ORF, 5' UTR. Ниже в табл. 1 описывается структура нуклеиновых кислот последовательностей SEQ ID NO: 1 и 8.

Таблица 1

Обзор генома парамиксовируса в соответствии с настоящим изобретением

Участок генома	нуклеотидная позиция (в SEQ ID NO: 1)	соответствующие полипептидные последовательности
3' UTR	1 - 107	---
нуклеокапсидный белок ORF	108 - 1667	SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9
межгенная последовательность	1668 - 1780	---
фосфопротеин ORF	1781 - 3256	SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 10
межгенная последовательность	3257 - 3388	---
матриксный белок ORF	3389 - 4402	SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11
межгенная последовательность	4403 - 4949	---
слитый белок ORF	4950 - 6581	SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12
межгенная последовательность	6582 - 6958	---
гемагглютинин ORF	6959 - 8746	SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13
межгенная последовательность	8747 - 8887	---
полимераза ORF	8888 - 15496	SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14
5' UTR	15497 - 16047	---

SEQ ID NO: с 2 по 7 представляют полипептидные последовательности открытых рамок считывания SEQ ID NO: 1 (штамм "Гордон"), а SEQ ID NO: с 9 по 14 представляют полипептидные последовательности открытых рамок считывания SEQ ID NO: 8 (штамм TV25).

Таким образом, изобретение в одном аспекте касается нуклеиновой кислоты, включающей полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, к которой относятся:

(а) нуклеотидная последовательность согласно последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8;

(б) нуклеотидная последовательность, являющаяся по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, 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% идентичной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8;

(в) нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9 (т.е. нуклеокапсидный белок), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 10 (т.е. фосфопротеин), SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 (т.е. матриксный белок), SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12 (т.е. слитый белок), SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13 (т.е. гемагглютинин) SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 14 (т.е. полимеразы);

(г) нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является:

(I) по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 2,

(II) по меньшей мере на 76%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно - по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 3,

(III) по меньшей мере на 92%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 4,

(IV) по меньшей мере на 89%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 5,

(V) по меньшей мере на 86%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 6 и/или

(VI) по меньшей мере на 91%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 7; и

(д) комплементарная цепь любой из нуклеотидных последовательностей с (а) по (г).

Нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением кодируют геном кошачьего парамиксовируса. Вышеупомянутый парамиксовирус в одном варианте осуществления способен вызывать инфекцию, в частности, инфекцию мочеполовой системы, конкретнее - инфекцию мочевой системы или почечное заболевание, в частности, хроническое почечное заболевание у человека или отличного от человека млекопитающего, преимущественно у кошачьих, собачьих, грызунов или человека, чаще всего - у

домашних кошек (*Felis silvestris catus*, которых иногда также называют *Felis catus*). SEQ ID NO: с 2 по 7 касаются полипептидных геновых продуктов шести открытых рамок считывания (ORF) в SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: с 9 по 14 касаются полипептидных геновых продуктов шести открытых рамок считывания (ORF) в SEQ ID NO: 8. Таким образом, полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой по п.(г)(I), является вирусным нуклеокапсидным белком, полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой по п.(г)(II), является вирусным фосфопротеином, полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой по п.(г)(III), является вирусным матриксным белком, полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой по п.(г)(IV), является вирусным слитым белком, полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой по п.(г)(V), является вирусным гемагглютинином, и полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой по п.(г)(VI), является вирусной полимеразой.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения нуклеиновая кислота в соответствии с изобретением включает:

(I) нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO: 2,

(II) нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 76% идентичной последовательности SEQ ID NO: 3,

(III) нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 92% идентичной последовательности SEQ ID NO: 4,

(IV) нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 89% идентичной последовательности SEQ ID NO: 5,

(V) нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 86% идентичной последовательности SEQ ID NO: 6, и/или

(VI) нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 91% идентичной последовательности SEQ ID NO: 7.

Также частью изобретения является полипептид, имеющий аминокислотную последовательность:

(а) выбранную из группы, к которой относится аминокислотная последовательность, выбранная из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14; или

(б) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 2,

(в) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 76%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно - по меньшей мере на 85%, более предпочтительно - по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 3,

(г) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 92%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 4,

(д) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 89%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 5,

(е) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 86%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 6, или

(ж) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 91%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 7.

Полипептид в некоторых вариантах осуществления может включать одну или несколько посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование.

Изобретение также касается кошачьего парамиксовируса, геном которого включает рибонуклеиновую кислоту, комплементарную нуклеиновой кислоте в соответствии с изобретением, как изложено выше. В частности, изобретение касается парамиксовируса, депонированного 16 августа 2016 г. в Нацио-

нальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM), Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Франция, под учетным номером CNCM I-5123. Этот штамм указывается авторами как штамм "Гордон". Изобретение также касается любого потомства парамиксовируса, депонированного как CNCM I-5123, поэтому вышеупомянутое потомство может быть аттенуированным или неаттенуированным. Таким образом, парамиксовирус в соответствии с настоящим изобретением может быть выбран из группы, к которой относятся: парамиксовирус, депонированный как CNCM I-5123, потомство парамиксовируса, депонированного как CNCM I-5123, аттенуированное потомство парамиксовируса, депонированного как CNCM I-5123, и штамм парамиксовируса, обладающий теми же характеристиками, что и парамиксовирус, депонированный как CNCM I-5123.

Парамиксовирус в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно включает один или несколько полипептидов, имеющих аминокислотную последовательность:

(а) выбранную из группы, к которой относятся аминокислотная последовательность, выбранная из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14; или

(б) аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 2,

(в) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 76%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно - по меньшей мере на 85%, более предпочтительно - по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 3,

(г) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 92%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 4,

(д) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 89%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 5,

(е) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 86%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно - по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 6, и/или

(ж) аминокислотная последовательность, которая является по меньшей мере на 91%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно - по меньшей мере на 97%, наиболее предпочтительно - по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO: 7.

Преимущественно парамиксовирус в соответствии с настоящим изобретением включает полипептиды последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 или полипептиды последовательностей SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 или все полипептиды по пп.(б)-(ж).

В соответствии с настоящим изобретением, термин "по меньшей мере на% идентичный" в связи с нуклеиновокислотными последовательностями или аминокислотными последовательностями означает количество соответствий ("попаданий") идентичных нуклеиновых кислот или аминокислот двух или более сопоставленных последовательностей по сравнению с количеством остатков, составляющих общую длину последовательностей (или их полную сравнимую часть). Другими словами, при применении сопоставления двух или более последовательностей или подпоследовательностей процент остатков, являющихся одинаковыми (например, по меньшей мере на 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными) может определяться, когда (под)последовательности сравнивают и сопоставляют на максимальное соответствие по окну сравнения или по указанному участку, согласно измерению с применением алгоритма сравнения последовательностей, известного специалистам в данной области, или при ручном сопоставлении и визуальном осмотре.

Специалистам в данной области хорошо известно, каким образом можно определить процент идентичности последовательностей между/среди последовательностей с применением различных алгоритмов, например, на основе компьютерной программы CLUSTALW (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673 - 4680) или FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, 85; 2444). Хотя алгоритм FASTA обычно при вычислении не учитывает внутренние несовпадающие делеции или вставки в последовательностях, т.е. гэпы, он может быть скорректирован вручную во избежание завышения результатов % идентичности последовательности. Однако CLUSTALW учитывает гэпы в последовательности при вычислении идентичности. Также в распоряжении специалистов в данной области имеются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0 (Altschul, Nucl. Acids Res., 25 (1977), 3389). Программа BLASTN для нуклеиновокислотных последовательностей по умолчанию использует длину слова (W) 11, ожидание (д) 10, M=5,

N=4 и сравнение двух цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP по умолчанию использует длину слова (W) 3 и ожидание (д) 10. Весовая матрица BLOSUM62 (Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci., 89 (1989), 10915) использует выравнивания (б) 50, ожидание (д) 10, M=5, N=4 и сравнение двух цепей. Все эти программы могут применяться с точки зрения настоящего изобретения. Однако предпочтение отдается применению программы BLAST. Соответственно, все молекулы нуклеиновых кислот или аминокислотные последовательности, выполняющие предписанную функцию, а также имеющие идентичность последовательности по меньшей мере 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, определяемую при помощи приведенных выше или других программ, имеющихся в распоряжении специалистов в данной области, предпочтительно при помощи программы BLAST, охватываются объемом изобретения.

В одном аспекте вышеупомянутый парамиксовирус способен вызывать инфекцию, в частности, инфекцию мочеполовой системы, конкретнее - инфекцию мочевой системы или заболевание почек, в частности, хроническое почечное заболевание у человека или отличного от человека млекопитающего, чаще всего - тубулоинтерстициальный нефрит (TIN), у субъекта, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно - представителя кошачьих, еще более предпочтительно - у домашней кошки (*Felis silvestris catus*).

Однако парамиксовирус в соответствии с настоящим изобретением также может быть аттенуированным относительно парамиксовируса, который был депонирован 16 августа 2016 г. в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM), Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Франция, под учетным номером CNCM I-5123, например, для применения в иммуногенной композиции или вакцине.

Способы аттенуирования парамиксовируса в соответствии с настоящим изобретением известны специалистам в данной области. Традиционные способы аттенуирования вирусов могут включать, например, непрерывный пассаж клинически изолированного вируса в эмбриональных куриных яйцах и куриных эмбрионах и/или культурах клеток куриного эмбриона (см., например, Buynak et al. (1966), *Experimental Biology and Medicine*, 123(3), 768 - 775) или адаптацию вируса дикого типа к линиям клеток стороннего вида и последовательный пассаж для снижения вирулентности и патогенности (см., например, Enders et al. (1960), *New England Journal of Medicine*, 263(4), 153-159). Более современные подходы, например, основываются на снижении вирулентности путем инженерии сдвига пары кодонов вируса дикого типа (см., например, Coleman et al. (2008), *Science*, 320(5884), 1784-1787) или генетической модификации клинически изолированных штаммов вируса путем делеции некоторых вирусных белков, которые отвечают за вирулентность и патогенность (см., например, Xu et al. (2014) *Journal of virology*, 88(5), 2600-2610).

Таким образом, изобретение также касается применения молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением (в частности, нуклеиновой кислоты согласно последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8 или нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80% является идентичной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8), для получения аттенуированного кошачьего парамиксовируса, при котором включают одну или несколько мутаций в молекулу нуклеиновой кислоты. Следовательно, изобретение также обеспечивает способ получения аттенуированного кошачьего парамиксовируса, включающий этап включения одной или нескольких мутаций в молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, в частности, в нуклеиновую кислоту согласно последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8 или нуклеиновую кислоту, которая является по меньшей мере на 80% идентичной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8.

Термин "аттенуированный" парамиксовирус, как описывается авторами, в частности, касается парамиксовируса, который является аттенуированным *in vitro* и/или *in vivo*, конкретнее - в восприимчивых линиях клеток и/или организме-хозяине.

Как упоминается авторами, "аттенуированный" в особенности касается сниженной вирулентности патогена, в частности, парамиксовируса, причем "вирулентность" следует понимать как степень патогенности, и "патогенность" относится к способности патогена к вызыванию клинических проявлений в организме-хозяине или потомстве хозяина. К возможным клиническим проявлениям инфицирования парамиксовирусом в соответствии с настоящим изобретением относятся, например, повышенная жажда, учащенное мочеиспускание, потеря веса, снижение аппетита, заторможенность и рвота у субъекта. К возможным результатам лабораторных исследований, связанным с инфицированием парамиксовирусом в соответствии с настоящим изобретением у субъекта, относятся, например, повышение уровня креатинина и симметричного диметиларгинина (SDMA). К возможным данным гистологического исследования, связанным с инфицированием парамиксовирусом в соответствии с настоящим изобретением у субъекта, относятся, например, кортикальное и медуллярное рубцевание, тубулярная дегенерация, кишечное воспаление вследствие инфильтрации, главным образом, лимфоцитов, плазмочитов, макрофагов и гранулоцитов.

Термин "хозяин" в контексте настоящего изобретения, в частности, касается млекопитающих, инфицируемых кошачьим парамиксовирусом в соответствии с настоящим изобретением, в частности, определяемых ниже субъектов, предпочтительно кошачьих, более предпочтительно - домашних кошек.

В контексте настоящего изобретения термин "субъект" (например, субъект, восприимчивый к ин-

фицированию парамиксовирусом в соответствии с изобретением, или подвергается лечению с применением вакцины в соответствии с настоящим изобретением, или которому поставлен диагноз в контексте настоящего изобретения) означает животное, предпочтительно млекопитающее, в частности, млекопитающее, выбранное из группы, к которой относятся представители отрядов Carnivora (предпочтительно), Rodentia, Chiroptera и Primates, более предпочтительно - семейств Felidae, Canidae, Cricetidae, Muridae или Hominidae. Предпочтительно субъект является представителем семейства Felidae, в частности, относится к родам Felis (предпочтительно с точки зрения настоящего изобретения), Lynx, Panthera, Neofelis, Caracal, Leopardus, Puma, Acinonyx, Prionailurus и Otocolobus. Семейство Canidae включает, например, роды Canis и Vulpes, например, Canis lupus, предпочтительно Canis lupus familiaris (домашняя собака). Однако изобретение не ограничивается этими видами, отрядами и семействами.

Род Felis включает, например, виды Felis silvestris, например, Felis silvestris silvestris (европейская дикая кошка), уличная кошка, предпочтительно Felis silvestris catus (также известная как Felis catus, т.е. домашняя кошка), Felis chaus, Felis nigripes, Felis margarita и Felis bieti.

Род Panthera, например, включает тигра (Panthera tigris), льва (Panthera leo), ягуара (Panthera onca), леопарда (Panthera pardus), снежного барса (Panthera uncia) и лигра.

К другим представителям Felidae, помимо прочих, относятся Lynx lynx, Lynx rufus, Acinonyx jubatus (гепард), Puma concolor (кугуар), Leopardus pardalis (оцелот).

К млекопитающим семейства Hominidae относятся борнейский орангутан (Pongo pygmaeus), суматранский орангутан (Pongo abelii), Gorilla gorilla, шимпанзе (Pan troglodytes), бородо (Pan paniscus) и Homo sapiens sapiens (человек).

К представителям Chiroptera (рукокрылым) относятся Megachiroptera (крылановые) и Microchiroptera (летучие мыши).

Млекопитающее также может быть типичным комнатным видом, например, морской свинкой (Cavia porcellus), декоративным кроликом (Oryctolagus cuniculus), декоративной мышью (Mus musculus), декоративной крысой (Rattus norvegicus), фреткой (Mustela putorius furo) или сирийским хомяком (Mesocricetus auratus). Предпочтение с точки зрения изобретения отдается комнатным и зоопарковым млекопитающим. Млекопитающее предпочтительно относится к кошачьим, собачьим, грызунам, может быть человеком или рукокрылым, более предпочтительно - кошкой ("кошачьим"), наиболее предпочтительно - домашней кошкой.

Настоящее изобретение также обеспечивает ДНК-конструкцию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, причем вышеупомянутая ДНК-конструкция, в частности, является ДНК-вектором, таким как плаزمид. ДНК-векторы или плазмиды, в которые может быть вставлена молекула нуклеотида в соответствии с настоящим изобретением, могут быть распознаны специалистами в данной области. ДНК-конструкция, как описывается авторами, предпочтительно представляет собой выделенную ДНК-конструкцию. В контексте настоящего изобретения термины "включающая молекула нуклеиновой кислоты" или "включающая молекулу ДНК", соответственно, в частности, следует понимать как эквивалентные термину "включающая последовательность молекулы нуклеиновой кислоты" или "включающая последовательность молекулы ДНК", соответственно. Таким образом, изобретение также касается вектора, включающего вышеупомянутую нуклеиновую кислоту в соответствии с изобретением и клетку-хозяина, включающую вышеупомянутый вектор.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает РНК-транскрипт описываемой авторами ДНК-конструкции, причем вышеупомянутый РНК-транскрипт предпочтительно является выделенным РНК-транскриптом. Настоящее изобретение также обеспечивает клетку, трансфицированную описываемой авторами ДНК-конструкцией, причем вышеупомянутая клетка предпочтительно является выделенной клеткой. Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает кошачий парамиксовирус, вырабатываемый вышеупомянутой клеткой, причем вышеупомянутый кошачий парамиксовирус предпочтительно является выделенным кошачьим парамиксовирусом. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клетку, трансфицированную упомянутым авторами РНК-транскриптом, причем вышеупомянутая клетка предпочтительно является выделенной клеткой. Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает кошачий парамиксовирус, вырабатываемый вышеупомянутой клеткой, причем вышеупомянутый кошачий парамиксовирус предпочтительно является выделенным кошачьим парамиксовирусом. К клеткам-хозяевам, в которых может вырабатываться парамиксовирус в соответствии с настоящим изобретением или полипептиды в соответствии с изобретением, помимо прочих, относятся клетки, выбранные из числа клеток HEK293, HEK293T, Vero, CrFK, LLC-MK2, BHK21, CHO, BSR-T7/5, MA-104 и HELA.

Настоящее изобретение также обеспечивает кошачий парамиксовирус, геном которого включает молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, или геном которого включает молекулу РНК, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, причем вышеупомянутый кошачий парамиксовирус предпочтительно является выделенным кошачьим парамиксовирусом. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения кошачьего парамиксовируса, причем вышеупомянутый способ включает трансфекцию клетки описываемой авторами ДНК-конструкцией или нуклеиновой кислотой в соответствии с изобретением.

Парамиксовирус в соответствии с настоящим изобретением также может быть химерным вирусом,

т.е. парамиксовирусом в соответствии с настоящим изобретением, геном которого включает гетерологическую нуклеиновокислотную последовательность. Химерный вирус, например, может быть кодирован вектором, который также включает гетерологическую нуклеотидную последовательность. В соответствии с изобретением, химерный вирус, таким образом, может быть кодирован вирусным вектором, в котором были добавлены или вставлены гетерологические нуклеотидные последовательности, или замещены на нативные или ненативные последовательности. Химерный вирус, например, может применяться для получения рекомбинантных вакцин, защищающих от двух или более вирусов, например, двух или более штаммов парамиксовирусов. Аттenuированные и репликационно-дефектные вирусы могут применяться в целях вакцинации с применением живых вакцин. Гетерологическая последовательность может кодировать антиген любого инфекционного патогена или антиген, связанный с заболеванием, способным вызвать иммунную реакцию.

Изобретение также касается антитела, которое является специфическим к парамиксовирусу в соответствии с изобретением и/или полипептиду в соответствии с изобретением. Термин "антитело" в контексте настоящего изобретения, если не указывается иного, применяется в широком смысле и означает как молекулы антител, так и различные производные от антител молекулы. Такие производные от антител молекулы включают по меньшей мере один вариабельный участок (вариабельный участок тяжелой цепи или легкой цепи), а также отдельные антитела легкой цепи, отдельные антитела тяжелой цепи, химерные слияния между цепями антител и другими молекулами и т. п. Функциональными фрагментами иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением могут быть be Fv, scFv, дисульфидно-связанные Fv, Fab и F(ab')₂. Антителами могут быть, например, IgM, IgD, IgE, IgA или IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2b, IgG3 или IgG4 или соответствующие подклассы IgG в соответствующих видах). Также термином "антитело" охватываются поликлональные антитела, моноклональные антитела ("mAb"), химерные моноклональные антитела; гуманизированные антитела, подвергнутые генной инженерии моноклональные антитела. Например, такие антитела могут быть получены путем введения отличному от человека млекопитающему, такому, как мышь или кролик, парамиксовируса (полного) в соответствии с изобретением или его части (например, полипептида в соответствии с изобретением или его антигенного фрагмента) с последующим выделением антител или вырабатывающих антитела клеток. В альтернативном варианте такие антитела могут быть отобраны из библиотек антител. Способы получения человеческих (или кошачьих или собачьих, или из других нужных видов), гуманизированных (или канинизированных, фелинизированных или приведенных в соответствие любому другому виду) или химерных антител хорошо известны специалистам в данной области. Например, могут применяться фаг-дисплейные и основанные на иммунизации трансгенных мышей технологии для выработки человеческих, кошачьих, собачьих или получаемых на основе других видов моноклональных антител. Антитела, выработанные или распознанные в соответствии с описанными выше способами, испытывают на специфичность к антигенам кошачьего парамиксовируса в соответствии с изобретением и/или способность к нейтрализации кошачьего парамиксовируса в соответствии с настоящим изобретением с применением биологических анализов, известных среди специалистов в данной области. Предпочтение в таких случаях отдается антителам, которые являются специфическими к эпитопу поверхности кошачьего парамиксовируса в соответствии с настоящим изобретением, в частности, антителам против белка гемагглютиниона (полипептид согласно последовательностям SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 13) или слитого белка (полипептид согласно последовательностям SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 12). В контексте антител в соответствии с настоящим изобретением термины "специфический к" и "специфическое связывание" относятся к антителам, вырабатываемым против соответствующей молекулы или ее фрагменту. Антитело считается специфическим, если его аффинность к нужной молекуле или ее вышеупомянутому фрагменту является по меньшей мере в 10 раз большей, предпочтительно в 50 раз большей, более предпочтительно - в 100 раз большей, наиболее предпочтительно - по меньшей мере в 1000 раз большей, чем к другим молекулам, содержащимся в образце, включающем нужную молекулу. Антитела в соответствии с изобретением могут применяться для обнаружения кошачьего парамиксовируса в соответствии с изобретением в образце и/или с диагностическими целями, например, для отслеживания эффективности терапии и/или прогрессирования заболевания.

В другом аспекте настоящее изобретение касается иммуногенных композиций и вакцин против парамиксовируса в соответствии с настоящим изобретением. Вышеупомянутые вакцины, например, могут включать:

- (а) парамиксовирус в соответствии с настоящим изобретением;
- (б) нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением;
- (в) полипептид в соответствии с настоящим изобретением или
- (г) антитело в соответствии с настоящим изобретением;

и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, причем предпочтительно вышеупомянутый носитель является подходящим для внутрикожного или внутримышечного применения, и вышеупомянутая вакцина необязательно также включает адъювант.

Вышеупомянутая иммуногенная композиция, например, может включать:

- (а) парамиксовирус по любому из пунктов формулы 5, 6 или 7;

(б) нуклеиновую кислоту по любому из пунктов формулы 1 или 2;

(в) полипептид по п.10;

(г) антитело по п.11;

(д) полипептид по п.10, слитый с гетерологическим или аутологическим (поли-)пептидом и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, причем вышеупомянутый носитель предпочтительно является подходящим для внутрикожного или внутримышечного применения, и вышеупомянутая вакцина необязательно также включает адъювант.

"Иммуногенная композиция" в контексте настоящего изобретения означает композицию вещества, включающего по меньшей мере один парамиксовирус, нуклеиновую кислоту, полипептид или антитело в соответствии с настоящим изобретением, или его иммуногенную часть, которая вызывает иммунологическую реакцию (клеточную или опосредованную антителом иммунную реакцию) в организме-хозяине на композицию. В конкретном аспекте иммуногенная композиция вызывает иммунную реакцию, более предпочтительно - вызывает защитный иммунитет против одного или нескольких из клинических проявлений инфекции парамиксовируса.

Термин "вакцина", применяемый в конкретных аспектах настоящего изобретения, касается фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере один иммунологически активный компонент, вызывающий иммунологическую реакцию у животного и возможно, хотя и не обязательно, один или несколько дополнительных компонентов, повышающих иммунологическую активность активного компонента. Вакцина дополнительно может включать другие компоненты, типичные для фармацевтических композиций. В целях различения иммунологически активный компонент вакцины может включать полные вирусные частицы в их первоначальной форме или в форме аттенуированных частиц в так называемой ослабленной живой вакцине (MLV) или частицы, инактивированные соответствующими способами в так называемой убитой вакцине (KV). В другой форме иммунологически активный компонент вакцины может включать соответствующие элементы организмов (субъединичные вакцины) и, таким образом, эти элементы генерируются либо путем разрушения всей частицы или культур роста, содержащих такие частицы, и, необязательно, с последующими этапами очистки, что обеспечивает на выходе нужную(ые) структуру(ы), или с применением синтетических процессов, включающих соответствующую манипуляцию путем применения подходящей системы, например, на основе бактерий, насекомых, млекопитающих или других видов, плюс необязательно, последующие процедуры выделения и очистки, или путем вызывания синтетических процессов в организме животного, нуждающегося в вакцине, путем прямого включения генетического материала с применением подходящих фармацевтических композиций (вакцинация полинуклеотидом). Вакцина может включать один и одновременно более одного из вышеописанных элементов. Термин "вакцина", применяемый в конкретных аспектах настоящего изобретения, описывает ослабленную живую, аттенуированную вакцину для ветеринарного применения, которая включает антигенные вещества и вводится с целью вызывания специфического и активного иммунитета против заболевания, возбуждаемого парамиксовирусной инфекцией, преимущественно инфекцией кошачьего парамиксовируса. В других конкретных аспектах настоящего изобретения вакцина, помимо прочего, может быть живой вакциной, живой аттенуированной вакциной, инактивированной вакциной или конъюгатной вакциной.

Разные физические и химические способы инактивации известны специалистам в данной области. Термин "инактивированный" относится к ранее вирулентному или невирулентному вирусу, который был подвергнут облучению (ультрафиолетовыми лучами (УФ), рентгеновскими лучами, электронным пучком или гамма-лучами), нагреванию (например, в течение от 30 мин до нескольких часов при температуре от 55°C до 65°C, например, 3 ч при 56°C) или химической обработке для инактивации, уничтожения такого вируса при сохранении его иммуногенности. В одном аспекте описываемые авторами инактивированные парамиксовирусы могут быть инактивированы путем обработки инактивирующим средством. Подходящими инактивирующими средствами являются бета-пропиолактон, бинарный или бета- или ацетилэтиленмин, глютеральдегид, озон и формалин (формальдегид).

Для инактивации формалином или формальдегидом формальдегид, как правило, смешивают с водой и метиловым спиртом для образования формалина. Добавление метилового спирта предотвращает распад или перекрестную реакцию во время процесса инактивации. В одном варианте осуществления применяют приблизительно от 0,1 до 1% 37% раствора формальдегида для инактивации вируса. Крайне важно отрегулировать количество формалина, чтобы гарантировать инактивацию материала, но не настолько, чтобы возникали побочные эффекты от высокой дозы.

Более конкретно термин "инактивированные" в контексте вируса означает, что вирус не способен к репликации *in vivo* или *in vitro*. Например, термин "инактивированный" может относиться к вирусу, который был размножен *in vitro* и был дезактивирован с применением химических или физических средств, таким образом, чтобы он утратил способность к репликации. В другом примере термин "инактивированный" может относиться к вирусу, который был размножен, а затем дезактивирован с применением химических или физических средств, с получением в результате суспензии вируса, фрагментов или компонентов вируса, которые могут применяться в качестве компонента вакцины. В контексте настоящего изобретения термины "инактивированный", "убитый" или "KV" применяются взаимозаменяемо.

Термин "живая вакцина" относится к вакцине, включающей живой, в частности, живой вирусный активный компонент.

Необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ, как упоминается авторами, включают любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, адъюванты, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические агенты, агенты, откладывающие адсорбцию и т. п. В некоторых аспектах, в особенности в тех, которые включают лиофилизированные иммуногенные композиции, к стабилизаторам относятся стабилизаторы для лиофилизации или сушка замораживанием.

В предпочтительном аспекте иммуногенная композиция в соответствии с изобретением включает количество от 10^3 до 10^8 вирусных частиц описываемого авторами аттенуированного вируса парамиксовируса на дозу, предпочтительно от 10^3 до 10^8 частиц на дозу, более предпочтительно - от 10^3 до 10^8 частиц на дозу.

В другом предпочтительном аспекте иммуногенная композиция в соответствии с изобретением включает количество парамиксовируса в соответствии с изобретением, которое эквивалентно титру вируса по меньшей мере приблизительно 10^3 TCID₅₀/мл на дозу, предпочтительно от 10^3 до 10^8 TCID₅₀/мл на дозу.

В контексте настоящего изобретения термины "вакцина" и "композиция вакцины" применяются взаимозаменяемо и, в частности, касаются композиции, которая вызывает защитную иммунную реакцию у субъекта, подвергнутого воздействию композиции. Иммунная реакция может включать индукцию антител и/или вызывание Т-клеточной иммунной реакции.

Вакцина в соответствии с настоящим изобретением также может быть маркерной вакциной, т.е. вакциной, позволяющей проводить иммунологическую дифференциацию или отделение инфицированных животных от вакцинированных. Например, маркерная вакцина может быть лишена иммуногенного антигена, присутствующего в патогене, против которого осуществляется вакцинация (т.е. парамиксовируса в соответствии с изобретением), таким образом, создавая отрицательный маркер вакцинации. Такие маркерные вакцины также называются в ветеринарной медицине DIVA или SIVA вакцинами ("Differentiation / Segregation of infected from vaccinated animals") и, в частности, находят применение для продуктивного поголовья сельскохозяйственных животных.

Как правило, "иммунная реакция" включает, помимо прочих, один или несколько следующих эффектов: выработка или активация антител, В-клеток, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксичных Т-клеток, специально направленных на антиген или антигены, включенные в нужную комбинацию или вакцину. Предпочтительно хозяин демонстрирует терапевтический или защитный иммунологический (вторичный) ответ, таким образом, чтобы резистентность к новому инфицированию повышалась, и/или клиническая тяжесть заболевания снижалась. Такая защита демонстрируется через уменьшение количества или снижение тяжести, или отсутствие одного или нескольких клинических проявлений, связанных с инфекцией патогена, задержку наступления виремии, снижение живучести вируса, снижение общей вирусной нагрузки и/или снижение вирусной экскреции.

Таким образом, "иммунная реакция", в частности, означает, помимо прочего, выработку в субпопуляции клеточной и/или опосредованной антителом иммунной реакций на соответствующую композицию или вакцину.

Вакцина в одном аспекте может включать слитый белок полипептида в соответствии с изобретением с другим пептидом или полипептидом. Партнер по слиянию может быть гетерологическим полипептидом/пептидом или аутологическим полипептидом/пептидом. К гетерологическим полипептидам, которые могут сливаться с полипептидом в соответствии с настоящим изобретением, помимо прочих, относятся полипептид вируса канарипокса (в частности, для вакцины для кошек), вируса миксомы (в частности, для вакцины для кроликов) или вируса герпеса.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа обнаружения парамиксовируса в соответствии с изобретением в образце, взятом у субъекта.

Образец в контексте настоящего изобретения является биологическим образцом, в частности образцом жидкости организма или ткани, взятом с целью диагностики, прогнозирования или оценки состояния субъекта. "Субъектом" с точки зрения настоящего изобретения может быть как человек, так и другие млекопитающие. Таким образом, способы применимы как для диагностики у людей, так и для ветеринарных целей. Предпочтительными образцами для исследований являются цельная кровь, сыворотка, плазма, моча, слюна, мокрота, аспират, пунктат и слизевые мазки. Кроме того, специалистам в данной области станет понятно, некоторые образцы для исследований легче поддаются анализу после процедуры фракционирования или очистки, например, разделения цельной крови на компоненты - сыворотку или плазму. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения образец выбирают из группы, к которой относятся образец крови, образец сыворотки, образец плазмы, образец слюны, образец аспирата, образец пунктата, слизевый мазок и образец мочи или экстракт любых из вышеупомянутых образцов. Также могут использоваться образцы срезов тканей в парафине. Предпочтительно образец представляет собой образец крови или мочи, наиболее предпочтительно - образец сыворотки или образец плазмы. В соответствующих случаях образец может требовать гомогенизации или экстрагирования

растворителем перед применением согласно настоящему изобретению с целью получения жидкого образца. Таким образом, жидкий образец может быть раствором или суспензией. Жидкие образцы могут подвергаться одному или нескольким этапам предварительной обработки перед использованием в соответствии с настоящим изобретением. Такая предварительная обработка включает, помимо прочего, разбавление, фильтрацию, центрифугирование, концентрирование, осаждение, преципитацию, диализ. Предварительная обработка также может включать добавление к раствору химических или биохимических веществ, таких как кислоты, основания, буферы, соли, растворители, реактивные красители, детергенты, эмульгаторы, хелатирующие агенты. "Плазма" в контексте настоящего изобретения фактически представляет собой бесклеточный супернатант крови с содержанием антикоагулянта, полученный после центрифугирования. К типичным антикоагулянтам относятся связывающие ионы кальция соединения, такие, как EDTA или цитрат, и ингибиторы тромбина, такие, как гепаринаты или гирудин. Бесклеточная плазма может быть получена путем центрифугирования антикоагулированной крови (например, цитрированной, обработанной EDTA или гепаринизированной крови) в течение по меньшей мере 15 мин при 2000-3000 g.

Обнаружение происходит либо на уровне нуклеиновой кислоты, т.е. геномную РНК вируса обнаруживают в образце, или на уровне вирусных белков, например, с применением иммунологического анализа. С этой целью может применяться любая система иммунологического анализа, известная специалистам в данной области, включая, помимо прочих, системы конкурентного и неконкурентного анализа с применением таких технологий, как радиоиммунологические анализы, ELISA (ферментные иммуносорбентные анализы), иммунологические сэндвич-анализы, реакции преципитации, реакции диффузной преципитации в геле, иммунодиффузные анализы, реакции агглютинации, анализы фиксации комплемента, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммунологические анализы, иммунологические анализы на основе белка А и анализы с применением иммуноэлектрофореза. Также могут применяться вестерн-блоттинг или иммунохроматографические анализы. Вирусная нуклеиновая кислота может быть обнаружена, например, при помощи обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (RT-ПЦР) с использованием специфических праймеров и/или зондов. Например, обнаружение нуклеиновой кислоты выполняют непосредственно в образце мочи субъекта. Также могут использоваться другие образцы на основе нуклеиновых кислот, например, амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA). ПЦР-анализы могут, например, включать такие форматы, как гнездовая ПЦР, полугнездовая ПЦР и количественная ПЦР.

В частности, настоящее изобретение касается способа обнаружения парамиксовируса в соответствии с изобретением в образце, включающего этапы:

(I) приведения образца в контакт с одним или несколькими олигонуклеотидными праймерами и/или зондами, которые являются специфическими к нуклеиновой кислоте в соответствии с изобретением (т.е. которые предпочтительно гибридизируются в жестких условиях с вышеупомянутой нуклеиновой кислотой), и

(II) обнаружения связывания между вышеупомянутым парамиксовирусом и вышеупомянутыми одним или несколькими олигонуклеотидными праймерами и/или зондами.

В другом конкретном аспекте настоящее изобретение касается способа обнаружения парамиксовируса в соответствии с изобретением в образце, включающего следующие этапы:

(I) приведение образца в контакт с антителом в соответствии с изобретением и

(II) обнаружение связывания между вышеупомянутым парамиксовирусом и вышеупомянутым антителом.

Способ обнаружения парамиксовируса в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, может быть основан на прямом обнаружении парамиксовируса в образце. Однако он также может основываться на более опосредованном подходе, т.е. обнаружении присутствия антител против вышеупомянутого парамиксовируса в образце. Присутствие антител против вышеупомянутого парамиксовируса указывает на то, что иммунная система субъекта уже контактировала с парамиксовирусом, и, таким образом, была запущена соответствующая иммунная реакция. В этом контексте действительная инфекция парамиксовируса может быть отличена от вакцинации субъекта маркерной вакциной (DIVA, см. выше) путем обнаружения антигенов (т.е. полипептида в соответствии с изобретением или его антигенного фрагмента) в образце, которые были удалены из маркерной вакцины.

Таким образом, изобретение также касается способа обнаружения парамиксовируса в соответствии с изобретением в образце, включающего обнаружение присутствия или отсутствия антитела против вышеупомянутого парамиксовируса в вышеупомянутом образце. Соответствующие подходы к обнаружению антител в образце включают иммунологические анализы, описанные выше (например, ELISA, в частности, сэндвич-ELISA, и иммунохроматографические анализы). Таким образом, изобретение также касается способов (и соответствующих комплектов) для обнаружения парамиксовируса в соответствии с настоящим изобретением в образце, включающего приведение образца в контакт с антигеном парамиксовируса и обнаружение связывания в образце антител (в случае присутствия) против вышеупомянутого парамиксовируса с вышеупомянутым антигеном. Вышеупомянутый антиген предпочтительно иммобилизуется на поверхности. Антитела, связанные с вышеупомянутым антигеном, например, могут быть

обнаружены путем применения вторичного идентифицирующего антитела, например, в случае кошачьего образца антитела против кошачьего иммуноглобулин (Ig), такого, как антитело мыши против Ig кошки. Типичные антигенные эпитопы полипептидов в соответствии с настоящим изобретением перечислены ниже в табл. 2.

Полипептид	Эпитопы (остатки в последовательности)
Нуклеокапсидный белок (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9)	13 - 29, 38 - 46, 61 - 69, 92 - 97, 106 - 115, 147 - 160, 182 - 192, 242 - 249, 399 - 409, 424 - 483, 496 - 512
Фосфопротейн (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 10)	18 - 30, 39 - 96, 106 - 176, 186 - 202, 208 - 234, 242 - 249, 251 - 268, 270 - 289, 363 - 378, 396 - 411, 425 - 430, 436 - 442,
Слитый белок (SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12)	210 - 217, 241 - 245, 297 - 302, 394 - 400, 528 - 538
Гемагглютинин (SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 13)	1 - 11, 124 - 131, 140 - 145, 331 - 336, 391 - 398, 409 - 414, 423 - 435, 477 - 482, 521 - 526, 536 - 543

Эти эпитопы (или фрагменты полипептидов в соответствии с изобретением, содержащие один или несколько из вышеупомянутых эпитопов), например, могут использоваться для выработки антител против парамиксовируса в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа диагностирования у субъекта инфекции парамиксовируса в соответствии с изобретением. В частности, изобретение также касается способа диагностирования инфекции парамиксовируса в соответствии с изобретением в образце, взятом у субъекта, предпочтительно представителя кошачьих, более предпочтительно - у домашней кошки, включающего способ обнаружения парамиксовируса, как описывается авторами выше, причем присутствие вышеупомянутого парамиксовируса указывает на наличие инфекции. В другом аспекте настоящее изобретение касается способа диагностирования инфекции парамиксовируса в соответствии с изобретением в образце, взятом у субъекта, предпочтительно у домашней кошки, включающего способ обнаружения антитела против вышеупомянутого парамиксовируса в соответствии с изобретением, причем присутствие вышеупомянутого антитела указывает на наличие инфекции вышеупомянутого парамиксовируса.

С контекста способов обнаружения и способов диагностирования в соответствии с настоящим изобретением предпочтение отдается обнаружению слитого белка или гемагглютинина парамиксовируса. Также в одном аспекте является предпочтительным, чтобы вирусная полимераза не обнаруживалась, или по меньшей мере не обнаруживались эпитопы или участки, соответствующие нуклеотидные остатки с 10055 по 10560 вирусного генома (SEQ ID NO: 1 или 8).

В другом аспекте настоящее изобретение касается комплекта для обнаружения парамиксовируса в соответствии с изобретением. Комплект в одном варианте осуществления может включать одно или несколько антител, специфичных к парамиксовирусу в соответствии с настоящим изобретением. В другом варианте осуществления комплект может включать олигонуклеотидные праймеры и/или зонды для обнаружения парамиксовируса в соответствии с изобретением.

И, наконец, изобретение касается медицинского применения вакцин, нуклеиновых кислот, полипептидов, антител и иммуногенных композиций в соответствии с изобретением и способов лечения и/или профилактики инфекции парамиксовируса у субъекта. Например, вакцина или иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением может применяться для уменьшения клинических проявлений инфицирования парамиксовирусом, преимущественно клинических проявлений инфекции мочеполовой системы, конкретнее - инфекции мочевой системы, или заболевания почек, в частности, хронического почечного заболевания у человека или отличного от человека млекопитающего, чаще всего - тубулоинтерстициального нефрита (TIN). В частности, настоящее изобретение касается вакцины или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении или профилактике инфицирования парамиксовирусом, в частности, кошачьим парамиксовирусом в соответствии с настоящим изобретением.

Изобретение также касается вакцины или иммуногенной композиции в соответствии с изобретением для применения в лечении или профилактике инфекции, в частности, инфекции мочеполовой системы, конкретнее - инфекции мочевой системы, или заболевания почек, в частности, хронического почечного заболевания у человека или отличного от человека млекопитающего, чаще всего - тубулоинтерстициального нефрита (TIN) у млекопитающего, предпочтительно представителя кошачьих, более предпочтительно - домашней кошки.

Изобретение также касается способа лечения или профилактики инфицирования парамиксовирусом, в частности, кошачьим парамиксовирусом в соответствии с изобретением, у субъекта, предпочтительно домашней кошки, который включает этап введения вакцины или иммуногенной композиции вышеупомянутому субъекту.

Изобретение также касается способа лечения или профилактики заболевания почек, преимущественно хронического заболевания почек, чаще всего - тубулоинтерстициального нефрита (TIN), у субъекта, предпочтительно представителя кошачьих, более предпочтительно - домашней кошки, включающего этап введения вакцины или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением вышеупомянутому субъекту.

В предпочтительном аспекте вакцину или иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением применяют для профилактики инфицирования субъекта парамиксовирусом в соответствии

с изобретением.

Настоящее изобретение также касается иммуногенной композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу уменьшения или предотвращения клинических проявлений или заболевания, вызванного инфицированием субъекта патогенным парамиксовирусом, преимущественно парамиксовирусом в соответствии с изобретением, или для применения согласно способу лечения или профилактики инфицирования субъекта патогенным парамиксовирусом, преимущественно парамиксовирусом в соответствии с изобретением, причем вышеупомянутый субъект предпочтительно является представителем кошачьих. Настоящее изобретение также касается иммуногенной композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу защиты субъекта, предпочтительно представителя кошачьих, от инфицирования парамиксовирусом, преимущественно парамиксовирусом в соответствии с изобретением, или от клинических проявлений заболевания, вызванного инфицированием патогенным парамиксовирусом, преимущественно парамиксовирусом в соответствии с изобретением.

Изобретение также касается способа иммунизации субъекта, предпочтительно представителя кошачьих, от клинического заболевания или от клинических проявлений, вызванных у субъекта парамиксовирусом, преимущественно парамиксовирусом в соответствии с изобретением, причем вышеупомянутый способ включает этап введения субъекту, предпочтительно представителю кошачьих, иммуногенной композиции или вакцины в соответствии с изобретением, и, таким образом, вышеупомянутый вирус не может вызывать клинических проявлений инфекции парамиксовируса, но способен вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую субъекта, предпочтительно представителя кошачьих, от патогенных форм парамиксовируса, преимущественно парамиксовируса в соответствии с изобретением.

Таким образом, изобретение также касается способа защиты или уменьшения клинических проявлений инфекции парамиксовируса (преимущественно инфицирования парамиксовирусом в соответствии с изобретением) у субъекта, предпочтительно представителя кошачьих, от клинического заболевания или от клинических проявлений, вызываемых парамиксовирусом, преимущественно парамиксовирусом в соответствии с изобретением, у субъекта, причем вышеупомянутый способ включает этап введения субъекту, предпочтительно представителю кошачьих, иммуногенной композиции или вакцины в соответствии с изобретением, и, таким образом, вышеупомянутый вирус не может вызывать клинических проявлений инфекции парамиксовируса, но способен вызывать иммунную реакцию, которая иммунизирует субъекта, предпочтительно представителя кошачьих, от патогенных форм парамиксовируса, преимущественно парамиксовируса в соответствии с изобретением.

Изобретение также касается комплекта для вакцинации субъекта, предпочтительно представителя кошачьих, от заболеваний, связанных с одним или несколькими клиническими проявлениями, и/или снижения частоты или тяжести таких проявлений, связанных с парамиксовирусом, преимущественно парамиксовирусом в соответствии с изобретением, или вызываемых им, у субъекта, причем комплект включает:

- (а) дозатор, позволяющий вводить вакцину субъекту, предпочтительно представителю кошачьих; и
- (б) иммуногенную композицию или вакцину в соответствии с изобретением, и
- (в) необязательно, листок-вкладыш с инструкцией.

Все приведенные патентные и непатентные документы включены в данное описание путем ссылки в их полном объеме.

Описание фигур

Фиг. 1 - обнаружение кошачьего парамиксовируса (FPaV-2) в супернатантах культуры клеток.

Показывается анализ супернатанта культур клеток с пассажа 3 CrFK и клеток LLC-MK2, соответственно, после инфицирования FPaV-2 штамма "Гордон". М: стандарт длины ДНК; 1: супернатант культур клеток CrFK; 2: супернатант культур клеток LLC-MK2; 3: вода; 4: положительный контроль.

Фиг. 2 - иммунофлуоресценция клеток LLC-MK2, инфицированных изолятом FPaV-2 "Гордон".

Ядра клеток окрашивали DAPI. Клетки, которые инфицированы FPaV-2, демонстрируют зеленую флуоресценцию. Увеличение: 200×; окрашивание через 5 дней после инфицирования.

Фиг. 3 - выделение первичных клеток почек кошачьих. Увеличение: 100×, 48 ч после высевания.

Фиг. 4 - инфицирование первичных клеток почек кошачьих FPaV-2.

Ядра клеток окрашивают DAPI. Клетки, которые инфицированы FPaV-2, демонстрируют зеленую флуоресценцию. Увеличение: 200×; окрашивание через 5 дней после инфицирования.

Фиг. 5 - разнообразие антител FPaV-2-инфицированных кошек.

Вестерн-блоттинг частично очищенного полного FPaV-2, отделенного при помощи SDS-PAGE и блотированного на нитроцеллюлозную мембрану.

А. = Инкубация с разведенным 1:100 образцом сыворотки FPaV-2-положительной кошки 'TV25'.

Б. = Инкубация с разведенным 1:100 образцом парамиксовирус-отрицательной кошки.

В. = Инкубация с разведенным 1:200 антителом против нуклеокапсида. Специфические реакции на вирусные белки аннотируются внизу справа в зависимости от их способности к реакции с антителами-мишенями (нуклеокапсидный белок и фосфопротеин) или в зависимости от их прогнозируемой молеку-

лярной массы (полимеразный и гемагглютининовый белок).

Фиг. 6 - разработка ELISA для обнаружения антител против FPaV-2 в образцах сыворотки кошек.

Образцы сыворотки кошек отбирали в FPaV-2-IFA на присутствие специфических антител. Результат IFA был установлен как общепринятый стандарт для сравнения со значениями ОП. Образцы, имеющие значение ОП ниже 0,5, определяются как FPaV-2-отрицательные, а образцы со значением ОП выше, чем 0,7, определяются как FPaV-2-положительные. Серый квадрат обозначает "пограничные" образцы, требующие проверки в IFA для оценки результата ELISA.

Фиг. 7 - первичные иммунные клетки-мишени FPaV-2.

Проточный цитометрический анализ PBMC через 48 ч после инфицирования FPaV-2 при MOI 0,1. Клетки окрашивали для поверхностных маркеров Т-клеток (CD4) или В-клеток (CD20) и на внутриклеточное присутствие FPaV-2 с использованием поликлонального антитела к нуклеокапсиду.

А. и В. = Ложно-инфицированные PBMC.

Б. и Г. = FPaV-2-инфицированные PBMC.

Фиг. 8 - вестерн-блоттинг FPaV-2-иммунизированного кролика.

Частично очищенный полный FPaV-2 отделяли при помощи SDS-PAGE и блотировали на нитроцеллюлозную мембрану.

А. = Инкубация с образцом сыворотки (разведение 1:100) кролика № 2 перед иммунизацией (преиммунная сыворотка).

Б. = Инкубация с образцом сыворотки (разведение 1:100) кролика № 2 через пять недель после иммунизации инактивированным нагреванием FPaV-2.

Специфические реакции на вирусные белки аннотируются внизу справа на основе реакционной способности, показанной на фиг. 5.

В отличие от преиммунной сыворотки, FPaV-2-специфические антитела были обнаружены через пять недель после иммунизации.

Примеры

Пример 1. Обнаружение FPaV-2.

Отбор образца.

Мочу 13-летнего кота с хроническим заболеванием почек брали и хранили на льду.

Выделение РНК.

РНК выделяют из 300 мкл мочи с применением комплекта "QIAamp Viral RNA Mini Kit" (Qiagen, Hilden), элюируют в 50 мкл буфера AVE и хранят при -80°C.

RT-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой).

RT-ПЦР выполняют в один этап с применением системы "Superscript III One Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity" (Life Technologies), как описывается в публикации Tong et al. (2008) (J Clin Microbiol. 46(8): 2652 - 8), с некоторыми незначительными модификациями: девять микролитров РНК смешивают с 12,5 мкл реакционного буфера (2-кратный, по 0,4 mM dNTP и 2,4 mM MgSO₄), 2 мкл сульфата магния (5 mM), 0,25 мкл праймера RES-MOR-HEN-R (100 мкМ), 0,25 мкл праймера RES-MOR-HEN-F1 (100 мкМ), 0,5 мкл ингибитора РНКазы (40 U/мкл, Life Technologies) и 0,5 мкл "Superscript III/Platinum Taq High Fidelity Enzyme Mix". Затем образцы обрабатывают в соответствии со следующим температурным профилем: одна минута при 60°C, 30 мин при 45°C и 2 мин при 94°C. После этой обработки образцы нагревают следующим образом: 45 циклов при 94°C в течение 15 с, 48°C в течение 30 с и 68°C в течение 30 с с окончательным этапом элонгации при 68°C в течение 5 мин. Продукты ПЦР визуализируют с применением электрофореза в агарозном геле в буфере трис-ацетат-EDTA (40 mM трис-ацетата, 1 mM EDTA, pH=8,3), включающем 0,2 мкг/мл бромида этидия. Конкретный ПЦР-фрагмент, имеющий размер приблизительно 611 п.о., вырезают из геля и очищают с применением комплекта "Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit" (Geneaid, Тайвань).

Секвенирование.

ПЦР-фрагмент секвенируют при помощи дидезокси-метода Сэнджера с применением RES-MOR-HEN-R (10 мкМ) и RES-MOR-HEN-F1 (10 мкМ) в качестве примирования секвенирования. Полученные в результате хроматограммы корректируют с применением программы "BioEdit" (версия 7.2.4) и выравнивают при помощи инструмента "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) на веб-сайте NCBI.

Пример 2. Выделение FPaV-2.

Для культивации вируса клетки LLC-MK2 и CrFK высевают в 75 см² флаконы для культивирования клеток в DMEM (с пируватом натрия и заменимыми аминокислотами) с 5% FBS в атмосфере, включающей 5% диоксида углерода при 37°C и 90% влажности. При 70 - 80% слипании клетки инфицируют смесью одного миллилитра мочи и 5 мл DMEM (с пенициллином и стрептомицином) в течение суток при 37°C, 5% CO₂ и 90% влажности.

Через 24 ч инфекционную среду заменяли 8 мл культивационной среды (DMEM, пируват натрия, заменимые аминокислоты, 5% FBS, пенициллин и стрептомицин) и культивировали в течение следующих 6 дней в указанных условиях. Супернатант культур клеток из этой инфекции подвергают трем дополнительным пассажам. После этого 600 мкл супернатанта культур клеток испытывают, как описывается в примере 1, на присутствие кошачьих парамиксовирусов. Фиг. 1 показывает результат такого экспе-

римента.

Пример 3. Иммунофлуоресцентное обнаружение FPaV-2.

Для обнаружения инфекций FPaV-2 клетки LLC-MK2 инфицируют, как описывается в примере 2, и окрашивают FPaV-2-специфическим антителом с применением технологий иммунофлуоресценции.

С этой целью адгезивные клетки промывают PBS после инфекционного периода в 5 дней, а затем фиксируют с использованием 80% ацетона при -20°C в течение 10 мин. Клетки дважды промывают PBS и неспецифическое связывание блокируют путем инкубации с 5% BSA в PBS при 37°C в течение одного часа.

Затем осуществляют этап инкубации с антителом против FPaV-2 (против нуклеокапсида FPaV-2, поликлональное, кролика) в конечной концентрации 1 мкг/мл в 1% BSA в PBS в течение одного часа при 37°C. Клетки трижды промывают PBS с последующим применением конъюгата "Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate" (Thermo Fisher Scientific) в конечном разбавлении 1:1000 в 1% BSA в PBS. После инкубации в течение одного часа при 37°C клетки дважды промывают в PBS и отбирают на присутствие FPaV-2 с применением флуоресцентного микроскопа. Результаты показаны на фиг. 2.

Пример 4. Спектр инфекции FPaV-2.

Для анализа восприимчивости *in vitro* FPaV-2 разные линии клеток инфицируют, а затем анализируют с применением технологий иммунофлуоресценции, как описывается в примере 3. В табл. 3 отражен результат такого эксперимента.

Таблица 3

In vitro спектр инфекции FPaV-2

Линия клеток	Ткань	Вид	Инфекция FPaV-2
CrFK	Почка, эпителий	Кошка	положительная
CrFK/CatSLAM	Почка, эпителий, трансфицированная кошачьим CD150	Кошка	положительная
FE	Эмбриональная, эпителиальная и фибробластная	Кошка	положительная
Vero (CCL-81)	Почка, эпителий	Зеленая мартышка	положительная
LLC-MK2	Почка, эпителий	Макака-резус	положительная
BHK-21	Почка, фибробласт	Золотистый сирийский хомячок	положительная

Пример 5. Инфицирование первичных клеток почек кошачьих FPaV-2.

Для того чтобы исследовать, являются ли первичные клетки также восприимчивыми к FPaV-2, выделяют первичные клетки почек кошачьих. С этой целью почки подвергнутой эвтаназии кошки вырезают в асептических условиях и сразу помещают на хранение на лед. Затем капсулу почки отделяют, а кору нарезают на мелкие фрагменты и пять раз промывают в HBSS. Эти фрагменты ткани затем обрабатывают 0,1-процентным трипсином в HBSS в течение 20 мин при 37°C в вертикальном шейкере. Суспензию клеток фильтруют через 100 мкм нейлоновый фильтр и фильтрат центрифугируют при 400×g в течение 10 мин. Сгусток клеток ресуспендируют в полной почечной среде (1:1 смесь DMEM и среды Хэма F12, дополненной "инсулином-трансферрином-селеном-этанолamineом" [Thermo Fisher Scientific], пируватом натрия, заменимыми аминокислотами, 10% FBS, пенициллином и стрептомицином), высевают в колбы с тканью и инкубируют при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90%. Фиг. 3 показывает типичный результат такого эксперимента.

Описанные выше первичные клетки почек кошачьих инфицируют FPaV-2, как описывается в примере 2, и окрашивают для обнаружения присутствия FPaV-2, как описывается в примере 3.

Фиг. 4 показывает результат такого эксперимента.

Пример 6. Определение и анализ генома FPaV-2 полной длины.

Для получения полной последовательности генома изолята культуры FPaV-2-клеток РНК "Гордон" выделяют из супернатанта культур клеток, как описывается в примере 1. FPaV-2-специфичные продукты ПЦР затем генерируют путем применения системы одноэтапной ПЦР, описанной в примере № 1, и стратегии "блуждающей затравки". Продукты амплификации отделяют от агарозного геля при помощи комплекта "Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit" (Geneaid) и секвенируют с применением дидезокси-метода Сэнджера с соответствующими праймерами амплификации. Каждый фрагмент ПЦР секвенируют дважды. Результат выравнивания полученной последовательности FPaV-2 с FmoPV-изолятом M252A (Woo et al. (2012), Proc. Nat. Acad. Sci. 109(14): 5435 - 5440); Accession number: JQ411016.1) показан в табл. 4.

Таблица 4

**Анализ полной геномной последовательности
FPaV-2 (штамм "Гордон")**

Участок генома	Нуклеотидная позиция (кРНК)	Нуклеотидная гомология с FmoPV-M252A (нт/нт)	Аминокислотная гомология с FmoPV M252A (ак/ак)
3' нетранслируемая область (UTR)	1 – 107	84,1 % (90/107)	не применяется
Нуклеокапсидный белок	108 – 1667	81,1 % (1266/1560)	89,8 % (466/519)
Межгенная последовательность	1668 – 1780	39,8 % (45/113)	не применяется
Фосфопротеин	1781 – 3256	80,5 % (1188/1476)	75,1 % (369/491)
Межгенная последовательность	3257 – 3388	44,7 % (59/132)	не применяется
Матриксный белок	3389 – 4402	83,3 % (845/1014)	91,7 % (309/337)
Межгенная последовательность	4403 – 4949	48,6 % (268/551)	не применяется
Слитый белок	4950 – 6581	80,9 % (1320/1632)	88,7 % (482/543)
Межгенная последовательность	6582 – 6958	56 % (211/377)	не применяется
Гемагглютининовый белок	6959 – 8746	80,5 % (1435/1788)	85,9 % (511/595)
Межгенная последовательность	8747 – 8887	54,6 % (77/141)	не применяется
Полимеразный белок	8888 – 15496	82,5 % (5453/6609)	90,9 % (2001/2202)
5' нетранслируемая область (UTR)	15497 – 16047	52,4 % (289/551)	не применяется
Полный геном	1 – 16047	78,2 % (12546/16047)	не применяется

нт: нуклеотиды;

ак: аминокислоты.

Пример 7. Преобладание FPaV-2 в образцах мочи.

Для пояснения преобладания FPaV-2 у домашних кошек образцы мочи собирали путем пункции мочевого пузыря, сразу отправляли на хранение при -20°C и анализировали на присутствие FPaV-2-RNA, как описывается в примере 1. Результаты показаны в табл. 5.

Таблица 5

Преобладание FPaV-2 в образцах мочи домашних кошек

Характеристики	Группа больных	Группа здоровых
Количество испытанных образцов мочи	325	238
Результаты клинических и лабораторных исследований	Урологический синдром FLUTD кошек, нефрит, анурия, полиурия, мочекаменная болезнь, цистит, гематурия, лейкоцитурия, липидурия, протеинурия	История болезней мочевых путей отсутствует
Средний возраст в годах	8 (1 – 19 лет)	10 (0,5 – 21 год)
Коты	72 %	61 %
RT-ПЦР положительная	4 (1,2 %)	0 (0 %)

Пример 8. Гетерогенность штаммов FPaV-2.

С применением процедуры, описанной в примере 1 второй штамм FPaV-2 выделяли из организма кота, страдающего от урологического синдрома кошачьих. Вирусный изолят (под названием "TV25") подвергали секвенированию полного генома с применением стратегии "блуждающей затравки" и дидезокси-метода секвенирования ДНК по Сэнджеру. Результаты сведены в табл. 6, нуклеотидная последовательность показана в SEQ ID NO: 8.

Таблица 6

**Сравнение полных геномных последовательностей
двух изолятов FPaV-2 "Гордон" и "TV25"**

Участок генома	Нуклеотидная позиция (кРНК)	Подобие нуклеотидов между "Гордон" и "TV25" (нуклеотиды)	Подобие аминокислот между "Гордон" и "TV25" (аминокислоты)
3' нетранслируемая область (UTR)	1 – 107	100 % (107/107)	не применяется
Нуклеокапсидный белок	108 – 1667	99,2 % (1547/1560)	99,2 % (515/519)
Межгенная последовательность	1668 – 1780	98,2 % (111/113)	не применяется
Фосфопротеин	1781 – 3256	99,6 % (1470/1476)	98,8 % (485/491)

Межгенная последовательность	3257 – 3388	98,5 % (130/132)	не применяется
Матриксный белок	3389 – 4402	99,4 % (1008/1014)	99,7 % (336/337)
Межгенная последовательность	4403 – 4949	98 % (540/551)	не применяется
Слитый белок	4950 – 6581	99,4 % (1622/1632)	99,4 % (540/543)
Межгенная последовательность	6582 – 6958	97,6 % (368/377)	не применяется
Гемагглютининовый белок	6959 – 8746	99,2 % (1774/1788)	99,5 % (592/595)
Межгенная последовательность	8747 – 8887	97,9 % (138/141)	не применяется
Полимеразный белок	8888 – 15496	99,2 % (6554/6609)	99,5 % (2191/2202)
5' не транслируемая область (UTR)	15497 – 16047	99,4 % (548/551)	не применяется
Полный геном	1 – 16047	99,2 % (15917/16047)	не применяется

Пример 9. Электронная микроскопия FPaV-2.

15 мл супернатанта культуры клеток FPaV-2 (описанного в примере 2) центрифугировали при 3000×g в течение 10 мин при 4°C с последующей фильтрацией через 0,5 мкм фильтр из нитрата целлюлозы. Фильтрат наносили на 20 мас./об.% сахарозную подушку и центрифугировали при 100000×g в течение 90 мин при 4°C. Сгусток затем суспендировали в 100 мкл PBS и вирусу давали абсорбироваться в покрытую формваром/углем медную решетку 300 меш в течение пяти минут при комнатной температуре. После трех этапов промывки дистиллированной водой вирусные частицы окрашивали 2 мас./об.% ацетатом уранила в течение 30 с. Анализ этого образца с применением просвечивающего электронного микроскопа обнаруживал типичную морфологию парамиксовируса: плейоморфные, оболочечные вирусные частицы, имеющие размер 100-150 нм.

Пример 10. Разнообразие антител FPaV-2-инфицированных кошек.

Для исследования разнообразия антител кошек, естественным образом инфицированных FPaV-2, частично очищенные вирусные частицы (как показано в примере 9) смешивали с равным объемом SDS загрузочного буфера (100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4 мас./об.% додецилсульфата натрия; 0,2 мас./об.% бромфенолового синего; 20 об./об.% глицерина; 200 mM Р-меркаптоэтанола), нагревали при 95°C в течение пяти минут и подавали на 8% полиакриламидный гель. Вирусные белки отделяли путем электрофореза при 130 В в течение 90 мин в подвижном буфере SDS-PAGE (25 mM Tris, 192 mM глицина, 0,1% SDS) с последующим блоттингом на нитроцеллюлозную мембрану.

После блокирования с 5 мас./об.% нежирным сухим молоком в PBS-T (0,05% tween 20) в течение 30 мин при комнатной температуре мембрану инкубировали в течение суток при 4°C с образцами сыворотки кошек, разведенными в соотношении 1:100 в блокирующем буфере. Мембрану трижды промывали PBS-T и инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена антителом α -Cat-IgG, разведенным в соотношении 1:1.000 в блокирующем буфере, в течение одного часа при комнатной температуре. Для проявления сигнала использовали 3,3'-диаминобензидин. Как показано на фиг. 5А, инфицированные FPaV-2 кошки могут вырабатывать антитела против широкого спектра вирусных структурных белков, например, полимеразного, фосфо-, нуклеокапсидного и гемагглютининового белка. Специфические реакции на вирусные белки аннотировали в зависимости от их способности к реакции с антителами-мишенями, как показано для нуклеокапсидного белка (фиг. 5С).

Фосфопротеин оказался высокофосфорилированным, что подтверждалось использованием антитела к фосфосерину (Q5 от QIAGEN N.V.), со сдвигом расчетной молекулярной массы с 53 кДа до приблизительно 75 кДа. Это явление сдвига молекулярной массы известно по другим морбилливирусам, таким как вирус кори (фосфопротеин=70 кДа) и вирус собачьей чумки (фосфопротеин=73 кДа). Аннотации специфических реакций против полимеразного и гемагглютининового белка выполняли на основе прогнозируемой молекулярной массы по их аминокислотным последовательностям.

Пример 11. Разработка реакции сывороточной нейтрализации для FPaV-2.

Для обнаружения нейтрализующих антител против FPaV-2 был предусмотрен анализ сывороточной нейтрализации (SNT). Таким образом, образцы сыворотки кошек обрабатывали при 56°C в течение 30 мин для инактивации факторов комплемента. 50 мкл этих инактивированных нагреванием образцов сыворотки смешивали с 50 мкл DMEM, содержащего 100 образующих флуоресценцию единиц (FFU) FPaV-2 (изолят "Гордон"), а затем инкубировали в течение одного часа при 4°C. Смесь использовали для инфицирования LLC-MK2-клеток в 96-луночном планшете для культивирования клеток в течение двух часов при 37°C. Затем смесь сыворотки /вируса удаляли и заменяли на DMEM, содержащее 2 об./об.% инактивированного негреванием FBS, пирувата натрия, заменимых аминокислот, пенициллина и стрептомицина. Клетки инкубировали в течение пяти дней при 37°C, 5% CO₂ и 90% влажности с последующим иммунофлуоресцентным окрашиванием, как описывается в примере 3. Титр нейтрализации испытательного образца сыворотки определяют как обратную величину наибольшего разбавления исследуемой сыворотки, для которого неэффективность вируса уменьшаю на 50% при сравнении с вирусным контролем без инкубации сыворотки.

Пример 12. Отбор на нейтрализующие антитела у FPaV-2-инфицированных кошек.

Образцы сыворотки кошек, естественным образом инфицированных FPaV-2, отбирали на присутст-

вие нейтрализующих антител с применением SNT, описанного в примере 11. Результаты этих экспериментов показаны в табл. 7. Они четко показывают, что инфекция FPaV-2 может вызывать высокие титры нейтрализующих антител против вируса (см. результаты FPaV-2-SNT образцов сыворотки кошек 98450 и TV25 в табл. 7). В отличие от них образцы сыворотки инфицированных вирусом собачьей чумки кошек (образец CDV в табл. 7) и отрицательных в отношении кошачьего парамиксовируса (образец TV26 в табл. 7) кошек не демонстрируют нейтрализующих антител, указывая на то, что обнаруженные титры антитела являются специфичными к FPaV-2.

Таблица 7

Результаты реакций сывороточной нейтрализации FPaV-2

ID кошачьей сыворотки	98450	TV25	TV26	CDV
Результат ПЦР мочи	FPaV2-положительный	Положительный	Парамиксовирус-отрицательный	-
Присутствие вирусной РНК в моче	> 14 недель	> 18 месяцев	-	-
IFA	Пол.	Пол.	Отр.	Отр.
FPaV-2 SNT титр	320	320	< 10	< 10

IFA: иммунофлуоресцентный анализ,

CDV: положительный на вирус собачьей чумки.

Пример 13. Разработка ELISA-анализа для отбора антител против FPaV-2 в образцах сыворотки кошек.

Для пояснения преобладания инфекций FPaV-2 в популяциях кошек Германии была принята система ELISA на основе некомбинантно экспрессированного нуклеокапсида. Таким образом, полную открытую рамку считывания FPaV-2-нуклеокапсида (SEQ ID NO: 2) клонировали в вектор экспрессии 'pGEX-4T-1' с использованием рестрикционных ферментов BamHI и XhoI. Полученная в результате рекомбинантную плазмиду экспрессии ("pGEX-Gordon-NC") трансформировали в химически компетентную E. coli BL21(DE3) при помощи стандартных технологий и рекомбинантные бактерии отбирали на LB-агаре с 100 мкг/мл ампициллина с получением в результате клона E. coli под названием "E. coli-Gordon-NC". Этот клон инокулировали в 1,000 мл среды Лурия-Бертани с 0,2% глюкозой и 100 мкл/мл ампициллина и взбалтывали при 37°C и 200 об/мин, пока культура не достигала оптической плотности $A_{600nm} = 1,0$. В этот момент культуру охлаждали до 22°C и экспрессию рекомбинантного белка вызывали при помощи изопропил-Р-В-1-тиогалактопиранозид (IPTG) в конечной концентрации 0,1 мМ. После инкубации в течение 20 ч при 22°C и 220 об/мин культуру центрифугировали при 3.000×g, 4°C в течение 20 мин и полученный в результате сгусток обрабатывали ультразвуком для разрушения клеток E. coli. Очистку рекомбинантного GST-слитого белка выполняли с применением Глутатион-сефарозы 4B (GE Healthcare Life Science), как описывается производителем.

200 нг полученного в результате белка "GST-Gordon-NC" наносили на каждую лунку в планшете Nunc MaxiSorp ELISA и держали в течение суток при 4°C, с последующими тремя этапами промывки PBS-T (0,05% tween 20). Свободные участки связывания белка блокировали, используя 5 мас./об.% нежирного сухого молока в PBS-T (блокирующий буфер) в течение 30 мин при 37°C. Образцы сыворотки разводили в соотношении 1:100 в блокирующем буфере и инкубировали в течение двух часов при 37°C на праймированном ELISA-планшете. После трех этапов промывки PBS-T лунки инкубировали с вторичным антителом (козы против IgG кошки (Fc):HRP, Bio-Rad, разведенным в соотношении 1:10000 в блокирующем буфере) в течение одного часа при 37°C. Несвязанное антитело смывали в три цикла промывки PBS-T и субтрактивный раствор (OPD Substrate Tablets, Thermo Fisher Scientific) вносили в каждую лунку и инкубировали в течение пяти минут при 22°C перед прекращением ферментативной реакции при помощи 2,5 М серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при 490 нм. Для определения порога отсечения этой ELISA-системы образцы сыворотки кошек отбирали на наличие FPaV-2-специфичных реакций, применяя реакцию иммунофлуоресценции, описанную в примере 3.

Результаты показаны на фиг. 6. Результат IFA был установлен как общепринятый стандарт и сравнивался со значениями ОП. Образцы, имеющие значение ОП ниже 0,5, определяли как FPaV-2-отрицательные, а образцы со значением ОП выше, чем 0,7, определяли как FPaV-2-положительные. "Пограничные" образцы со значением ОП от 0,5 до 0,7 требуют проверки в IFA для оценки результата ELISA.

При применении этого подход 13 из 230 образцов сыворотки (=5,6%) домашних кошек оказались положительными на FPaV-2. Этот результат отражает относительно высокое преобладание FPaV-2 в популяциях кошек Германии.

Пример 14. Первичные клетки-мишени FPaV-2.

Мононуклеарные клетки периферической крови кошачьих *in vitro* инфицировали FPaV-2 для того, чтобы выяснить, являются ли иммунные клетки кошачьих также мишенями FPaV-2. С этой целью мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из организма здоровых котов, применяя центрифугирование со стандартным градиентом плотности Фиколла. МКПК обрабатывали 2 об./об.% фитогемагглютинином (M-from, необработанный экстракт, Thermo Fisher Scientific) в RPMI в течение четырех часов при 37°C с последующим инфицированием FPaV-2 при MOI 0,1 или ложно инфицировали в течение двух часов при 37°C. МКПК один раз промывали PBS, а затем инкубировали при 37°C, 5% CO₂

и 90% влажности в течение 48 ч. Клетки окрашивали для поверхностных маркеров CD4 и CD20, применяя стандартные протоколы проточной цитометрии. После этапа фиксации с 2 мас./об.% параформальдегида в течение 10 мин при 4°C клетки внутриклеточно окрашивали антителом против FPaV-2-нуклеокапсида (см. пример 2) в FACS-буфере (PBS, pH=7,4; 3% FBS; 0,1% азида натрия) с 0,5 (масса/объем) сапонином в течение 30 мин при 22°C. Окрашенные клетки трижды промывали FACS-буфером и анализировали при помощи анализатора клеток LSRFortessa™ (Becton Dickinson). Как показано на фиг. 7, положительные на CD4 кошачьи Т-клетки, а также положительные на CD20 кошачьи В-клетки являются клетками-мишенями FPaV-2. Эти результаты четко указывают на вероятность системного состояния FPaV-2.

Пример 15. Иммунизация кроликов инактивированным FPaV-2.

Цель этого эксперимента для подтверждения работоспособности концепции состояла в том, чтобы выяснить, вызывает ли иммунизация инактивированным FPaV-2 выработку нейтрализующих антител и, таким образом, может ли служить в качестве потенциальной вакцины. Самца кролика иммунизировали вакцинной смесью 1 мл инактивированного нагреванием (3 ч при 56°C) штамма FPaV-2 "Гордон" (1×10^5 FFU/мл, см. пример 2) и 2 мл адьюванта (92,8% минерального масла; 3,48% Tween 80; 3,48% Span 80; 23% липополисахарида). В качестве отрицательного контрольного животного такой же объем супернатанта культур ложно инфицированных клеток (без вируса), смешанных с адьювантом, использовали вместо FPaV-2.

Иммунизацию осуществляли в соответствии со следующей схемой:

1-я иммунизация: сбор преиммунной сыворотки, с последующей инокуляцией вакцинной смеси 1 мл подкожно и 1 мл внутримышечно;

2-я иммунизация: через 14 дней после 1-й иммунизации: инокуляция вакцинной смеси 1 мл подкожно и 1 мл внутримышечно;

3-я иммунизация: через 7 дней после 2-й иммунизации: инокуляция вакцинной смеси 1 мл подкожно и 1 мл внутримышечно;

окончательный забор крови (кроликов умерщвляли): через 14 дней после третьей иммунизации.

Конечные образцы сыворотки сначала испытывали путем вестерн-блоттинга с применением цельного вирусного препарата, как описывается в примере 10. Этот эксперимент продемонстрировал, что через пять недель после иммунизации специфические антитела против полимеразного, фосфо-, гемоглобулинового и нуклеокапсидного белка были обнаружены у вакцинированного FPaV-2 животного (см. фиг. 8B). Специфичность наблюдаемых реакций подтверждалась путем анализа преиммунной сыворотки этого кролика. Как показано на фиг. 8A, до иммунизации специфичные к вирусу антитела отсутствовали. Кроме того, характер окрашивания постиммунизационного образца сыворотки (фиг. 8B) был идентичен результатам естественным образом инфицированных FPaV-2 кошек (см. фиг. 5A), что доказывает вирус-специфический характер наблюдаемых полос в представленных анализах с применением вестерн-блоттинга. Таким образом, применяемая формула вакцинации FPaV-2 способна индуцировать широкий спектр антител против FPaV-2 у животных.

Чтобы выяснить, обладают ли эти антитела нейтрализующими свойствами, выполняли FPaV-2-SNT (как описывается в примере 11), используя образцы сыворотки, собранные через пять недель после иммунизации FPaV-2 или супернатантом культур ложно инфицированных клеток. Результаты показаны в табл. 8.

Таблица 8

Результаты FPaV-2-SNT иммунизированного кролика

Кролик №	1	2
Иммуноген	Инактивированный нагреванием супернатант культур ложно инфицированных клеток	Инактивированный нагреванием супернатант культур, инфицированных FPaV-2 (штамм "Гордон")
Результат SNT:		
Титр сыворотки (образцы через 5 недель после иммунизации)	Нейтрализующая вирус активность титра сыворотки	
1:10	Отрицательный	Положительный
1:20	Отрицательный	Положительный
1:40	Отрицательный	Положительный
1:80	Отрицательный	Положительный
1:160	Отрицательный	Положительный
1:320	Отрицательный	Отрицательный
1:640	Отрицательный	Отрицательный
1:1280	Отрицательный	Отрицательный
SNT-титр	< 10	160

Кроликов иммунизировали либо инактивированным нагреванием FPaV-2, штамм "Гордон" (кролик № 2), либо супернатантом культур клеток в качестве отрицательного контроля (кролик № 1), как описывается в примере 15. Через пять недель после иммунизации образцы сыворотки этих кроликов испытывали на присутствие нейтрализующих антител против FPaV-2. "Положительный" результат в табл. 8 означает отсутствие роста вируса, т.е. свидетельствует о наличии активности нейтрализации вируса. Рост вируса измеряли через иммунофлуоресцентное окрашивание в соответствии с примером 3.

Эти эксперименты четко демонстрируют, что формула инактивированного нагреванием FPaV-2 может индуцировать высокий титр нейтрализующих антител, способных подавлять вирусную инфекцию. Несмотря на тестирование на кроликах, можно предполагать, что подобная стратегия вакцинации будет эффективной и для других животных, таких как домашняя кошка.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, включающая 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: 8;

(б) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98, по меньшей мере на 99% идентичной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8;

(в) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14;

(г) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 5, по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 6 или по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 7; и

(д) комплементарной цепи любой из нуклеотидных последовательностей (а)-(г), где нуклеиновая кислота кодирует геном парамиксовируса.

2. Нуклеиновая кислота по п.1, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота включает:

(i) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2,

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 3,

(iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 4,

(vi) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 5,

(v) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 6, и

(vi) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 7.

3. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1, 2, отличающаяся тем, что вышеупомянутый парамиксовирус способен вызывать инфекцию, в частности инфекцию мочеполовой системы, у кошачьих, чаще всего у домашних кошек (*Felis silvestris catus*).

4. Парамиксовирус, предназначенный для получения вакцины, геном которого включает рибонуклеиновую кислоту, комплементарную нуклеиновой кислоте по п.1(а)-(г) или 2.

5. Парамиксовирус, предназначенный для получения вакцины, депонированный под регистрационным номером CNCM I-5123.

6. Парамиксовирус по п.4 или 5, отличающийся тем, что парамиксовирус является аттенуированным.

7. Вектор для обеспечения экспрессии парамиксовируса, включающий нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-3.

8. Клетка-хозяин, предназначенная для получения парамиксовируса, включающая вектор по п.7.

9. Полипептид, имеющий аминокислотную последовательность:

(а) выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7; или

(б) выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14; или

(в) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2,

(г) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 3,

(д) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 4,

(е) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 5,

(ж) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 6, или

(з) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 7.

10. Иммуногенная композиция, включающая эффективное количество вещества, выбранного из группы, состоящей из:

(а) парамиксовируса по любому из пп.4, 5 или 6;

(б) нуклеиновой кислоты по любому из пп.1 или 2;

(в) полипептида по п.9 или

(г) полипептида по п.9, слитого с гетерологическим или аутологическим (поли-)пептидом, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

11. Иммуногенная композиция по п.10, где носитель является подходящим для внутрикожного или внутримышечного применения.

12. Иммуногенная композиция по п.10, включающая адъювант.

13. Вакцина для лечения или профилактики инфекции, вызываемой парамиксовирусом, включающая эффективное количество вещества, выбранного из группы, состоящей из:

(а) парамиксовируса по любому из пп.4, 5 или 6;

(б) нуклеиновой кислоты по любому из пп.1 или 2;

(в) полипептида по п.9 или

(г) полипептида по п.9, слитого с гетерологическим или аутологическим (поли-)пептидом, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

14. Вакцина по п.13, где носитель является подходящим для внутрикожного или внутримышечного применения.

15. Вакцина по п.13, включающая адъювант.

16. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.10-12 или вакцины по любому из пп.13-15 в способе уменьшения или предотвращения клинических проявлений или заболевания, вызванного инфицированием субъекта парамиксовирусом по любому из пп.4, 5 или 6, или в способе лечения или профилактики инфицирования субъекта парамиксовирусом по любому из пп.4, 5 или 6, причем вышеупомянутый субъект является представителем кошачьих.

17. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.10-12 или вакцины по любому из пп.13-15 в способе иммунизации кошачьих, от клинического заболевания, вызванного у них парамиксовирусом по пп.4, 5 или 6, причем вышеупомянутый способ включает этап введения представителю кошачьих, иммуногенной композиции или вакцины, и, таким образом, вышеупомянутый вирус не может вызывать клинических проявлений инфекции парамиксовируса, но способен вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую представителя кошачьих от парамиксовируса по любому из пп.4, 5 или 6.

18. Набор для вакцинации представителя кошачьих от заболевания, связанного с одним или несколькими его клиническими проявлениями, и/или для снижения частоты или тяжести таких проявлений, связанных с парамиксовирусом по любому из пп.4, 5 или 6, у представителя кошачьих, причем набор включает:

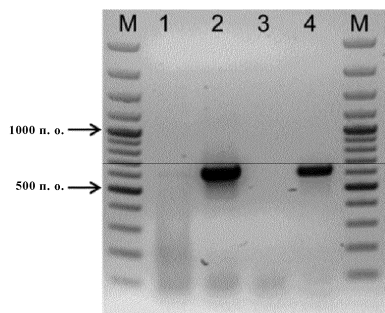
(а) дозатор, позволяющий вводить вакцину представителю кошачьих; и

(б) иммуногенную композицию по любому из пп.10-12 или вакцины по любому из пп.13-15.

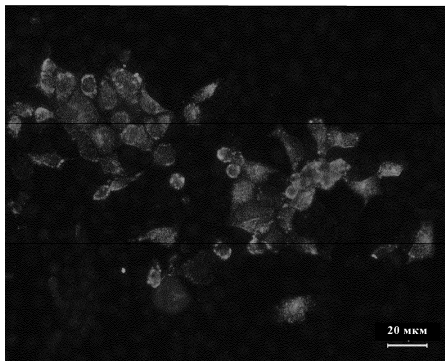
19. Способ обнаружения парамиксовируса по любому из пп.4-6 в образце, включающий этапы:

(I) приведения образца в контакт с одним или несколькими олигонуклеотидными праймерами и/или зондами, которые являются специфическими для нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3, и

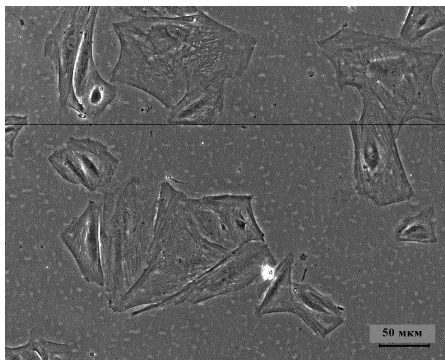
(II) обнаружения связывания между вышеупомянутым парамиксовирусом и вышеупомянутыми одним или несколькими олигонуклеотидными праймерами и/или зондами.



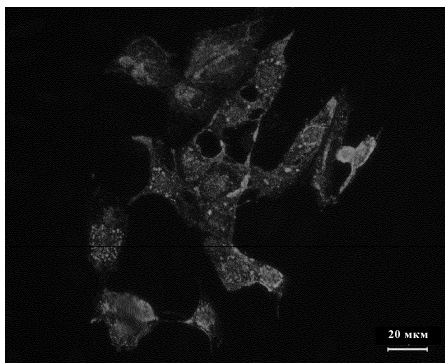
Фиг. 1



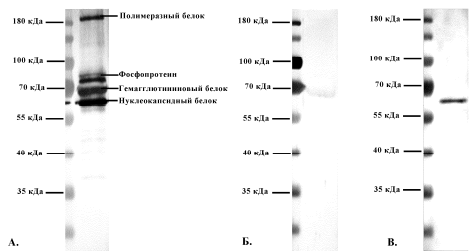
Фиг. 2



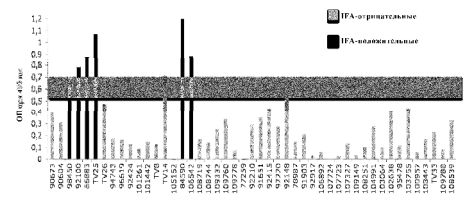
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

